

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ



DIZERTAČNÍ PRÁCE



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

**ZMENY SENZORICKY AKTÍVNYCH LÁTKOK
POČAS ZRENIA PRÍRODNÝCH SYROV**

CHANGES OF SENSORY ACTIVE COMPOUNDS IN MATURATION PROCESS OF NATURAL
CHEESES

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Michal Sýkora

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. Ing. František Buňka, Ph.D

BRNO 2021

ABSTRAKT

Predložená dizertačná práca je štúdiou zameranou na charakterizáciu senzorickej kvality, predovšetkým flavouru, modelových vzoriek prírodných syrov. Pozornosť je venovaná zloženiu a obsahu prchavých (senzoricky aktívnych) látok ako významných markerov flavouru a voľných/viazaných mastných kyselín ako ich prekurzorov.

Pre stanovenie prchavých látok bola použitá headspace mikroextrakcia pevnou fázou v spojení s plynovou chromatografiou s hmotnostným spektrometrom. Pre stanovenie mastných kyselín bola aplikovaná izolácia lipidov zo vzorky zmesou rozpúšťadiel dietyléter a petroléter, následná esterifikácia za použitia metanolickeho roztoku bórtrifluoridu ako katalyzátora a konečná analýza pomocou plynovej chromatografie s plameňovo-ionizačnou detekciou.

Experimentálna časť bola rozdelená do dvoch experimentov; v rámci experimentu I boli analyzované syry typu Moravský bochník (45 % tuk v sušine, 60 % sušina), v experimente II syry eidamského typu (45 % t. v s., 50 % sušina). Modelové vzorky syrov boli vyrobené na Univerzite Tomáša Bati v Zlíne. U všetkých vzoriek bola ako základ použitá klasická mezofilná kultúra obsahujúca *Lactococcus* spp. a *Leuconostoc* spp., táto bola vždy doplnená vhodnou monokultúrou termofilných baktérií; v prípade syrov typu Moravský bochník kultúry *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus helveticus* a v prípade eidamských syrov kultúry *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus plantarum*. Podstatou oboch experimentov bolo posúdenie vplyvu použitých mikrobiálnych kultúr na vyššie zmienené parametre, zároveň boli sledované ich zmeny v priebehu zrenia syrov.

Výsledky preukázali, že prídavok termofilných kultúr ani priebeh zrenia neovplyvňujú počet mastných kyselín ani prchavých látok, významné rozdiely však boli nájdené v ich obsahu.

Obsah viazaných mastných kyselín v priebehu zrenia syrov klesal v dôsledku prebiehajúcich lipolytických zmien pri súčasnom zvyšovaní obsahu voľných mastných kyselín a ich následnom odbúravaní na prchavé látky, ktoré v konečnom dôsledku prispievajú k chuti a vôni syra. Vo všetkých vzorkách boli kvantitatívne najviac zastúpené ketóny a kyseliny. Počas zrenia, oproti očakávaniam, taktiež klesal obsah identifikovaných prchavých látok.

Vplyv prídavku termofilných kultúr nebol jednoznačný a menil sa v závislosti na fáze zrenia. V prvej fáze sa síce prejavil výraznejšou lipolytickou aktivitou, ale následné metabolické procesy – odbúravanie voľných mastných kyselín na prchavé látky, tieto rozdiely vyrovnávali. Tieto výsledky potvrdzujú významný podiel základnej mezofilnej kultúry na tvorbe prchavých látok, resp. flavouru syrov.

KEÚČOVÉ SLOVÁ:

prírodné syry, senzoricke aktívne látky, MK, SPME, GC, MS

ABSTRACT

The presented dissertation is a study focused on the characterization of sensory quality, especially the flavour of model samples of natural cheeses. Attention is aimed to the composition and content of volatile (sensory active) substances as important markers of flavour and free/bound fatty acids as their precursors.

The headspace solid phase microextraction in conjunction with gas chromatography with mass spectrometry was used to determine volatiles. For the determination of fatty acids, the lipids were isolated from the sample with a solvent mixture of diethyl ether and petroleum ether, followed by esterification using a methanolic solution of boron trifluoride as a catalyst and final analysis by gas chromatography with flame ionization detection.

The experimental part was divided into two experiments; in experiment I, Moravský bochník type cheeses (45 % fat in dry matter., 60 % dry matter) were analysed, in experiment II, Edam type cheeses (45 % fat in dry matter, 50 % dry matter). Model samples of cheeses were made at Tomas Bata University in Zlín. For all samples, a classical mesophilic culture containing *Lactococcus* spp. and *Leuconostoc* spp. was used, this was always supplemented with a suitable monoculture of thermophilic bacteria; in the case of Moravský bochník cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* and in the case of Edam cheeses *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. The essence of both experiments was to assess the influence of the used microbial cultures on the above-mentioned parameters, at the same time their changes during the ripening of the cheeses were monitored.

The results showed that the addition of thermophilic cultures, as well as the maturation process did not affect the number of fatty acids or volatiles, but significant differences were found in their content.

The content of bound fatty acids decreased during cheese ripening due to ongoing lipolytic changes while increasing the content of free fatty acids and their subsequent degradation to volatile substances, which ultimately contribute to the taste and aroma of the cheese. Ketones and acids were the most quantitatively present in all samples. During maturation, contrary to expectations, the content of identified volatiles also decreased.

The addition of the thermophilic cultures did not have a clear effect and varied depending on the maturation phase. In the first phase, although they showed more pronounced lipolytic activity, the subsequent metabolic processes - the breakdown of free fatty acids into volatile substances, compensated for these differences. These results confirm a significant share of the basic mesophilic culture in the formation of volatile substances, in particular the flavour of cheeses.

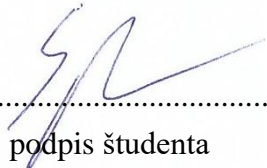
KEY WORDS:

natural cheese, sensory active compounds, FA, SPME, GC, MS

SÝKORA, M. *Zmeny senzoricky aktívnych látok počas zrenia prírodných syrov*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2021 r. 174 s. Vedoucí disertační práce prof. Ing. František Buňka, Ph. D.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som dizertačnú prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Dizertačná práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho dizertačnej práce a dekana FCH VUT.



.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Ďakujem vedúcemu dizertačnej práce **prof. Ing. Františkovi Buňkovi, Ph.D.** a vedúcej-špecialistke **doc. Ing. Eve Vítovej, Ph.D.** za ich cenné poznatky, rady a pripomienky, ktorými mi boli nápomocní pri tvorbe tejto práce. Ďalej moje poďakovanie patrí taktiež **prof. Henryk H. Jeleň** za pomoc pri výskume a realizácii vedeckého článku. V neposlednom rade ďakujem mojej rodine za ich nekončiacu podporu a dôveru.

OBSAH

1 Úvod do riešenej problematiky	6
2 Súčasný stav riešenej problematiky	8
2.1 Prírodné syry	8
2.1.1 Klasifikácia syrov	8
2.1.2 Mlieko ako surovina pre výrobu prírodných syrov	9
2.1.3 Princíp technológie výroby prírodných syrov	10
2.1.4 Zloženie prírodných syrov	12
2.1.5 Syry typu Moravský bochník.....	16
2.1.6 Syry holandského typu.....	18
2.1.7 Kultúry používané pri výrobe syrov s vysoko	
a nízkodohrievanou syreninou	23
2.2 Senzoricky aktívne látky	24
2.2.1 Vznik a vývoj senzoricky aktívnych látok v prírodných syroch	25
2.2.2 Hlavné skupiny senzoricky aktívnych látok v syroch	36
2.2.3 Senzoricky aktívne látky v syroch ementálskeho typu.....	39
2.2.4 Senzoricky aktívne látky v syroch eidamského typu.....	39
2.3 Používané metódy a experimentálne techniky	41
2.4 Metódy izolácie senzoricky aktívnych látok v syroch	41
2.5 Extrakčne-destilačné metódy	42
2.5.1 Extrakcia rozpúšťadlom.....	42
2.5.2 Vysokotlaková extrakcia rozpúšťadlom.....	42
2.5.3 Extrakcia superkritickou kvapalinou	43
2.5.4 Extrakcia mikrovlnným ohrevom	43
2.5.5 Ultrazvuková extrakcia	43
2.5.6 Odparovanie vonných látok pomocou rozpúšťadla	44
2.5.7 Mikroextrakcia kvapalnou fázou	44
2.5.8 Destilácia vodnou parou	44
2.5.9 Simultánna destilácia/extrakcia	44
2.6 Headspace metódy	45
2.7 Extrakcia pevnou fázou.....	46
2.7.1 Mikroextrakcia pevnou fázou	46
2.7.2 Extrakcia na miešajúce tyčinke.....	48
2.8 Izolácia lipidov z matrice syrov	49
2.9 Derivatizácia mastných kyselín.....	50
2.10 Inštrumentálne metódy vhodné pre analytické stanovenie senzoricky aktívnych látok a mastných kyselín v syroch.....	51
2.10.1 Plynová chromatografia	52
2.10.2 Plynová chromatografia s plameňovo ionizačným detektorom.....	53
2.10.3 Plynová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou	54
2.10.4 Plynová chromatografia s olfaktometriou.....	58
3 Ciele dizertačnej práce	60
4 Experimentálna časť	61
4.1 Laboratórne vybavenie	61
4.1.1 Prístroje.....	61
4.1.2 Pracovné pomôcky.....	61

4.1.3	Chemikálie	61
4.2	Čisté mliekarenské kultúry	61
4.3	Analyzované vzorky	62
4.4	Použité metódy pre stanovenie mastných kyselín.....	63
4.4.1	Extrakcia lipidov zo vzorky syra	64
4.4.2	Príprava metylesterov mastných kyselín	64
4.4.3	Podmienky stanovenia metylesterov mastných kyselín.....	65
4.4.4	Identifikácia a kvantifikácia mastných kyselín.....	66
4.5	Použité metódy pre stanovenie senzoričky aktívnych látok	67
4.5.1	Príprava vzorky syru	67
4.5.2	Podmienky pre SPME extrakciu	67
4.5.3	Podmienky pre GC-MS analýzu	68
4.5.4	Identifikácia a kvantifikácia senzoričky aktívnych látok	68
4.5.5	Podmienky pre GC-O analýzu	68
4.6	Štatistické spracovanie výsledkov.....	69
5	Výsledky a diskusia.....	70
5.1	Overenie vybraných validačných parametrov použitých metód.....	70
5.1.1	Stanovenie mastných kyselín.....	71
5.1.2	Stanovenie senzoričky aktívnych látok.....	72
5.2	Experiment I – Moravský bochník.....	73
5.2.1	Stanovenie voľných a viazaných mastných kyselín	73
5.2.2	Stanovenie prchavých (senzoričky aktívnych) látok	86
5.3	Experiment II – syry eidamského typu	98
5.3.1	Stanovenie voľných a viazaných mastných kyselín	98
5.3.2	Stanovenie prchavých (senzoričky aktívnych) látok	108
5.4	Štatistické vyhodnotenie výsledkov merania pomocou metódy PCA	123
5.4.1	Experiment I	123
5.4.2	Experiment II	128
6	Prínos práce pre vedu a prax.....	134
7	Závery	136
8	Zoznam použitých zdrojov.....	138
9	Zoznam použitých skratiek.....	159
10	Prílohy	160

1 ÚVOD DO RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Prírodné syry patria celosvetovo k obľúbeným a často konzumovaným mliečnym výrobkom. Dôvodom je ich vysoká nutričná hodnota, ľahká použiteľnosť, veľká variabilita v možnostiach chuti, konzistencie, veľkosti, tvaru a veľmi dobrá trvanlivosť. Syry sú neodmysliteľnou súčasťou ľudskej stravy už tisícky rokov. Výroba syrov je zaznamenaná od staroveku (približne 6000 rokov pred našim letopočtom). K histórii sa viaže príbeh arabského kupca Kanana zo Stredného Východu, ktorý si na dlhú cestu púšťou vzal so sebou vo vaku z kozieho žalúdka zásobu mlieka. Práve vďaka prítomným proteolytickým enzýmom, pôsobením tepla a natriasania vznikol prvý syr.

Od vtedy sa samozrejme zdokonalila technológia a spôsob výroby, princíp však zostáva rovnaký. Výroba syrov dnes patrí ku najnáročnejším mliekarenským technológiám, všetky zložky mlieka podliehajú rade fyzikálne-chemických a biochemických zmien, ktorých druh a rozsah závisí od typu syra. Syry tak tvoria širokú skupinu výrobkov odlišujúcich sa spracovaním syreniny, spôsobom zrenia, zložením a sensorickými vlastnosťami. V súčasnej dobe existuje približne 500 druhov syrov, ktoré sú uznané Medzinárodnou mliekarskou federáciou. S produkciou približne 20 miliónov ton ročne hrajú syry významnú úlohu vo výžive ľudstva. Primárnym cieľom ich výroby je zachovanie jedinečných výživových vlastností mlieka, ktorá by malo bez tepelného ošetrovania a skladovania pri nízkych teplotách iba veľmi obmedzenú trvanlivosť. Je zaujímavé, že pre skoncentrovanie hlavných zložiek mlieka za účelom vytvorenia stabilného produktu – syru, sú využívané 3 klasické metódy konzervácie potravín: fermentácia, dehydratácia a solenie. Vývoj tohto procesu a jeho rôzne modifikácie základných krokov vedú k možnosti produkcie rôznych druhov týchto fermentovaných mliečnych výrobkov.

Syry patria vzhľadom ku svojmu zloženiu k najhodnotnejším potravinám, zdrojom využiteľnej energie sú bielkoviny a mliečny tuk. Bielkoviny obsiahnuté v syroch sú plnohodnotné, keďže obsahujú všetky pre život nevyhnutné aminokyseliny (esenciálne). Mliečne proteíny sa vyznačujú suplementárnym účinkom, čo je schopnosť vyrovnávať deficit esenciálnych aminokyselín. Mliečny tuk obsahuje z výživového hľadiska dôležité polynenasýtené mastné kyseliny (linolová, linolénová a arachidonová). Sprevádzajúcimi látkami lipidov sú steroly. Najvýznamnejším zástupcom je cholesterol, ktorý sa podieľa na tvorbe biomembrán buniek. Okrem vitamínov obsahujú syry aj značné množstvo minerálnych látok, predovšetkým vápniku a fosforu. Mliečny cukor – laktóza – je v syroch takmer rozložený, preto je syr taktiež vhodnou potravinou pre jedincov s laktózovou intoleranciou. Všetky spomenuté, predovšetkým hydrofóbne látky, sa podieľajú na tvorbe sensoricky aktívnych látok, ktorých stanovenie bude tvoriť podstatnú časť dizertačnej práce. Dnešní konzumenti sú nároční, majú viac znalostí o výžive a vyžadujú bezpečné, nutrične hodnotné, ale aj sensoricky atraktívne kvalitné potraviny. Asi najdôležitejším, z hľadiska spotrebiteľa, zostáva chutnosť potraviny, pre ktorú sa dnes často používa anglický výraz „flavour“, ktorý je z chemického hľadiska tvorený predovšetkým obsahom zmiených sensoricky aktívnych látok. Bohužiaľ práve flavour v súčasnej dobe u rady druhov potravín nedosahuje požadovaných kvalít. To je spôsobené požiadavkou českých spotrebiteľov na nízku cenu a čo najdlhšiu trvanlivosť výrobku. Výrobcovia sú tak v rámci šetrenia nútení vyberať lacnejšiu, často menej kvalitnú a menej chutnú surovinu.

Následná aplikácia rôznych konzervačných zásahov potom vedie ku výrazným a nezvratným stratám práve veľmi citlivých sensoricky aktívnych látok. Vzniku a vývoji sensoricky aktívnych látok v priebehu zrenia syrov sa venuje rad nižšie citovaných publikácií, väčšina z nich je však zameraná na ovčie a kozie syry, príp. rôzne miestne špeciality často zo surového mlieka; z klasických syrov, vyrábaných z kravského mlieka, je to hlavne Čedar, čo je z celosvetového hľadiska najviac vyrábaný a konzumovaný syr.

Výroba syrov je zložitý proces, založený na rade fyzikálnych, chemických a biochemických zmien, ktoré doposiaľ nevieme presne definovať, kvantifikovať ani ovládať. Nevieme teda ani zabezpečiť štandardne dobrú sensorickú kvalitu konečných výrobkov ako hlavný faktor oceňovaný spotrebiteľmi. Hlavným zámerom tejto dizertačnej práce je prispieť novými poznatkami k pochopeniu zmien v procese zrenia syrov a ich vplyvu na sensorickú kvalitu (flavour). Získané poznatky bude možné v praxi využiť pre skvalitnenie technologického procesu výroby syrov a štandardizácii ich kvality.

Pozornosť bude venovaná vybraným syrom typickým (z hľadiska pôvodu, obľuby a konzumovaného množstva) pre Českú republiku: polotvrde syry eidamského typu a tvrdé syry ementálskeho typu, ktoré sú z tohto hľadiska pomerne málo preskúmané.

Ako hlavné parametre charakterizujúce flavour vzoriek boli vybrané a sledované: profil prchavých (sensoricky aktívnych) látok a viazaných/volných mastných kyselín. Pre stanovenie sensoricky aktívnych látok bola použitá mikroextrakcia pevnou fázou v spojení s plynovou chromatografiou a s hmotnostnou spektrometriou, pre stanovenie mastných kyselín bola použitá plynová chromatografia s plameňovo-ionizačnou detekciou.

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Ako už bolo zmienené, táto práca je zameraná na sledovanie zmien senzoričky aktívnych látok (SAL) počas zrenia prírodných syrov. V nasledujúcich kapitolách je popísané zloženie, technológia výroby a proces zrenia prírodných syrov. Hlavná pozornosť je venovaná mliečnym lipidom, mastným kyselinám (MK) a SAL, ktoré sú dôležité pre vznik konečných senzoričkových vlastností syrov a boli vybrané a sledované ako majoritné charakterizujúce parametre flavouru a jeho tvorby v procese zrenia.

2.1 Prírodné syry

Súčasná legislatíva, vyhláška č. 397/2016 Sb., definuje syr ako „*mliečny výrobok vyrobený vyvrážením mliečnej bielkoviny z mlieka pôsobením syridla alebo iných vhodných koagulačných činidiel, prekysnutím a oddelením podielu srvátky*“ a zrejúci syr ako „*syr, u ktorého po prekysnutí došlo k ďalším biochemickým a fyzikálnym procesom*“.

Syr je mliečny výrobok, ktorý predstavuje stabilizovanú pevnú zrazeninu vytvorenú koaguláciou kazeínu (mliečny proteín), tuku a ostatných zložiek mlieka (> 90 % hm. syra). Redukcia obsahu vody nastáva odstránením srvátky od zrazeniny. Srvátka obsahuje srvátkové bielkoviny, laktózu a soli [1].

2.1.1 Klasifikácia syrov

Vzhľadom k existencii veľkého množstva rôznych typov syrov neexistuje jednoznačná klasifikácia; syry sú klasifikované podľa rôznych kritérií. V prílohe vyhlášky č. 397/2016 Sb. je uvedené nasledovné rozdelenie syrov.

Podľa obsahu tuku v sušine sa syry delia na odtučnené (< 10 % hm.), nízkotučné (10 – 25 % hm.), stredne tučné (25 – 45 % hm.), plnotučné (45 – 60 % hm.), vysokotučné (> 60 % hm.) [2]. Podľa obsahu vody v beztukovej hmote syra (VBHS) sa syry delia na mäkké (> 68 %), polomäkké (62 – 68 %), polotvrdé (55 – 62 %), tvrdé (47 – 55 %), extra tvrdé (< 47 %) [2].

Klasifikácia syrov podľa druhu môže byť na syry kravské, ovčie, kozie (popríklad iných cicavcov), albumínové, tepelne získané zo srvátky alebo cmaru [2]. Podľa spôsobu koagulácie sa syry delia na sladké a kyslé, prípadne vyrobené kombinovaným zrážaním.

Ďalšia možná klasifikácia syrov je podľa spôsobu zrenia na syry zrejúce, nezrejúce a zrejúce v slanom náleve [2].

Tabuľky (Tabuľka 1 a Tabuľka 3) uvádzajú ďalšie parametre, vhodné pre klasifikáciu prírodných syrov: podľa obsahu vápnika v beztukovej hmote syra v závislosti od technológie výroby zobrazuje Tabuľka 1 [1]; hodnoty pH a obsahu laktózy (Tabuľka 2); obsahu relatívne nerozštiepeného kazeínu a stupňa kyslosti (Tabuľka 3).

Tabuľka 1: Rozdelenie syrov podľa obsahu vápnika v beztukovej hmote syra v závislosti od technológie výroby [2]

Zrážanie	Obsah vápniku [%]	Účinok enzýmu [%]	Typ syru
Enzymatické	2,5 a viac	100	ementálske
Enzymaticko-kyslé	2,3 – 2,4	90	Čedar
	1,9 – 2,3	70 – 90	eidamské
	1,0 – 1,9	30 – 70	camembert
	0,6 – 0,9	5 – 20	syrený tvaroh
Kyslé	> 0,5	bez účinku enzýmu	priemyselný tvaroh

Tabuľka 2: Klasifikácia syrov podľa hodnoty pH a obsahu laktózy [3]

Typ syru	pH	Obsah laktózy [%]
Čerstvé syry	4,5 – 4,8	1,0 – 3,5
Nezrelé tvrdé syry	5,0 – 5,4	0,1 – 1,0
Nezrelé mäkké syry	4,5 – 4,8	0,1 – 0,5
Zrejúce v chlade	5,0 – 5,4	1,0 – 2,0
Zrelé syry	5,0 – 6,0	0
Prezreté syry	6,0 – 7,0	0

Tabuľka 3: Klasifikácia syrov podľa obsahu relatívne nerozštiepeného kazeínu (Rel. ner. kazeín) a stupňa kyslosti tuku [3]

Typ syru	Rel. ner. kazeín [%]	Stupeň kyslosti [ml KOH(c = 1 mol·l ⁻¹ ·g ⁻¹ tuku)]
Čerstvé	96	4,5 – 5,0
Eidamské	97 – 74	8,0 – 10,0
Ementálske	88 – 77	6,0 – 11,0
Camembert	96 – 50	10,0 – 20,0
Rokfort	95 – 60	30,0 – 80,0

2.1.2 Mlieko ako surovina pre výrobu prírodných syrov

Hlavnou surovinou pre výrobu syrov v ČR je kravské mlieko. Iné druhy sa vyrábajú tiež z ovčieho a kozieho mlieka. Základnými zložkami mlieka sú: voda, tuky, proteíny (kazeíny a srvátkové proteíny), cukry (laktóza – fermentačný substrát pre baktérie mliečného kvasenia - BMK) a minerálne látky (fosfor, vápnik), vitamíny a enzýmy.

Typické zloženie kravského mlieka je cca: laktóza (4,7 – 5,0 %), tuk (3,7 – 4,2 %), dusíkaté látky (3,2 – 3,5 %; delené na kazeíny ~ 2,2 – 2,8 % a srvátkové proteíny ~ 0,5 – 0,8 %), minerálne látky (0,6 – 0,7 %). Zloženie mlieka ovplyvňuje napr. krmivo, laktačná fáza, sezónnosť a iné faktory [3]. Mlieko je komplexný systém tvoriaci emulziu (mliečny tuk v globulách chránených membránou mliečného tuku), koloidnú suspenziu (kazeínové micely tvoria agregáty spolu s koloidným fosforečnanom vápenatým) a pravý roztok tvorený laktózou a niektorými minerálnymi látkami [1].

Rovnako tak prírodné syry predstavujú z fyzikálneho hľadiska zložitý polydisperzný systém, v ktorom sa vedľa minoritných látok (solí, kyselín, zvyškov laktózy a iných) nachádzajú predovšetkým bielkoviny, tuk a voda. Syr tak môže byť popísaný ako trojrozmerná proteínová sieť, v ktorej póroch je zachytený prirodzene emulgovaný tuk a voda. Štruktúra syra je tvorená kazeínmi, tuky taktiež prispievajú k tvorbe textúry ale aj chuti (lipolýza tukov). Okrem toho ovplyvňujú textúru aj minerálne látky mlieka (koloidný fosforečnan vápenatý).

2.1.3 Princíp technológie výroby prírodných syrov

Podstatou výroby syrov je premena mlieka v gélovú zrazeninu buď kyslým/izoelektrickým zrážaním, alebo pomocou koagulačného činidla. Aj keď rozdielnym spôsobom, v oboch prípadoch dochádza k porušeniu stability kazeínových micél, a tým k ich vyzrážaniu. Následným oddelením mliečného séra, tj. srvátky, získavame syr. Všeobecne možno operácie pri výrobe syrov rozdeliť na niekoľko častí – tepelné ošetrenie mlieka, úprava mlieka pred spracovaním, syrenie, spracovanie syreniny, formovanie a lisovanie, solenie a zrenie.

2.1.3.1 Tepelné ošetrenie mlieka

Na mlieko určené pre výrobu syrov sú kladené vysoké požiadavky predovšetkým z hľadiska jeho mikrobiálnej kvality: je nutný čo najnižší obsah koliformných, termorezistentných, spórotvorných a psychrotrofných mikroorganizmov (MO), pretože sú príčinou rôznych väd. Podľa spôsobu ošetrenia delíme mlieko na surové (natívne), pasterizované a taktiež termizované (subpasterizované). Vzhľadom k možným nežiadúcim vedľajším účinkom vysokej teploty sa pre výrobu tvrdých syrov používa prakticky výhradne šetrná pasterizácia.

- a) **Šetrná pasterizácia** (72 °C, 15 – 30 s) má za následok iba malé zmeny chemických a fyzikálnych vlastností. Vyššou teplotou by dochádzalo ku zníženiu rozpustnosti vápenatých solí, denaturácii sérových bielkovín a zmene chuti mlieka.
- b) **Termizácia** (65 – 70 °C, 15 – 20 s) síce nespĺňa parametre pasterizácie, ničí niektoré vegetatívne formy baktérií, ale nedeaktivuje enzýmy mlieka (možnosť použitia vyšších teplôt v závislosti na výťažnosti pre mäkké a polomäkké syry)

Počet kontaminujúcej mikroflóry možno znížiť aj pomocou fyzikálnych separačných metód, napr. baktofugácia alebo mikrofiltrácia. Baktofugácia zníži celkový počet MO (o ~ 86 %), anaeróbných spórotvorných MO (o ~ 58 %) a počet laktobacilov (o ~ 92 %). Taktiež veľmi účinne odstraňuje bakteriálne spóry.

Kombináciou s klasickou pasterizáciou dochádza ku efektívnejšiemu procesu odstránenia mikroflóry [3]. V našich podmienkach sa syry vyrábajú prakticky výhradne z pasterizovaného mlieka, vo svete sa však bežne používa aj surové mlieko.

2.1.3.2 Princíp zrážania (koagulácie) mlieka

Väčšia časť produkcie syrov je vyrábaná enzymatickým zrážaním (tj. syrením) za vzniku **sladkých syrov**. Enzýmy (syridlá, koagulačné činidlá) užívané na nevratné zrážanie sú chymozín (zo žalúdkov cicajúcich teliat) alebo tzv. náhrady syridla, mikrobiálne syridlá s proteolytickou funkciou, produkované hlavne pomocou geneticky modifikovaných MO.

Syrenie prebieha v troch fázach. V primárnej fáze prebieha selektívna enzymatická (peptidáza chymosín) hydrolýza κ -kazeínu, ktorý chráni ostatné frakcie kazeínu, v peptidickej väzbe fenylalanín (105)-metionín (106) za vzniku para- κ -kazeínu, ktorý má vysokú afinitu k ostatným frakciám kazeínu (α_{s1-} , α_{s2-} , β -, κ -kazeín). Druhou časťou je hydrofilný κ -kazeínmakropeptid, ktorý je vysoko polárny, rozpustný vo vode a odchádza do srvátky. V sekundárnej fáze dochádza v prítomnosti Ca^{2+} iónov a teplote $> 20\text{ }^\circ\text{C}$ ku agregácii všetkých frakcií kazeínu za vzniku kazeinátu vápenatého, samotnej syreniny. Terciárna fáza prebieha pri dlhšom pôsobení proteolytických enzýmov (proces zrenia), kedy dochádza ku štepeniu kazeínových frakcií (vznik peptidov, aminokyselín), je nežiadúca, pretože dochádza ku tvorbe horkých peptidov. Množstvo proteolytického enzýmu [4], teplota zrážania, kyslosť mlieka a obsah rozpustných Ca^{2+} sú hlavnými faktormi ovplyvňujúcimi priebeh enzymatického zrážania mlieka. Čím viac je enzýmu a Ca^{2+} iónov prítomných, tým rýchlejšie dochádza ku tvorbe dobre vytvrdenej zrazeniny. Začiatok zrážania začína pri teplote $29 - 33\text{ }^\circ\text{C}$, pri $35\text{ }^\circ\text{C}$ je optimum účinnosti enzýmu chymozín, ktorého aktivita následne prudko klesá. Obvyklá teplota, pri ktorej dochádza ku inaktivácii chymozínu, je $45\text{ }^\circ\text{C}$, teda pri výrobe syrov z vysokodohrievanej syreniny. A teda konkrétny druh syra má konkrétne nastavené podmienky koagulácie [1].

Okyslením mlieka za použitia mliekarenských kultúr a potravinárskych kyselín alebo prekysnutím za vzniku kyseliny mliečnej ($T \sim 20 - 40\text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} \sim 4,6 - 4,9$) dochádza ku vyzrážaniu kazeínových micél a tvorbe **kyslých syrov**. Podstatou je bipolárny charakter aminokyselín, kedy pri izoelektrickom bode nastáva vratné zrážanie nerozpustných bielkovín kazeínu. Takto pripravená mliečna zrazenina je spracovaná po oddelení srvátky na tvarohy a tvarohové výrobky. Pri $\text{pH} 5,7 - 5,8$ je približne 50 % koloidného fosforečnanu vápenatého v roztoku a začína proces destabilizácie micél. Vytvorený kyslý gél je kratší, tuhší a vykazuje nízku synerézu, resp. syry majú nižšiu sušinu. Srvátkové bielkoviny je možné vyzrážať až pri teplote $80 - 95\text{ }^\circ\text{C}$, kedy strácajú vodný obal. **Kombináciou** pôsobenia rôznych kyselín a teplôt (napr. $T = 90\text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} 5,6$) je možné vyprodukovať širokú paletu rôznych druhov syra (tvarohy a mäkké syry) [3].

Vzhľadom k tomu, že sa väčšina druhov syra, vrátane Eidamu, vyrába enzymatickou koaguláciou („sladké“ zrážanie – viď kapitola 2.1.1), je nutné pridať do mlieka syridlo. Pri tradičnej výrobe sa používajú syridlá získavané zo žalúdkov mláďat (obvykle teľatá) obsahujúcich predovšetkým enzým chymozín (95 % celkovej aktivity pri zrážaní mlieka) s malým množstvom pepsínu. Obmedzené zásoby tohto syridla a vysoký dopyt syrární viedli ku hľadaniu iných alternatívnych zdrojov.

Z používaných náhrad je možné uviesť aplikáciu kuracieho a bravčového pepsínu, mikrobiálnych syridiel z *Rhizomucor miehei* a menej často z *Rhizomucor pusillus* alebo *Cryphonectria parasitica*. Ku veľmi široko užívaným patria taktiež čistý chymozín produkovaný geneticky modifikovanými organizmami (*Kluyveromyces lactis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*) [5]. Druhou prísadou, ktorá napomáha koagulácii mlieka vyvolanej syridlom, je chlorid vápenatý. Typický prídavok 10 – 100 g CaCl₂ na 100 litrov surového mlieka vedie ku zníženiu pH o cca 0,1 – 0,2, pričom nepriamo zvyšuje aktivitu syridla a podporuje tak enzymatickú hydrolyzu κ -kazeínu. Konkrétne je hydrolyzovaná peptidová väzba medzi fenyalanínom a metionínom (105. a 106. aminokyselina v peptidovom reťazci) práve za vzniku parakazeínu (κ -kazeínový fragment 1-105, κ -CN f1-105), ktorý difunduje do vodnej fáze. Hneď ako dôjde ku väčšine (> 75 %) hydrolytického štiepenia, začína sprostredkovaná agregácia parakazeínových micél [5]. Už v rokoch 1910 a 1912 publikoval J. Alexander [6][7] vo svojich štúdiách, že kazeín v mlieku existuje ako nestabilný koloid, ktorý je chránený a stabilizovaný κ -kazeínom a navrhol použitie syridla pre jeho hydrolyzu. Wake [8] v roku 1959 dokázal, že syridlo hydrolyzuje peptidový reťazec κ -kazeínu a o 6 rokov neskôr Delfour a kol. [9] konkretizovali štiepenú peptidovú väzbu [10].

2.1.4 Zloženie prírodných syrov

Kravske mlieko je v ČR základnou surovinou pre výrobu syrov. Počas nej dochádza ku skoncentrovaniu niektorých zložiek sušiny mlieka, ktorá tvorí približne 12,2 – 13,2 % tohto polydisperzného systému [5].

Aj keď laktóza, hlavný mliečny sacharid, predstavuje 4,4 – 5,0 % obsahu kravského mlieka, prevažná väčšina (90 – 95 %) je odstránená v srvátke počas procesu výroby syra. Ku ďalšiemu zníženiu jej podielu sa navyše u holandských syrov prevádza tzv. pranie syreniny. Zostávajúce množstvo je fermentované zrážkovými kultúrami na kyselinu mliečnu, a preto sa laktóza v tomto druhu syra prakticky nevyskytuje [5].

Proteíny mlieka (celkovo cca 3,4 %) je možné rozdeliť do 2 kategórií na základe ich rozpustnosti pri teplote 20 °C a pH 4,6. Srvátkové bielkoviny (0,6 %), ktoré za týchto podmienok zostávajú rozpustné, sú nefosforylované globulárne proteíny nesenzitívne na vápenaté ióny, ktoré denaturujú až pri zohrevení a ich štruktúra je stabilizovaná intramolekulárnymi disulfidickými väzbami.

Približne polovicu frakcie sérových bielkovín tvoria β -laktoglobulíny a približne štvrtinu α -laktalbumín. V menšej miere sú potom zastúpené rôzne imunoglobulíny, sérový albumín, laktoferín a transferín. Srvátkové proteíny tvoria iba minimálny podiel sušiny eidamských syrov, pretože pôsobením syridla nedochádza k ich zrážaniu, čo je dôvodom ich oddeľovania zo syreniny do srvátky spoločne s laktózou a niektorými ďalšími vo vode rozpustnými látkami [11].

Druhou, z hľadiska výroby syra najdôležitejšou, skupinou mliečnych proteínov, ktoré sa pri daných podmienkach zrážajú, zastupujú kazeíny. Túto dusíkatú frakciu mlieka (2,6 %) tvoria 4 bielkoviny: α_{S1} -, α_{S2} -, β - a κ -kazeín. Kazeín existuje v mlieku vo forme micél tvorených radou submicél spoločne spojených koloidným fosforečnanom vápenatým. Na povrchu micely sa nachádzajú κ -kazeíny s vyčnievajúcimi reťazcami hydrofilnej časti molekuly proteínu pre stabilizáciu systému.

Jadro micely naopak tvoria hydrofóbne, Ca^{2+} senzitivne $\alpha_{\text{S1-}}$, $\alpha_{\text{S2-}}$, β -kazeíny. Pôsobenie syridla na κ -kazeín vedie ku destabilizácii kazeínovej micely a strate vonkajšieho záporného náboja, ktorý bráni agregácii, v dôsledku čoho v prítomnosti vápenatých iónov dochádza ku koagulácii a vzniku gélu. Kazeíny v syroch predstavujú 97-98 % celkových proteínov, pričom v syroch typu Eidam sa obsah bielkoviny pohybuje okolo 26,0 g/100,0 g syra, a v syroch typu Gouda približne 24,0 g/100,0 g [12].

Problematika lipidov v mlieku a syroch je, vzhľadom k zameraniu tejto práce, preberaná podrobnejšie v nasledujúcej kapitole. Syry sú taktiež považované za cenný zdroj niektorých vitamínov a minerálnych látok. Keďže je prevažná väčšina vo vode rozpustných vitamínov mlieka odstraňovaná ako súčasť srvátky, tak sú v sušine, spoločne s lipidmi, zadržované hlavne vitamíny rozpustné v tukoch, medzi ktoré patrí predovšetkým vitamín A, príp. jeho provitamín β -karotén [13]. Majoritný podiel minerálnych látok syrov, spolu so sodíkom, ktorý sa do syreniny dostáva počas solenia, tvoria prvky ako vápnik, horčík a fosfor. V kravskom mlieku sa vápnik, ktorého obsah je asi 120 mg/100 ml, nachádza jednak v koloidnej forme ako fosforečnan a kazeinát vápenatý, a z časti rozpustný vo forme vápenatých iónov a ich solí, napr. citrónan [3].

2.1.4.1 Mliečny tuk

Kravské mlieko zvyčajne obsahuje okolo 3,5 – 5,0 % lipidov vo forme emulgovaných guľičiek o priemere 0,1 – 10 μm , dispergovaných v kontinuálnej sérovej fáze. Koncentrácia lipidov a zastúpenie jednotlivých MK v mlieku závisí na mnohých faktoroch ako: plemeno dobytka, druh výživy, doba laktácie, zdravie a spôsob chovu zvierat [14].

Mliečny tuk je považovaný za jeden z najkomplexnejších prirodzene sa vyskytujúcich tukov, kvôli vysokému počtu a širokému spektru MK (Tabuľka 4), ktoré obsahuje. Z kvantitatívneho hľadiska sú dominantné lipidy mlieka triacylglyceroly (TAG), ktoré môžu predstavovať až 98 % celkového obsahu tuku, pričom zvyšné 2 % tvoria diacylglyceroly (DAG), monoacylglyceroly (MAG), voľné mastné kyseliny (VMK), fosfolipidy a steroly [14].

Tabuľka 4: Hlavné MK v mliečnom tuku [15]

MK	triviálny názov kyseliny	systematický názov kyseliny	% hm.
4:0	maslová	butánová	3,7
6:0	kaprónová	hexánová	2,4
8:0	kaprylová	oktánová	1,5
10:0	kaprínová	dekánová	3,2
12:0	laurová	dodekánová	3,6
14:0	myristová	tetradekánová	11,1
14:1	myristoolejová	cis-9-tetradekánová	0,9
15:0	-	pentadekánová	1,2

Tabuľka 4: Hlavné MK v mliečnom tuku [15] - pokračovanie

MK	triviálny názov kyseliny	systematický názov kyseliny	% hm.
16:0	palmitová	hexadekánová	28,3
16:1	palmitoolejová	cis-9-hexadecénová	1,6
18:0	stearová	oktadecénová	11,8
18:1	olejová	cis-9-oktadecénová	18,8
18:1	vakcénová	trans-11-oktadecénová	4,2
18:2	linolová	cis,cis-9,12-oktadekadiénová	1,4
18:2	linolová (konjugovaná)	cis,trans-9,11-oktadekadiénová	1,1
18:3	α -linolénová	cis,cis,cis-9,12,15-oktadekatriénová	0,9
-	ostatné kyseliny	-	4,4

TAG sú nepolárne zlúčeniny s molekulovou hmotnosťou v rozmedzí 470 – 890 Da, ktorých štruktúru tvorí glycerolový skelet s esterovo viazanými 3 molekulami MK. Ich kompozícia je extrémne zložitá, keďže v 3 polohách (sn-1, sn-2 a sn-3) glycerolového reťazca je možné esterovo naviazať v rôznych koncentráciách viac než 400 MK.

Tie sa líšia v dĺžke reťazca (od 4 do 18 C), stupni nasýtenosti, polohách násobných väzieb a izomérii [14]. Distribúcia MK v molekule TAG nie je náhodná, pretože mechanizmy podieľajúce sa na ich biosyntéze v mliečnej žľaze vykazujú určitú selektivitu. Jedným z charakteristických črt mliečneho tuku je esterifikácia MK s krátkym uhl'ovodíkovým reťazcom (C4:0 – C6:0) v polohe sn-3. V pozícii sn-2 sú esterovo viazané MK s dlhším reťazcom (až C16). V polohe sn-1 je zvyčajne umiestnená C18:0, zatiaľ čo nenasýtené MK sú prednostne viazané v pozíciách sn-1 a sn-3 [16]. Nasýtené MK v mlieku prežúvavcov tvoria 60 - 70 % všetkých MK [14]. Najvýznamnejšiu skupinu nasýtených MK reprezentujú molekuly s nerozvetvenými uhl'ovodíkovými reťazcami s párnym počtom (4 – 18) uhlíkov. Zásadné postavenie z pohľadu kvantity zaujíma kyselina palmitová (C16:0), ktorej obsah sa pohybuje okolo 25-30 % celkového množstva. Kyseliny myristová (C14:0) a stearová (C18:0) predstavujú každá približne 12 % [13]. Mliečny tuk je hlavným zdrojom nasýtených MK s krátkym uhl'ovodíkovým reťazcom v ľudskej potrave. Predovšetkým sa jedná o kyselinu maslovú (C4:0) a kaprónovú (C6:0), pričom každá má relatívne vysoké zastúpenie od 2 do 4 % [16].

Celkovo z nenasýtených MK tvorí najväčšiu časť (17 – 25 %) kyselina olejová (C18:1^{Δ9}) v konfigurácii *cis*. K ďalším mononenasýteným MK s príspevkom rádovo v jednotkách percent patria kyselina myristoolejová (C14:1^{Δ9}), palmitoolejová (C16:1^{Δ9}) a vakcénová (C18:1^{Δ11}). Kyselina vakcénová sa tvorí v dôsledku biohydrogenácie v bacheru a jej podiel v mliečnom tuku je výrazne ovplyvnený potravou. U kráv kŕmených prevažne senom sa koncentrácia tejto kyseliny udržiava na nízkej hladine (cca 1,5 %), zatiaľ čo konzumácia čerstvej trávy u voľne sa pasúcich zvierat vedie ku zvýšeniu až na 5 %. Biohydrogenačné reakcie majú za následok aj nízke zastúpenie polynenasýtených MK – linolová a linolénová [13].

Ako už bolo zmienené, existuje celý rad ďalších MK, z ktorých mnohé sú prítomné v extrémne nízkych koncentráciách. Z ďalších skupín je možné uviesť MK s nepárnym počtom uhlíkov, napr. kyselina margarová (C17:0), alebo s rozvetveným reťazcom. Monometylované kyseliny sú pomerne významné, pretože predstavujú približne 2,5 % z celkového množstva MK. Patria k nim 12-metyl a 13-metyltetradekánová kyselina, ktoré spoločne tvoria asi 1 %. V stopovom množstve sa v mliečnom tuku vyskytujú taktiež niektoré hydroxy- a ketokyseliny [13].

Čerstvé mlieko priamo po dojení obsahuje iba malé množstvo DAG, MAG a VMK. Pri skladovaní mlieka, rovnako ako pri zrení syra, však môže dochádzať k enzymatickej hydrolyze TAG pomocou lipáz mlieka a prítomných baktérií, čo môže významne zvýšiť podiel týchto zlúčenín. Fakt, že poloha sn-3 je posledná, ktorá je acylovaná počas biosyntézy TAG, vysvetľuje najvyššiu koncentráciu 1,2-diacylglycerolov oproti všetkým ostatným DAG v čerstvom mlieku, keďže sa jedná o medziprodukt tohto procesu. Je totiž nepravdepodobné, že by sa jednalo o produkty lipolýzy, pretože lipázy napádajú prednostne nielen sn-3, ale aj sn-1 polohu, čím vzniká zmes 1,2- a 2,3-diacylglycerolov. Profil VMK v čerstvom nadojenom mlieku sa čiastočne líši od profilu MK esterovo viazaných v molekulách TAG [13].

Fosfolipidy sú malá, ale veľmi dôležitá trieda lipidov mlieka, keďže sú prítomné v membráne tukových guľčiek a ich amfifilný charakter napomáha stabilizovať polydisperzný systém mlieka vo forme emulzie olej vo vode (O/V).

Štruktúrne sa fosfoglyceridy podobajú TAG, avšak líšia sa zložením na pozícii sn-3, kde je namiesto acylu pripojená fosfátová skupina, na ktorú sú naviazané ďalšie zlúčeniny. V priemere obsahujú dlhšie a polynenasýtené MK, preto sú náchylnejšie k oxidácii. K najviac zastúpeným patria: fosfatidylcholín a fosfatidyletanolamín. V menšom množstve sa v mlieku nachádzajú aj fosfatidylserín a fosfatidylinositol [16].

Amfipatické vlastnosti vykazuje aj sfingomyelín, najvýznamnejší sfingolipid, ktorého štruktúru tvorí fosforylcholínová skupina esterovo viazaná na ceramid, ktorá sa skladá zo sfingosínu spojeného cez amidovú väzbu s molekulou MK. V stopovom množstve sú prítomné aj iné sfingolipidy, ako cerebrosidy a gangliosidy. Prevládajúcim sterolom mlieka (viac než 95 %) zo všetkých je cholesterol [13]. Priemerné zloženie lipidov kravského mlieka uvádza Tabuľka 5.

Tabuľka 5: Priemerné zloženie lipidov kravského mlieka [5]

Podiel jednotlivých lipidov v mlieku [% hm. celkového lipidu]											
TAG		DAG		MAG		Cholesterol		VMK		Fosfolipidy	
97,5		0,36		0,027		0,31		0,027		0,6	
Obsah hlavných MK v mliečnom tuku [% hm., 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* – voľné mastné kyseliny

2.1.5 Syry typu Moravský bochník

Pre experimentálnu časť tejto dizertačnej práce (Experiment I) bol vybraný syr typu Moravský blok/bochník, čo je pôvodný český variant ementálskeho typu syra (švajčiarskeho) s minimálnou tvorbou ôk.

Podľa vyššie uvedeného rozdelenia patria medzi syry sladké, tvrdé, plnotučné, anaeróbne zrejúce. Moravský bochník je syr s vysokodohrievanou syreninou, bez typických ôk pre ementálske syry. Technológia výroby je podobná ementálu, avšak používa sa nižšia teplota dohrievania syreniny. Celková doba spracovania a aj následného zrenia je kratšia oproti ementálu. Syr zreje iba v chladnej miestnosti pri teplote 10 – 14 °C [3]. Moravský bochník bol vyvinutý v Československu v prvej polovici minulého storočia. Hlavným dôvodom výroby bola predovšetkým žiadosť na menšiu hmotnosť syra (pravý švajčiarsky ementál váži 60 až 130 kg) a pravdepodobne aj zjednodušenie výroby, keďže správna tvorba ôk v ementálu vyžaduje zložité a presné podmienky zrenia a precíznu kontrolu ich vzniku. Pôvodne sa syr vyrábala vo forme bochníku o váhe 12 až 14 kg. Dnes sa vyrábajú vo forme bloku/hranolu ako tzv. Moravský blok. Syry majú pevné pružné cesto a sladkastý flavour, podstatne menej výrazný ako klasické ementálske syry. Používajú sa na plátkovanie, ale taktiež ako surovina pre tavené syry [5], [17]. Moravský blok by mal obsahovať 62 % sušiny, 45 % (poprípade 50 %) tuku v sušine a 1,3 % soli [5], [18], [19].

Vzhľadom k tomu, že sa jedná o českú špecialitu, o syroch typu Moravský blok je dostupných pomerne veľmi málo informácií a doposiaľ prakticky neboli vedecky skúmané; jediná dostupná publikácia sa venuje zmenám obsahu aminokyselín v tavených syroch vyrobených z Moravského bochníku v závislosti na použitom sterilizačnom záhreve [20].

2.1.5.1 Lipidy v syroch ementálskeho typu

V Českej republike je zo skupiny ementálskych syrov vyrábaný veľký ementál (~80 kg, 45 % t. v s.), malý ementál (~ 10 kg, 45 % t. v s.) a Moravský bochník (~13 kg, 45 % t. v s.). Väčšina ementálskych syrov obsahuje aspoň 40 % t. v s.

Švajčiarske syry sa vyznačujú bežne nízkym priebehom lipolýzy (1 až 2 % tuku), čo je spôsobené inaktíviou lipoproteínovej lipázy mlieka pri pasterizácii a všeobecne slabou lipolytickou aktivitou BMK použitých kultúr. Majú výrazne sladkastú a orieškovú chuť, za ktorú je zodpovedná kyselina propiónová; ku vzniku charakteristického flavouru však prispievajú taktiež VMK s krátkym reťazcom uvoľnené lipolýzou mliečného tuku. Priebeh lipolýzy, ktorá je esenciálna pre dobrú rovnováhu flavouru, nemusí byť príliš vysoký, aby vytvoril zreteľný príspevok ku sensorickým vlastnostiam syra [21]. Majoritný podiel obsahu VMK v syre Ementál je tvorený kyselinou stearovou, oproti tomu sú koncentrácie ostatných lineárnych nasýtených MK (C4:0 – C12:0) dosť nízke [22]. Profilu VMK syru Ementál taktiež dominuje kyselina olejová a palmitová; ďalej sa vo významných množstvách vyskytujú aj nasledujúce MK, medzi nimi hlavne kyseliny maslová, laurová alebo myristová [16]. Prehľad priemerného obsahu hlavných VMK v syroch ementálskeho typu uvádza Tabuľka 6.

Tabuľka 6: Obsah hlavných VMK v ementálskych syroch (v mg · kg⁻¹) [16]

	C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Ementál	112	45	71	-	68	207	515	256	842	59	31

2.1.5.2 Výroba syra typu Moravský bochník

V tejto kapitole sú prebrané špecifiká technologického procesu výroby Moravského bloku/bochníku.

Vyrába sa z pasterizovaného kravského mlieka. Mlieko musí byť najvyššej kvality – musí mať dobrú a neporušenú kvasnú a syriacu funkciu s kyslosťou maximálne 7,5 SH (SH – titračná kyslosť podľa Soxhlet-Henkela udáva počet mililitrov odmerného roztoku NaOH (c = 0,25 ml · l⁻¹) potrebného na neutralizáciu 100 ml mlieka za prídavku fenolftaleínu) [23]. V mlieku sa nesmú vyskytovať väčšie množstvá plynotvorných, peptonizačných, spórotvorných a hlavne koliformných MO. Taktiež nesmie obsahovať inhibičné látky. Pasterizácia prebieha pri 72 až 74 °C po dobu 20 až 30 sekúnd. Ďalej sa mlieko ochladzuje na syriacu teplotu približne 32 až 34 °C a napúšťa sa do výrobného zariadenia. Najčastejšie sa tučnosť mlieka upravuje prídavkom odstredeného mlieka. Syriteľnosť sa upravuje pomocou nasýteného roztoku, prípadne kryštalickým chloridom vápenatým. Môže sa pridať aj KNO₃ pre utlmenie aktivity klíčenia spór (viď kapitola 2.1.3). Základom pri úprave kyslosti mlieka je prídavok smotanovej kultúry [19].

Mezofilná (smotanová) kultúra je základnou kultúrou pre prakticky všetky druhy syrov, pričom podľa typu syra býva doplnená ďalšími kultúrami. Pri výrobe syrov s vysokodohrievanou syreninou sa do mlieka pridáva mezofilná a termofilná kultúra a v prípade ementálskych syrov aj propiónová kultúra.

Čisté mliekarenské kultúry sa pridávajú 30 minút pred syrením a to buď ako zmesová ementálska kultúra (0,1 až 0,15 %) alebo v rovnakom množstve samostatné kultúry *Lactobacillus helveticus* a *Streptococcus thermophilus* v pomere 1:1 alebo 2:3. *Lactobacillus casei* sa pridáva v množstve 0,01 až 0,02 %. Mliekarské kultúry sa pridávajú za stáleho miešania. Po pridaní smotanovej kultúry začína tzv. mliečne predzrenie, ktoré trvá do druhého dňa [17].

Zaujímavé je, že sa z dostupnej literatúry nepodarilo bezpečne zistiť, či sú propiónové baktérie nevyhnutné aj pre výrobu syrov typu Moravský bochník; tieto syry nemajú oká, a je teda možné predpokladať, že aplikácia propiónovej kultúry nie je nevyhnutná.

Mlieko sa syří pri 32 až 34 °C. Syridlo sa pridáva do mlieka za stáleho miešania. Spracovanie syreniny prebieha podľa výrobného harmonogramu a delí sa na prípravu a vytužovanie syrového zrna. Veľkosť syrového zrna by mala byť medzi 2 až 4 mm. Vytužovanie začína zahrievaním zmesi srvátky a syrového zrna pri sušiacej teplote 48 až 52 °C do 30 minút. Dosušanie zrna prebieha pozvoľna a to rastom teploty 3 °C za minútu po dobu 40 až 60 minút. Doba od zasýrenia po ukončenie sušenia činí 165 až 170 minút. Po dosušení nasleduje lisovanie syra vo vaniach, ktoré sú vyložené perforovaným dnom. Presný časový úsek lisovania je charakteristický pre danú technológiu. Vylisované bloky sa vyťahujú z vaní ručne alebo mechanicky, solia sa v soľnom náleve (20 % NaCl) pri teplote 12 až 14 °C, vyťahujú, sušia a následne balia do plastových obalov na zrenie.

Moravský blok zreje po dobu 6 až 8 týždňov pri teplote 12 až 14 °C [19]. Do tržnej siete sú syry dodávané vo vhodnom stupni zrelosti, čo je konkrétne pre Moravský blok najmenej 2 mesiace od výroby [19].

2.1.6 Syry holandského typu

Pre druhú časť tejto dizertačnej práce (Experiment II) bol vybraný syr eidamského typu. Eidamské (holandské) syry sú prírodné polotvrde syry vyrábané prevažne z pasterizovaného, čiastočne odstredeného kravského mlieka. Pre ich výrobu sa používajú BMK rodu *Lactococcus* spp. a *Leuconostoc* spp. Pre zrážanie a tvorbu syreniny sa využívajú klasické syridlá z žalúdkov teliat alebo mikrobiálneho pôvodu. Dohrievanie a dosušanie syreniny sa z dôvodu prítomnosti mezofilných MO prevádza pri teplotách iba do 40 °C – preto sa z hľadiska technológie výroby radí medzi syry s nízkodohrievanou syreninou. K prihrievaniu syreniny na požadovanú teplotu dochádza v priebehu zrenia syrového zrna, kedy sa pre zníženie obsahu laktózy za účelom regulácie rozsahu acidifikácie pridáva teplá voda. Ku hlavným druhom eidamských syrov, ktorých historický pôvod spadá na územie Holandska, patrí Gouda a Eidam (angl. Edam) [22] -[25]. Podľa nich sa v rôznych krajinách vyrábajú varianty s rozličnými obmenami. Európska únia však schválila nové chránené zemepisné označenia pre tieto syry vyrábané v Holandsku; nesú názvy: „Edam Holland“ a „Gouda Holland“ [25]. Gouda, ktorá dostala názov podľa rovnako menného mestečka, má pôvod v holandských provinciách Zuid-Holland a Utrecht. Tradične sa vyrába v plochom valcovitom alebo obdĺžnikovitom tvare o hmotnosti približne 10-16 kg. V závislosti na ročnom období, zrelosti a príp. použitom farbive, môže mať syrové cesto žltú alebo žltoranžovú farbu.

Syr Gouda sa vyznačuje polotvrdou konzistenciou s hladkou štruktúrou, ktorá sa pri reze nelepí a obsahuje len malé množstvo menších ôk. Pri dlhej dobe zrenia sa konzistencia stáva tvrdšia, hlavne v okolí kôrky. Chuť tohto syra sa značne líši podľa štádia zrelosti, druhu použitej štartovacej kultúry, príp. prídavku ďalších kultúr. Mladý syr má veľmi jemnú chuť a arómu s „čerstvými kyslými maslovými“ tónmi. Dozrievaním sa chuť mení na omnoho výraznejšiu a plnšiu, zatiaľ čo „maslové“ tóny sú menej výrazné [25].

Názov syru Eidam je odvodený od mesta Edam, ktoré sa nachádza v severnej časti holandskej provincie Noord-Holland, odkiaľ tieto syry pochádzajú. Typický a jedinečný tvar tohto syra je spravidla guľovitý s mierne sploštenou spodnou a hornou stranou o váhe 1 – 4 kg; ale vyrába sa aj vo forme bloku o hmotnosti 16 – 20 kg alebo bochníkov o hmotnosti 2 – 5 kg. Rovnako ako u Goudy je v konzistencii polotvrdý s hladkou štruktúrou, nelepivým rezom a iba ojedinele s malými okami v syrovom ceste. Farba cesta Eidamu je zvyčajne žltá až oranžová, ale viac sýta než u bledšej Goudy. Chuť, ktorá taktiež závisí na stupni zrelosti a druhu použitých kultúr, je u mladších syrov jemná, ľahko kyslá a slaná. Dozrievaním sa stáva výraznejšia s pikantnejšími tónmi [25].

Eidamské syry, ako všetky syry vyrábané sladkým zrážaním, majú pomerne vysoký obsah vápniku v porovnaní so syrmi vyrobenými kyslým zrážaním, pretože čím je pH srvátky pri oddeľovaní nižšie, tým viac vápniku do nej prechádza [5]. Priemerné zloženie syrov Eidam a Gouda zhrňujú Tabuľka 7 a Tabuľka 8.

Tabuľka 7: Priemerné chemické zloženie eidamských syrov – základné zložky [5]

Základné zložky [g/100 g syru]					
	Voda	Proteíny	Lipidy	Sacharidy	Cholesterol
Eidam	43,8	26,0	25,4	Stopové množstvo	0,08
Gouda	40,1	24,0	31,0	Stopové množstvo	0,10

Tabuľka 8: Priemerné chemické zloženie eidamských syrov – minerálne látky [5]

Syr	Minerálne látky [mg/100 g syru]						
	Sodík	Draslík	Vápnik	Horčík	Fosfor	Železo	Zinok
Eidam	1020	97	770	39	530	0,4	2,2
Gouda	910	91	740	38	490	0,1	1,8

Tabuľka 9: Priemerné chemické zloženie eidamských syrov – vitamíny [5]

Syr	Vitamíny [µg/100 g syru]					
	Retinol	Karotén	Vitamín D	Vitamín E	Tiamín	Riboflavín
Eidam	175	150	0,19	0,48	0,03	0,35
Gouda	245	145	0,24	0,53	0,03	0,30
Syr	Niacín	Vitamín B6	Vitamín B12	Foliát	Vitamín B5	Biotín
Eidam	0,07	0,09	2,1	40	0,38	1,8
Gouda	0,05	0,08	1,7	43	0,32	1,4

2.1.6.1 Lipidy v syroch eidamského typu

Väčšina eidamských syrov má obsah tuku v sušine (t. v s.) min. 40 %. Vo svete sa však vyrábajú taktiež varianty s redukovaným množstvom tuku. V Českej republike je syr Edam známy pod názvom Eidam a vyrába sa aj ako nízko-tučná forma s 30 % t. v s. alebo menej [26].

Holandské syry sa vyznačujú relatívne obmedzeným priebehom lipolýzy, čo je spôsobené inaktíviou lipoproteínovej lipázy mlieka pri pasterizácii a všeobecne slabou lipolytickou aktivitou BMK použitých kultúr. Z tohto dôvodu sú aj koncentrácie VMK v eidamských syroch v porovnaní s inými syrmi, ako napr. Camembert, Parmezán alebo Roquefort, výrazne nižšie. Vysoký obsah vzniknutých VMK by mohol spôsobovať napr. nežiadúci žltnutý off-flavour, napriek tomu nízke koncentrácie VMK, ktoré sú v správnej rovnováhe s produktami proteolýzy, prispievajú ku výslednej chuti eidamských syrov. Ich hlavný význam tkvie v tvorbe laktónov [27].

K najbežnejším laktónom patria δ -dekalaktón a δ -dodekalaktón, ktoré sú nevyhnutné pre charakteristický flavour eidamských syrov [27].

Majoritný podiel obsahu VMK v syroch Gouda je tvorený kyselinou palmitovou, naproti tomu sú koncentrácie ostatných lineárnych nasýtených MK (C4:0 – C18:0) dosť nízke [22]. Profilu VMK syru Eidam taktiež dominuje kyselina palmitová; ďalej sa vo významných množstvách vyskytujú aj nasledujúce MK, medzi nimi hlavne kyseliny maslová, stearová, laurová alebo myristová [16]. Prehľad priemerného obsahu jednotlivých VMK v syroch Eidam a Gouda uvádza Tabuľka 10.

Tabuľka 10: Priemerný obsah hlavných VMK v eidamských syroch (v mg · kg⁻¹) [16]

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

2.1.6.2 Výroba eidamských syrov

Výroba eidamských syrov začína výberom vhodného kravského mlieka vysokej kvality. Dobrý zdravotný stav dojníc a vyhovujúca výživa sú základnými predpokladmi pre produkciu mlieka prijateľnej akosti. Kŕmenie zvierat, napr. nevhodnými typmi rastlín, ovplyvňuje sensorické vlastnosti mlieka a následne aj syra, siláž s nižšou kvalitou môže byť zase zdrojom anaeróbných baktérií, ktoré sa dostávajú do mlieka a spôsobujú tzv. neskoré durenie syrov. Naopak pozitívny vplyv na zloženie má stratégia voľne sa pasúceho dobytku alebo využívanie čerstvých krmív, čo vedie k nárastu koncentrácie omega-3 MK (viď kapitola 2.1.6.1) v mlieku a okrem toho zlepšuje aj jeho sensoricky aktívny profil. Mlieko musí byť kontrolované na prítomnosť cudzorodých látok, predovšetkým rezíduí antibiotík, ktoré by mohli inhibovať rast mliekarenských kultúr. K ďalším faktorom, ovplyvňujúcim zloženie a vlastnosti surového mlieka, patrí napr. plemeno, vek dojníc, genetické faktory, doba laktácie alebo ročné obdobie [13].

Typy syrov sú klasifikované podľa obsahu t. v s., preto je potrebné pred samotnou výrobou surové mlieko štandardizovať. Dosiachnutie požadovaného pomeru tuku a bielkovín sa najčastejšie prevádza zmiešaním odstredeného a plnotučného mlieka, čím sa zníži obsah lipidov [22]. Pred výrobou Eidamu je normalizované mlieko pasterizované. Toto tepelné ošetrenie, ktorého cieľom je inaktivácia nežiadúcich MO, sa bežne prevádza 10-20 sekúnd pri teplote 70 – 75 °C. Počas pasterizácie dochádza ku odstráneniu väčšiny baktérií mliečneho kvasenia, *Listeria monocytogenes*, koliformných a gram-negatívnych baktérií a iných MO. Súčasne dochádza ku inaktivácii niektorých enzýmov, ktorých katalytický účinok by mohol mať negatívny vplyv pri zrení syrov. Zníženie aktivity lipoproteínovej lipázy zabraňuje vysokému stupňu lipolýzy, ktorá je u eidamských syrov považovaná za nežiadúcu. Súbežne s tým však môžu byť inaktivované aj prospešné enzýmy, zvlášť ak je intenzita ošetrenia príliš vysoká. K najdôležitejším z nich patrí xantínoxidáza, viazaná na membráne, ktorá mimo iného katalyzuje aj redukciu dusičnanu na dusitan, čoho prítomnosť zabraňuje klíčeniu spór *Clostridium* spp. (napr. *Clostridium tyrobutyricum*).

Teplné ošetrenie mlieka vedie k určitému stupňu denaturácie termolabilných srvátkových proteínov. Tento vedľajší efekt môže byť prospešný, ak sa ich iba malé množstvo viaže na povrchu kazeínových micél, pretože sa tak zvýši výťažnosť sušiny syra. Avšak pri rozsiahlejšej denaturácii dochádza k veľmi nepriaznivému ovplyvneniu priebehu koagulácie, čo sa prejavuje vznikom slabšej syreniny, zlou synerézou a celkovým zhoršením kvality syra [10].

Ďalším krokom, ktorý sa často uplatňuje pre zvýšenie mikrobiálnej stability surového mlieka, je baktofugácia, predovšetkým za účelom odstránenia endospór baktérií *Clostridium tyrobutyricum*, ktoré môžu spôsobiť tzv. neskoré durenie syrov. Príčinou tejto vady je fermentácia kyseliny mliečnej až na kyselinu maslovú a octovú za súčasného nadmerného vývinu oxidu uhličitého a vodíku, v dôsledku čoho vznikajú veľké oká až praskliny poškodzujúce syr, sprevádzané nepríjemným zápachom. Proces baktofugácie je založený na princípu centrifugácie, kedy sa dosahuje separácia endospór odstredivou silou v podobe tzv. ťažkého kalu s účinnosťou až 98 %, pretože väčšina z nich má vyššiu hustotu než mlieko [14]. Nutným opatrením pri výrobe syra z pasterizovaného mlieka je prídavok čistých kultúr, označovaných tiež ako štartovacie alebo zákvasové.

Pre výrobu syrov holandského typu sa uplatňujú hlavne mezofilné baktérie rodov *Lactococcus* spp. a *Leuconostoc* spp., konkrétne *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *cremoris*, *Leuconostoc lactis* a *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Enzymatickým pôsobením týchto baktérií dochádza k rýchlej a takmer úplnej fermentácii laktózy na kyselinu mliečnu, čo má za následok zníženie pH na 5,1 – 5,2. Tento kritický bod, akým je práve úprava kyslosti, hrá pri výrobe syra dôležitú úlohu, keďže usmerňuje rýchlosť syrenia, kvalitu koagulátu, podporuje syneréziu a podmieňuje aktivitu lipolytických a proteolytických enzýmov počas dozrievania, čím sa vytvárajú podmienky pre správny vývoj syrového flavouru. Rýchlosť poklesu pH navyše určuje aj rozsah rozpúšťania koloidného fosforečnanu vápenatého, ktorý upravuje citlivosť kazeínov podliehať proteolýze. Paralelne s ďalšími faktormi ovplyvňuje aj reologické vlastnosti syra a celkovo tak výslednú konzistenciu. Súčasne tieto zmeny napomáhajú inhibícii rastu nežiadúcich a patogénnych MO [5]. Iným variantom, okrem baktofugácie, ktorým je možné predchádzať vzniku väd spôsobených činnosťou klostrídií, je prídavok dusičnanu do mlieka. V prítomnosti enzýmu xantinoxidáza sú dusičnany prevádzané na dusitany, ktoré zabraňujú klíčivosti spór týchto baktérií, a tak minimalizujú riziko tvorby defektov pri tzv. neskoršom durení syrov [10]. Pre zachovanie konštantnej intenzity sfarbenia po celý rok je možné do surového mlieka pridávať karotenoidové farbivá: annatto alebo β -karotén. Annatto je žlté až červené prírodné farbivo získané extrakciou z vonkajších vrstiev semien tropického stromu *Bixa orellana*, ktoré obsahuje hlavne žltoranžový lipofilný pigment bixín a vo vode rozpustný norbixín. Vhodnejšou alternatívou môže byť prídavok β -karoténu, ktorý sa v nízkych koncentráciách prirodzene vyskytuje aj v mlieku [28]. Enzymatické pôsobenie syridla je primárnou fázou dvojfázového procesu, ktorý aktivuje sekundárnu neenzymatickú fázu, počas ktorej už kazeínové micely postupne strácajú schopnosť interagovať s molekulami vody v dôsledku zníženia sférickej a nábojovej repulzie medzi časticami, spôsobené odštiepením makropeptidu z κ -kazeínu. Ako postupuje koagulácia, tak micelárne reťazce začínajú vytvárať trojrozmernú sieťovú maticu, ktorá zachytáva molekuly vody a ďalšie hlavné zložky mlieka (laktózu, lipidy, srvátkové proteíny, minerálne látky). Tento proces prebieha pri teplote 30 – 31 °C a koagulácia trvá približne 20-30 minút.

V okamžiku dosiahnutia dostatočnej pevnosti je mliečny gél, ktorý je za bežných podmienok pomerne stabilný, rozkrájaný špeciálnymi nožmi (syrárske harfy) na kusy o veľkosti 8 – 15 mm (tzv. syrové zrno). Veľkosť syrového zrna je významným faktorom ovplyvňujúcim konečný obsah sušiny syru, a preto vyžaduje prísnu kontrolu. Krájanie má za následok zväčšenie plochy koagulátu, čím je podporená syneréza, a teda vylučovanie srvátky. Čím väčší je pomer plochy k objemu zrn, tým rozsiahlejšie je uvoľňovanie srvátky, a tým nižší je obsah vody vo výslednom syre. Rozsah a rýchlosť synerézy sú okrem veľkosti zrn závislé najmä na koncentrácii vápenatých iónov a kazeínu, pH, dobe trvania procesu, rýchlosti miešania a samozrejme teplote [5].

Pri polotvrdých a tvrdých syroch sa pre podporenie uvoľňovania srvátky syrové zrno prihrieva. Pri výrobe Eidamu sa tohto cieľu bežne dosahuje prídavkom teplej vody po odpustení časti srvátky v procese tzv. prania syreniny, ktorý umožňuje upraviť obsah laktózy fermentovanej kvasovými baktériami, a tým zabrániť prílišnému zníženiu pH syra. Dohrievanie a dosušanie pokračuje po prídavku teplej vody za stáleho miešania približne ďalších 30 minút pri teplotách maximálne 40 °C. Použitie vyšších teplôt by síce ďalej podporilo syneréziu, ale súčasne by viedlo k nežiadúcemu poškodeniu mezofilných baktérií [22]. V okamžiku, kedy syneréza dosiahne požadovaného stupňa, je syrenina oddelená od srvátky na perforovaných formách, čím získavame potrebný tvar a veľkosť syra. U polotvrdých a tvrdých syrov sa pre urýchlenie a podporu uvoľňovania ďalšej srvátky pôsobí na syreninu tlakom. Popri vplyve na synerézu podporuje lisovanie aj dokonalejšie spojenie častíc cesta. Výsledný produkt má celistvejšiu štruktúru s menším počtom ôk a uzavretejší hladký povrch, ktorý zabraňuje ďalším stratám vody, zaisťuje mechanickú stabilitu a slúži ako bariéra proti mikrobiálnej kontaminácii. V priebehu musí tlak narastať pozvoľna, inak by to totiž viedlo k nežiadúcim spevneniam a uzavretiu štruktúry povrchu syra, čím by sa zamedzilo odtoku srvátky [22].

Posledným krokom pred zabalením syra a zrením je solenie. Tento proces sa u eidamských syrov prevádza ponorením do tzv. soľnej kúpele, tj. roztoku chloridu sodného o koncentrácii 18 – 20 %, teplote okolo 13 °C a obsahu vápenatých iónov približne 0,2 %. Difúzia sodných iónov do hmoty syra má okrem pozitívneho účinku na výslednú charakteristickú chuť, taktiež vplyv aj na aktivitu prítomných enzýmov, reguláciu rastu a prežívania MO. K ďalším aspektom sa radia podpora synerézy, teda uvoľňovanie ďalšej srvátky, a tým zníženie hodnoty konečného obsahu vody v syre, a predovšetkým zlepšenie konzistencie výmenou vápenatých iónov v parakazeínu za ióny sodné. Nasolené syry sa po vytiahnutí zo soľného kúpeľu nechávajú oschnúť a potom sa balia do vhodných obalov [5].

Vhodný materiál, používaný pre balenie syrov, by mal spĺňať radu kritérií, medzi ktoré patria napr. poskytovanie dostatočnej ochrany pred MO, ale aj inými nepriaznivými vplyvmi, mal by zabraňovať výrazným stratám vlhkosti, disponovať špecifickými vlastnosťami pre priepustnosť voči plynom a už zmienenej vlhkosti, zlepšovať vzhľad alebo byť kompatibilný s podmienkami distribúcie a predaja. Tradičným obalovým materiálom bochníkov syra Eidam je červený parafínový vosk. Avšak takto zabalené produkty sú viac náchylné ku vzniku väd kvôli prítomnosti nežiadúcich mikrobiálnych kultúr na syrovej kôre. Alternatívou, ktorá sa stále viac používa, je vákuové balenie syrov v plastových fóliách z polyetylénu a polyamidu, ktoré ponúkajú lepšiu ochranu proti mechanickému poškodeniu, a zároveň spomaľujú rast aeróbných baktérií, a tým tak účinnejšie zabraňujú kontaminácii [10].

Takto pripravené syry získavajú svoju výslednú štruktúru, vzhľad a predovšetkým zloženie katalytickým pôsobením enzýmov mlieka, prítomných MO a syridla počas procesu zrenia.

Jedná sa o komplexnú, zložitú radu biochemických zmien, ktoré zahŕňajú metabolizmus zostatkovej laktózy, lipolýzu, proteolýzu, popr. premenu laktátu na citrát, a na nich nadväzujúce sekundárne transformácie. Týmito transformáciami sú katabolizmus VMK a aminokyselín a s nimi súvisiace reakcie: esterifikácia, laktonizácia a mnohé ďalšie. Rozsah týchto reakcií a rovnováha vznikajúcich zlúčenín ovplyvňuje typický charakter vône a chuti syra [29]. Proces zrenia syrov je podrobnejšie popísaný v kapitole 2.2.1. Eidamské syry sú počas zrenia uchovávané v klimatizovaných miestnostiach pri teplote 8-15 °C v závislosti na použítom obalovom materiálu a relatívnej vlhkosti v rozmedzí 85 – 88 % po dobu najmenej 4 týždňov [5], [22].

2.1.7 Kultúry používané pri výrobe syrov s vysoko a nízkodohrievanou syreninou

Vzhľadom k tomu, že jedným z hlavných cieľov oboch experimentov bolo sledovať vplyv rôznych mikrobiálnych kultúr, sú v tejto kapitole podrobnejšie popísané možné varianty kultúr a ich funkcie.

BMK tvoria prirodzenú skupinu nepohyblivých nesporulujúcich G+ kokov a tyčínok, ktoré fermentujú laktózu za tvorby kyseliny mliečnej (homofermentatívne) a prípadne ďalších produktov (heterofermentatívne). Medzi BMK patria zástupcovia rodov *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. V prírode sú veľmi rozšírené, vyskytujú sa v mlieku, na rozkladajúcich sa rastlinách, na slizniciach ľudí a zvierat. Sú príčinou samovoľného kysnutia mlieka, na druhú stranu sem taktiež patrí dôležitá skupina kultúrnej mikroflóry, ktorá je základom, tzv. čistých mliekarenských kultúr [1]. Mikroorganizmy nachádzajúce sa v mliečnych výrobkoch, teda v syroch, majú pôvod v mlieku, pri výrobe syrov prechádzajú z mlieka prevažne do syrového zrna a iba malé množstvo do srvátky. Preto sa mikroflóra syreniny a syrového zrna v podstate nelíši od mikroflóry mlieka. Nevyhnutným predpokladom výroby syrov je však prídavok žiadúcich MO vo forme mliekarenských kultúr.

Základnou kultúrou pre prakticky všetky druhy syrov je mezofilna kultúra, podľa typu syra býva doplnená ďalšími kultúrami [19]. Prídávajú sa tesne pred syrením v množstve 0,1 – 0,15 % [30]. Pri výrobe a zrení syrov dochádza ku veľkým zmenám vo vývoji a fyziologickej činnosti prítomných MO, čo je predovšetkým závislé na ich fyziologickej aktivite, na zložení syrov, teplotných podmienkach atď. Preto je potrebné prísne sledovať a cieľavedome riadiť vývoj MO, ich fyziologickú aktivitu, zloženie syra a klimatické podmienky [31].

Syry s nízkodohrievanou syreninou, medzi ktoré patria syry holandského typu (Eidam, Gouda), obsahujú zmesovú mezofilnú (optimálna kultivačná teplota je 20 – 30 °C) kultúru: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, *Lactobacillus delbruecki* subsp. *lactis*. Prídáva sa taktiež kultúra *Lactobacillus casei*, ktorá vykazuje mierne proteolytickú aktivitu a prispieva tak ku dosiahnutiu žiadúcich sensorických vlastností. Obvykle nie je súčasťou základnej mezofilnej kultúry, aj keď jej optimálna teplota rastu je 30 °C.

Do tejto skupiny taktiež patria syry typu Čedar, ktoré obsahujú termorezistentnú (60 °C) kultúru odolnú voči NaCl (6,5 %), s vysokou proteolytickou aktivitou, ktorá sa pridáva ku vyššie spomenutej zmesovej mezofilnej kultúre a obsahuje baktérie *Lactobacillus helveticus*, prípadne *Enterococcus durans* [32].

Pri výrobe syrov s vysokodohrievanou syreninou sa do mlieka pridáva základná kultúra zložená z mezofilných baktérií *Lactococcus* spp. a *Leuconostoc* spp. a termofilná syrárska kultúra zložená z baktérií *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* a *Lactobacillus lactis*. Termofilná kultúra sa uplatňuje až počas dohrievania a dosušania syrov (optimálna kultivačná teplota je 40 – 45 °C), vykazuje proteolytickú aktivitu a prispieva tak ku dosiahnutiu žiadúcich sensorických vlastností syra. *Lactobacillus lactis* a *Lactobacillus helveticus* majú veľkú schopnosť rozkladať mliečne bielkoviny až na aminokyseliny. Bolo zistené, že *Lactobacillus lactis* hydrolyzuje v mlieku až 7,88 % bielkovín [30]. Baktérie propiónového kvasenia (*Propionibacterium* spp.) sa nachádzajú už v samotnom mlieku v dostatočnom množstve. Keďže sú termorezistentné, prežijú šetrnú pasterizáciu, ale ich biologická a fyziologická aktivita môže byť do určitej miery oslabená, preto sa pri výrobe syrov typu Ementál navyše pridávajú vo forme kultúry, keďže sú nevyhnutné pre dosiahnutie sensorických vlastností. Pôsobenie propiónových baktérií je vymedzené na obdobie vlastného zrenia, pri nízkej teplote (15 – 20 °C) rozkladajú kyselinu mliečnu na kyselinu propiónovú a octovú (charakteristická sladkastá, orechová chuť) a oxid uhličitý (tvorba ôk) [33].

Lipolýza je dôležitým faktorom pri zrení syra, rovnako ako proteolýza a glykolýza, a je všeobecne uznávaná za nevyhnutnú ku tvorbe typickej chuti a arómy syra Ementál. Množstvo VMK sa počas zrenia zvyšuje (cca v rozsahu 2 až 7 g na kg syra) a závisí na lipolytickej aktivite mikrobiálnej flóry počas výroby syrov a ich zrenia. Táto lipolýza je síce nízka v porovnaní s inými syrmi (predovšetkým plesňovými), ale významná, pretože okrem vzniknutých VMK vznikajú dôležité sensoricky aktívne zlúčeniny ako konečné produkty ich rozkladu: alkoholy, metylketóny, estery a laktóny. Baktérie mliečneho kvasenia majú všeobecne veľmi nízku lipolytickú aktivitu, na rozdiel od propiónových baktérií, ktoré ju majú omnoho vyššiu [33]. Štúdia Chamba a Perrearda [21] ukázala, že propiónové baktérie sú hlavnými činiteľmi pri lipolýze syrov tohto typu. Bolo preukázané, že lipolytická aktivita je závislá na kmene a na interakcii medzi propiónovými baktériami a termofilnými laktobacilmi.

V mlieku by mal byť vyvážený pomer medzi laktobacilmi a streptokokami, z dôvodu vzájomného súladu kysnutia a syrenia. Pri prevahe laktobacilov, môže byť chuť ementálskych syrov kyslá až horká [34].

2.2 Sensoricky aktívne látky

Senzorickú kvalitu potravín, a teda aj syrov, určujú prítomné SAL, tj. látky, ktoré vnímame svojimi zmyslami. Za jeden z najdôležitejších indikátorov sensorickej kvality je považovaný flavour, ktorý je často rozhodujúcim faktorom prijateľnosti potravín pre konzumenta. ČSN EN ISO 5492 definuje flavour ako „celkovú kombináciu čuchového, chuťového a trigeminálneho vnemu vnímaného počas skúšania“.

Flavour je teda súhrn chuti, vône a mechanických podnetov v ústnej dutine počas konzumácie potraviny [5]. Typický flavour daného typu výrobku je výsledkom zložitej rovnováhy zmesi zložiek, z ktorých prchavé tvorí arómu – vôňu (interakcia s čuchovými receptormi) a neprchavé tvorí chuť potraviny (interakcia s chuťovými receptormi) [5]. Z chemického hľadiska býva flavour často redukovaný na stanovenie prchavých látok práve preto, že majú najdôležitejšiu úlohu v celkovom flavouru, a taktiež sa pomerne dobre inštrumentálne stanovujú. V potravinách sa odhaduje výskyt približne 10 000 týchto látok, identifikovaných bolo zatiaľ cca 7 000. V jednom type potraviny sa ich môže vyskytovať až niekoľko stoviek, pričom ich celkový obsah je 1 – 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ [35]. Skôr sa vedecké tímy snažili o identifikáciu všetkých prchavých látok v danej potravine, avšak v súčasnej dobe sa výskum zameriava najmä na identifikáciu zlúčenín, ktoré sú pre vnímanie flavouru skutočne dôležité (tzv. „kľúčové“), ktorých môže byť iba niekoľko a v mnohých potravinách sa ich zatiaľ nepodarilo určiť [36].

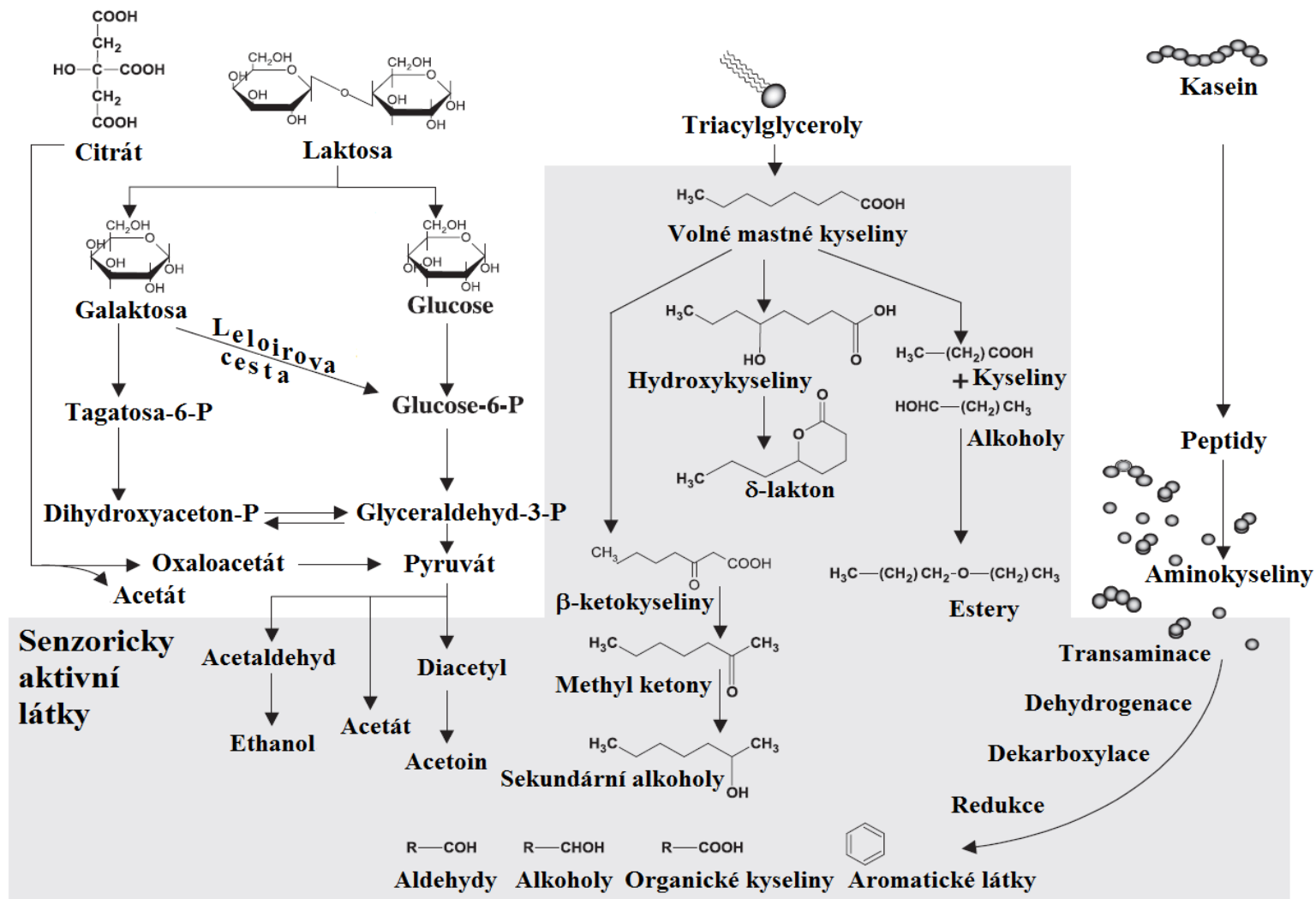
Pre vnímanie celkového flavouru je dôležitý prah vnímania jednotlivých látok, ktorý je definovaný ako najmenšia koncentrácia zlúčeniny, ktorá u viac ako polovice hodnotiteľov umožní rozlíšiť dve vzorky, inak povedané najnižšia koncentrácia, ktorú je možné vnímať; hodnoty sa líšia až v rozsahu niekoľko rádov. Jednotlivé látky sa navyše môžu vzájomne ovplyvňovať (antagonizmus, synergizmus), prípadne interagovať s ostatnými zložkami potraviny, čo nie je možné podchytiť žiadnym prístrojom [37]. Ku vnímaniu flavouru dochádza ešte pred konzumáciou, kedy spotrebiteľ môže syr cítiť (vôňa, odour), ale výsledný pocit vzniká až pri konzumácii [38]. Pre pochopenie príspevku individuálnych SAL k flavouru je nutná kombinácia sensorického hodnotenia s inštrumentálnymi metódami [39].

Pre označenie zmenenej, neprirodzenej vône a/alebo chuti v dôsledku najrôznejších vplyvov sa používa termín off-flavour (prípadne off-odour) [40]. Na off-flavouru syrov sa môže podieľať široké spektrum prchavých zlúčenín. Niektoré látky, ktoré sú v nízkych koncentráciách súčasťou prirodzeného aróma syru, môžu pri nadmernom množstve spôsobovať defekty [41]. Off-flavour, rovnako ako flavour, pochádza z mikrobiálnej aktivity alebo z okolitého prostredia a taktiež činnosťou enzýmov samotného mlieka [32]. Charakterizácií a popisu vône prchavých látok sa venuje rad rozsiahlych publikácií [5], [39]. Podrobný prehľad SAL identifikovaných v syroch a ich charakteristická aróma sú zhrnuté v tabuľkách (Tabuľka 29 až Tabuľka 33). Zlúčeniny boli vybrané na základe publikácií [42] so zameraním na prírodné syry švajčiarskeho a eidamského typu.

Ku najdôležitejším chemickým skupinám, do ktorých sa radia zlúčeniny prítomné v prchavých frakciách syra patria alkoholy, karbonylové zlúčeniny, VMK a ich estery, laktóny a zlúčeniny síry. Tieto zložky najviac ovplyvňujú výslednú arómu syrov a budú im venované nasledujúce kapitoly [42].

2.2.1 Vznik a vývoj sensoricky aktívnych látok v prírodných syroch

SAL sa primárne tvoria predovšetkým pri procese zrenia. Tento proces zahŕňa biochemické a mikrobiologické deje, ktoré majú vplyv na vývoj flavouru, ale aj textúru syru [15]. Dôležité faktory ovplyvňujúce tieto zmeny sú dĺžka a podmienky zrenia. Zvýšená teplota môže biochemické deje zrýchliť, naopak zníženie teploty zrenia spomaľuje tieto procesy [43].



Obrázok 1: Biochemické procesy vedúce k tvorbe SAL v syroch; SAL sú na šedom pozadí [13]

Konečný flavour syra ovplyvňuje predovšetkým použitá mikrobiálna kultúra, výrobná technológia, obsah tuku a soli v syre [44]. Hlavné biochemické procesy sprevádzajúce zrenie syrov možno rozdeliť na primárne, ktoré zahŕňajú metabolizmus laktózy, laktátu a citrátu, proteolýzu, kde sú konečným produktom voľné aminokyseliny a lipolýzu, kde sú konečným produktom VMK [45], [46]. Medzi sekundárne biochemické procesy patrí tvorba SAL. Jedná sa hlavne o metabolizmus VMK a aminokyselín [47], [48]. Zjednodušená schéma vzniku týchto zlúčenín v syroch je vyobrazená na obrázku vyššie (Obrázok 1) [32]. MO, ktoré sa podieľajú pri zrení syrov, sú najmä BMK. Je to početná, morfológicky heterogénna skupina mezofilných kultúr (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) alebo termofilných kultúr (*Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*) [49] - [51]. BMK produkujú intracelulárne enzýmy (peptidázy, lipázy, enzýmy ovplyvňujúce katabolizmus aminokyselín) a extracelulárne enzýmy [50], [34].

Ďalšou skupinou MO, ktoré ovplyvňujú procesy zrenia, sú tzv. neštartérové (nezákvasové) baktérie mliečneho kvasenia (NBMK), ktorých zdrojom môže byť mlieko alebo prostredie mliekarene [52], [53]. NBMK môžu ovplyvňovať aj proteolytické a lipolytické procesy a patria medzi ne napríklad rody *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* a iné [54], [55].

2.2.1.1 Metabolizmus laktózy, kyseliny mliečnej a citrátu

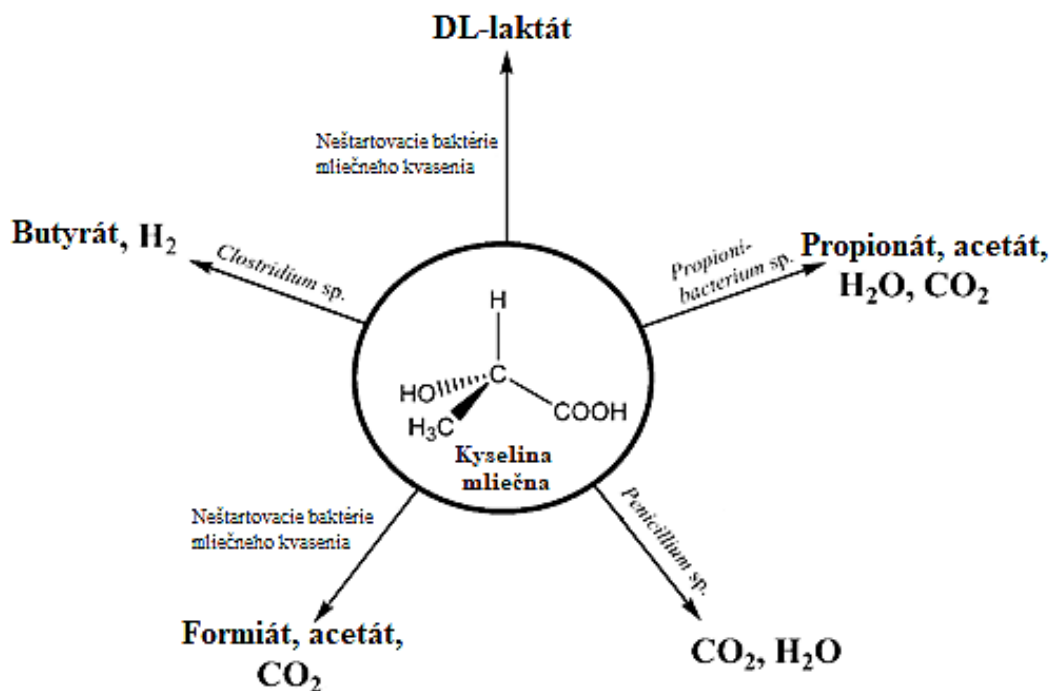
Základným procesom pri zrení väčšiny druhov syrov je metabolizmus laktózy na kyselinu mliečnu. Počas biotechnologického spracovania odchádza prevažná časť laktózy so srvátkou. Laktóza, ktorá zostáva v syre, je metabolizovaná glykolyticky prostredníctvom primárnych zákvasových kultúr (najmä homofermentatívne *Lactococcus* spp.) alebo fosfoketolázovou dráhou (heterofermentatívne *Leuconostoc* spp.) až na pyruvát, ktorý je následne premenený na laktát (D-laktát, L-laktát alebo ich racemickú zmes) [56]. Najbežnejším spôsobom katabolického rozkladu laktózy je homofermentatívne mliečne kvasenie, ktoré prebieha po hydrolyze laktózy na glukózu a galaktózu. Glukóza je fermentovaná priamo na kyselinu mliečnu (laktát), galaktóza sa metabolizuje až po jej enzymatickej premene na glukózu [57].

Glykolýza alebo Embden-Meyerhofova dráha primárne slúži k získaniu energie zo sacharidických molekúl v podobe ATP (adenozíntrifosfát) a zisku energeticky bohatého pyruvátu. Odbúravanie glukózy na pyruvát prebieha v slede desiatich reakcií, ktoré sú katalyzované desiatimi enzýmami. Proces glykolýzy prebieha v troch krokoch: dvojnásobná fosforylácia, dehydrogenácia glyceraldehyd-3-fosfátu a vznik pyruvátu. Samotná glukóza neposkytuje atómy vodíku, preto musí byť za spotreby dvoch molekúl aktivovaná dvojnásobnou fosforyláciou. Enzým hexokináza tvorí za spotreby jedného ATP glukóza-6-fosfát. Po izomerácii na fruktóza-6-fosfát, ktorú katalyzuje fosfoglukozizomeráza, dochádza ku druhej fosforylácii enzýmom fosfofruktokináza na fruktóza-1,6-bisfosfát (najpomalší krok, regulácia metabolizmu). Aldolovým štepením vznikajú dve triózy: dihydroxyacetónfosfát a glyceraldehyd-3-fosfát, ktoré sú na seba prevediteľné vďaka triózafosfátizomeráze, ktorá udržiava ich rovnovážny pomer [33]. Glyceraldehyd-3-fosfát, ako požadovaný zdroj vodíkových atómov, je oxidovaný enzýmom glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza na 1,3-bisfosfoglycerát (jediný oxidačný dej glykolýzy).

Vyrovňavanie spotreby dvoch molekúl ATP pri aktivácii glukózy začína syntézou molekúl ATP za využitia energie z oxidácie. Pre potrebu dehydrogenácie ďalšieho glyceraldehydu je nutná reoxidácia redukovanej formy koenzýmu NAD^+ . Aeróbne MO regenerujú NAD^+ v dýchacom reťazci (nerrelevantné u BMK). Redukciou rôznych organických metabolitov je NAD^+ regenerovaný u anaeróbných MO. 1,3-bisfosfát je fosfoglycerátkínázou prevedený na 3-fosfoglycerát. Prenos fosfoesterovej väzby z tretieho na druhý uhlík katabolizuje fosfoglycerátmutáza. Vzniknutý 2-fosfoglycerát je dehydrogenovaný enolázou na enolpyruvát. Pyruvátkínáza nakoniec preniesie makroergickú väzbu na ADP za vzniku druhej molekuly ATP a tvorby pyruvátu [58].

Fosforyláciou a dehydrogenáciou glukózy sa počas fosfoketolázovej dráhy tvorí 6-fosfoglukonát. Dekarboxyláciou 6-fosfoglukonátu vzniká pentóza-6-fosfát, ktorí je štepený fosfoketolázou na glyceraldehyd-3-fosfát a acetylfosfát. Glyceraldehyd-3-fosfát sa zapája do glykolýzy (popísané vyššie) za vzniku jednej molekuly laktátu [36]. Ak nie je prítomný ďalší akceptor elektrónov, tak dochádza k redukcii acetylfosfátu cez acetylkoenzým A, acetaldehyd až na etanol. Okrem laktátu vzniká aj CO_2 a etanol [37]. NBMK prítomné v syroch holandského typu izomerizujú D-laktát na L-laktát. Racemizácia laktátu výrazne neovplyvňuje senzorické vlastnosti syrov. D-laktát vápenatý je menej rozpustný než L-laktát a môže dôjsť ku kryštalizácii a následnej tvorbe bielych škvŕn (nerozpustný D-laktát) na rezu syra [59].

Obrázok 2 znázorňuje metabolizmus laktátu na ďalšie produkty prostredníctvom rôznych skupín MO. Účinkom *Propionibacterium* spp. vznikajú karboxylové kyseliny (octová, propiónová), oxid uhličitý a voda. Metabolizmus BMK produkuje kyselinu mravenčiu, octovú a oxid uhličitý. Grampozitívne *Clostridium* spp. môžu za anaeróbných podmienok metabolizovať laktát až na kyselinu maslovú a vodík, pričom dochádza k nežiaducemu, tzv. neskorému dureniu syrov (tvorba off-flavouru) [55].



Obrázok 2: Schematicky znázornený metabolizmus laktátu počas zrenia syrov [32]

Pyruvát je metabolickým medziproduktom odbúravania laktózy a zároveň substrátom pre tvorbu mnohých SAL s krátkym reťazcom: biacetyl (butan-2,3-dión), acetaldehyd (etanal), acetoín (3-hydroxybutan-2-ón) a etanol [60], [61], [62]. Všetky vykazujú typickú jogurtovú a maslovú chuť a vôňu [62]. Rozpustený mliečny citrát je odvádzaný spolu so srvátkou. Zostatkový podiel je metabolizovaný BMK a NBMK na acetát a biacetyl; biacetyl má charakteristickú orechovú a maslovú vôňu a ďalej sa metabolizuje na SAL, ako napríklad acetoín, butan-2,3-diol alebo butan-2-ón [54].

2.2.1.2 Lipolýza a tvorba voľných mastných kyselín

Neoddeliteľným zdrojom pre rozvoj správneho flavouru počas zrenia syrov je mliečny tuk. Na tvorbe SAL má rozhodujúci vplyv enzymatická hydrolyza, resp. lipolýza TAG až na MK, glycerol a mono- /di- acylglyceroly. Ku štepeniu esterickéj väzby medzi MK a glycerolom dochádza účinkom lipolytických enzýmov (lipáz) [64].

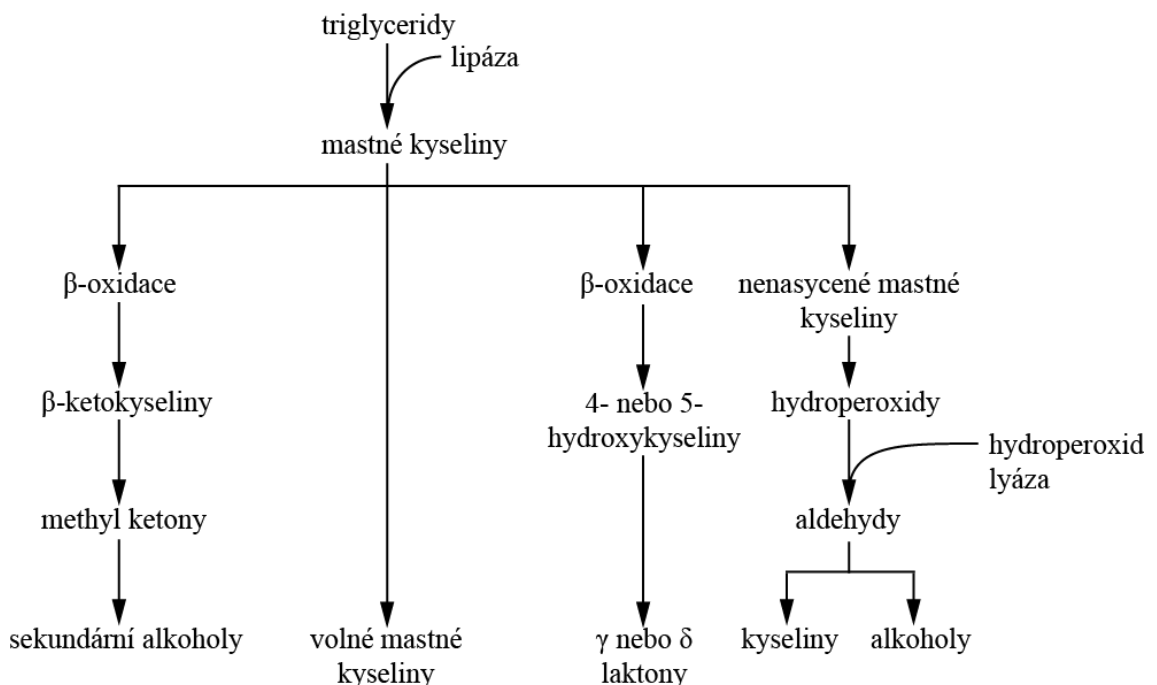
Zdrojmi lipáz sú: mlieko, syridlo, BMK, sekundárne štartovacie kultúry (syry s plesňou), NBMK a exogénne lipázové preparáty. Primárnymi produktmi lipolýzy sú VMK, ktoré sú prekurzormi dôležitých SAL (aldehydy, ketóny, laktóny, alkoholy a estery) [65]. K chuti prispievajú iba MK, ktoré sú vo voľnej, protonovanej forme [66]. VMK udeľujú hlavne štiplavé, ostré, zatuchnuté aróma.

MK s dlhším reťazcom (> 12 uhlíkových atómov) majú vysoké prahy vnímania. Naopak kyseliny s krátkym a stredne dlhým reťazcom s párnym počtom uhlíkových atómov majú nízke prahy vnímania, teda významne ovplyvňujú flavour syru [67], [68]. K odbúraniu MK dochádza pri β -oxidácií po tzv. Lynenovej špirále. Proces začína aktiváciou a transportom VMK z cytozolu do mitochondrie. Ešte predtým VMK penetrujú do cytozolu cez bunkovú membránu pomocou špecifických proteínových prenášačov [69], [70]. Acyl-CoA-ligáza katalyzuje reakciu za prítomnosti ATP a tvorí acyl-CoA a AMP. Na acyl-CoA s dlhým reťazcom je naviazaný karnitín pomocou karnitín-palmitoyltransferázy I. Cez proteínový prenášač karnitínu vo vnútornej mitochondriálnej membráne je následne transportovaný do matrixu mitochondrie.

V matrixu mitochondrie je karnitínový komplex štepený karnitínpalmitoyltransferázou II na acyl-CoA a karnitín, ktorý je späťne prepravený do cytozolu [71]. Krátke reťazce acyl-CoA prechádzajú difúziou cez vnútornú membránu mitochondrie [72]. V druhej fáze nastúpi β -oxidácia, ktorá postupným odštepovaním dvoch atómov uhlíka vytvorí acetyl-CoA. Enzým acyl-CoA dehydrogenáza katalyzuje dehydrogenáciu väzby C2 – C3 za tvorby trans-delta-2-enoyl-CoA. Akceptorom elektrónov je FAD (flavínadenosín dinukleotid), ktorý je redukovaný na FADH₂. Hydratácie vzniknutej dvojnej väzby C2 – C3 za prítomnosti enoyl-CoA hydratázy vzniká L-3-hydroxyacyl-CoA. Enzým 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenáza katalyzuje ďalšiu dehydrogenáciu, tvorí sa 3-ketoacyl-CoA (akceptorom elektrónov je NAD). Nukleofilickou thiolýzou medzi C2 a C3 dochádza k tvorbe acetyl-CoA a o 2 atómy uhlíku kratšiemu reťazcu acyl-CoA. VMK s nepárnym počtom uhlíkov sú oxidované až na propionyl-CoA a acetyl-CoA. Propionyl-CoA je karboxylovaný na D-metylmalonyl-CoA. Táto reakcia zahŕňa kofaktor biotín, ATP a enzým propionyl-CoA karboxylázu.

Enzýmovou konverziou metylmalonyl-CoA epimerázy je D-methylmalonyl-CoA prevedený na L-formu. Intramolekulárnym prešmykom katalyzovaný metylmalonyl-CoA-mutázou (potrebný koenzým B12) dochádza k tvorbe sukcinyl-CoA. Sukcinyl-CoA následne vstupuje do citrátového cyklu a zvyšuje množstvo prítomného cirkulujúceho sukcinyl-CoA. V prípade nadbytku, môže byť sukcinyl-CoA extrahovaný glukoneogenezou do pečene a obličiek. Konverziou fosfoenolpyruvátcarboxylázou je konvertovaný na glukózu [72], [73]. Ku oxidácií nenasýtených MK dochádza využitím dodatočných enzýmov enoyl-CoA-izomeráza a 2,4-dienoyl-CoA-reduktáza. Ak acyl-CoA obsahuje cis- Δ^3 dvojitú väzbu, potom cis- Δ^3 -enoyl-CoA izomeráza konvertuje väzbu na trans- Δ^3 , následne štandardný metabolizmus nasýtených MK s párnym počtom uhlíkov. Ak acyl-CoA obsahuje cis- Δ^4 dvojitú väzbu, tak jeho dehydrogenáciou vzniká 2,4-dienoyl. Ten je redukovaný 2,4-dienoyl-CoA-reduktázou s NADPH na trans- Δ^3 -enoyl-CoA, následne štandardný metabolizmus nasýtených MK s párnym počtom uhlíkov [48]. Podobne ako β -oxidáciu, aj syntézu sprevádza 6 reakcií až po tvorbu palmitovej kyseliny, ktorá je prekursorom SAL. Tieto reakcie sú vykonávané komplexom enzýmov pod označením syntáza MK II (FASII, fatty acid synthase II), ktorá sa nachádza v prokaryotoch, hubách, rastlinách, parazitoch a mitochondriách.

Okrem toho existuje ešte FAS I, ktorú majú zvieratá. FAS I je menej efektívna a pomalšia ako FAS II [74]. Acetyl-CoA:ACP transacyláza aktivuje acetyl-CoA reakciou s malonyl-ACP (acyl carrier proteín, proteínový prenášač acylu). Malonyl-CoA:ACP-transacyláza aktivuje malonyl-CoA. Enzým 3-ketoacyl-ACP-syntáza katabolyzuje predlžovanie reťazca malonyl-ACP.



Obrázok 3: Schéma katabolizmu VMK v syroch [75]

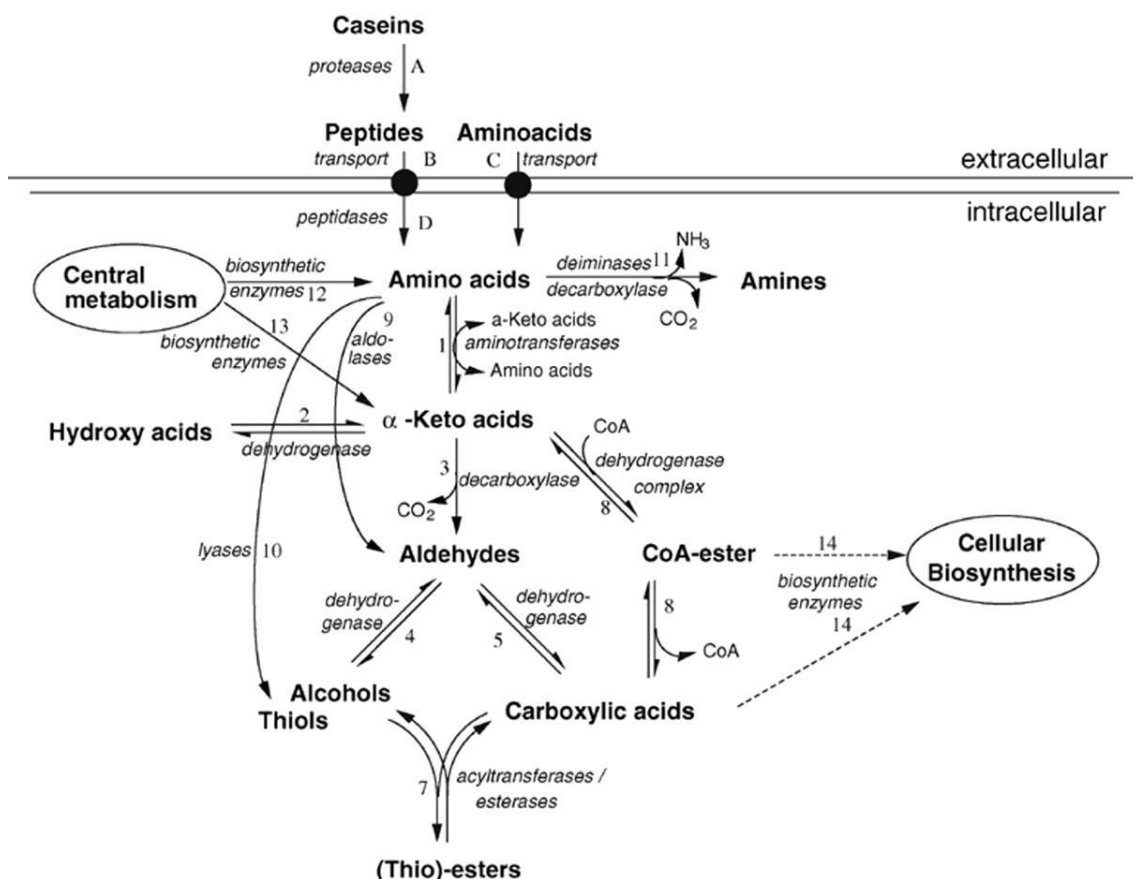
Enzým 3-ketoacyl-ACP-reduktáza za prítomnosti NADPH+H⁺ (nikotínamidadenín-dinukleotidfosfát) redukuje C3 ketónovú skupinu na hydroxylovú skupinu. Následnou dehydratáciou 3-hydroxyacyl-ACP-dehydratázou vzniká dvojná väzba. Dvojná väzba je redukovaná enoyl-ACP-reduktázou na jednoduchú C2 – C3 väzbu.

Reakcie sa opakujú až kým nevznikne kyselina palmitová. Rôznymi elongázami a desaturázami dochádza k predlžovaniu reťazca a tvorbe dvojných väzieb [75], [76].

Konkrétne SAL sú charakteristické pre rôzne druhy syrov. U syrov s modrou plesňou vnútri hmoty a tvrdých talianskych syrov prebieha rozklad TAG veľmi intenzívne, naopak u syrov ako je Čedar alebo Gouda je tento proces mierny a nadmerná intenzita lipolytických reakcií je nežiaduca [77]. Obrázok 3 schematicky znázorňuje súhrnný metabolizmus VMK v syroch [75].

2.2.1.3 Proteolýza a tvorba voľných aminokyselín

Najvýznamnejším a najkomplexnejším metabolickým procesom prebiehajúcim pri zrení syrov je proteolýza. Počas neho sú kazeíny hydrolyzované pomocou enzýmov proteáz na dlhé a stredne dlhé peptidy. Tie sú následne proteinázami a peptidázami štiepené na kratšie peptidy a voľné aminokyseliny (VAK) [76]. Enzýmy prechádzajú zo syridla, mlieka, primárnych a sekundárnych štartérových kultúr, NBMK a exogénnych proteináz a/alebo peptidáz využívaných k akcelerácii zrenia syrov. MO disponujú endopeptidázami, ktoré katalyzujú hydrolýzu väzby vnútri reťazca a exopeptidázami, ktoré odštiepujú koncové VAK. BMK disponujú veľmi komplexným systémom proteináz/peptidáz, ale vykazujú slabú proteolytickú aktivitu. Konečným produktom proteolýzy sú VAK [78].



Obrázok 4: Schéma niektorých biochemických premien aminokyselín vedúcich k tvorbe SAL v syroch [78]

VAK priamo neovplyvňujú vývoj syrovej arómy, prispievajú až prostredníctvom konverzie na SAL ako sú amoniak, amíny, karbonylové zlúčeniny, fenoly, indoly, alkoholy a iné. Intracelulárne enzýmy MO využívajú rozličné prekurzory, napr. kyselinu glutámovú, leucín, metionín a iné. Metabolizmus aminokyselín je veľmi zložitý proces (Obrázok 4). Nežiaduca horká chuť môže byť spôsobená hydrofóbnymi peptidmi a celou radou ďalších látok, napr. aminokyseliny, amíny, substituované amidy, ketóny s dlhým reťazcom a niektoré MAG. Off-flavour spôsobujú okrem iného aj zlúčeniny vznikajúce Streckerovými reakciami ako sú fenylacetaldehyd, fenyletanol, 3-metylbutanol, fenol a p-kresol [79]. Vo väčšine prípadov sú VAK pomocou intracelulárnych enzýmov premenené na SAL. Rozvetvené aminokyseliny (leucín, izoleucín, valín), obsahujúce síru (metionín) a aromatické (fenylalanín, tyrosín, tryptofán) sú prekurzory dôležitých SAL, ako sú aldehydy, alkoholy, MK, estery a zlúčeniny síry [80].

Dekarboxyláciou aminokyselín vzniká príslušný amín za uvoľnenia CO₂. Koncentrácia amínov a biogénnych amínov závisí na typu syra a na prítomnosti MO. Biogénne amíny, vyskytujúce sa v syroch sú, napr. tyramín, putrescín, kadaverín a histamín, ktoré vznikajú dekarboxyláciou príslušných aminokyselín: tyrozín, arginín, lyzín a histidín. Ďalšie amíny sú metylamín, etylamín, n-propylamín, izopropylamín, etanolamín, detylamín, dibutylamín.

Amidy sú acetamid, propionamid, isobutyramid alebo isovaleramid, ktorých deamináciou vznikajú príslušné aldehydy [81]. Pri deaminácii VAK vznikajú α -ketokyseliny a zároveň sa uvoľňuje amoniak, účinkom deamináz za prítomnosti NAD⁺. Charakteristickú arómu syru má α -keto-3-metylbutanová kyselina a α -keto-3-metylpentanová kyselina. Ďalšími činiteľmi deaminácie sú oxidázy využívajúce ako akceptor elektrónu kyslík, vznikajú aldehydy a amoniak. Oxidatívnou deamináciou môžu vznikáť okrem amoniaku a aldehydov (Streckerova reakcia) tiež MK (isovalérová, isomaslová). Transamináciou vznikajú z aminokyselín α -ketokyseliny, ktoré slúžia ako prekurzory pre SAL. Preto sú pravdepodobne limitujúcim krokom vo vývoji chute a vône. Streckerovými reakciami môžu z aminokyselín fenylalanínu, leucínu/izoleucínu, valínu a metionínu vznikáť fenylacetaldehyd, isobutanal, metionál a 3-metylbutanal.

Pri dehydrogenácii dochádza ku konverzii α -ketokyselín na hydroxykyseliny. Rozkladom aromatických aminokyselín lyázami vzniká fenol, indol, metántiol. Premenu sírnych aminokyselín (metionín, cysteín) vznikajú prchavé sírne zlúčeniny zodpovedné za charakteristické aróma mnohých syrov, napr. metántiol, dimetyldisulfid, dimetyltrisulfid majú výrazné cesnakové aróma, po veľmi zrelom syre, v niektorých prípadoch po varených zemiakoch alebo pokazených uhorkách [81].

Z produktov metabolizmu aminokyselín s rozvetveným reťazcom sú významné SAL: 3-metylbutanal, 2-metylbutanal a 2-metylpropanal. Väčšinou sa v syroch vyskytujú prechodne, z dôvodu rýchlej redukcie na odpovedajúce alkoholy alebo oxidované na kyseliny. Aldehydy a ketóny majú často nežiaduci vplyv na flavour syrov a spôsobujú ich vady. Napr. zvýšená koncentrácia 3-metylbutanal a 3-metylbutanolu spôsobuje chuť a vôňu po sladku. Zvýšená koncentrácia 3-metylbutanal a 3-metylpropanal spôsobuje drsný a nepríjemný off-flavour. MK vznikajúce týmto spôsobom, sú zodpovedné za sladkú, ovocnú, voskovú, jablčnú, spálenú a nahnúť arómu syrov. Reakciami sacharidov a aminokyselín/iných dusíkatých látok, vznikajú látky na báze pyrazinov, ktoré tiež prispievajú k charakteristickým sensorickým vlastnostiam syrov [55].

Tabuľka 11: Niektoré senzorycky aktívne látky identifikované v syroch a ich charakteristická aróma [82]

Skupina	Zlúčenina	Charakteristická aróma
Alkoholy	bután-1-ol	kvetinové, ovocné, sladké
	petán-1-ol	ovocné, alkoholové, zelené
	bután-2-ol	alkoholové
	2-metylbután-1-ol	alkoholové, zelené
	2-metylpropán-1-ol	alkoholové, ovocné
	pentán-2-ol	čerstvé
	propán-2-ol	sladké, ovocné
	3-metylbut-2-én-1-ol	syrové, ovocné, zelené
	etanol	suché, jemné, alkoholové
	hexanol	tukové, kvetinové, trávové
	fenyletanol	růžové
	bután-1,3-diol	ovocné
	okt-1-én-3-ol	hubové, zemité, plesňové
	oktán-2-ol	hubové, orieškové, olejové
	bután-1,3-diol	neurčené
	metanol	neurčené
	fenol	neurčené
Aldehydy	2-metylpropanál	sladové, zelené, kvetinové
	3-metylbutanál	sladové, čokoládové
	2-metylbutanál	sladové
	fenylacetaldehyd	kvetinové, medové
	acetaldehyd	ostré, prenikavé, ovocné, trávové
	benzaldehyd	horké, mandľové
	pentanál	penikavé, medové
	hexanál	trávové
	heptanál	olejové, tukové, trávové, bylinné
	nonanál	trávové, zelené, zvieracie
	dekanál	zelené, orechové
	nonen-2-ál	senné, trávové
2,4-dekadienál	smažené	

Tabuľka 11: Niektoré senzorycky aktívne látky identifikované v syroch a ich charakteristická aróma [82] - pokračovanie

Skupina	Zlúčenina	Charakteristická aróma
Aldehydy	butanál	neurčené
	tetradekanál	neurčené
	hexadekanál	neurčené
	2,4-heptadienál	neurčené
Ketóny	acetón	senné
	butan-2-ón	éterové, karamelové
	hexan-2-ón	ovocné
	heptan-2-ón	mastné, zelené
	nonan-2-ón	kvetinové, broskyňové, horké mlieko
	undekan-2-ón	plesňové, kvetinové, ovocné
	biacetyl (butan-2,3-dión)	trávové
	okt-1-én-3-on	maslové, syrové, karamelové
	pentán-2-ón	sladové, ovocné
	tridekán-2-ón	kozie
	pentadekan-2-ón	vlhké
	3-hydroxy-2-butanón (acetoín)	maslové
	dekan-2-ón	neurčené
	dodekan-2-ón	neurčené
	acetofenón	neurčené
	pentán-2,3-dión	neurčené
1-hydroxypropan-2-ón	neurčené	
Estery	etyl acetát	ovocné, ananásové
	etyl butanoát	sladké, ovocné, trávové
	etyl hexanoát	mladý syr, ovocné
	etyl oktanoát	ovocné, karamelové
	etyl dodekanoát	kvetinové
	butyl acetát	hruškové
	metyl acetát	neurčené

Tabuľka 11: Niektoré senzorycky aktívne látky identifikované v syroch a ich charakteristická aróma [82] - pokračovanie

Skupina	Zlúčenina	Charakteristická aróma
Estery	etyl dekanoát	neurčené
	etyl tetradekanoát	neurčené
	etyl hexadekanoát	neurčené
Mastné kyseliny	octová	octové, kyslé, kvetinové, trávové
	propánová	penikavé, štipľavé, spálené, syrové
	butánová (maslová)	maslové, zatuchnuté, ostré
	hexánová	ostré, kozie
	oktánová	spálené, voskové
	nonánová	kozie
	dekánová	syrové, kozie, masné
	dodekánová	mydlové, horúce mlieko
	tetradekánová	sladké, trpké
	2-metylpropánová	maslové, sladké, jablkové
	2-metylbutánová	syrové
	3-metylbutánová	syrové
	undekánová	neurčené
	hexadekánová	neurčené
Zlúčeniny síry	metántiol	sírne, kapustové, cibul'ové, cesnakové
	dimetylsulfid	
	dimetyltrisulfid	
Laktóny	γ -nonalaktón	kokosové
	γ -undekalaktón	
	cis- γ -6-dodekalaktón	broskyňové
	γ -dekalaktón	broskyňové, citrusové
	δ -dekalaktón	broskyňové, kokosové
	δ -oktalaktón	broskyňové, kokosové
	δ -dekalaktón	kokosové, masné
	δ -dodekalaktón	masné, maslové, mliečny tuk
	δ -undekalaktón	neurčené
	δ -tetradekalaktón	neurčené

Tabuľka 11: Niektoré sensoricky aktívne látky identifikované v syroch a ich charakteristická aróma [82] - pokračovanie

Skupina	Zlúčenina	Charakteristická aróma
Laktóny	δ -hexadecalaktón	neurčené
Terpény	α -pinén	borovicové, trávové
	limonén	citrusové
	β -linalool	sladké, kvetinové

2.2.2 Hlavné skupiny sensoricky aktívnych látok v syroch

2.2.2.1 Alkoholy

Dráhy zodpovedné za biosyntézu alkoholov zahŕňajú metabolizmus laktózy a citrátu, katabolizmus aminokyselín a degradačné reakcie niektorých MK (kyselina linolová a linolénová). Ďalšou možnosťou je redukcia odpovedajúcich prekurzorov. Redukciou metylketónov vznikajú sekundárne alkoholy, hlavne propán-2-ol, bután-2-ol, oktán-2-ol a nonán-2-ol, ktoré sú typickými zložkami flavouru syrov s plesňou, rovnako ako ich príslušné karbonyly [66], [16].

Fenolické látky majú pri koncentráciách blízkych prahu vnímania taktiež pozitívne vplyvy na aróma syrov, avšak s ich zvyšujúcim sa obsahom väčšinou dochádza ku tvorbe nepríjemných pachutí. Sensorický popis flavouru týchto látok obvykle používa výrazy ako „sladký, aromatický, karamelový“, resp. až „ostrý, dymový a spálený“ [16]. Kľúčovou zložkou arómy všetkých syrov (tvrdých aj mäkkých) je alkohol 1-oktén-3-ol, ktorý vzniká rozkladom kyseliny linolovej a linolénovej. Sekundárne alkoholy sú v syroch tvorené enzýmovou redukciou metylketónov. Významné SAL sú propán-2-ol, bután-2-ol, oktán-2-ol a nonán-2-ol. Tieto alkoholy sú typické pre mäkké plesňové syry [16].

2.2.2.2 Aldehydy

β -oxidáciou nenasýtených MK vznikajú aldehydy s nerozvetveným reťazcom (butanál, pentanál, hexanál a nonanál). Tieto aldehydy môžu pri vyšších koncentráciách spôsobovať nežiadúcu a nepríjemnú arómu. Sú charakterizované ako aróma zelenej trávy, resp. čerstvo pokosenej trávy alebo bylín. Najčastejšie vyskytujúcim sa aldehydom je hexanál, ktorý je charakteristický pažitkovou arómou, prípadne arómou nezrelého ovocia [54].

Biosyntéza aldehydov zahrňuje predovšetkým β -oxidáciu nenasýtených MK a katabolizmus aminokyselín. Acetaldehyd vzniká aj z pyruvátu pri metabolizme laktózy a citrátu. V syroch sa vyskytujú iba prechodne, pretože počas zrenia dochádza k ich rýchlej redukcii na alkoholy alebo oxidácii na príslušné kyseliny [83]. Aldehydy s priamym reťazcom (butanál, pentanál, hexanál, nonanál) vykazujú arómu po čerstvo posekanej zelenej trávě a bylinách. Pri vyšších koncentráciách je ale ich aróma nepríjemná, a preto je prítomnosť týchto látok skôr nežiaduca [84].

Ku najvýznamnejším aldehydom s rozvetveným reťazcom patria 2-metylpropanál, 2-metylbutanál a 3-metylbutanál. Tvorí sa degradáciou valínu, isoleucínu a leucínu, a okrem iných deskriptorov je možné pre ich popis použiť pojmy ako „sladkastá aróma“ alebo „vôňa zelenej trávy a sladu“. Hrajú taktiež ústrednú rolu v orieškovej príchuťi Čedaru [85], [86].

2.2.2.3 *Ketóny*

Ketóny sa ako SAL vyskytujú vo väčšine mliečnych výrobkov. Majú veľmi nízke prahy vnímania. Na typickej aróme a chuti syrov sa podieľajú hlavne metylketóny, biacetyl, acetoín a okt-1-én-3-ón [16].

Práve metylketóny je možné považovať za kľúčové SAL plesňových syrov. Pochádzajú z β - oxidácie VMK a vytvárajú ovocnú, kvetinovú, poprípade pri vyšších koncentráciách až nepríjemne zatuchnutú arómu [16]. Najviac zastúpeným diketónom v syroch (predovšetkým u Camembertov, Čedaru a Ementálu) je biacetyl, ktorý je klasicky spojovaný s metabolizmom laktózy a citrátu. Významne prispieva k maslovej chuti a sladkej, karamelovej a orieškovej aróme. Jeho redukcia poskytuje ďalšie aromatické ketóny – acetoín (3-hydroxybután-2-ón) a bután-2-ón [87], [88]. Hubovitá, zemitá či plesňová aróma 1-oktén-3-olu môže byť zvýšená prítomnosťou ketónu 1-oktén-3-ónu [78].

2.2.2.4 *Karboxylové kyseliny*

Ako SAL sa uplatňujú aj karboxylové kyseliny. Jedná sa o produkty hydrolytickej aktivity lipáz pri rozklade mliečneho tuku, katabolizmu aminokyselín alebo iných reakcií (hlavne oxidácie) príslušných prekursorov [66].

VMK s dlhým reťazcom (>12 atómov uhlíka) vďaka svojim vysokým prahom vnímania hrajú skôr vedľajšiu úlohu pri tvorbe arómy syrov. Na druhej strane kyseliny s krátkymi a stredne dlhými reťazcami majú podstatne nižšie prahové hodnoty, aj keď v porovnaní s inými SAL sú tieto limity stále veľmi vysoké. S výnimkou kyseliny valérovej nemá žiadna iná kyselina arómu podobnú vôni syru. Pri vyšších koncentráciách a v izolovanom stave sú špecifické chute a vône týchto kyselín (C4:0 – C12:0) často opisované skôr negatívne. Napriek tomu pri nízkych koncentráciách a v správnej rovnováhe s ostatnými SAL sa významne podieľajú na tvorbe žiadúceho flavouru mnohých typov syrov [16]. Intenzita chuti VMK závisí nielen na koncentrácii, ale taktiež na ich distribúcii medzi vodnou a tukovou fázou, prítomnosti určitých katiónov (napr. Na^+ , Ca^{2+}) a ďalších faktoroch. Významnú úlohu má aj pH, keďže iba protónovaná forma karboxylovej kyseliny je prchavá a má tak prínos k syrovému flavouru. Pri syroch s vysokým pH je tak prevažná časť kyselín vo forme solí, v dôsledku čoho je aromatický efekt MK pri neutralizácii značne potlačený [85]. MK odvodené od aminokyselín s rozvetveným uhlíkovým reťazcom (2-metylbutánová, isomaslová, izovalérová) sú charakteristické „spoteným, hnilým a zatuchnutým“ pachom. Pri vyšších koncentráciách môžu mať škodlivý efekt na výslednú arómu. Oproti tomu kyseliny, ktoré majú na konci uhlíkového reťazca naviazaný aromatický kruh, sú zodpovedné za ovocné, kvetinové a ďalšie príjemné vône [44].

Octová a propánová kyselina majú typický octový zápach; maslová kyselina vytvára zatuchnutú a tvarohovú arómu; hexánová kyselina má štipľavú arómu. MK sú dôležité pri tvorbe senzorického profilu syrov, avšak ich vyššia koncentrácia vedie k off-flavouru [61]. Aróma kyseliny 3-metylbutánovej je opisovaná ako nepríjemná, nechutná, skazená, „spotená“ (angl. sweaty) a je súčasťou flavouru zreých syrov [78].

2.2.2.5 Estery

Dôležitými produktami metabolizmu MK sú estery. Esterifikačné reakcie prebiehajú medzi VMK s krátkym a stredne dlhým uhlíkovým reťazcom a primárnymi a sekundárnymi alkoholmi z fermentácie laktózy alebo z aminokyselín (najbežnejšie s etanolom, metanolom). Charakteristická aróma esterov v syre je sladká a kvetinová. Veľké množstvo etylesterov je spôsobené prevládajúcim alkoholom etanolom v syroch [27]. Estery sú bežnými prchavými látkami v syroch. Ich typ a koncentrácia sa medzi jednotlivými druhmi syra podstatne líši, u niektorých (napr. Čedar) je ich prítomnosť až nežiaduca [66]. Prevažná časť z nich sa vyznačuje nízkym prahom vnímania, čo znamená, že aj keď sú prítomné v nízkych koncentráciách, môžu významne prispievať k celkovej aromatickej rovnováhe syrov. Tú ovplyvňujú aj synergické interakcie medzi rôznymi esterami, poprípade medzi esterami a inými prchavými zlúčeninami aj v koncentráciách pod prahom vnímania [84]. Väčšina esterov identifikovaných v syroch sú označované ako „sladké, ovocné a/alebo kvetinové“. Hlavne etylestery, ktoré sa vyskytujú zo všetkých esterov najčastejšie, sú známe svojou dôležitou úlohou pri formovaní ovocného charakteru [88]. Estery prispievajú k celkovej aróme syrov taktiež tým, že minimalizujú ostrosť a horkosť spôsobenú prítomnosťou určitých VMK a amínov, alebo dokážu potlačovať nepríjemné chute niektorých metylketónov [32]. Procesu esterifikácie sa okrem alkoholov môžu zúčastňovať aj tioly (hlavne metántioly) za vzniku odpovedajúcich tioesterov. S-metyltioestery vykazujú syrovú arómu, ale taktiež chuťový nádych vareného karfiolu, cibule a cesnaku [89].

2.2.2.6 Laktóny

Laktóny sú cyklické zlúčeniny tvorené intramolekulárnou esterifikáciou hydroxykyselín. Aj keď ich aróma nie je „syrová“, môžu prispievať k flavouru väčšiny syrov. Niektoré štúdie uvádzajú, že sa podieľajú na maslovom charakteru syru. Ak ich porovnáme s inými SAL, majú laktóny veľmi nízke prahy vnímania. U γ -laktónov sú tieto limity nižšie než u δ -laktónov. Laktóny s kratším uhlíkovým reťazcom majú prah vnímania dokonca ešte nižší, napr. γ -oktalaktón, γ -dekalaktón, γ -dodekalaktón sú rozpoznateľné pri obsahu od 7 do 11 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ vo vode. Celkovo sa γ - a δ -laktóny vyznačujú veľmi výraznými, predovšetkým ovocnými tónmi („broskyňový, marhuľový, kokosový“) [16]. Najčastejšie sa v syroch nachádzajú γ - a δ -laktóny, ktorú sú identifikovateľné výraznou arómou (napr. broskyne, marhule, kokos, maslo). Majú nízke prahy vnímania a prispievajú k celkovému flavouru [39]. Nevyhnutné sú pre charakteristický flavour syrov typu Gouda a Ementál; δ -dekalaktón je kľúčovým odorantom syru Hermelín [78].

2.2.2.7 *Sírne zlúčeniny*

Sírne zlúčeniny patria medzi významné látky s nízkymi prahmi vnímania, ktoré spolu s inými zlúčeninami poskytujú veľmi žiadúcu silnú hlbokú chuť. Pre ich vznik je kľúčová degradácia metionínu. K typickým zástupcom tejto skupiny patria metional, metántiol a organické sulfidy, ktoré zodpovedajú predovšetkým za vône „varených zemiakov, kapusty, karfiolu, cibule a cesnaku“. Medzi sírne zlúčeniny patria aj tioestery, ktoré boli bližšie popísané v kapitole 2.2.2.5 [90].

2.2.3 **Senzoricky aktívne látky v syroch ementálskeho typu**

Ako už bolo zmienené, o syroch typu Moravský bochník bolo nájdené minimum informácií, preto bola v rámci rešerše venovaná pozornosť všeobecne syrom ementálskeho typu, ku ktorým by sa mal Moravský bochník zo senzorického hľadiska najviac podobáť. Chuť a vôňa syra sú mandľovo sladkasté, čisté, viac aromatické s rastúcim vekom syra. Ku vzniku charakteristického jemného orieškového flavouru prispievajú VMK s krátkym reťazcom uvoľnené lipolýzou mliečneho tuku a tvorbou kyseliny octovej a propiónovej pri propiónovom kvasení. V tvrdých syroch ementálskeho typu sa vyskytujú predovšetkým niektoré estery (etyl butanoát, etyl 3-metylbutanoát) a rôzne kyseliny (maslová a propiónová). U syrov vyrobených pomocou baktérií propiónového kvasenia sú dôležitými SAL kyselina propiónová, metyl-thioacetát, laktóny (δ -dekalaktón) a amíny. Ketón 2-heptanón patrí medzi kľúčové SAL v syre Ementál; rovnako aj oct-1-én-3-ón, ktorý má hubovitú arómu. Biacetyl, ktorý je tvorený metabolizmom pyruvátu, je charakterizovaný maslovou a orechovou arómou. Ďalšou kľúčovou SAL je 4-hydroxy-2,5-dimetyl-3(2H)-furanón (furaneol), ktorý je tvorený tepelnou degradáciou fruktózy alebo 6-deoxyhexóz v prítomnosti amínov a aminokyselín (Maillardova reakcia). Taktiež 5-etyl-4-hydroxy-2-metyl-3(2H)-furanón sa podieľa na tvorbe syrovej a orechovej arómy Ementálu. Z dusíkatých zlúčenín je dôležitý skatol. Zo sírnych zlúčenín je najčastejšie sa vyskytujúcim metionál (3-metylthiopropanál), ktorý vzniká Streckerovou degradáciou; charakteristický arómou varených zemiakov a štipľavým zápachom [66]. Rychlík a Bosset [91] identifikovali metyltiol, dimetylsulfid a etyl-2-metylbutanoát ako kľúčové zlúčeniny vo švajčiarskom syre Gruyere.

Thierry a kol. [92] skúmali vplyv použitej propiónovej kultúry na prchavé látky ementálskych syrov. MK s krátkym uhlíkovým reťazcom (octová, propiónová, maslová, hexánová a isovalérová) a estery (estery octovej a propiónovej kyseliny) boli zistené ako hlavné látky pravdepodobne produkované propiónovými baktériami.

2.2.4 **Senzoricky aktívne látky v syroch eidamského typu**

Syry eidamského typu alebo eidamské syry majú v porovnaní s inými druhmi syrov skôr veľmi mierne, až nevyrazné aróma. To je výsledkom rovnováhy medzi látkami vznikajúcimi pri komplexných biochemických dejoch v priebehu zrenia, na ktoré má vplyv celý rad faktorov. V dôsledku odstránenia pôvodnej mikroflóry mlieka procesom pasterizácie, dozrievajú syry pomalšie a rozvíja sa menej intenzívny flavour, než u syrov zo surového mlieka [25]. Navyše je výrazne inaktivovaná aj lipoproteínová lipáza, ktorá by inak prispievala k rozsiahlej lipolýze, resp. ku tvorbe prekursorov ďalších SAL. Všeobecne používané baktérie pri výrobe eidamských syrov nedisponujú enzymatickými systémami pre rozsiahly rozklad tukov a VMK [93].

Práve preto je lipolýza u týchto syrov odlišná a menej výrazná, aj keď jej vplyv nie je zanedbateľný [93]. Dominantnou cestou produkcie prchavých SAL je katabolická konverzia aminokyselín uvoľnených pri proteolýze [25]. Chuť a vôňa by mali byť jemne syrové (nie príliš výrazné), jemne mliečne kyslasté (hlavne u syrov s nižším obsahom tuku), mierne slané, sladkasté. Mladé syry majú jemnú, maslovú, mierne fondánovú, alebo ľahko horko-mandľovú, alebo orieškovú chuť a postupným zretím získavajú plnšiu a výraznejšiu chuť [27].

Ku kľúčovým SAL, ktoré bývajú u eidamských syrov najčastejšie identifikované vo významných koncentráciách, patria 2-metylpropanál, 2- a 3- metylbutanál, poprípade od nich odvodené alkoholy alebo kyseliny, ďalej hexanál, metántiol, dimetylsulfid a dimetyltrisulfid, biacetyl, kyselina octová, kyselina maslová, δ -dekalaktón, etyl butyrát a D-limonén [78]. Zlúčeniny 2-metylpropanál, 2- a 3-metylbutanál, ktoré vznikajú ako produkty degradácie aminokyselín s rozvetvenými reťazcami, sú spájané s vôňou „zelené a sladú“, ale v nižších koncentráciách prispievajú k príjemným ovocným tónom [79]. Redukciou sa z nich tvoria alkoholy (2-metylpropán-1-ol, 2-metylbután-1-ol a 3-metylbután-1-ol), ktoré majú vplyv na ovocnú a alkoholovú arómu, naopak ich kyseliny (isomaslová, 2-metylmaslová a isovalérová) sú zodpovedné za „spotené, fekálne, hnilobné“ a ďalšie nepríjemné pachy [78]. Hexanál, ktorý je charakteristický predovšetkým vôňou trávy a bylín, vzniká pravdepodobne pri β -oxidácii nenasýtených MK [66]. Odbúravaním sírnych aminokyselín, predovšetkým metionínu, dochádza k produkcii metántiolu, ktorý môže byť následne oxidovaný enzymaticky či chemicky za vzniku organických sulfidov, u Eidamu hlavne už spomenutého dimetylsulfidu a dimetyltrisulfidu. Tieto zlúčeniny síry sú spájané s výraznou arómou kapusty, cibule, cesnaku a karfiolu [44].

Biacetyl (bután-2,3-dión) je jedným z najdôležitejších diketónov a zároveň kľúčovou SAL holandských syrov. Táto látka vzniká prevažne z pyruvátu pochádzajúceho z metabolizmu laktózy a citrátu, hlavne vďaka aktivite citrát-pozitívnych BMK, a je nápadná svojou maslovou, orechovou a karamelovou arómou [93].

Typickým ostrým, kyslým zápachom sa vyznačuje kyselina octová, ktorá je výsledkom metabolizmu citrátu, kyseliny mliečnej, katabolizmu alanínu, serínu alebo treonínu [83]. Zatuchnutý, fekálny, spotený, hnijúci, nepríjemný, ostrý a kyslý zápach je charakteristický pre najviac zastúpenú VMK v syroch holandského typu – kyselinu maslovú. Táto kyselina je v nižších koncentráciách kľúčovou zložkou syrovej arómy a súčasne prevládajúcou VMK v syroch eidamského typu [93], [95], [96]. Preto je v týchto syroch podľa očakávania najviac zastúpeným esterom etyl butyrát, ktorý má charakteristickú kvetinovú, sladkú a ovocnú vôňu [97].

Rovnako sladkou, kvetinovou alebo ovocnou arómou, pripomínajúcou napr. broskyne, ale taktiež je často spájaný s kokosovou vôňou, je δ -dekalaktón, ktorý vzniká intramolekulárnou esterifikáciou hydroxykyselín [98]. Ku terpenoidom patria cyklický terpén D-limonén, ktorý sa do mlieka a následne do syru dostáva ako súčasť stravy dojníc. Pre jeho popis sa používajú deskriptory ako „mäťová“ alebo „zelená tráva“ [93].

2.3 Používané metódy a experimentálne techniky

Syrový flavour je kritickým znakom kvality a senzorická analýza je najlepšou metódou k jeho určeniu. Na druhej strane, inštrumentálne techniky majú väčšinové zastúpenie pri identifikácii a kvantifikácii SAL, keďže majú nespočetné množstvo výhod: rýchlosť, možnosť vyhodnocovania veľkého počtu vzoriek, nízka cena, jednoduché (často automatizované) prevedenie, dobrá opakovateľnosť, nízka chybovosť, pomerne jednoduché spracovanie výsledkov [42].

Hlavnou náplňou tejto dizertačnej práce tvorí stanovenie SAL a MK ako hlavných zložiek flavouru a markerov priebehu zrenia eidamských a ementálskych syrov. Nasledujúce kapitoly sú zamerané na prehľad metód a inštrumentálnych techník vhodných pre ich stanovenie. V oboch prípadoch je najprv nevyhnutná ich izolácia z matrice syra a prípadne niektoré ďalšie kroky (viď ďalej) v rámci prípravy vzorky k analýze, ktorá je prevádzaná na plynovom chromatografe (GC) s plameňovo-ionizačným detektorom (FID) alebo hmotnostným spektrometrom (MS) [99], [100].

2.4 Metódy izolácie senzoricky aktívnych látok v syroch

Aj keď v dnešnej dobe sú k dispozícii najmodernejšie separačné a detekčné metódy, prevažná väčšina z nich neumožňuje priame stanovenie niektorých analytov vo vzorkách potravín bez nutnosti ich prvotnej izolácie z komplexnej matrice a skoncentrovaniu. Práve voľba metódy úpravy vzorky výrazne ovplyvňuje spoľahlivosť a presnosť analýzy. Rovnako je tomu aj pri SAL, pre ktoré sa pri kvalitatívnom a kvantitatívnom stanovení často používa plynový chromatograf s hmotnostným spektrometrom (GC-MS) [100].

Inštrumentálne metódy sa primárne využívajú ku stanoveniu prchavých SAL, ale taktiež k meraniu neprchavých chuťových zlúčenín (napr. horké peptidy, chlorid sodný, kyselina mliečna, laktóza, aminokyseliny, a iné SAL) [101]. Syrové SAL sú často v nízkych, až stopových koncentráciách, sú hydrofóbne, heterogénne distribuované [102]. Začiatkom je výber vhodnej analytickej metódy pre ich izoláciu z matrice syra. Za účelom dosiahnutia praktickej a spoľahlivej izolácie SAL z matric vzoriek heterogénnej povahy bolo vyvinutých niekoľko extrakčných a destilačných metód. Napriek tomu, pri väčšine spomenutých metód sú potrebné niekoľko stupňové postupy náchylné ku strate analytov. Spravidla sa každým ďalším krokom v analytickom postupe zvyšuje pravdepodobnosť vzniku analytickej chyby, z čoho vyplýva, že je žiadúce minimalizovať počet krokov pri príprave vzorky bez zníženia kvality analýzy [103] - [104]. Pre extrakciu a izoláciu prchavých zlúčenín zo vzorky sa používajú v súčasnosti rôzne metódy. Bežné metódy, ako parná destilácia, extrakcia rozpúšťadlom a/alebo zachytenie prchavých látok na sorbentoch, však majú radu nevýhod: sú časovo náročné, vyžadujú veľké objemy vzorky a rozpúšťadla, môžu nežiadúcim spôsobom meniť niektoré analyty vplyvom vysokej teploty alebo použitého rozpúšťadla, príp. môže dôjsť ku stratám niektorých prchavých zlúčenín [115]. Okrem toho, využívanie veľkých objemov rozpúšťadiel vplyva na stopovú analýzu, predstavuje zdroj environmentálneho znečistenia, zdravotné riziko pre laboratórny personál a navýšenie financií na prevádzku čističiek odpadov [99]. V ideálnom prípade má byť extrakčný proces jednoduchý, rýchly (80 % času analýzy sa strávi nad prípravou vzorky), lacný, selektívny (nutnosť separácie čo najväčšieho množstva možných interferujúcich látok), kvantitatívny a umožňujúci automatizáciu.

Podmienky majú byť mierne k zabráneniu oxidačných, tepelných a akýchkoľvek iných zmien vzorky [56]. Preto sa dnes klasické techniky často nahradzujú novými, napr. extrakcia a mikroextrakcia pevnou fázou, mikrovlnná extrakcia, extrakcia superkritickou tekutinou, vysokotlaková extrakcia rozpúšťadlom. Tieto nové extrakčné techniky vyžadujú minimálne množstvo vzorky, sú menej časovo náročné, automatizovateľné a vhodné pre on-line zapojení so separačnými technikami [56], [99].

Avšak, rôzne extrakčné metódy zachytia iba určitú časť z celkového obsahu prítomných prchavých zlúčenín, čo môže viesť k odlišným výsledkom a je otázkou, ktorá z metód poskytne najviac reprezentatívnu zmes SAL, teda najviac sa blížiacu vnímaniu v ústach [116]. Kritériom bezchybnej izolácie a skoncentrovania aromatických látok je senzorické porovnanie výsledného produktu s koncentrátom. Iba vtedy, keď sa zachová typický pach, je možné vylúčiť hrubé zmeny vzorky [117].

2.5 Extrakčne-destilačné metódy

Pri extrakčných metódach dochádza ku miešaniu dvoch nemiesiteľných fáz. Izolované zlúčeniny sú následne separované a koncentrované do malého objemu extrakčného činidla. Delenie prchavých a neprchavých látok na základe rozdielneho bodu varu je princípom destilačných techník. Extrakčne-destilačné metódy sú jednoduché, nenáročné, s dobrou opakovateľnosťou.

Izoláciu však komplikuje rad faktorov: SAL majú široké rozmedzie bodov varu, od izbovej teploty až $> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ [99], mnoho je nestabilných a ľahko podliehajú oxidačnej a tepelnej degradácii, sú často intracelulárne a je nutné rozrušenie vzorky [56], [117].

2.5.1 Extrakcia rozpúšťadlom

Klasická, ale v súčasnosti najmenej využívaná metóda (podľa množstva publikácií), je extrakcia rozpúšťadlom (SE – Solvent Extraction). Ide o separačnú metódu, pri ktorej analyt prechádza zo zmesi látok v kvapalnej alebo tuhej fáze do inej kvapalnej fáze, vhodného rozpúšťadla [118]. Pre extrakciu prchavých látok zo syrových matric je táto klasická metóda využívaná menej a skôr na ústupe oproti SPME a SFE. Z novších publikácií možno uviesť Domagalu a kol. [119], ktorí extrahovali VMK z rôznych druhov syrov (napr. Ementál, Gouda, Parmezán, Camembert) pomocou zmesi rozpúšťadiel chloroform:metanol (2:1, v/v). Alewijn a kol. [27] extrahovali SAL zo vzoriek syru Gouda pomocou acetonitrilu. Gratzionis a kol. [120] použili pre analýzu syrov s modrou plesňou techniky SE a SPME v spojení s GC-MS. Po izolácii pomocou dichlórmetánu bolo identifikovaných 11 zlúčenín, zatiaľ čo metódou SPME 29 zlúčenín.

2.5.2 Vysokotlaková extrakcia rozpúšťadlom

Hlavnou výhodou PFE (Pressurized Fluid Extraction) je lepší (oproti SE) prenos analytov do rozpúšťadla, vyššia sila a nižšia spotreba rozpúšťadla. Extrakcia je prevádzaná pri teplotách $50 - 200\text{ }^{\circ}\text{C}$ a tlakoch do 20,7 MPa. Tým sa výrazne zvyšuje extrakčná účinnosť, na druhej strane je možné pracovať iba s tepelne stabilnými analytmi [121]. Pre extrakciu prchavých látok nie je príliš vhodná a na syry zatiaľ nebola použitá.

2.5.3 Extrakcia superkritickou kvapalinou

Alternatívny spôsob extrakcie ku konvenčným metódam ponúka extrakcia superkritickou kvapalinou (SFE – Supercritical Fluid Extraction), ktorá má niekoľko výhod predovšetkým pri extrakcii lipidov. Vďaka možnosti plynulej modulácie nastavenia sily a selektivity rozpúšťadla ide o flexibilný proces. Taktiež dochádza k eliminácii použitých (často toxických) rozpúšťadiel - odpadá proces ich likvidácie [122]. Veľkou výhodou SFE je možnosť práce s termolabilnými zlúčeninami, keďže sa využívajú nízke teploty a vysoké tlaky. Pri SFE sa využívajú superkritické kvapaliny, ktoré sú v stave nad ich kritickým tlakom a kritickou teplotou v jedinom kondenzovanom stave. Najčastejšie používaným rozpúšťadlom je oxid uhličitý (cena, dostupnosť, bezpečnosť) vďaka rozpúšťacím vlastnostiam pre TAG. Pridanie malého množstva tekutého modifikátoru (napr. etanol) môže viesť k výrazne lepšej extrakcii polárnych zlúčenín [123] - [126]. Táto metóda bola použitá napr. pre extrakciu MK zo vzoriek syrov Ementál a bola porovnaná s metódou SE. Obe metódy vykazovali analogické zloženie a počet MK [127].

Ďalej je možné uviesť napr. štúdium arómy ovčieho syra Roncal [128], zisk VMK a ďalších prchavých látok zo syrov ementálskeho typu [129], zaujímavé je praktické využitie SFE pre výrobu syrov so zníženým obsahom tuku [130], [131]. Larráyoza a kol. [132] ju použili pri optimalizácii parametrov extrakcie SAL zo syru Idiazábal.

2.5.4 Extrakcia mikrovlnným ohrevom

Táto zaujímavá technika je aj v súčasnosti často využívanou voľbou pri extrakcii SAL. Kombinuje spolu mikrovlnnú energiu a tradičnú extrakciu rozpúšťadlom. Polárne rozpúšťadlo je ohrievané mikrovlnami a je v kontakte medzi pevnou vzorkou a časťami zlúčenín, ktoré nás zaujímajú. Táto technika teda znižuje extrakčný čas a zároveň aj množstvo rozpúšťadla [133].

Bola aplikovaná napr. pre extrakciu organických kyselín z gréckych syrov [132] alebo pre stanovenie obsahu tukov v syroch, kde bola porovnávaná s klasickou Soxhletovou extrakciou [133].

2.5.5 Ultrazvuková extrakcia

Ďalšou technikou je ultrazvuková extrakcia, ktorá funguje nasledovne. Po vložení vzorky do prístroja je ultrazvukom vytvorená kavitácia, ktorá vedie ku silným strihovým silám. Implózia kavitačných bublín na povrchu vzorky vytvára efekt podobný tvorbe mikro-dýz, ktoré generujú ďalšie efekty odlupovania, erózie a rozpad čiastočiek vzorky. Okrem toho, implózia kavitačných bublín vedie v tekutom médiu ku makroskopickým turbulenciám, ktoré pomáhajú pri miešaní.

Jej veľkými výhodami je redukcia množstva rozpúšťadla, času, energie, možnosť viacerých operácií naraz, lepšia bezpečnosť pri práci a výrazne nižší dopad na životné prostredie (tzv. zelená chémia). Taktiež ide o techniku, ktorá je lacná a jej hodnota je veľmi rýchlo návratná [134] - [136]. Jej aplikácia na syry zatiaľ nebola publikovaná.

2.5.6 Odparovanie vonných látok pomocou rozpúšťadla

Princípom tejto techniky (SAFE – Solvent Assisted Flavour Evaporation) je získanie prchavých látok pomocou nízkej teploty pri vysokom vákuu. Filtrované rozpúšťadlo, zvyčajne dietyléter alebo dichlórmetán, kvapká z chladiča do nádoby, ktorá má približne teplotu 20 – 30 °C a tlak 10^{-3} Pa. Vďaka nízkemu tlaku a relatívne nízkej teplote dochádza k okamžitému odpareniu vzorky. Odparená vzorka spolu s rozpúšťadlom následne kondenzuje na stenách zbernej nádoby, celý proces trvá približne 1 – 2 hodiny. Rozpúšťadlo sa následne odparuje pre získanie koncentrovanej vzorky. Hlavnými výhodami sú extrémne vysoký výťažok (takmer 100 %) polárnych zlúčenín a taktiež zlúčenín s vysokým bodom varu. Na druhú stranu je táto technika veľmi náročná na množstvo spotrebovaného rozpúšťadla, čas a taktiež je vysoká nákupná cena vybavenia [137].

SAFE bola použitá napr. pre extrakciu prchavých látok z komerčných polotvrdých syrov [138], ovčích syrov [93], z tureckého syru „Gaziantep“ [139] alebo poľského plesňového syru „Lazur“ [140].

2.5.7 Mikroextrakcia kvapalnou fázou

LPME (Liquid Phase Microextraction) je technika s využitím minimálneho množstva rozpúšťadla (rádovo μ l). K extrakcii dochádza v malom množstve rozpúšťadla (akceptor) z rozpustenej vzorky obsahujúcej analyt (donor). Môže byť rozdelená do troch kategórií: jedno kvapková mikroextrakcia (SDME), disperzná mikroextrakcia kvapalina-kvapalina (DLLME) a mikroextrakcia s dutými vláknami (HF-LPME). Pri SDME môže dochádzať ku priamej injekcii alebo ku využitiu headspace [135]. Metóda je rýchla a lacná, avšak pre získanie prchavých látok zo syrov zatiaľ nebola použitá.

2.5.8 Destilácia vodnou parou

Ide o jednoduchú techniku, ktorá mala v minulosti široké využitie pre extrakciu prchavých MK. Najväčšie využitie má práve pri získaní prchavých látok s vysokou teplotou varu, z inertných a komplexných matric, pevných alebo kvapalných, s využitím vysoko vriacej pary ako separačné a energetické rozpúšťadlo. V dnešnej dobe sa najčastejšie využíva pre extrakciu prchavých SAL pri tvorbe parfumov [141]. Aplikácií na syry je publikovaných len málo, možno spomenúť prácu autorov O’Riordan a Delahunty [142].

2.5.9 Simultánna destilácia/extrakcia

Najstaršou a v minulosti najpoužívanejšou metódou je destilácia/extrakcia. Podstatou je izolácia analytu zo zmesi pomocou destilácie vodnou parou a následnou extrakciou vhodným organickým rozpúšťadlom. Tento proces je možné spojiť do simultánnej destilácie/extrakcie s využitím Likens-Nickersonovej špeciálnej aparatury [143], prebieha za atmosférického tlaku alebo vákuu a pri izbovej teplote. Destilačné metódy sú nenáročné na obsluhu. S výnimkou vysoko polárnych hydrofilných látok dáva SDE dobré výťažky. K extrakcii sa najčastejšie používajú organické rozpúšťadlá ako je pentán, dietyléter, dichlórmetán a iné, ktoré je možné jednoducho oddeliť [144].

Využitie SDE bolo mnohokrát publikované: Shiota a kol. [145] pri testovaní vplyvu flavouru a textúry na celkové senzoričné vnímanie syru typu Gouda, Van Hoorde a kol. [80] pri výbere vhodných kmeňov *Lactobacillus paracasei* pre výrobu syrov typu Gouda, Dirinck a de Winne [146] pri charakterizácii a klasifikácii profilov troch syrov typu Gouda a Ementál z rôznych oblastí (Rakúsko, Švajčiarsko, Francúzsko). V spojení s GC-MS izolovali frakcie MK, metylketónov, laktónov, aldehydov a alkénov. Zistili, že Gouda od rôznych výrobcov má podobný aromatický profil, zatiaľ čo medzi syrmi typu Ementál boli pozorované značné rozdiely, najviac u rakúskeho syru. Van Leuven a kol. [78] analyzovali rovnakou metódou profil Goudy zo surového a pasterizovaného mlieka. Celkom identifikovali 63 zlúčenín, ktoré sa tvorili aj počas zrenia syrov. Koncentrácia podobných aminokyselín a etylesterov pri Goude z pasterizovaného mlieka stúpila, zatiaľ čo koncentrácia aldehydov a VMK klesla. Majcher a Jeleň porovnávali využitie metód SDE, SAFE a SPME na extrudovaných zemiakových snackoch [147].

2.6 Headspace metódy

Statická headspace (HS), dynamická headspace (tzv. „purge and trap“) a headspace SPME (HS-SPME) sú metódy založené na prchavosti analyzovaných látok.

Podstatou týchto metód je analýza plynnej fáze, ktorá bola v kontakte s extrahovaným materiálom, v ideálnom prípade až do ustálenia rovnovážnej distribúcie prchavých látok medzi plynnou a kondenzovanou (kvapalnou alebo pevnou) fázou, ktorá je popísaná distribučnou konštantou jednotlivých zložiek v danej sústave.

Statická HS je jednoduchá a rýchla metóda, avšak poskytuje nízku reprodukovateľnosť [115]. Pri statickej HS je vzorka temperovaná až do vytvorenia rovnováhy medzi kvapalnou a plynnou fázou. Odobraný známy objem plynnej fáze je analyzovaný na chromatografickej kolóne [148], [149]. Hlavnými výhodami sú jednoduchosť, nízka cena a rýchlosť [150].

Dynamická HS metóda využíva prívod inertného plynu (He, N) nad/skrz vzorku. Pri dynamickej HS je do priestoru nad vzorkou privádzaný inertný plyn, pri „purge and trap“ plyn prechádza vzorkou. Voľné prchavé zlúčeniny sú zachytávané prechodom sorpčnou trubicou smerujúcou na kolónu. Hlavnými výhodami sú jednoduchosť, nízka cena a rýchlosť. Statická aj dynamická HS sú vhodné pre stanovenie vysoko prchavých zlúčenín, menej prchavé nemusia byť zachytené [148]. Dynamická headspace metóda je relatívne novou technikou, pri ktorej je možné extrakciu a skoncentrovanie analytu dosiahnuť v jedinom kroku. V súčasnosti patrí k obľúbeným a často používaným extrakčným technikám aplikovaným aj pri analýze syrov, o čom svedčí rad publikácií. Sunesen a kol. [116] využili dynamickú HS pri stanovení SAL v priebehu skladovania tavených syrov. Zistili, že flavour ovplyvňujú faktory ako teplota alebo svetlo/tma.

Taktiež ju využili Rychlik a Bosset [91] pri zisťovaní flavouru a off-flavouru švajčiarskeho syru Gruyere. Hannon a kol. [151] pri stanovení prekursorov SAL v syre Čedar zistili že autolýza BMK má veľký vplyv na skorú tvorbu prekursorov pre syrový flavour počas zrenia. Engels a kol. [136] použili dynamickú HS pri identifikácii látok v tvrdých syroch typu Čedar, Eidam, Gouda, Parmezán a iné. Identifikovali 53 zlúčenín pomocou GC-MS a 25 z nich kvantifikovali použitím techniky GC-FID. Hlavné skupiny nájdených látok boli MK, estery, aldehydy, alkoholy, ketóny a zlúčeniny síry.

Jeong a kol. [152] vyrobili modelový syr Gouda s/bez syridla a porovnávali vplyv syridla na prchavé a neprchavé látky. Výroba syru bez syridla prebehla pomocou imobilizovaného chymozínu na oxidovanej a chemicky upravenej uhlíkovej tkanine. Profil prchavých látok bol v priebehu zrenia (3 a 12 týždňov) pri oboch syroch podobný.

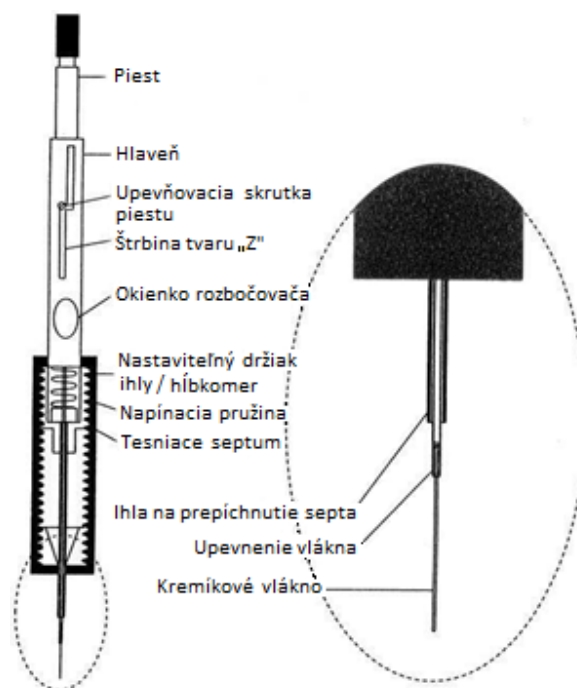
2.7 Extrakcia pevnou fázou

Extrakcia na pevnej fáze (Solid Phase Extraction; SPE) je založená na princípu kvapalinovej chromatografie (Liquid Chromatography; LC), silnej ale reverzibilnej interakcie medzi analytom a stacionárnou fázou obsiahnutou v SPE kolónkach. Zlúčeniny vo vzorke reagujú viac so stacionárnou fázou ako s rozpúšťadlom, a tým zostávajú v stacionárnej fáze, z ktorej sú následne vymyté vhodne zvolenými rozpúšťadlami [153]. Kolóny pre SPE boli vynájdené v polovici 70. rokov minulého storočia. V roku 1978 firma Waters navrhla kolónky Sep-Pak, pohodlné jedno rázové kolónky na báze oxidu kremíku (SiO_2). O dva roky neskôr boli publikované prvé práce o uplatnení SPE v oblasti lipidov, najprv na biologické vzorky tkanív. Neskôr bolo publikovaných niekoľko prehľadných článkov zhrňujúcich aplikácie SPE metódy pre izoláciu a frakcionáciu lipidov nielen v biologických, ale aj potravinárskych matriciach [153]. Univerzálnosť SPE umožňuje, aby bola použitá pre veľké množstvo účelov, napr. efektívne čistenie vzoriek, alebo pre izoláciu zlúčenín a odstránenie prebytku rozpúšťadla. Aj vzorky metylesterov, určené pre GC, môžu byť čistené priechodom cez SPE kolónku, ktorá môže odstrániť peroxidy a hydroxidy. Nielen GC, ale aj vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (High Powered Liquid Chromatography; HPLC) využívajú výhod SPE ako predprípravný krok [153]. Aj napriek veľmi častému použitiu, postup SPE, a najmä jej aplikácie na delenie lipidov, sú v dostupných publikáciách mnohokrát nedostatočne popísané, vrátane predprípravy vzorky pred analýzou. Aj v prípade, kedy sú publikované metódy popísané ako dôkladné a reprodukovateľné, sú v praxi len ťažko úspešne opakovateľné. Dôvody, týkajúce sa zvolenia správnej SPE kolónky, mobilnej fáze, objemu vzorku alebo prietokovej rýchlosti, nie sú častokrát v publikáciách komentované. Typické interakcie sú napr. nepolárne interakcie medzi C–H väzbami analytu a C–H väzbami v absorbente (Van der Waalsove sily) [153]. Pre výskum nepolárnych interakcií sa používajú C18 kolónky; pre separáciu lipidov kolónky C8 a C2.

Oproti tomu polárne interakcie sú typické pre všetky látky s kyano-(CN) a amino-(NH_2) skupinami, dioly alebo oxidy kremíku. Ďalej sa vyskytujú iónomeničové interakcie, ako sú u kvartérnych amínov, benzén-sulfónových kyselín alebo propyl-sulfónových kyselín. K týmto interakciám dochádza vtedy, keď analyty majú negatívny alebo pozitívny iónový charakter [153].

2.7.1 Mikroextrakcia pevnou fázou

Profesor Janusz Pawliszyn a jeho kolegovia na Univerzite Waterloo v Kanade v roku 1989 vynašli izolačnú techniku, ktorá sa volá mikroextrakcia pevnou fázou (Solid-Phase Microextraction – SPME) [138]. Konštrukčne je SPME veľmi jednoduché zariadenie podobné injekčnej striekačke (Obrázok 5), kde najdôležitejšiu časť tvorí samotné vlákno z taveného oxidu kremičitého, na ktorom je imobilizovaná stacionárna fáza [111].



Obrázok 5: Schéma SPME vlákna [99]

Ide o modernú, rýchlu, lacnú, bezrozpúšťadlovú techniku, ktorá sa bežne využíva v kombinácii s GC a GC-MS, HPLC alebo LC-MS [154]. Princíp extrakcie požadovaných zlúčenín je založený na rovnovážnom procese fyzikálne-chemickej adsorpcie na exponovanom povrchu sorpčného vlákna s následnou tepelnou desorpciou v injektore GC, v prípade spojenia SPME a LC sú analyty desorbované vhodným rozpúšťadlom [155]. V závislosti na vlastnostiach analytov a matrici vzorky sa na základe polohy vlákna rozlišujú dva typy SPME extrakcie, umiestnenia SPME vlákna, a to do kvapalného roztoku (DI-SPME, direct immersion) alebo do uzavretého priestoru nad vzorkou (HS-SPME, headspace). DI-SPME je vhodná predovšetkým pre polárne a neprchavé látky.

Pre stanovenie prchavých a tepelne labilných látok sa skôr používa HS-SPME, kedy je vlákno zasunuté v tzv. headspace priestore (plynná fáza nad kvapalnou alebo pevnou vzorkou). Absencia priameho kontaktu s matricou značne predlžuje životnosť vlákna. V určitých prípadoch sa môže využívať aj modifikácie v podobe nepriamej extrakcie cez selektívnu membránovú bariéru, kedy musia najprv zlúčeniny difundovať membránou a až potom nasleduje adsorpcia na stacionárny film, čím sa proces stáva pomalší v porovnaní s vyššie spomenutými spôsobmi. Vďaka ochranej funkcii membrány je životnosť vlákna rovnako ako u HS-SPME dlhšia, avšak na rozdiel od nej umožňuje izolovať aj málo prchavé zlúčeniny [99] - [100].

Pri klasickom postupe po aplikácii vzorky do vialky dochádza ku ustáleniu rovnováhy medzi pevnou a plynnou fázou. Adaptér s vláknom je cez septum vsunutý do uzavretého priestoru nad vzorkou. Následným vystavením sorbentu plynnej fázy dochádza ku adsorpcii prchavých zlúčenín na vlákno. Nasleduje desorpcia skoncentrovaných analytov v analytickom prístroji (manuálne/autosampler) [156]. Pevným podkladom pre stacionárnu sorpčnú fázu je vlákno z taveného oxidu kremičitého.

Na trhu sa nachádza päť základných komerčne dostupných sorpčných fáz: polydimetylsiloxan (PDMS), polyakrylát (PA), divinylbenzén (DVB), karboxén (CAR) a Carbowax (CW). Pre extrakciu prchavých SAL sa v súčasnosti odporúčajú dva typy vlákien: Carboxen/PDMS hrúbky 75 alebo 85 μm , a DVB/CAR/PDMS 50/30 μm . Použitie SPME poskytuje radu výhod, ako sú spoľahlivosť, rýchlosť, nízka náročnosť, skrátenie doby analýzy a v neposlednej rade zníženie nákladov, predovšetkým kvôli nepotrebnosti organických rozpúšťadiel, a relatívne dlhá životnosť vlákna. Univerzálnosť a dostatočná citlivosť SPME umožňuje jej úspešné použitie pre celú škálu zlúčenín a to ako pri stopovej analýze, tak aj pri aplikácii na vzorky o veľmi nízkom objeme alebo aplikácii na komplexné heterogénne matrice. Z konštrukčného prevedenia je výhodné priame prepojenie SPME s GC a možnosť automatizácie analýzy.

Na druhú stranu, ako každá metóda, aj SPME má svoje nevýhody, ku ktorým patrí nízka mechanická odolnosť samotného vlákna a náročnejšia optimalizácia plynúca z nízkej výťažnosti, robustnosti a horšej reprodukovateľnosti. Tieto nevýhody, a predovšetkým možnosť tzv. kompetitívnej sorpcie (tj. vytlačovanie už nasorbovaných zlúčenín látkami s vyššou distribučnou konštantou), limitujú použitie SPME pre kvantifikáciu. Vzhľadom k tomu, že sa nejedná o kvantitatívnu extrakciu, ale o rovnovážny proces, je nevyhnutné čo najpresnejšie dodržiavať jednotlivé experimentálne podmienky, inak by dochádzalo k podstatnému zhoršeniu reprodukovateľnosti celej metódy. Napriek tomu, práve jednoduchosť prispieva k jej popularnosti a dominancii medzi ostatnými extrakčnými technikami [157]-[163]. Medzi parametre, ktoré je treba zohľadniť a tým ovplyvniť selektivitu, efektivitu, rýchlosť, citlivosť a ďalšie vlastnosti metódy, patria typ a hrúbka stacionárnej fáze, teplota, doba a spôsob extrakcie, pH, miešanie, vlastnosti analytu (afinita ku stacionárnej fáze, prchavosť), vlastnosti matrice vzorky (obsah solí, lipidov, organických rozpúšťadiel, vlhkosť), desorpčné podmienky (hlbka expozície vlákna v injektore, teplota a dĺžka desorpcie) a prípadná derivatizácia [157]. V dnešnej dobe je touto metódou možné stanoviť široké spektrum látok od polárnych až k nepolárnym a od látok neprchavých až po látky extrémne prchavé [117]. Z aplikácií na syry je možné uviesť napr.: pri identifikácii prchavých látok typického sicílskeho syra [164], argentínskeho [165] a talianskeho ovčieho syra [166], španielskeho kozieho [167] a taktiež mäkkého [168] a tureckého syra [169] bolo použité vlákno 50/30 μm DVB/CAR/PDMS, ktoré sa používa pre izoláciu prchavých a stredne prchavých SAL [170]. Expozícia vlákna v headspace priestoru trvala 15 [117] až 40 minút [156]. V iných publikáciách [171] bola extrakcia prevedená pomocou CAR/PDMS vlákna hrúbky 75 alebo 85 μm . Taktiež Frank a kol. [172] použili CAR/PDMS vlákno, doba expozícia trvala až 16 hodín.

Na základe mnohých publikácií, aplikácií na rôzne vzorky a vzhľadom k vyššie uvedeným výhodám a v neposlednej rade s prihliadnutím k možnostiam inštrumentálneho vybavenia pracoviska bola v rámci tejto dizertačnej práce zvolená pre extrakciu SAL metóda SPME.

2.7.2 Extrakcia na miešajúce tyčinke

Ďalší rozvoj mikroextrakčných techník dospel ku zavedeniu metódy extrakcie na miešajúcej tyčinke (Stir Bar Sorptive Extraction; SBSE). Tento postup je založený na sorpcii analytu na tenký film z PDMS, ktorým je pokrytá miešajúca tyčinka.

Technika SBSE pomáha pri efektívnej extrakcii organických zlúčenín z vodnej matrice. Oproti konvenčným extrakčným metódam je udávaná väčšia rýchlosť a viac ako 1000x vyššia senzitivita než SPME, keďže obsahuje podstatne vyššie množstvo sorbentu, má možnosť extrakcie a koncentrácie analytov z väčších objemov, čo je zapríčinené možnosťou miešania. Desorpcia jednoduchým teplotným programom robí z tejto techniky veľmi rýchlu a taktiež prívetivú pre životné prostredie [173]. Z aplikácií na syry bola nájdená iba práca Moro a kol. [174], ktorí sledovali zmeny sensorických látok v priebehu výroby ovčieho syra s prídavkom extraktu z rozmarínu.

2.8 Izolácia lipidov z matrice syrov

Ako už bolo zmienené, GC, zvyčajne v spojení s plameňovo-ionizačným detektorom (GC-FID) je dominantnou technikou pre rutinné kvantitatívne stanovenie MK nielen v syroch, ale aj iných potravinách. Pred samotnou analýzou je nutné lipidy najskôr izolovať zo vzorky a následne previesť na vhodné prchavé deriváty, obvykle metylestery (MEMK) [16]. Pre izoláciu lipidov, na rozdiel od SAL (viď kapitola 2.5.1), sa používa klasická SE. Podmienky extrakcie sa volia predovšetkým podľa zložitosti matrice. U syrov môžu byť lipidy pomerne silne naviazané na proteíny, navyše mliečny tuk obsahuje ako MK s krátkym reťazcom, ktoré sú rozpustené vo vodnej fáze, tak aj vyššie MK, nachádzajúce sa hlavne v lipidovej fáze. Oba tieto faktory robia výber vhodnej metódy pre kvantitatívnu izoláciu z oboch frakcií veľmi komplikovaný. Možným prevedením je viac než 100 rokov stará, overená, značne rozšírená a predovšetkým jednoduchá metóda kontinuálnej extrakcie podľa Soxhleta, ktorá bola pôvodne navrhnutá k extrakcii tuku z mlieka. Pary rozpúšťadla umiestneného vo varnej banke stúpajú do chladiča, kde kondenzujú, stekajú do extrakčnej komory, a tak prichádzajú do kontaktu so vzorkou v extrakčnej patrône. Následne sa používa tzv. sifónového efektu, čím dochádza ku cirkulácii rozpúšťadla. Po ukončení procesu sa rozpúšťadlo od vyextrahovaných látok oddelí destiláciou. Časová náročnosť, veľké množstvo extrahovateľného materiálu a rozklad termolabilných látok sú hlavnými nevýhodami.

Väčšina modifikácií konvenčnej Soxhletovej extrakcie (využitie vysokého tlaku, mikrovln, ultrazvuku aj.), navrhnutých v poslednom desaťročí, bola zameraná na priblíženie Soxhleta ku novým technológiám pre prípravu pevných vzoriek, ku skráteniu času extrakcie, zníženiu spotreby rozpúšťadiel a automatizácii odsávacej zostavy [23], [175]. Ďalšou klasickou možnosťou je extrakcia podľa Folche využívajúca zmes rozpúšťadiel chloroform-metanol s následnou homogenizáciou vzorky za studena. Pre odstránenie nerozpustných podielov zo suspenzie je možné využiť centrifugáciu alebo filtráciu, a následnú destiláciu rozpúšťadla na vákuovej odparke [101]. Pre SE sa môžu využívať ale aj iné rozpúšťadlá alebo ich zmesi. Zo štúdií zameraných na syry je možné uviesť v dnešnej dobe rutinne používanú metódu De Jonga a Badingsa [176], neskôr uplatnenú napr. Mannionom a kol. [177], kedy sa ku vzorku syra pridá bezvodý síran sodný a kyselina sírová a extrakcia MK sa následne prevádza zmesou dietyléteru a heptánu. Kim Ha a Lindsay [178] do zmesi miesto heptánu použili hexán. Partidário a kol. [64] petroléter. Pri stanovení VMK je vhodné odseparovať z extraktu fosfolipidy, TAG, a lipidické látky, aby nedochádzalo ku hydrolýze esterových väzieb prítomných esterov. K tomuto účelu boli navrhnuté napr. rôzne adsorpčné metódy, medzi nimi tenkovrstvá chromatografia (TLC) alebo extrakcia na pevnej fáze (SPE) [179].

Selektívne zadržovanie skupiny látok na pevnej fáze vo forme stĺpca alebo membrány v malej kolónke je pre svoju univerzálnosť a jednoduchosť rozšírenou separačnou metódou. V rámci stanovenia MK našla SPE uplatnenie hlavne pri frakcionácii rôznych lipidických tried, izolácii VMK pre ich následnú derivatizáciu či priamu separáciu. Výber vhodného sorbentu a elúčného činidla závisí v prvej rade na zložení vzorky [180]. V skôr zmienenej práci De Jonga a Bandigsa [176] používajú autori aminopropyl-SPE kolónky, pričom vychádzajú z práce Kaluznyho a kol. [181]. Z ďalších využití týchto kolóniek pri analýze mliečnych výrobkov je možné uviesť práce napr. Chavarriho a kol. [182], Voigta a kol. [183], Kilcawleye a kol. [4] alebo Manniona a kol. [177]. Prchavé MK je možné od ostatných lipidov aj oddestilovať. Už v roku 1974 Dulley a Grieve [184] publikovali štúdiu, v ktorej popisujú využívanie destilácie k tomuto účelu. Kim Ha a Lindsay [178] popisali elúciu extrahovaných MK adsorbovaných na oxidu hlinitom kyselinou mravenčiou v diisopropyléteru za súčasnej destilačnej extrakcie, za účelom oddelenia nižších MK od vyšších.

2.9 Derivatizácia mastných kyselín

Pre potreby GC, ktorá je použiteľná iba pre separáciu prchavých látok, je nutná derivatizácia vyzolovaných MK na prchavejšie látky. Naviac MK sú vysoko polárne zlúčeniny, ktoré majú tendenciu vytvárať vodíkové väzby, čo môže viesť k ovplyvneniu adsorpcie. Zníženie ich polarít je tak pre analýzu priaznivejšie. Vhodným derivatizačným postupom je tvorba esterov, obvykle MEMK, ktoré ponúkajú výbornú stabilitu, najvyššiu prchavosť, reakcie s najvyššími reakčnými rýchlosťami a vysoké výťažky. Aj keď zvyšovanie molekulovej hmotnosti alkoholu vyžaduje dlhší reakčný čas, pre špecifické účely môžu byť vhodnejšie iné typy esterov, napr. Kim Ha a Lindsay [178] stanovovali prchavé VMK v Parmezáne vo forme butylesterov. V zásade môže byť použitá akákoľvek alkoholická zložka, ale v praxi sa výber obmedzuje na alkoholy, ktoré môžu byť z reakčného prostredia vylúčené selektívnym odparením (tj. metanol po cca pentanol). Rovnako ako u iných analýz, neexistuje ani tu jednotný postup využiteľný pre všetky typy vzoriek.

Medzi základné a najpoužívanejšie metódy derivatizácie MK patria kyslo katalyzovaná esterifikácia a kyslo alebo bázicky katalyzovaná transesterifikácia [182]. Metóda využívajúca kyslý katalyzátor je vhodná pre derivatizáciu viazaných MK aj VMK, v prípade syrov prevažne v rámci TAG. VMK sú tak na estery prevádzané esterifikáciou, u viazaných MK dochádza k tzv. transesterifikácii. Vzhľadom k tomu, že všetky kroky u oboch procesov sú reverzibilné, je ku posunutiu rovnováhy v smeru tvorby produktu nutný veľký nadbytok alkoholu. Prítomnosť vody, ako silnejšieho donoru elektrónov než alifatické alkoholy, má pri tvorbe esterov negatívny efekt.

Kritickým bodom je voľba vhodného kyslého katalyzátoru, ktorý by mal uľahčiť reakciu bez nežiadúcich vedľajších účinkov [182]. Najčastejšie používaným činidlom pre prípravu MEMK je 5% bezvodý chlorovodík v metanole. Jedná sa o relatívne mierne reakčné činidlo poskytujúce takmer kvantitatívne výťažky, ktoré sa vyrába prebublávaním bezvodého metanolu chlorovodíkom alebo z acetaldehydu a metanolu. Nestabilita tohto bezvodého katalyzátoru je zapríčinená nukleofilnou substitúciou HCl s metanolom za vzniku vody a chlórmetánu počas skladovania, v dôsledku čoho vznikajúca voda negatívne ovplyvňuje samotný proces.

Týmto problémom sa zaoberali Ichihara a Fukubayashi [182], ktorí predstavili alternatívne reakčné činidlo vhodné pre metanolýzu, ľahko pripraviteľné v laboratóriu zmiešaním bežných chemikálií, ako sú koncentrovaná kyselina chlorovodíková, metanol a toluén. Výťažky MEMK, získané použitím tejto zmesi boli takmer rovnaké s výťažkami obvyklých metód využívajúcich kyslé alebo bázické katalyzátory [182]. Aj keď sa v niektorých prípadoch používajú omnoho vyššie koncentrácie, 1 až 2% roztok kyseliny sírovej v metanole má takmer identické vlastnosti ako 5% metanolickej roztok chlorovodíkov a je veľmi jednoduché ho pripraviť. Dlhá doba spätného toku, nadmerná koncentrácia kyseliny alebo vysoká teplota však vedú ku tvorbe farebných vedľajších produktov a degradácii polynenasýtených MK. Hlavnou nevýhodou všetkých vyššie uvedených katalyzátorov je pomerne dlhý čas refluxu ku dosiahnutiu úplnej konverzie [181]. Naproti tomu použitie bórtřifloridu, vo forme koordinačného komplexu s metanolom, vedie ku značnému skráteniu času, takže sa tento katalyzátor používa už niekoľko rokov aj napriek značnej toxicite a obmedzenej skladovateľnosti. Niektoré štúdie navyše upozorňujú na tvorbu metoxy artefaktov z nenasýtených MK pri použití tohto činidla o vyššom obsahu (50 % hm.), alebo na významné straty pri použití vzorky menšej než 200 mg. Napriek uvedeným nevýhodám našiel tento katalyzátor široké uplatnenie v rade prác nielen na téma mliečnych výrobkov, pre predstavu napr. Partidário a kol. [64], Hauff a Vetter [158], alebo Lashkari a Jensen [185], a používa sa aj v oficiálnej AOAC metóde stanovenia mastných kyselín 996.06 (2005). Určitý potenciál majú aj iné Lewisove kyseliny (chlorid hlinitý, bórtřichlorid a ďalšie) [182].

Pre tvorbu prchavých derivátov z esterovo viazaných MK je možné aplikovať tiež bázicky katalyzovanú transesterifikáciu. Ku kvantitatívnej výmene alkoholovej časti esteru je potreba nadbytku alkoholu, rovnako ako u kyslo katalyzovanej reakcie. Rovnováha rozpadu aniónového medziproduktu vzniknutého z esteru v prítomnosti báze, ako je alkoholátový anión, je posunutá ku vzniku požadovaného produktu. Voda má nepriaznivý priebeh aj na túto reakciu, pretože medziprodukt nevratne disperguje na voľnú kyselinu. Výhodou využitia báze je rýchlejší priebeh aj pri miernej teplote, avšak bez nožnej esterifikácie VMK. Základnými transesterifikačnými činidlami sú methoxid sodný alebo draselný v bezvodom metanole. Aplikácia kvartérnych amóniových hydroxidov (tetrametylamonium hydroxid a iné) vedie ku tvorbe kvartérnych amóniových solí MK, ktorých pyrolýza produkuje žiaduce MEMK [88].

2.10 Inštrumentálne metódy vhodné pre analytické stanovenie senzoricke aktívnych látok a mastných kyselín v syroch

Ako už bolo niekoľkokrát zmienené, dominantnou technikou pre stanovenie SAL a MK je GC. Väčšinou sú MK analyzované pomocou GC-FID, a SAL pomocou GC-MS. Kombinácia plynovej chromatografie s olfaktometriou (GC-O, Gas Chromatography-Olfactometry), kde sú SAL eluované ako na FID, tak na ľudský nos posudzovateľa, je veľmi užitočná technika pre stanovenie kľúčových prchavých látok [31].

Pre stanovenie celkového flavouru existujú špeciálne inštrumentálne metódy: elektronické nosy založené na technológii plynových senzorov, alebo MS bez predchádzajúcej separácie GC [114], [176]. Inštrumentálne techniky užívané pri analýze flavouru tvoria rozsiahle dátové súbory. Štatistická analýza dát je nevyhnutnou metódou pre ich vyhodnotenie, klasifikáciu a kontrolu kvality [114], [177].

2.10.1 Plynová chromatografia

Analytické techniky používané na stanovenie prchavých zlúčenín bez ohľadu na to, aká metóda bola použitá pre ich extrakciu, sú prevažne založené na separácii pomocou GC s vysokým rozlíšením v kombinácii s vhodným detektorom [31]. GC je jednoduchá a rýchla analytická separačná technika poskytujúca vysokú separačnú účinnosť; založená na rozdelení látok medzi nepohyblivú, stacionárnu fázu a pohyblivú, mobilnú fázu – nosný plyn (dusík, hélium alebo argón) [186]. Prakticky jedinou požiadavkou na analyty je, aby boli prchavé alebo polo-prchavé a čo možno najviac tepelne stabilné. Pre odparenie polárnych molekúl je kvôli silným intramolekulárnym silám potrebná vysoká teplota, ktorá však na kolóne spôsobuje ich rozklad. Z tohto dôvodu nemôžu byť malé, vysoko polárne zlúčeniny stanovené pomocou GC. Možným riešením je použitie chemických derivatizačných postupov, pri ktorých sa polárne skupiny cieľových molekúl prevádzajú na menej polárne skupiny, čo v konečnom dôsledku priaznivo pôsobí na tlak pri splynení v injektore a na adsorpčné charakteristiky kolóny. Derivatizáciu je možné použiť aj pre zvýšenie prchavosti inak neprchavých zlúčenín [188], [189].

Stacionárnou fázou býva kvapalina s vysokou molekulovou hmotnosťou uložená buď na povrchu jemne rozptýlených častíc alebo na stenách dlhej kapiláry. Používa sa pre separáciu, kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu zmesí plyných a prchavých látok, predovšetkým však pre organické zlúčeniny s bodom varu menším ako 400 °C [190]. K deleniu zložiek zmesí dochádza v chromatografickej kolóne, kde analyty unášané nosným plynom (mobilná fáza) v závislosti na ich afinite interagujú so stacionárnou fázou, čím dochádza u jednotlivých zložiek k rôznemu zdržaniu pri pohybu kolónou a tým k ich separácii [189], [191].

V minulosti sa analýzy prevádzali na náplňových GC kolónach, dnes už sa však kvôli vyššej účinnosti používajú výhradne kapilárne kolóny z taveného kremeňa potiahnuté vrstvou polyamidu pre zvýšenie ich pružnosti. Voľba stacionárnej fáze (obvykle na báze polysiloxánov) nanesej na vnútornej strane kapiláry, závisí na charakteru vzorky [191]. Väčšina vzoriek pre analýzu GC pozostáva z purifikovaného rozpúšťadla obsahujúceho analyty, ktoré sú predmetom záujmu. Takýto typ vzorky sa do injektora chromatografu zavádza pomocou mikrodávkovача, ktorý býva obvykle súčasťou autosamplera.

Možné je splitless (bez deliča toku) ale aj split (s deličom toku nosného plynu) nastavenie dávkovania vzorky. Pri týchto režimoch izotermického vstrekovania sa volí dostatočne vysoká teplota, aby sa odparilo rozpúšťadlo a aj všetky analyty. Výber vhodného režimu je ovplyvnený najmä koncentráciou. Pri dávkovaní s delením toku iba malá časť analytu spolu s rozpúšťadlom, ktorá je odparená do prúdu mobilnej fáze, smeruje na kolónu, preto sa tento režim používa u koncentrovaných vzoriek, aby nedochádzalo k presiahnutiu sorpčnej schopnosti stacionárnej fáze kolóny. Naopak režim splitless je primárne odporúčaný pre stopovú analýzu.

Medzi ďalšie možnosti dávkovania patrí užitie injektora s programovateľnou teplotou, ktorý sa zahrieva až po nadávkovaní vzorky a je vhodný pre zmes zlúčenín s širokým rozsahom bodu varu alebo pre tepelne labilné zlúčeniny [117]. Analyty izolované metódou SPME sú z vlákna vloženého cez septum tepelne desorbované priamo do priestoru injektora a unášané nosným plynom na kolónu. Dostatočne vysoká čistota maximalizuje životnosť kolóny a zabraňuje tvorbe šumu pri detekcii. Preto pred vstupom na kolónu prechádza odľučovačom vlhkosti, nečistôt a ostatných plynov.

Moderné GC sú vybavené elektronickými regulátormi prietoku, aby bol zaistený stabilný a reprodukovateľný prúd mobilnej fáze [189]. Po výbere vhodnej stacionárnej fáze je najkritickejším krokom voľba teploty kolóny pre separáciu všetkých analytov. Možnosti zahŕňujú izotermický priebeh, kedy je kolóna vyhrievaná konštantnou teplotou po celú dobu analýzy, a je teda vhodný pre vzorky obsahujúce iba niekoľko látok, ktoré sú si podobné polaritou a teplotou varu. Ku oddeleniu všetkých zložiek zmesi vzorky obsahujúcej zlúčeniny s širokým rozmedzím bodov varu je nevyhnutné programové vyhrievanie, kedy je teplota zvyšovaná postupne, a to rôznou rýchlosťou [189].

Ku ďalším faktorom ovplyvňujúcim výkon systému GC patria už zmienené módy dávkovania vzorky, dĺžka kolóny a hrúbka stacionárnej fáze, prietok a druh nosného plynu a mnohé ďalšie parametre [190]. Metóda je ďalej vhodná pre prchavé látky, ktoré možno previesť do plynného stavu. Pre stanovenie SAL býva aplikovaná najčastejšie v kombinácii s MS [191].

Lawlor a kol. [192] pomocou GC identifikovali SAL (alkoholy, aldehydy, ketóny, estery, terpény) v syroch s modrou plesňou. Za plesňové aróma boli zodpovedné hlavne ketóny (pentán-2-ón, oktán-2-ón, heptán-2-ón, nonán-2-ón). Bergamini a kol. [165] pri stanovení VMK identifikovali majoritne zastúpené kyseliny myristovú, palmitovú a stearovú. GC bola použitá pri sledovaní rozdielov v zložení VMK v talianskom syre „Toma piemontese“. Syry z letného mlieka mali nižší podiel nasýtených MK a vyšší podiel monoénových a polyénových VMK [193]. Noronha a kol. [194] sledovali MK s krátkym reťazcom pomocou GC vo vzorkách syrových analógov. Pre stanovenie intenzity chutnosti a prijateľnosti ochutených analógov bol dôležitý obsah kyseliny butánovej. O'Brien a kol. [195] posudzovali účinnosť *Lactobacillus nodensis* ako vedľajšie kultúry v syre Gouda počas rôznych technologických podmienok. Po izolácii pomocou vlákna CAR/PDMS boli SAL analyzované na GC s pulzovým plameňovým fotometrickým detektorom. Zvýšenie obsahu metántiolu a sulfánu bolo dôsledkom lepšej sekundárnej proteolýzy a zvýšenej koncentrácie VMK spôsobené pridanou kultúrou. Pre následnú identifikáciu a kvantifikáciu prchavých látok disponuje GC radou univerzálnych či selektívnych detektorov alebo prepojením s inými analytickými metódami [189].

2.10.2 Plynová chromatografia s plameňovo ionizačným detektorom

Pre stanovenie MK, respektíve ich esterov, sa najčastejšie používa FID, ktorý kombinuje výhody nízkej ceny, univerzálnosti, citlivosti a širokého lineárneho rozsahu. Okrem toho je vhodný pre kvalitatívnu aj kvantitatívnu analýzu. Ku vzniku plameňa v tomto deštruktívnom detektore je vyžadovaný prívod zmesi vodíku, slúžiaceho ako palivo, a vzduchu, ktorý sa uplatňuje ako oxidačné činidlo. Analyty eluované z kolóny sú privádzané do plameňa, kde dochádza k ich ionizácii, a teda zvýšeniu počtu katiónov a elektrónov v priestore detektora. Medzi dýzou horáku a protiľahlou katódou, na ktorej je aplikované napätie, prechádza v dôsledku nárastu vodivosti prostredím elektrický prúd, pričom veľkosť signálu závisí na typu a koncentrácii detegovanej látky [31].

2.10.3 Plynová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou

Hmotnostná spektrometria (MS) je ďalším univerzálnym detektorom u GC pre kvantitatívnu a kvalitatívnu analýzu a pridáva špecifickú výhodu identifikácie separovaných zlúčenín pomocou ich fragmentačnej štruktúry. Využitie komplementárnych knižníc referenčných spektier prispieva k významnej užitočnosti techniky GC-MS pri analýze zložitejších zmesí organických zlúčenín, napr. SAL [196]. Technické riešenie spojenia tlakovo nekompatibilných metód GC a MS priamym zavedením kremíkovej kapiláry do priestorov iónového zdroja je možné predovšetkým vývojom kapilárnych kolón a konštrukciou výkonných čerpacích zariadení [196].

Pre ionizáciu plynnej fázy eluovanej z kolóny GC sa štandardne využíva univerzálnej metódy elektrónovej ionizácie (EI). Zo žeravenej katódy sú smerom k protiľahlej anóde do priestoru, kam je privádzaný eluát, emitované a urýchľované elektróny o kinetickej energii 70 eV. Priblíženie týchto subatomárnych častíc má za následok uvoľnenie valenčných elektrónov z molekuly organickej zlúčeniny, čím vzniká molekulový ión s kladným nábojom. Príliš veľký prebytok vnútornej energie týchto iónov sa prejaví ich následnou fragmentáciou za produkcie fragmentových iónov, ktoré v hmotnostnom spektrometri predstavujú viac či menej špecifický „otlačok prstu“ (angl. „fingerprint“) analyzovanej zlúčeniny. U niektorých molekúl je však interpretácia obmedzená, pretože ich molekulové ióny sú tak energetické, že ich hmotnostné spektrá nevykazujú tzv. molekulový pík, ale iba píky príslušných fragmentov. Väčšina organických molekúl má ionizačný potenciál približne 10 eV a ich maximálna fragmentácia prebieha okolo 30 eV. Použitie elektrónov o energii 70 eV je konvencia, ktorá zaručuje, že EI spektrá zlúčenín budú rovnaké aj ak sú merané na rôznych prístrojoch. Táto reprodukovateľnosť umožňuje vytvárať hromadné databáze hmotnostných spektier a ich používanie pri kvalitatívnych analýzach. Produkty tvrdej ionizačnej techniky sú z iónového zdroja vypudené a urýchlené vytesňovaciou elektródou k hmotnostnému analyzátoru [188].

Aj keď máme dnes k dispozícii rôzne ďalšie možnosti separácie iónov na základe pomeru ich hmotnosti a náboja (m/z), stále sú u GC systémov najpoužívanejšie hmotnostné spektrometre využívajúce kvadrupólové analyzátory. Princíp kvadrupólového analyzátoru bol prvýkrát vysvetlený Wolfgangom Paulom a jeho kolegami na začiatku 50. rokov 20. storočia [197]. Konštrukciu tvoria štyri rovnaké kovové tyče, na dve protiľahlé je vložené kladné jednosmerné napätie a na zostávajúce dve negatívne jednosmerné napätie, pričom polarita týchto tyčí sa striedavo menia. Zároveň je na všetky tyče vkladané vysokofrekvenčné striedavé napätie. Ióny, urýchlené z iónového zdroja k detektoru, pri preletu priestorom kvadrupólu začnú v dôsledku prítomnosti vzniknutého elektrického poľa oscilovať medzi tyčami. Na stabilnej trajektórii sa však v danom časovom okamihu pohybujú iba ióny určitého m/z , ktoré na rozdiel od ostatných iónov prechádzajú analyzátorom a dopadajú na detektor. Plynulou zmenou hodnôt jednosmerného napätia a amplitúdy rádiografického napätia, tzv. skenovaním, môžu byť postupne prepúšťané ióny všetkých pomerov m/z [198]. V momente keď ióny opustia analyzátor, narážajú na povrch detektora, ktorý generuje kaskádu elektrónov a zaznamenáva sa signál, ktorého intenzita je priamo úmerná množstvu dopadajúcich iónov so špecifickým pomerom m/z . Aby ióny na dráhe z iónového zdroja cez analyzátor do detektora nekolidovali s žiadnou časticou, ktorá by mohla spôsobiť zmenu ich trajektórie, je potrebné hmotnostný spektrometer prevádzkovať pri veľmi nízkych tlakoch.

Pre udržanie tlaku na požadovanej prevádzkovej úrovni musí vákuový systém v rámci GC-MS odvádzať aj relatívne značné množstvo mobilnej fáze, ktorá je do hmotnostného spektrometru plynule privádzaná z GC [199]. Aktuálny trend využívania metódy GC-MS kombinuje vysokú separačnú schopnosť kapilárnej GC s vysoko špecifickou detekciou MS [198]. Zároveň umožňuje získanie informácií o štruktúre neznámych látok [200].

GC-MS bola použitá pre stanovenie SAL v mnohých publikáciách. Sunesen a kol. [116] použili dynamickú headspace metódu a GC-MS pre identifikáciu a kvantifikáciu SAL v tavených syroch. Zistili, že aróma tavených syrov je ovplyvnená rôznymi faktormi, od vstupných surovín až po technologický proces. Po skladovaní pri rôznych teplotách (5, 20, 37 °C), na svetle alebo pri tme počas 12 mesiacov bolo identifikovaných 28 SAL. U oktanálu a hexanálu došlo ku zvýšeniu koncentrácie, naopak u 2-pentylfuránu ku zníženiu. Dirinck a De Winne [146] za použitia GC-MS charakterizovali chuť syrov Gouda a Ementál. Gouda mala najväčšie zastúpenie laktónov a acetoínu, Ementál zase vysoký obsah VMK a metylketónov. Majcher a Jeleń [201] použili GC-MS ku štúdiu zmien SAL počas prípravy údeného ovčieho syru. Biochemickými reakciami vznikala prvá skupina látok (VMK, estery, ketóny, aldehydy, alkoholy, sírne zlúčeniny). Údením vznikala druhá skupina látok (furány, fenoly). Z mlieka pochádzala tretia skupina látok – terpény. Túto metódu tiež využili Van Leuven a kol. [78] a Alewijn a kol. [27] ku stanoveniu SAL v priebehu zrenia syrov typu Gouda. Panseri a kol. [202] identifikovali pomocou GC-MS v talianskom syre celkovo 84 SAL. Delgado a kol. [167] skúmali španielsky syr Queso Ibores z nepasterizovaného mlieka a identifikoval 64 SAL. Obsah najdôležitejších kyselín, ketónov a esterov rástol počas prvých 60 dní zrenia. Typickými zlúčeninami tohto syra boli: kyselina butánová, hexánová, oktánová, bután-2-ol, heptán-2-ol, etyl hexanoát a butanoát, bután-2-ón, pentán-2-ón, heptán-2-ón a δ -dekalaktón. Delgado a kol. [168] taktiež sledovali pomocou GC-MS rozdiely počas zrenia španielskeho ovčieho syra. Najdôležitejšími SAL boli kyselina octová, propyl butanoát, 3-metylbutánová a bután-2-ón. Pomocou GC-MS Hayaloglu a kol. [203] identifikovali ketóny a alkoholy ako hlavné SAL v plesňovom syre Kuflu.

Salum a kol. [204] optimalizovali metódu SPME s dvomi rôznymi vláknami pre stanovenie prchavých zlúčenín v bielom tureckom syre. Výsledky ukázali, že extrakcia prchavých látok s nižším bodom varu bola lepšia s vláknom CAR/PDMS 75 μ m (ideálne podmienky: teplota extrakcie – 56,2 °C, doba extrakcie – 84,92 min) než s DVB/CAR/PDMS 50/30 μ m (ideálne podmienky v uvedenom poradí: 54,75 °C, 85,60 min). Štandardy desiatich látok (isoamylalkohol, etyl butanoát, nonán-2-ón, etyl oktanoát, 2-etylhexán-1-ol, kyselina butánová, fenylalkohol, fenol, δ -dekalaktón, dekánová kyselina) boli použité k optimalizácii. Analýza bola prevedená na GC-MS a GC-FID. Tureckým syrom sa tiež zaoberali Hayaloglu a Karabulut [203]. Identifikovali 112 SAL v 11 rôznych druhoch tureckého syru, pričom najviac zastúpené boli ketóny, estery a alkoholy. Kavaz a kol. [205] analyzovali turecké bylenné syry a identifikoval v nich 60 SAL, z ktorých boli dôležité acetaldehyd, hexánál, etanol, etyl acetát, pentán-2-ón, heptán-2-ón, nonán-2-ón, hexán, heptán a toluén. Ozturkoglu-Budak a kol. [206] analyzovali profil SAL polotvrdého syru Divle Cave z odstredeného nepasterizovaného ovčieho mlieka. Vláknko 75 μ m CAR/PDMS vystavili vzorke (30 min, 60 °C) zreých syrov (1, 30, 60, 90, 120 dní) od troch dodávateľov. Charakteristické aróma tohto syra tvorili kyselina butánová, octová, pentánová, etyl butanoát, bután-2-ol, bután-2-ón, heptán-2-ón, α -pinén a toluén.

Bezzera a kol. [207] optimalizovali techniku HS-SPME-GC-MS pre stanovenie SAL v kozom syre Coalho a taktiež Mondello a kol. [186] v syre sicílskeho pôvodu. Spomedzi štyroch vlákien (DVB/CAR/PDMS – 50/30 μm ; PDMS – 100 μm ; CW/DVB – 65 μm , PDMS/DVB – 65 μm) najviac adsorbovaných látok poskytovalo DVB/CAR/PDMS vlákno, ktoré vybrali pre HS-SPME analýzu. Celkovo 32 SAL bolo identifikovaných pri optimalizovaných podmienkach: rovnováha – 20 min, extrakcia – 40 min, teplota – 45 °C. Taktiež sledovali v rovnakom syre vplyv pridaných BMK. Najväčší vplyv na aromatický profil mala dĺžka skladovania – 4 týždne. Identifikovaných bolo 25 SAL. Predovšetkým ketóny a estery mali priaznivý vplyv na tvorbu flavouru kozieho syru Coalho, ktoré zároveň pomáhajú minimalizovať off-flavour [208].

Caporaso a kol. [209] skúmali flavour zmesového talianskeho syra Conciato Romano vyrobeného z kozieho, ovčieho a kravského mlieka, ktorý následne zreje v olivovom oleji, víne a korení. Celkovo bolo identifikovaných 76 SAL (podmienky: vlákno DVB/CAR/PDMS – 50/30 μm , 60 minút pri 40 °C). Vyšší obsah SAL obsahovala kôra syrov – fenylacetát, 2-fenyletanol, nonán-2-ón, kyselina oktánová, dekánová a dodekánová. Januskiewicz a kol. [138] optimalizovali rovnakú metódu pre syr Čedar, v ktorom bolo identifikovaných 180 rôznych SAL. Spomedzi troch vlákien (CAR/PDMS – 85 μm , CW/DVB – 65 μm , PA – 85 μm) bolo vybrané CAR/PDMS ako optimálne pre vysokú účinnosť a počet nasorbovaných zlúčenín. Rovnaký syr analyzovali aj Iwasawa a kol. [210]. Sberveglieri [211] validoval tú istú metódu pre taliansky syr Parmigiano Reggiano. Neskôr analyzovali 25 zrelých vzoriek tohto syra (1 – 3 roky) vláknom DVB/CAR/PDMS (50/30 μm). Izolovaných bolo 150 SAL (15 min, 50 °C) [212]. Urgeghe a kol. [166] charakterizovali profil ovčieho syru Fiore Sardo – najväčšie zastúpenie mali karboxylové kyseliny (68 %), estery (14 %), ketóny (9 %) a alkoholy (8 %). Sulejmani a Hayaloglu [213] skúmali vplyv dohrievania syreniny (60, 70, 90 °C – 5 min) na tvrdý syr Kashkaval. Najväčší obsah bol kyselín a esterov (57,1 a 26,8 %). Najviac SAL obsahoval 120 dní zrejúci syr.

V ďalšej publikácii Sulejmani a kol. [214] popisujú profil macedónskeho ovčieho syru Beaten stanovený rovnakým vláknom (40 °C, 20 min). Identifikovaných bolo 62 SAL. Ceruti a kol. [215] skúmali prchavé látky pri rôznej dobe a teplote uskladnenia tvrdého argentínskeho syru Reggianito. Vláknom DVB/CAR/PDMS (50/30 μm) bolo extrahovaných (30 min, 40 °C) 41 SAL, z ktorých hlavných podiel tvorili VMK s krátkym reťazcom. Najväčšie zmeny profilu SAL boli identifikované počas prvých dvoch mesiacov zrenia, čo súvisí s nárastom koncentrácie VMK, ale aj ketónov, aldehydov, etyl butanoátu a alkoholov. Hamama a kol. [216] analyzovali flavour kozieho syra Bouhezza vyrábaného z nepasterizovaného mlieka za použitia rovnakého vlákna pri 37 °C za 30 min. Najdôležitejšie skupiny z 50 identifikovaných SAL tvorili estery, aldehydy a ketóny. Rovnakým vláknom Bergamaschi a kol. [217] stanovili 55 SAL v modelových vzorkách syrov z mlieka hnedého švajčiarskeho plemena kráv. Aromatický profil syrov bol ovplyvnený systémom chovu, laktáciou a dennou dojivosťou kráv. Suzzi a kol. [218] charakterizovali DVB/CAR/PDMS (65 μm) vláknom celkovo 50 SAL v talianskom syre Pecorino di Farindola (50 °C za 40 min). Bovolenta a kol. [219] analyzovali taliansky syr Montasio, kde najviac zastúpených SAL z celkového počtu 61 zlúčenín bolo kyselín, esterov a alkoholov - tenšia vrstva sorbentu (30/50 μm). Boltar a kol. [220] identifikovali 60 SAL v slovinskom tvrdom syre Nanos. Doba extrakcie vláknom DVB/CAR/PDMS (50/30 μm) a CAR/PDMS (85 μm) bola 24 hodín.

Najväčšie rozdiely medzi zlúčeninami z rôzne vyzretých syrov z rôznych výrobných období (ročné obdobia) boli v obsahu kyselín: octovej, butánovej, 3-metylbutánovej, hexánovej, oktánovej, dekanovej; taktiež etylesteru kyseliny hexánovej, sabinénu, bután-2-ónu a α -pinénu. Proces zrenia indukoval pokles koncentrácie biacetylú a acetoínu a naopak nárast kyselín a esterov.

Aminifar a Emamdjome [221] charakterizovali (DVB/CAR/PDMS 50/30 μm , 40 °C, 20 a 30 min) v ovčom syre Lighvan 41 SAL. Medzi najdôležitejšie patrili karboxylové kyseliny, ktorých koncentrácia, rovnako ako ďalších zlúčenín (ketóny, aldehydy, estery, cyklické aromatické zlúčeniny) počas zrenia (90 dní) stúpala; koncentrácia alkoholov naopak klesala. Palencia a kol. [222] analyzovali (DVB/CAR/PDMS 50/30 μm) údený a neúdený mäkký syr Herreño z Kanárskych ostrovov (zmes kravského, kozieho a ovčieho mlieka). Najpočetnejšou skupinou v neúdených syroch boli uhl'ovodíky, terpény a seskviterpény. Údený syr bol obohatený o ketóny a diketóny, metylestery, aldehydy, dusíkaté zlúčeniny, estery a fenoly. Celkovo bolo identifikovaných 228 zlúčenín. Milosavljević a kol. [223] testovali vlákna PDMS (100 μm) a PA (85 μm) k identifikácii SAL vo dvoch rôznych syroch Pasta-Filata počas zrenia (1, 5, 20 a 30 dní). Jeden vyrobený z ovčieho a druhý z kravského mlieka. Všeobecný profil syru poskytovalo PA vlákno, zatiaľ čo PDMS kládlo dôraz na kvalitu a kvantitu určitých SAL.

Del Mar Cajaa kol. [224] analyzovali (CAR/PDMS 85 μm , 40 °C, 30 min) španielsky syr Manchego. Pri optimalizácii testovali rôznu teplotu (40, 50, 60 °C), čas extrakcie (5, 15, 30, 40 min) a rôzne vlákna (PDMS 100 μm , PDMS/DVB 65 μm , CAR/PDMS 85 μm). Metódu optimalizoval na základe kľúčových zlúčenín v syre: kyselina octová, propánová, butánová, hexánová, oktánová a dekanová. Fernandéz a kol. [225] identifikovali rovnakým vláknom 60 SAL v syroch typu Gouda a Manchego.

Zabaleta a kol. [226] identifikovali v komerčných ovčích syroch vláknom DVB/CAR/PDMS (50/30 μm) 77 prchavých zlúčenín. Off-flavour spôsobovali kyselina butánová, hexánová a ich metylestery tvorené lipolýzou počas zrenia. Trpký off-flavour spôsobujú produkty katabolizmu AMK 3-metylbután-1-ol, 2-fenyletanol a 4-metylphenol, kyslý off-flavour spôsobuje hlavne kyselina octová. Shiota a kol. [145] použili rovnakú metódu pre stanovenie aromatického profilu Goudy (37 °C, 60 min). Spoločne porovnávali SPME s SDE metódou. Až 19 zlúčenín bolo identifikovaných a kvantifikovaných SDE-GC-MS, o 3 viac než u SPME-GC-MS.

Ako je vidieť z uvedených prác, v rámci problematiky SAL je GC-MS veľmi užitočnou metódou pre ich identifikáciu a kvantifikáciu, ale neumožňuje zistiť, či je daná prchavá látka skutočne aromatická alebo nie, to jest či vykazuje nejaký pach/vôňu. Ideálnym variantom je túto techniku kombinovať s olfaktometrickým detektorom, pričom operátor súčasne prevádza aj kontinuálnu čuchovú analýzu s individuálnym senzoričným popisom pre charakterizáciu aróma. Vzhľadom ku vzájomnému ovplyvňovaniu jednotlivých zlúčenín (antagonizmus / synergizmus) však ani toto spojenie nedáva presnú predstavu o príspevku jednotlivých prchavých zlúčenín k celkovému flavouru [66].

2.10.4 Plynová chromatografia s olfaktometriou

Plynová chromatografia s olfaktometriou (GC-O, Gas Chromatography-Olfactometry) je moderná, často používaná a publikovaná metóda pre charakterizáciu SAL v rôznych typoch potravín vrátane syrov [117]. Po separácii jednotlivých látok pomocou GC dochádza k ich identifikácii na základe interakcie s ľudskými čuchovými receptormi [117]. GC-O je jediná metóda schopná definovať či prchavá zlúčenina vykazuje nejaký pach (vôňu/zápach) a zároveň dokáže popísať profil pachu. Metóda je náročná na čas a skúsenosti hodnotiteľov [155], v súčasnosti však často používaná a bola publikovaná vo veľkom množstve nižšie citovaných prác, ktoré sa zaoberali charakterizáciou SAL rôznych potravín (viď Tabuľka 11). Taktiež pomáha vybrať tie zložky extraktu, ktoré definujú celkový flavour produktov. Odlišná selektivita ľudského nosu však spôsobuje rozdiel medzi výstupom z GC detektorov a GC-O analýzou.

Ľudský nos je cca 1000-krát citlivejší ako FID, takže môže odhaliť aj stopové množstvá chemických zlúčenín v koncentrácii hlboko pod hranicou detekcie FID. Prahová koncentrácia konkrétnych SAL je na tomto jave závislá a pre každú jednu prchavú látku sa líši, niekedy až v niekoľko násobnom množstve [115].

Curioni a Bosset [66] analyzovali s použitím GC-O syry a rozdelili v nich SAL na alkoholy, aldehydy, ketóny, estery, laktóny, furány, alkalické zlúčeniny (dusíkaté zlúčeniny, pyrazíny, sírne zlúčeniny, terpény) a kyslé zlúčeniny (fenoly, VMK).

Cieľom výskumu Rychlika a Bosseta [116] bolo aktualizovať znalosti o identifikácii kľúčových odorantov vo švajčiarskom syre Gruyere. Významnú úlohu v tvorbe profilu syra hrali metyltiol, dimetylsulfid a etyl-2-metylbutanoát. Frank a kol. [171] zistili metódami GC-O a GC-MS, že hlavnými SAL v syroch Čedar, tvrdom syre (bližšie nešpecifikovanom) a syre s modrou plesňou sú metántiol, 3-metyltiopropánál, dimetyltrisulfid a kyselina maslová a teda tvoria základ syrového aróma. Tvrdé syry obsahovali vysoké koncentrácie kyseliny maslovej a hexánovej; syry s modrou plesňou zase heptán-2-ón.

Cornu a kol. [227] identifikovali s GC-O v syre Cantal celkovo 42 SAL. Hlavnými odorantami boli kyselina maslová, biacetyl, 3-metyltiopropánál, hexánal, kyselina octová, kyselina isomaslová, okt-1-én-3-ol.

Fuchsman a kol. [228] analyzovali SAL v troch komerčne dostupných švajčiarskych syroch Tilsit. Flavour všetkých troch syrov bol charakterizovaný ako maslovo-syrový so syrovým pachom. Maslovo-syrovou príchuťou sa vyznačuje kyselina maslová, 3-metylbutánová, bután-2,3-dión. Z celkových 30 sírnych SAL ovplyvňovali celkové aróma iba bis(metyltio)metán, 3-(metyltio)propanál, dimetyldisulfid, dimetyltrisulfid, metántiol a 2-metyltetrahydrotiofén-3-ón.

Yalman a kol. [229] skúmali chemické, fyzikálne a senzorické zmeny v tureckom syre Kasar a z nich vyrobených tavených syroch a analógoch počas 90 dní skladovania. Z celkovo identifikovaných 18 SAL boli najvýznamnejšie biacetyl, kyselina octová, butánová, 2- a 3-metylbutánová, 2-acetyl-2-tiazolín, 2-fenyletanol, maltol, p-kresol, sotolon, δ -dekalaktón a γ -dodekalaktón. V syrových analógoch bol detegovaný voskový a trpký off-flavour, podstatne silnejší než v prírodných syroch.

Sádecká a kol. [98], [230] skúmali tradičný ovčí syr bryndza metódou GC-FID-O paralelne s GC-MS. Identifikovali celkovo 39 kľúčových SAL, z ktorých najvýznamnejšie boli kyseliny butánová, isovalérová, hexánová, oktánová, dekánová, etyl -butanoát / -hexanoát / - oktanoát, p-kresol a δ -dekalaktón.

Valdivielso a kol. [231] sledovali zmeny v ovčom syre. Siefert a Buettner [232] analyzovali SAL v surovom kozom mlieku. Najvyššiu intenzitu z 54 detegovaných a 42 identifikovaných SAL vykazovali kyseliny 4-etyloktánová a 3-metylindolová (skatol).

Morita a kol. [233] identifikovali v syre Čedar 98 zlúčenín, z čoho 15 SAL pomocou GC-O. Rapisarda a kol. [234] analyzovali jariné, letné a jesenné kravské mlieko. Jariné mlieko vykazovalo väčšiu variabilitu zlúčenín než mlieko jesenné. Celkovo 197 SAL bolo detegovaných pomocou GC-O, z ktorých 87 % bolo identifikovaných na GC-MS.

Pomocou GC-O charakterizovali Pomocou GC-O charakterizovali Majcher a Jeleń [201] charakterizovali aromatický profil v tradičnom poľskom syru Oscypek, a to údenom a neúdenom. Analýza odhalila 20 SAL v údenom a 8 v neúdenom syre, pričom najintenzívnejšími odorantami boli 2-metoxyfenol, 2-metoxy-4-metylfenol. 4-metylfenol a kyselina maslová.

3 CIELE DIZERTAČNEJ PRÁCE

Cieľom dizertačnej práce bolo popísať zmeny senzorickej kvality (flavouru) modelových syrov vybraného typu (eidamský syr a Moravský blok/bochník) v priebehu zrenia, v závislosti na typu použitej mikrobiálnej kultúry. Ako hlavné parametre charakterizujúce flavour vzoriek boli vybrané a sledované: profil prchavých (senzoricky aktívnych) látok a voľných/viazaných mastných kyselín ako ich prekurzorov.

Za účelom splnenia cieľov boli v rámci dizertačnej práce riešené tieto dielčie úlohy:

- spracovanie literárnej rešerše zhrnajúcej súčasný stav riešenej problematiky,
- na základe rešerše výber vhodných metód pre stanovenie SAL a MK,
- overenie, optimalizácia a validácia vybraných metód (HS-SPME-GC-MS, GC-FID),
- výroba modelových vzoriek syrov, charakterizácia ich kvality s využitím zmienených metód
- porovnanie vyrobených vzoriek s komerčnými syrmi obdobného typu
- posúdenie vplyvu použitej mikrobiálnej kultúry na profil SAL a MK vyrobených vzoriek,
- sledovanie zmien SAL a MK v priebehu zrenia syrov.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Laboratórne vybavenie

4.1.1 Prístroje

Pre stanovenie MK bol použitý plynový chromatograf TRACE™ GC 2000 (ThermoQuest Italia S. p. A, Taliansko) s plameňovo-ionizačným detektorom a split/splitless injektorom.

Pre stanovenie SAL bol použitý plynový chromatograf TRACE™ 1310 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) s adaptérom pre SPME a hmotnostným detektorom ISQ™ LT Single Quadrupole (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) spolu s knižnicou spektier NIST/EPA/NIH, Verzia 2.0 (Gaithersburg, USA).

Pre navažovanie vzorky, štandardov a chemikálií boli použité analytické digitálne váhy GR-202-EC, HELAGO, Taliansko.

Extrakcia bola prevedená vo vodnej kúpeli so stojanmi, Julabo TW 2 (Nemecko). Esterifikácia bola prevedená v klasickej priamej destilačnej aparatúre s vykurovacím hniezdom 100 ml (Brněnská Druťeva v. d., Česká republika). Rozpúšťadlo z esterifikačného roztoku bolo následne odparené na vákuovej rotačnej odparke KIKA®-WEKE-RV06-ML (Nemecko).

4.1.2 Pracovné pomôcky

Pre sorpcie SAL zo vzorky bolo použité SPME vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30 μm (Supelco, Bellefonte, Pensylvánia, USA), vialky so skrutkovým magnetickým uzáverom a septom (objem 10 ml). Ďalej boli použité pre pipetovanie malých objemov automatické pipety 100-1000 μl (Biohit Proline, Fínsko) a bežné laboratórne sklo Simax (Kavalier, ČR) a pomôcky.

4.1.3 Chemikálie

Pre stanovenie MK boli použité nasledujúce chemikálie, všetky v čistote p.a: kyselina chlorovodíková 35% p. a., PENTA, Česká republika, etanol 96 % p. a., Lach-Ner, Česká republika, dietyléter p. a., Lach-Ner, Česká republika, petroléter p. a., Lach-Ner, Česká republika, hydroxid sodný p. a., Lach-Ner, Česká republika, metanol p. a., Lach-Ner, Česká republika, chlorid sodný p. a., Lach-Ner, Česká republika, síran sodný (bezvodný) p. a., Lach-Ner, Česká republika, hexán p. a., Lach-Ner, Česká republika, bórtrifluorid (metanolický roztok 10 %), p. a., SIGMA-ALDRICH, Nemecko a zmes štandardov metylesterov mastných kyselín, Supelco™ 37 Component FAME Mix, SIGMA-ALDRICH, Nemecko.

4.2 Čisté mliekarenské kultúry

Pre výrobu modelových syrov boli použité komerčne dostupné lyofilizované kultúry vhodné ku priamemu zaočkovaniu do mlieka (Chr. Hansen, Česká republika); CCDM (Česká zbierka mliekarenských mikroorganizmov).

Pre výrobu modelových syrov typu Moravský bochník (Experiment I) boli použité:

- Mezofilná aromatická kultúra – typ LD Flora Danica – zloženie: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc* spp.
- Termofilná kultúra LH-B02 – *Lactobacillus helveticus*
- Termofilná kultúra STI-12 – *Streptococcus thermophilus*

Pre výrobu modelových syrov eidamského typu (Experiment II) boli použité:

- Mezofilná aromatická kultúra totožná ako pre experiment I
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (kmeň CCDM 946)
- *Lactobacillus casei* (kmeň CCDM 198)
- *Lactobacillus casei* (kmeň CCDM 422)
- *Lactobacillus plantarum* (kmeň CCDM 187)
- *Lactobacillus plantarum* (kmeň CCDM 189)

4.3 Analyzované vzorky

V rámci tejto práce boli prevedené dva obdobné experimenty zamerané na výrobu a následnú analýzu modelových vzoriek syrov.

V rámci **experimentu I** boli analyzované vzorky prírodných syrov typu Moravský bochník (45 % t. v s., 60 % sušiny), ktoré boli vyrobené štandardným technologickým postupom [15] (viď kapitola 2.1.5) počas júna – septembra 2016 na Univerzite Tomáša Bati v Zlíne.

Celkovo boli vyrobené 3 série vzoriek (A, B, C) ktoré sa líšili kombináciou použitých mikrobiálnych kultúr (viď Tabuľka 12).

Tabuľka 12: Použité kombinácie mikrobiálnych kultúr (Experiment I)

Kombinácia kultúr (% hm.)	Mezofilná kultúra	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Označenie vzorky			
A	77	15	8
B	70	15	15
C	25	50	25

U jednotlivých sérií boli odobrané vzorky po 2, 3, 4 a 8 mesiacoch zrenia; prehľad analyzovaných vzoriek a ich označenia je uvedený v Tabuľka 13.

Tabuľka 13: Prehľad a kódovanie modelových vzoriek (Experiment I)

Použitá kultúra	Doba zrenia [mesiac]			
	2	3	4	8
A	A2	A3	A4	A8
B	B2	B3	B4	B8
C		C3	C4	

V rámci **experimentu II** boli analyzované vzorky prírodných syrov eidamského typu (45 % t. v s., 50 % sušiny), ktoré boli vyrobené štandardným technologickým postupom [15] počas augusta – októbra 2018 na Univerzite Tomáša Bati v Zlíne. Celkovo bolo vyrobených 5 sérií vzoriek (D, G, H, I, J), ktoré sa líšili kombináciou použitých mikrobiálnych kultúr; u všetkých bola ako základ použitá mezofilná kultúra s prídavkom vybraného kmeňa *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (CCDM 946), a ďalej vybrané kmene *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus plantarum* (Tabuľka 14). U každej série boli odobrané vzorky po 14, 28 a 56 dňoch zrenia; prehľad analyzovaných vzoriek a ich označenie je uvedené v Tabuľka 15.

Tabuľka 14: Použité kombinácie mikrobiálnych kultúr (Experiment II)

Označenie vzorky	Mezofilná zmesová kultúra + <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (CCDM 946)	<i>Lactobacillus casei</i> (kmeň CCDM)	<i>Lactobacillus plantarum</i> (kmeň CCDM)
D	x	-	-
G	x	422	-
H	x	-	187
I	x	-	189
J	x	198	-

Tabuľka 15: Prehľad a kódovanie modelových vzoriek (Experiment II)

Použitá kultúra	Doba zrenia		
	14 dní	28 dní	56 dní
D	D14	D28	D56
G	G14	G28	G56
H	H14	H28	H56
I	I14	I28	I56
J	J14	J28	J56

Všetky vzorky boli okamžite po odberu zmrazené (-18 °C) a uchované až do doby analýzy. Pre porovnanie boli analyzované komerčné vzorky prírodných syrov: Moravský Bochník (45 % t. v s., suš. 60 %), Ementál (plátky, 45 % t. v s., suš. 60 %) a 3 druhy syrov eidamského typu s rôznym obsahom t. v s. (20, 30 a 45 %) zakúpené v bežnej tržnej sieti. Pre GC-O bol použitý komerčne dostupný syr eidamského typu (45 % t. v s., suš. 60 %)

4.4 Použité metódy pre stanovenie mastných kyselín

Pre identifikáciu a kvantifikáciu MK a VMK v modelových vzorkách syrov boli MK vo vyzolovanom tuku najprv prevedené esterifikáciou na MEMK a následne podrobené analýze pomocou GC-FID.

4.4.1 Extrakcia lipidov zo vzorky syra

Extrakcia lipidov zo vzoriek syra bola prevedená podľa normy ČSN EN ISO 1735:2005 [235].

Princíp: po rozpustení netukových látok výrobku sa uvoľnený tuk vytrepe kvantitatívne zmesou dietyléteri a petroléteri (2:1 w/w) a po ich odparení sa zväži.

Príprava vzorku k analýze: odstráni sa kôra alebo povrchová vrstva syra (vzorka syra je vo forme obvyklej konzumácie). Syr sa nastrúha na jemnom strúhadle a uchováva sa v uzavretej prachovnici až do doby analýzy (najlepšie v ten istý deň).

Pred analýzou bol syr premiešaný, navážený na analytických váhach s presnosťou na 4 desatinné miesta a pridaný ku 5 ml kyseliny chlorovodíkovej. Následne bola skúmavka vložená do vodného kúpeľa o teplote 80 °C, kde bola ponechaná do doby, než došlo ku zmene sfarbenia roztoku na fialovú (približne 10 minút), následne bola zmes ochladená pod tečúcou vodou. Po ochladení bola zmes pomocou 5 ml etanolu kvantitatívne prevedená do deliaceho lieviku. V prvom kroku bolo ku zmesi v deliacom lieviku pridaných 9 ml dietyléteri, v druhom kroku 9 ml petroléteri a zakaždým bola zmes po prídavku extrakčného činidla pretrepaná po dobu asi 1 minúty. Pre oddelenie fáz sa roztok nechal odstáť po dobu 30 minút pri laboratórnych podmienkach (pri teplote cca 22 °C). Do skôr zvaženej a vysušenej destilačnej banky s guľatým dnom (100 ml) bola opatrne odobraná pipetou vrchná hydrofóbna vrstva a pre dolnú hydrofilnú vrstvu bol proces extrakcie ešte následne dvakrát zopakovaný rovnakým spôsobom, ale s polovičným množstvom extrakčných činidiel. Z výsledného extraktu (spojením produktov zo všetkých troch extrakčných krokov) bolo rozpúšťadlo odparené na vákuovom rotačnom odparovacom zariadení pri teplote 40 °C.

Množstvo vyextrahovaného tuku sa zistí gravimetricky – zvážením vyextrahovaného tuku na analytických váhach. Takto získaný tuk je možné podrobiť priamo esterifikácii.

4.4.2 Príprava metylesterov mastných kyselín

Pre prípravu MEMK bola použitá kyslá esterifikácia s bórtrifluoridom ako katalyzátorom.

4.4.2.1 Kyslá esterifikácia s bórtrifluoridom ako katalyzátorom (TAG)

Princíp: v prvom kroku bázekej katalýzy sú acylglyceroly transmetylované pomocou metanolickeho roztoku hydroxidu sodného na metylestery, prítomné VMK sú prevedené na soli. V druhom kroku kyslej katalýzy sú soli MK prevedené na metylestery reakciou s komplexom BF₃-metanol [236].

Postup: Do destilačnej banky s guľatým dnom (50 ml) bol kvantitatívne prevedený vyextrahovaný tuk. Pridalo sa 4 ml metanolickeho roztoku hydroxidu sodného ($c = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), ktorý bol pripravený rozpustením 2 g hydroxidu sodného v 100 ml metanolu pri miernom ohreve (metanolickeý roztok je možné uchovávať v chlade po dobu najdlhšie 3 mesiacov), a tiež varný kamienok. Obsah banky sa varil pod spätným chladičom do momentu zmiznutia kvapôčok tuku. Každých cca 30 sekúnd je potrebné banku jemnými krúživými pohybmi premiešať, inak sa na stene banky tvorí pevný krúžok hydroxidu sodného (neúčinná reakcia). Tento krok zvyčajne trvá 5 až 10 minút.

Potom sa do vriacej zmesi cez spätný chladič pridalo 5 ml metanolickeho roztoku bórtřifluoridu a pokračuje sa vo vare (celková doba od začiatku varu je 30 minút). Nasledujú 3 ml polárneho rozpúšťadla isooktanu, ktorý sa opäť pridalo do zmesi cez horný koniec spätného chladiča. V tomto momente sa destilačná banka aj s celou aparátúrou zdvihla a vytiahla z vykurovacieho hniezda a var sa zastavil. Ihneď, bez akéhokoľvek chladenia, sa pridalo do zmesi 20 ml nasýteného vodného roztoku chloridu sodného, banka sa uzavrela a pretrepala 15 sekúnd. Potom sa pridalo väčšie množstvo nasýteného vodného roztoku chloridu sodného tak, aby hladina kvapaliny dosiahla hrdla banky a bolo možné rozpoznať rozhranie dvoch fáz. Banka sa pre oddelenie fáz nechala odstáť na asi 5 minút. Z hornej isooktánovej vrstvy sa odobralo 1 – 2 ml do 4 ml vialky a pre odstránenie stôp vlhkosti bolo pridané malé množstvo bezvodého síranu sodného. Pre analýzu na GC sa využil 1 ml pripraveného roztoku 10x až 100x zriedeného (pozn. pre samotnú analýzu sa dávkuje 1 μ l roztoku).

4.4.2 Kyslá esterifikácia s bórtřifluoridom ako katalyzátorom (VMK)

Princíp: VMK sú esterifikované zahrievaním v prebytku bezvodého metanolu v prítomnosti BF_3 ako katalyzátoru [236].

Postup: Do destilačnej banky s guľatým dnom (50 ml) sa kvantitatívne previedol vyextrahovaný tuk. K banke sa pripojil spätný chladič, pridalo sa varný kamienok a 5 ml metanolickeho roztoku bórtřifluoridu cez spätný chladič, zmes sa priviedla k varu. Po 3 minútach sa do vriacej zmesi cez horný koniec spätného chladiča pridali 3 ml polárneho rozpúšťadla isooktanu, var bol zastavený vysunutím celej sústavy z vykurovacieho hniezda. Ihneď, bez akéhokoľvek chladenia, sa pridalo do zmesi približne 20 ml nasýteného vodného roztoku chloridu sodného a obsah banky bol dôkladne pretrepán cca 15 sekúnd. Po prídavku väčšieho množstva nasýteného roztoku chloridu sodného, ktorý spôsobil zvýšenie hladiny kvapaliny až po hrdlo banky (kvôli jednoduchšiemu odobratu vrchnej organickej fáze – viditeľné rozhranie fáz), sa fáze nechali behom približne 5 minút oddeliť. Z hornej isooktánovej vrstvy sa odobralo 1-2 ml do 4 ml vialky a pre odstránenie stôp vlhkosti bolo pridané malé množstvo bezvodého síranu sodného. Pre analýzu na GC sa využil 1 ml pripraveného roztoku (pozn. pre samotnú analýzu sa dávkuje 1 μ l roztoku).

4.4.3 Podmienky stanovenia metylesterov mastných kyselín

Pre stanovenie MK bol použitý plynový chromatograf TRACE™ GC (ThermoQuest S.p.A, Taliansko) s autosamplerom: AI/AS 3000 a plameňovo-ionizačným detektorom (teplota detektoru 250 °C). Prietok vzduchu bol 350 ml \cdot min⁻¹, prietok vodíku bol 35 ml \cdot min⁻¹ a make-up dusíku 30 ml \cdot min⁻¹. Teplota injektora bola 250 °C a technika dávkovania bola splitless (ventil uzavretý na 1 minútu). Dávkovaný objem vzorky bol 1 μ l. Ako nosný plyn bol použitý dusík o prietoku 1 ml \cdot min⁻¹. Separácia MEMK prebehla na kapilárnej kolóne DB-WAX s vysoko polárnou stacionárnou fázou (30 m x 0,32 mm x 0,5 μ m). Teplotný program bol nasledovný: 50 °C 1 minúta; vzostupný gradient 25 °C \cdot min⁻¹ do 200 °C s výdržou 0 minút; vzostupný gradient 3 °C \cdot min⁻¹ do 230 °C s výdržou 30 minút. Celková doba analýzy bola 47 minút.

4.4.4 Identifikácia a kvantifikácia mastných kyselín

MK boli stanovené vo forme MEMK metódami popísanými v predošlej kapitole (4.4.2). Identifikácia jednotlivých MEMK v modelových vzorkách bola prevedená na základe porovnania retenčných časov s retenčnými časmi štandardov. Kvantifikácia bola prevedená výpočtom ich koncentrácie z plôch píkov MEMK vo vzorkách a známej koncentrácie a plôch píkov štandardov (Tabuľka 16). Zastúpenie MK je vyjadrené po prepočte v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ vyextrahovaného tuku (za predpokladu: $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \approx \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$).

Tabuľka 16: Štandardy použité pre identifikáciu a kvantifikáciu MK

Názov MK	Skrátený zápis MK	T_R [min]	c_s [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]	$M_{r_{\text{MEMK}}}$ [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]	$M_{r_{\text{MK}}}$ [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$]
Kyselina kaprónová	C6:0	5,74	0,04	130,187	116,160
Kyselina kaprylová	C8:0	6,87	0,04	158,241	144,214
Kyselina kaprínová	C10:0	8,01	0,04	186,295	172,268
Kyselina undekánová	C11:0	8,64	0,02	200,322	186,295
Kyselina laurová	C12:0	9,37	0,04	214,349	200,322
Kyselina tridekánová	C13:0	10,20	0,02	228,376	214,349
Kyselina myristová	C14:0	11,19	0,04	242,403	228,376
Kyselina myristoolejová	C14:1 ^{Δ9}	11,67	0,02	240,387	226,360
Kyselina pentadekánová	C15:0	12,35	0,02	256,430	242,403
Kyselina cis-10-pentadecénová	C15:1 ^{Δ10}	12,92	0,02	254,414	240,387
Kyselina palmitová	C16:0	13,72	0,06	270,457	256,43
Kyselina palmitoolejová	C16:1 ^{Δ9}	14,19	0,02	268,441	254,414
Kyselina heptadekánová	C17:0	15,25	0,02	284,484	270,457
Kyselina cis-10-heptadecénová	C17:1 ^{Δ10}	15,79	0,02	282,468	268,441
Kyselina stearová	C18:0	16,99	0,04	298,511	284,484
Kyselina olejová	C18:1 ^{Δ9}	17,47	0,04	296,495	282,468
Kyselina linolová	C18:2 ^{Δ9,12}	18,46	0,02	294,479	280,452
Kyselina γ-linolénová	C18:3 ^{Δ6,9,12}	19,21	0,02	292,463	278,436
Kyselina α-linolénová	C18:3 ^{Δ6,12,15}	20,02	0,02	292,463	278,436
Kyselina arachová	C20:0	21,56	0,04	326,565	312,358
Kyselina cis-11-eikosénová	C20:1 ^{Δ11}	22,30	0,02	322,533	308,506

Tabuľka 16: Štandardy použité pre identifikáciu a kvantifikáciu MK - pokračovanie

Názov MK	Skrátený zápis MK	T_R [min]	c_s [mg·ml ⁻¹]	Mr_{MEMK} [g·mol ⁻¹]	Mr_{MK} [g·mol ⁻¹]
Kyselina heneikosánová	C21:0	24,80	0,02	340,592	326,565
Kyselina cis-8,11,14-eikosatriénová	C20:3 ^{Δ8,11,14}	25,02	0,02	320,517	306,490
Kyselina cis-11,14,17-eikosatriénová	C20:3 ^{Δ11,14,17}	25,99	0,02	316,485	302,458
Kyselina arachidonová	C20:4 ^{Δ5,8,11,14}	26,47	0,02	318,501	304,474
Kyselina behénová	C22:0	28,96	0,04	354,619	340,592
Kyselina eruková	C22:1 ^{Δ13}	30,16	0,02	352,603	338,576
Kyselina cis-13,16-docosadiénová	C22:2 ^{Δ13,16}	32,90	0,02	350,587	336,560
Kyselina trikosánová	C23:0	34,29	0,02	368,646	354,619
Kyselina lignocérová	C24:0	41,21	0,04	382,673	368,646
Kyselina nervónová	C24:1 ^{Δ15}	43,29	0,02	380,657	366,630
Kyselina cis-4,7,10,13,16,19-dokosaheptaénová	C22:6 ^{Δ4,7,10,13,16,19}	43,79	0,02	342,523	328,496

MK – masná kyselina, *MEMK* – metylester mastnej kyseliny, T_R – retenčný čas *MEMK*, c_s – koncentrácia štandardov *MEMK*, Mr_{MEMK} – molekulová hmotnosť *MEMK*, Mr_{MK} – molekulová hmotnosť *MK*

4.5 Použité metódy pre stanovenie senzoricky aktívnych látok

Pre identifikáciu a semikvantifikáciu SAL v modelových vzorkách syrov bola použitá metóda headspace mikroextrakcie na pevnú fázu v spojení s plynovou chromatografiou s hmotnostným spektrometrom (HS-SPME-GC-MS).

4.5.1 Príprava vzorky syru

Do vialky so skrutkovaným magnetickým uzáverom boli navážené 2 g s presnosťou na 4 desatinné miesta. Vialka so vzorkou bola umiestnená do autosampleru pre analýzu.

4.5.2 Podmienky pre SPME extrakciu

Pre účel extrakcie bolo použité SPME vlákno: Supelco, Bellefonte, Pensylvánia, USA so stacionárnou fázou Divinylbenzén/Carboxen/Polydimetylsiloxán (DVB/CAR/PDMS) 50/30 μm. Doba inkubácie (temperovanie) vlákna bola 10 min a doba extrakcie 20 min.

Teplota agitátora (teplota extrakcie a inkubácie) bola nastavená na 40 °C, pričom bol agitátor zapnutý 5 s a následne vypnutý 60 s. Hĺbka ponorenia vlákna do vialky bola 20 mm.

4.5.3 Podmienky pre GC-MS analýzu

Pre stanovenie SAL bol použitý plynový chromatograf s hmotnostným spektrometrom Thermo Scientific™ ISQ™ Series GC-MS System (TRACE™ 1310 Series Gas Chromatograph, ISQ™ LT Single Quadrupole Mass Spectrometer). Teplota desorpcie (teplota injektora) bola nastavená na 240 °C a doba desorpcie na 20 minút. Hĺbka ponorenia vlákna do injektora pri desorpcii bola 40 mm. Pre techniku dávkovania bol zvolený mód splitless (ventil uzavretý na 10 minút). Ako nosný plyn bolo použité hélium (prietok: 1 ml · min⁻¹). Ku separácii došlo na kapilárnej kolóne: TG-WaxMS (30 m × 0,25 mm × 0,5 µm). Teplotný program bol nasledovný: 40 °C s výdržou 2 minúty; vzostupný gradient 3 °C · min⁻¹ do 110 °C s výdržou 10 minút; vzostupný gradient 3 °C · min⁻¹ do 200 °C s výdržou 0 minút. Celková doba analýzy bola 65 minút. Ako ionizačná technika plynnej fázy v hmotnostnom spektrometre bola použitá elektrónová ionizácia s teplotou iónového zdroja 200 °C. Typ analyzátoru bol kvadrupólový analyzátor. Skenovalo sa v rozsahu m/z 30–370 amu rýchlosťou skenovania každých 0,2 s.

4.5.4 Identifikácia a kvantifikácia senzoricky aktívnych látok

Vyextrahované prchavé zlúčeniny vo vzorkách syrov boli identifikované na základe porovnania hmotnostných spektier s dostupnou knižnicou spektier. Obsah identifikovaných zlúčenín je vyjadrený semikvantitatívne pomocou plôch príslušných píkov na chromatogramu, meraného v režime úplného skenu (30 – 370 m/z).

4.5.5 Podmienky pre GC-O analýzu

Vzorka komerčne dostupného syru eidamského typu (45 % t. v s., 60 % sušiny) bola analyzovaná na dvoch kolónach, pričom jedna obsahovala polárnu stacionárnu fázu (Supelcowax 10) a druhá nepolárnu stacionárnu fázu (RI SPB-5). Experiment prebiehal v spolupráci s Ústavom analytickej chémie na University of Life Sciences (Poznaň, Poľsko).

Celý blok eidamského syru bol nakrájaný na 1 cm kocky, zmrazený v tekutom dusíku, a následne pomletý na syrový prach. V ďalšom kroku bolo 100 g syrového prachu vložených do Erlenmeyerovej banky a extrahovaných zvlášť rozpúšťadlami o rozdielnej polarite, dietyléter (200 ml) a dichlórmetán (200 ml), každým po dobu 2 hodín. Obe frakcie boli po filtrácii spojené a následne destilované metódou SAFE. Teplota vodného kúpeľa bola 40 °C a tlak bol redukovaný pomocou rotačnej lopatkovej pumpy Edwards RV5 (<300 mTorr). Destilát s prchavými zlúčeninami bol zhromažďovaný v banke chladenej tekutým dusíkom. Po 30 minútach bola zmes sušená nad Na₂SO₄, a následne skoncentrovaná na objem 400 µl s použitím Kuderna-Danish koncentrátora (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) po dobu 8 až 10 hodín.

Prchavé látky z takto získaného SAFE extraktu boli identifikované pomocou GC-O na HP 5890 chromatografe (Hewlett-Packard, Wilmington, DE, U.S.A.) s použitím kapilárnych kolón SPB-5 (30 m x 0,53 mm x 1 μ m) (Supelco, Bellefonte, PA, U.S.A.) a Supelcowax 10 (30 m x 0,53 mm x 1 μ m). Na GC bol nainštalovaný Y rozdeľovač oddeľujúci výtok v pomere 1:1 medzi olfaktometrický port so zvlhčeným vzduchom, ktorý slúži ako make-up plyn, a plameňovo-ionizačný detektor. Ako nosný plyn pri separácii bolo použité hélium s prietokom 32,2 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$.

Teplotný program pre SPB-5 kolónu bol nasledovný: počiatočná teplota 40 $^{\circ}\text{C}$ (výdrž 1 min), vzostupný gradient 6 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ na 180 $^{\circ}\text{C}$, potom 20 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ na 280 $^{\circ}\text{C}$. Pre kolónu Supelcowax 10: počiatočná teplota 40 $^{\circ}\text{C}$ (výdrž 2 min), vzostupný gradient 6 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ na 240 $^{\circ}\text{C}$ (výdrž 2 min). Pachovo aktívne oblasti boli detegované pomocou vdychovania výtoku z GC (GC-O), traja hodnotitelia panelu určili popis prchavých SAL. Pre všetky píky a záznamy pachov boli vypočítané retenčné indexy na porovnanie získaných výsledkov s údajmi z literatúry (Príloha 1 až Príloha 8). Retenčné indexy sa vypočítali pre každú zlúčeninu pomocou homológnej série C7 – C24 n-alkánov.

4.6 Štatistické spracovanie výsledkov

Dáta boli spracované a vyhodnotené pomocou programu MS Excel 365. Každá vzorka bola analyzovaná zvlášť pre MK, VMK a SAL a každá analýza bola prevedená v 3 opakovaniach ($n = 3$).

Pre zistenie rozdielov medzi vzorkami bola použitá parametrická jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA – Analysis of Variance) s následným Tukeyho HSD-testom [237]. Pre skúmanie korelácií medzi obsahom identifikovaných zlúčenín a vizualizáciu rozdielov medzi vzorkami bola použitá analýza hlavných komponentov (PCA - Principal Component Analysis).

Všetky štatistické testovania boli prevedené na hladine štatistickej významnosti $\alpha = 0,05$; štatistický software XLstat (Addinsoft, New York, NY), SPSS Statistics 20 (IBM).

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

V rámci tejto dizertačnej práce boli prevedené dva experimenty zamerané na výrobu a následnú analýzu modelových vzoriek prírodných tvrdých a polotvrdých syrov. V rámci experimentu I boli analyzované syry typu Moravský bochník, v experimentu II syry eidamského typu.

Práca sa zaoberá posúdením senzorickej kvality syrov, so zameraním predovšetkým na chunosť (flavour) a s ňou súvisiaci obsah SAL. Pozornosť je zároveň venovaná lipidom a MK ako dôležitým prekursorom SAL v syroch.

Podstatou oboch experimentov bolo posúdenie vplyvu rôznych mikrobiálnych kultúr na obsah zmienených parametrov, zároveň boli sledované ich zmeny v priebehu zrenia syrov. Práca prebiehala v spolupráci s Univerzitou Tomáša Bati v Zlíne, modelové vzorky syrov boli vyrobené štandardným technologickým postupom (kapitola 2.1.5.2 a 2.1.6.2) v poloprevádzkových podmienkach technologického laboratória UTB v Zlíne, ktorá disponuje potrebným technologickým vybavením pre výrobu syrov.

Pre stanovenie MK a VMK bola aplikovaná izolácia lipidov zo vzorky zmesou rozpúšťadiel dietyléter a petroléter (kapitola 4.4.1), následná esterifikácia MK za použitia metanolického roztoku bórtrifluoridu ako katalyzátora (kapitola 4.4.2) a konečná analýza GC-FID (kapitola 2.10.2). Pre stanovenie SAL bola použitá metóda HS-SPME-GC-MS (kapitola 4.5).

5.1 Overenie vybraných validačných parametrov použitých metód

Pre štúdium tak komplexnej matrice, akou je syr, je dôležité používať účinné metódy. Pre overenie kvality a funkčnosti analytickej metódy je vždy nevyhnutné je validovať. Metódy použité v tejto práci, stanovenie MK, resp. VMK a SAL sú na ÚCHPBT už zavedené a používané pre analýzu rôznych vzoriek potravín a prírodných materiálov, napr. tavených syrov [238], liečivých rastlín [239], čokolády [240] a iné, v rámci tejto práce boli optimalizované podmienky (kap. 4.4 a 4.5) a overené validačné parametre pre ich aplikáciu na analýzu tvrdých syrov.

Validácia je definovaná napr. ako proces, pri ktorom sa určuje vhodnosť použitia daného systému pre získanie relevantných dát. Za základné validačné parametre sú považované opakovateľnosť, reprodukovateľnosť, linearita, medze detekcie a medze stanoviteľnosti [156].

Opakovateľnosť je typ presnosti vzťahujúcej sa ku meraniam prevedením za opakovateľných podmienok; charakterizuje metódu a precíznosť jej prevedenia v laboratóriu. Analýzy sú vykonávané všetky naraz, rovnakou osobou na rovnakom pracovisku a s rovnakou vzorkou [156]. Metóda je opakovateľná, ak u všetkých výsledkov merania, prevedeného za podmienok opakovateľnosti, nepresiahne relatívna smerodajná odchýlka (RSD) hodnotu 10 % [156].

Reprodukovateľnosť, na rozdiel od opakovateľnosti, vypovedá o chybe pri reprodukcii výsledkov s danou vzorkou a rovnakou metódou, ale so zmenenými podmienkami ako napr. miesto, pozorovateľ, čas a pod [156].

Linearita je definovaná ako priamková závislosť medzi dvoma premennými – analytickým signálom alebo odozvou inštrumentu a koncentráciou analytu.

Medza detekcie (LOD) vyjadruje najmenšie množstvo analytu vo vzorke, ktoré je možné detegovať, tj. pre ktoré je analytický signál štatisticky významný od šumu [156].

Medza stanoviteľnosti (LOQ) vyjadruje najnižšiu koncentráciu analytu, ktorú je možné kvantifikovať ako exaktnú hodnotu so stanovenou presnosťou [156].

5.1.1 Stanovenie mastných kyselín

Opakovateľnosť metódy bola stanovená opakovaným meraním ($n = 5$) zmesového štandardu MEMK, realizovaným jednou osobou v priebehu jedného dňa, reprodukovateľnosť opakovaným meraním ($n = 5$) totožného štandardu jednou osobou v priebehu 14 dní.

V prípade retenčných časov jednotlivých píkov bola RSD vo všetkých prípadoch $< 0,5\%$, v prípade plôch píkov $< 10\%$. Metóda teda vykazuje výbornú presnosť pre identifikáciu a dostatočnú presnosť pre kvantifikáciu.

Linearita bola testovaná v koncentračnom rozsahu $0,06 - 60 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ pre jednotlivé MK, všetky korelačné koeficienty boli v rozmedzí $0,984 - 0,999$.

Pre stanovenie LOD a LOQ bol určený maximálny šum základnej línie v oblasti chromatogramu daného dvadsaťnásobkom polovičnej šírky píku jednotlivých separovaných látok h_{max} . LOD boli určené ako $3 \cdot h_{\text{max}}$ a LOQ ako $10 \cdot h_{\text{max}}$. LOD sa pohybovali v rozsahu od $0,02 - 0,06 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a LOQ v rozsahu $0,06 - 0,18 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Zo získaných výsledkov plynie, že metóda vykazuje dobrú linearitu a je dostatočne citlivá aj pre stanovenie nízkych koncentrácií MK vo vzorkách syrov. Namerané validačné parametre pre vybrané MK sú zhrnuté v Tabuľka 17.

Tabuľka 17: Prehľad validačných parametrov GC-FID pre MK

Mastná kyselina	Skrátený vzorec	Lineárny koncentračný rozsah [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]	R^2	LOD [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]	LOQ [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]
kaprónová	C6:0	0,12 – 40,8	0,999	0,04	0,12
kaprylová	C8:0	0,12 – 40,7	0,999	0,04	0,12
kaprínová	C10:0	0,12 – 40,7	0,999	0,04	0,12
undekánová	C11:0	0,06 – 20,4	0,999	0,02	0,06
laurová	C12:0	0,12 – 40,8	0,999	0,04	0,12
tridekánová	C13:0	0,06 – 20,3	0,999	0,02	0,06
myristová	C14:0	0,12 – 40,7	0,999	0,04	0,12
myristoolejová	C14:1	0,06 – 20,3	0,999	0,02	0,06
pentadekánová	C15:0	0,06 – 20,2	0,999	0,02	0,06
pentadecénová	C15:1	0,06 – 20,3	0,999	0,02	0,06
palmitová	C16:0	0,18 – 61,0	0,998	0,06	0,18
heptadekánová	C17:0	0,06 – 18,9	0,989	0,02	0,06

Tabuľka 17: Prehľad validačných parametrov GC-FID pre MK - pokračovanie

Masťná kyselina	Skrátený vzorec	Lineárny koncentračný rozsah [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]	R^2	LOD [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]	LOQ [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]
heptadecénová	C17:1	0,06 – 20,3	0,998	0,02	0,06
stearová	C18:0	0,12 – 40,7	0,998	0,04	0,12
olejová	C18:1	0,18 – 40,7	0,998	0,06	0,18
linolová	C18:2	0,12 – 20,2	0,998	0,04	0,12
gama-linolénová	C18:3n6	0,06 – 20,3	0,998	0,02	0,06
linolénová	C18:3n3	0,06 – 20,2	0,998	0,02	0,06
arachová	C20:0	0,12 – 40,7	0,993	0,04	0,012
eicosénová	C20:1	0,06 – 20,4	0,999	0,02	0,06
eicosadiénová	C20:2	0,06 – 20,3	0,998	0,02	0,06
heneicosánová	C21:0	0,06 – 20,4	0,998	0,02	0,06
eicosatriénová 6	C20:3n6	0,06 – 19,8	0,998	0,02	0,06
eicosatriénová 3	C20:3n3	0,06 – 19,7	0,998	0,02	0,06
arachidonová	C20:4	0,06 – 20,2	0,998	0,02	0,06
behénová	C22:0	0,18 – 40,8	0,998	0,06	0,18
eruková	C22:1	0,06 – 20,4	0,984	0,02	0,06
docosadiénová	C22:2	0,06 – 19,0	0,995	0,02	0,06
trikosánová	C23:0	0,06 – 20,4	0,995	0,02	0,06
lignocérová	C24:0	0,12 – 40,7	0,995	0,04	0,12
nervónová	C24:1	0,06 – 20,4	0,997	0,02	0,06
docosahexaénová	C22:6	0,06 – 19,5	0,996	0,02	0,06

5.1.2 Stanovenie senzorickej aktivity látok

Opakovateľnosť metódy bola stanovená opakovaným meraním ($n = 5$) zmesi vybraných štandardov prchavých látok, realizovaným jednou osobou v priebehu jedného dňa, reprodukovateľnosť opakovaným meraním ($n = 5$) totožného štandardu jednou osobou v priebehu 14 dní. Bolo vybraných 12 zlúčenín (etanol, hexanol, metyl butanoát, metyl hexanoát, acetoín, heptán-2-ón, D-limonén, linalool, kyselina octová a maslová, benzaldehyd a δ -dekalaktón), významných pre aróma tvrdých syrov, tak aby zastupovali jednotlivé chemické skupiny.

V prípade retenčných časov jednotlivých píkovo bola RSD vo všetkých prípadoch < 1 %, v prípade plôch píkovo sa pohybovala v rozmedzí 3 -7 %.

Z uvedených výsledkov je jasné, že aj táto metóda vykazuje výbornú presnosť pre identifikáciu a dostatočnú presnosť pre kvantifikáciu, napriek použitiu extrakčnej techniky, SPME, ktorá má z tohto hľadiska radu nevýhod (viď kap. 2.7.1) – je veľmi citlivá na vplyvy okolia, všeobecne vykazuje horšiu reprodukovateľnosť a robustnosť, napr. vďaka opotrebovaniu vlákna, hlavne v móde HS-SPME [153].

Opakovateľnosť/reprodukovateľnosť bola horšia u zlúčenín s krátkym retenčným časom, tj. veľmi prchavých (RSD 6-7 %), čo môže byť spôsobené tzv. kompetitívnou sorpciou. Podľa literatúry [201] má SPME najlepšiu reprodukovateľnosť až po dosiahnutí rovnováhy, čo bolo nevyhnutné striktno dodržiavať pri experimentoch. Vzhľadom k použitiu autosamplera a automatizácii celého procesu boli perfektne dodržiavané všetky nevyhnutné konštantné podmienky pre extrakciu.

Linearita bola testovaná v koncentračnom rozsahu 0,01 – 200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ pre jednotlivé štandardy SAL, všetky korelačné koeficienty boli v rozmedzí 0,988 – 0,999.

LOD a LOQ boli stanovené obdobne ako u predchádzajúcej metódy (stanovenie MK); hodnoty LOD sa pohybovali v rozsahu od 0,01 do 0,5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; hodnoty LOQ sa pohybovali v rozsahu od 0,03 do 1,8 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Z vyššie uvedených skutočností vyplýva, že metóda má dobrý potenciál aj pre kvantifikáciu, ale vzhľadom k počtu identifikovaných zlúčenín vo vzorkách a veľkému množstvu potrebných drahých štandardov bola vo vzorkách syrov prevedená semikvantifikácia SAL na základe plôch píkov.

5.2 Experiment I – Moravský bochník

V tomto experimente boli analyzované syry ementálskeho typu, tj. polotvrde syry z vysokodohrievanej syreniny. Konkrétne sa jednalo o Moravský bochník, čo je špecifický český variant syrov ementálskeho typu s minimálnou tvorbou ôk.

Tri série vzoriek boli vyrobené s použitím rôznych mikrobiálnych kultúr; konkrétne klasická mezofilná kultúra a vybrané kmene termofilných baktérií *Lactobacillus helveticus* a *Streptococcus thermophilus*. Cieľom bolo posúdiť vplyv použitých kultúr (hlavne dodatok termofilných kultúr) na obsah prchavých látok a mastných kyselín vo vzorkách. Syry boli analyzované v rôznych fázach zrenia (2, 3, 4 a 8 mesiacov).

5.2.1 Stanovenie voľných a viazaných mastných kyselín

V mlieku bolo doposiaľ identifikovaných 437 rôznych MK, avšak iba malá časť z nich má nutričný význam a z hľadiska stanovenia je venovaná pozornosť približne 20-30 z nich [109].

Mliečny tuk je charakteristický prítomnosťou predovšetkým MK s krátkymi až stredne dlhými reťazcami (C4 – C16). Medzi najdôležitejšie MK mliečného tuku patria nasýtené (maslová, kaprónová, kaprylová, kaprínová, laurová, myristová, palmitová, stearová), ktoré tvoria približne 60 – 70 % všetkých MK. Rovnako dôležité, avšak zastúpené v menšej miere (26 – 42 %) sú mononenасыtené MK, z ktorých je najdôležitejšia kyselina olejová. Polynenasýtené MK (linolová, linolénová, arachidonová) tvoria veľmi nízky podiel (< 6 %) [109].

Cca 96 až 98 % z celkového obsahu MK v mliečnom tuku je naviazaných na glycerol, najčastejšie vo forme TAG. V mliečnych výrobkoch, a teda aj v syroch, sa vyskytujú aj VMK. Jedná sa o malé množstvá, ktoré však ovplyvňujú aromatické a senzorické vlastnosti zmiených produktov [15]. Tuk v syroch významne ovplyvňuje textúru, ale je nevyhnutný aj pre vývoj správnej chuti a vône syra. Lipidy v syroch môžu podliehať oxidačnej a/alebo hydrolytickej degradácii. Oxidácia lipidov v syroch väčšinou nebýva príliš rozsiahla, pravdepodobne kvôli nízkemu redoxnému potenciálu (-250 mV) a prítomnosti prirodzených antioxidantov (napr. vitamín E); tento príspevok k aróme syrov je menej dôležitý. Na druhú stranu enzymatická hydrolýza TAG na MAG/DAG a VMK (lipolýza) je jedným zo zásadných procesov prebiehajúcich počas zrenia syrov a je považovaná, spolu s proteolýzou, za hlavnú metabolickú cestu pre tvorbu chuti a vône syra [15]. Následkom lipolýzy sa uvoľňujú VMK, ktoré jednak priamo prispievajú ku syrovej aróme, zvlášť MK s kratším a stredne dlhým C-reťazcom (< 12 C), a jednak sú dôležitými prekurzormi ďalších SAL, ako sú alkány, estery, sekundárne alkoholy, metylketóny a laktóny. Prekročenie určitého obsahu VMK (cca 3000 mg · kg⁻¹) však vedie ku tvorbe zatuchnutej chuti [15].

Pre charakterizáciu tuku sa väčšinou používa jednoduché stanovenie celkového obsahu MK. Avšak stanovením celkového obsahu MK nie je možné dobre postihnúť zmeny lipidických frakcií; vzhľadom k vyššie zmienenej dôležitosti VMK v chuti syra bol vo vzorkách sledovaný aj ich obsah. Pre stanovenie VMK bola použitá jednoduchá esterifikácia s bórtrifluoridom bez predchádzajúceho zmydelnenia hydroxidom sodným (kap. 4.4.2.2). Zásadné bolo v tomto prípade dodržanie parametrov metódy, predovšetkým doby esterifikácie. V nasledujúcich kapitolách sú porovnávané samostatne obsahy MK a VMK.

5.2.1.1 Identifikácia a kvantifikácia mastných kyselín v modelových vzorkách syru

Identifikácia MK vo vzorkách bola prevedená na základe porovnania retenčných časov MEMK vo vzorkách s retenčnými časmi identických štandardov, kvantifikácie porovnaním plôch píkovo so štandardmi o známej koncentrácii (vid' Tabuľka 16).

Celkovo bolo vo vzorkách syrov identifikovaných 20 MK. V tabuľkách (Tabuľka 18 až Tabuľka 27) je uvedený komplexný prehľad identifikovaných MK a ich obsah (v mg · g⁻¹ vyextrahovaného tuku) pre každú vzorku. Príloha 9 zobrazuje ukážky chromatogramov vzoriek syrov v poslednej fáze zrenia.

Okrem toho bolo detegovaných ďalších 14 MK (arachová, cis-11-eicosénová, cis-11,14-eicosadiénová, cis-8,11,14-eicosatriénová, arachidonová, behénová, trikosánová, lignocérová, docosahexaénová, nervónová, eruková, heneicosánová, cis-5,8,11,14,17-eicosapentaénová), tieto však nebolo možné kvantifikovať (< LOQ), ich význam možno považovať za zanedbateľný a ďalej nebudú brané v úvahu.

Tabuľka 18: Obsah MK a VMK identifikovaných vo vzorkách syrov A2 [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku]

Názov MK	MK	VMK
	c [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$] tuku	c [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$] tuku
kapronová	26,33 ± 1,19	1,19 ± 0,09
kaprylová	18,97 ± 1,58	0,52 ± 0,04
kaprínová	30,76 ± 1,81	1,01 ± 0,08
undekánová	1,92 ± 0,16	0,02 ± 0,01
laurová	35,83 ± 2,56	1,45 ± 0,12
tridekánová	2,17 ± 0,18	0,03 ± 0,01
myristová	126,87 ± 5,73	4,28 ± 0,35
myristoolejová	14,26 ± 1,43	0,16 ± 0,01
pentadekánová	11,63 ± 1,13	1,09 ± 0,09
cis-10-pentadecenová	2,73 ± 0,22	0,41 ± 0,03
palmitová	348,73 ± 20,72	16,46 ± 1,37
palmitoolejová	24,33 ± 2,02	0,23 ± 0,02
heptadekánová	14,52 ± 1,21	0,68 ± 0,05
cis-10-heptadecenová	5,54 ± 0,46	0,17 ± 0,01
stearová	102,95 ± 6,91	2,92 ± 0,24
olejová	174,89 ± 9,57	6,23 ± 0,51
linolelaidová	7,65 ± 0,63	0,12 ± 0,01
linolová	13,24 ± 1,35	0,65 ± 0,05
γ -linolénová	3,47 ± 0,28	0,76 ± 0,06
linolénová	6,57 ± 0,54	0,74 ± 0,06

Značenie vzoriek vid' Tabuľka 13.

Tabuľka 19: Obsah MK a VMK identifikovaných vo vzorkách syrov A3 [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku]

Názov MK	MK	VMK
	c [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$] tuku	c [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$] tuku
kapronová	25,32 ± 2,11	1,06 ± 0,08
kaprylová	14,59 ± 1,21	0,75 ± 0,06
kaprínová	28,89 ± 1,4	0,77 ± 0,06
undekánová	0,97 ± 0,08	0,04 ± 0,01
laurová	39,95 ± 3,32	1,74 ± 0,14
tridekánová	1,52 ± 0,12	0,06 ± 0,01
myristová	123,45 ± 8,28	4,65 ± 0,38
myristoolejová	12,15 ± 1,01	0,16 ± 0,01
pentadekánová	9,06 ± 0,75	1,07 ± 0,08
cis-10-pentadecenová	2,26 ± 0,18	0,21 ± 0,02
palmitová	324,86 ± 22,07	16,31 ± 1,35
palmitoolejová	18,15 ± 1,51	0,35 ± 0,02
heptadekánová	12,63 ± 1,05	0,82 ± 0,06
cis-10-heptadecenová	3,71 ± 0,3	0,13 ± 0,01
stearová	97,56 ± 8,13	2,05 ± 0,17
olejová	157,8 ± 13,15	6,03 ± 0,55
linolelaidová	6,52 ± 0,54	0,45 ± 0,03

Značenie vzoriek vid' Tabuľka 13.

Tabuľka 19: Obsah MK a VMK identifikovaných vo vzorkách syrov A3 [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku] - pokračovanie

Názov MK	MK	VMK
	c [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$] tuku	c [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$] tuku
linolová	10,33 ± 0,86	0,29 ± 0,02
γ -linolénová	3,43 ± 0,28	0,52 ± 0,04
linolénová	6,68 ± 0,55	0,33 ± 0,02

Značenie vzoriek vid' Tabuľka 13.

Tabuľka 20: Obsah MK a VMK identifikovaných vo vzorkách syrov A4 [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku]

Názov MK	MK	VMK
	c [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$] tuku	c [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$] tuku
kapronová	20,13 ± 1,67	0,44 ± 0,04
kaprylová	10,04 ± 0,87	0,28 ± 0,02
kaprínová	24,55 ± 2,13	0,43 ± 0,04
undekánová	1,09 ± 0,09	0,04 ± 0,01
laurová	37,21 ± 3,33	1,38 ± 0,12
tridekánová	1,57 ± 0,13	0,04 ± 0,01
myristová	125,91 ± 12,97	3,84 ± 0,32
myristolejová	13,37 ± 1,16	0,83 ± 0,07
pentadekánová	9,69 ± 0,85	1,04 ± 0,09
cis-10-pentadecenová	2,35 ± 0,19	0,12 ± 0,01
palmitová	314,64 ± 20,22	15,22 ± 1,25
palmitolejová	14,94 ± 1,45	0,66 ± 0,06
heptadekánová	10,21 ± 0,88	0,48 ± 0,04
cis-10-heptadecenová	3,38 ± 0,27	0,14 ± 0,01
stearová	97,97 ± 8,16	2,51 ± 0,21
olejová	142,14 ± 9,45	5,52 ± 0,46
linolelaidová	5,16 ± 0,43	0,44 ± 0,04
linolová	8,69 ± 0,72	0,49 ± 0,04
γ -linolénová	3,42 ± 0,28	0,29 ± 0,02
linolénová	5,24 ± 0,43	0,35 ± 0,03

Značenie vzoriek vid' Tabuľka 13.

Tabuľka 21: Obsah MK a VMK identifikovaných vo vzorkách syrov A8 [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku]

Názov MK	MK	VMK
	c [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$] tuku	c [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$] tuku
kapronová	18,27 ± 1,52	0,41 ± 0,03
kaprylová	7,16 ± 0,59	0,24 ± 0,02
kaprínová	23,06 ± 1,21	0,41 ± 0,03
undekánová	0,93 ± 0,07	0,05 ± 0,01
laurová	37,76 ± 3,14	1,42 ± 0,12

Značenie vzoriek vid' Tabuľka 13.

Tabuľka 21: Obsah MK a VMK identifikovaných vo vzorkách syrov A8 [mg · g⁻¹ tuku] - pokračovanie

Názov MK	MK	VMK
	c [mg · g ⁻¹] tuku	c [mg · g ⁻¹] tuku
tridekánová	1,96 ± 0,16	0,05 ± 0,01
myristová	106,61 ± 7,87	3,08 ± 0,26
myristoolejová	10,06 ± 0,83	0,96 ± 0,08
pentadekánová	5,27 ± 0,46	1,05 ± 0,09
cis-10-pentadecénová	1,12 ± 0,09	0,16 ± 0,01
palmitová	309,03 ± 19,75	15,74 ± 1,31
palmitoolejová	16,3 ± 1,35	0,77 ± 0,06
heptadekánová	10,29 ± 0,82	0,71 ± 0,06
cis-10-heptadecenová	3,77 ± 0,37	0,11 ± 0,01
stearová	61,37 ± 5,11	2,74 ± 0,23
olejová	140,28 ± 11,69	5,77 ± 0,45
linolelaidová	5,18 ± 0,43	0,52 ± 0,04
linolová	7,71 ± 0,64	0,64 ± 0,05
γ-linolénová	4,02 ± 0,33	0,32 ± 0,03
linolénová	5,14 ± 0,42	0,52 ± 0,04

Značenie vzoriek vid' Tabuľka 13.

Tabuľka 22: Obsah MK a VMK identifikovaných vo vzorkách syrov B2 [mg · g⁻¹ tuku]

Názov MK	MK	VMK
	c [mg · g ⁻¹] tuku	c [mg · g ⁻¹] tuku
kapronová	22,48 ± 1,03	1,05 ± 0,12
kaprylová	15,41 ± 1,28	0,31 ± 0,03
kaprínová	32,43 ± 1,25	0,67 ± 0,02
undekánová	1,96 ± 0,16	0,05 ± 0,01
laurová	36,04 ± 3,01	1,19 ± 0,10
tridekánová	2,45 ± 0,21	0,05 ± 0,01
myristová	147,57 ± 8,29	4,43 ± 0,37
myristoolejová	11,27 ± 0,93	0,37 ± 0,03
pentadekánová	15,86 ± 1,32	1,01 ± 0,08
cis-10-pentadecenová	3,42 ± 0,28	0,07 ± 0,01
palmitová	297,36 ± 24,78	16,71 ± 1,32
palmitoolejová	23,09 ± 1,92	0,52 ± 0,04
heptadekánová	15,02 ± 1,25	0,85 ± 0,07
cis-10-heptadecénová	3,26 ± 0,27	0,22 ± 0,02
stearová	102,13 ± 8,51	3,18 ± 0,27
olejová	161,06 ± 13,42	5,21 ± 0,43
linolelaidová	5,91 ± 0,45	0,17 ± 0,01
linolová	16,73 ± 1,37	0,28 ± 0,02
γ-linolénová	3,95 ± 0,37	0,16 ± 0,01
linolénová	6,42 ± 0,53	0,16 ± 0,01

Značenie vzoriek vid' Tabuľka 13.

Tabuľka 23: Obsah MK a VMK identifikovaných vo vzorkách syrov B3 [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku]

Názov MK	MK	VMK
	c [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$] tuku	c [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$] tuku
kapronová	20,64 ± 1,51	0,92 ± 0,08
kaprylová	15,63 ± 1,29	0,43 ± 0,04
kaprínová	28,95 ± 1,22	0,77 ± 0,06
undekánová	1,59 ± 0,12	0,07 ± 0,01
laurová	38,33 ± 2,91	1,08 ± 0,09
tridekánová	2,78 ± 0,23	0,07 ± 0,01
myristová	148,52 ± 11,42	3,19 ± 0,27
myristoolejová	12,83 ± 0,76	0,32 ± 0,03
pentadekánová	14,93 ± 1,14	1,01 ± 0,08
cis-10-pentadecénová	3,77 ± 0,29	0,04 ± 0,01
palmitová	222,15 ± 17,08	15,32 ± 1,24
palmitoolejová	21,58 ± 1,66	0,46 ± 0,04
heptadekánová	14,05 ± 1,08	0,73 ± 0,06
cis-10-heptadecénová	3,44 ± 0,26	0,19 ± 0,02
stearová	96,11 ± 7,39	3,15 ± 0,51
olejová	160,37 ± 8,33	6,17 ± 0,26
linolelaidová	4,37 ± 0,34	0,41 ± 0,03
linolová	12,43 ± 0,95	0,19 ± 0,02
γ -linolénová	3,49 ± 0,26	0,43 ± 0,04
linolénová	6,22 ± 0,47	0,13 ± 0,01

Značenie vzoriek vid' Tabuľka 13.

Tabuľka 24: Obsah MK a VMK identifikovaných vo vzorkách syrov B4 [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku]

Názov MK	MK	VMK
	c [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$] tuku	c [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$] tuku
kapronová	17,89 ± 1,49	0,74 ± 0,06
kaprylová	11,79 ± 0,98	0,31 ± 0,03
kaprínová	23,24 ± 1,36	0,39 ± 0,03
undekánová	0,81 ± 0,06	0,08 ± 0,01
laurová	32,69 ± 2,72	1,36 ± 0,11
tridekánová	1,66 ± 0,18	0,04 ± 0,01
myristová	145,17 ± 12,09	3,92 ± 0,33
myristoolejová	12,48 ± 1,04	0,79 ± 0,07
pentadekánová	10,23 ± 0,82	1,05 ± 0,09
cis-10-pentadecénová	3,28 ± 0,27	0,15 ± 0,01
palmitová	209,01 ± 17,45	15,39 ± 1,53
palmitoolejová	19,06 ± 1,53	0,21 ± 0,02
heptadekánová	10,29 ± 0,82	0,58 ± 0,05
cis-10-heptadecénová	2,85 ± 0,23	0,12 ± 0,01
stearová	81,76 ± 6,81	2,66 ± 0,22
olejová	138,17 ± 11,51	5,74 ± 0,47
linolelaidová	4,81 ± 0,43	0,51 ± 0,04

Značenie vzoriek vid' Tabuľka 13.

Tabuľka 24: Obsah MK a VMK identifikovaných vo vzorkách syrov B4 [mg · g⁻¹ tuku] - pokračovanie

Názov MK	MK	VMK
	c [mg · g ⁻¹] tuku	c [mg · g ⁻¹] tuku
linolová	8,47 ± 0,75	0,38 ± 0,03
γ-linolénová	3,97 ± 0,33	0,47 ± 0,04
linolénová	5,27 ± 0,41	0,16 ± 0,01

Značenie vzoriek vid' Tabuľka 13.

Tabuľka 25: Obsah MK a VMK identifikovaných vo vzorkách syrov B8 [mg · g⁻¹ tuku]

Názov MK	MK	VMK
	c [mg · g ⁻¹] tuku	c [mg · g ⁻¹] tuku
kapronová	16,33 ± 11,02	0,29 ± 0,02
kaprylová	9,08 ± 0,6	0,18 ± 0,02
kaprínová	22,01 ± 1,02	0,33 ± 0,03
undekánová	0,55 ± 0,04	0,04 ± 0,01
laurová	32,57 ± 2,51	1,35 ± 0,11
tridekánová	1,61 ± 0,12	0,04 ± 0,01
myristová	104,74 ± 8,05	2,07 ± 0,17
myristolejová	11,88 ± 0,91	0,25 ± 0,02
pentadekánová	5,52 ± 0,42	1,06 ± 0,09
cis-10-pentadecénová	2,06 ± 0,15	0,19 ± 0,02
palmitová	207,66 ± 15,62	15,81 ± 1,32
palmitolejová	19,35 ± 1,48	0,23 ± 0,02
heptadekánová	11,91 ± 0,46	0,81 ± 0,07
cis-10-heptadecenová	2,69 ± 0,77	0,11 ± 0,01
stearová	73,12 ± 5,61	2,78 ± 0,23
olejová	136,57 ± 6,56	4,93 ± 0,43
linoleaidová	3,88 ± 0,29	0,17 ± 0,01
linolová	6,79 ± 0,52	0,53 ± 0,04
γ-linolénová	3,14 ± 0,24	0,28 ± 0,02
linolénová	3,31 ± 0,25	0,26 ± 0,02

Značenie vzoriek vid' Tabuľka 13.

Tabuľka 26: Obsah MK a VMK identifikovaných vo vzorkách syrov C3 [mg · g⁻¹ tuku]

Názov MK	MK	VMK
	c [mg · g ⁻¹] tuku	c [mg · g ⁻¹] tuku
kapronová	23,39 ± 1,04	1,01 ± 0,10
kaprylová	13,31 ± 1,11	0,61 ± 0,05
kaprínová	28,97 ± 1,41	0,67 ± 0,06
undekánová	0,48 ± 0,04	0,05 ± 0,01
laurová	39,11 ± 3,25	1,64 ± 0,14
tridekánová	0,78 ± 0,06	0,04 ± 0,01

Značenie vzoriek vid' Tabuľka 13.

Tabuľka 26: Obsah MK a VMK identifikovaných vo vzorkách syrov C3 [mg · g⁻¹ tuku]
- pokračovanie

Názov MK	MK	VMK
	c [mg · g ⁻¹] tuku	c [mg · g ⁻¹] tuku
myristová	76,61 ± 6,38	4,74 ± 0,42
myristoolejová	6,44 ± 0,53	0,47 ± 0,04
pentadekánová	4,87 ± 0,45	1,16 ± 0,10
cis-10-pentadecénová	3,71 ± 0,31	0,27 ± 0,02
palmitová	288,51 ± 24,04	16,61 ± 1,34
palmitoolejová	17,77 ± 1,48	0,26 ± 0,02
heptadekánová	13,52 ± 1,12	0,75 ± 0,06
cis-10-heptadecénová	4,49 ± 0,37	0,14 ± 0,01
stearová	81,26 ± 6,77	2,55 ± 0,21
olejová	144,89 ± 12,07	6,21 ± 0,57
linolelaidová	2,91 ± 0,24	0,15 ± 0,01
linolová	13,72 ± 1,14	0,18 ± 0,02
γ-linolénová	4,41 ± 0,36	0,53 ± 0,04
linolénová	4,08 ± 0,34	0,11 ± 0,01

Značenie vzoriek vid' Tabuľka 13.

Tabuľka 27: Obsah MK a VMK identifikovaných vo vzorkách syrov C4 [mg · g⁻¹ tuku]

Názov MK	MK	VMK
	c [mg · g ⁻¹] tuku	c [mg · g ⁻¹] tuku
kapronová	20,63 ± 1,19	0,38 ± 0,02
kaprylová	10,77 ± 0,89	0,32 ± 0,03
kaprínová	20,17 ± 1,03	0,19 ± 0,02
undekánová	0,41 ± 0,03	0,06 ± 0,01
laurová	31,8 ± 2,65	1,05 ± 0,09
tridekánová	1,03 ± 0,08	0,06 ± 0,01
myristová	60,24 ± 5,02	4,84 ± 0,42
myristoolejová	5,68 ± 0,43	0,53 ± 0,04
pentadekánová	3,69 ± 0,35	1,21 ± 0,10
cis-10-pentadecénová	3,53 ± 0,29	0,33 ± 0,03
palmitová	271,54 ± 20,62	16,32 ± 1,25
palmitoolejová	18,25 ± 1,52	0,17 ± 0,01
heptadekánová	12,91 ± 1,07	0,66 ± 0,06
cis-10-heptadecénová	4,35 ± 0,36	0,22 ± 0,02
stearová	68,31 ± 5,69	2,26 ± 0,19
olejová	135,19 ± 11,26	5,31 ± 0,41
linolelaidová	2,75 ± 0,22	0,17 ± 0,01
linolová	12,43 ± 1,03	0,19 ± 0,02
γ-linolénová	3,23 ± 0,26	0,44 ± 0,04
linolénová	2,76 ± 0,23	0,31 ± 0,03

Značenie vzoriek vid' Tabuľka 13.

Z hľadiska kvantitatívneho boli vo vzorkách najviac zastúpené MK laurová, myristová, palmitová a stearová, z nenasýtených olejová, s kratším reťazcom kaprónová, kaprylová a kaprínová. Výsledky sú v súlade s doposiaľ získanými znalosťami o zložení mliečného tuku (Tabuľka 6).

Pre zjednodušenie boli pri porovnávaní vzoriek v nasledujúcich kapitolách brané do úvahy MK považované za najvýznamnejšie pre mliečny tuk; z MK s dlhým reťazcom to boli: palmitová, myristová a stearová; z MK s krátkym reťazcom to boli: kaprónová, kaprylová a kaprínová a z nenasýtených MK olejová, linolová a α -linolénová [109].

Medzi dôležité MK mliečného tuku patrí taktiež kyselina maslová [78]. Túto MK sa nepodarilo detegovať, z dôvodu pravdepodobného úniku počas prípravy vzorky k analýze. Podarilo sa ju stanoviť v rámci prchavých látok metódou HS-SPME-GC-MS a bude diskutovaná ďalej (kapitola 5.3.2.1).

5.2.1.2 Porovnanie obsahu voľných a viazaných mastných kyselín vo vzorkách – použité štartovacie kultúry

Prídavok mikrobiálnych, tzv. štartovacích kultúr BMK, je nevyhnutným predpokladom výroby syrov. Účelom je pomnoženie pridaných MO v mlieku, čím sa dosiahne žiadaného stupňa kyslosti, konzervačného efektu a koagulácie mlieka.

Hlavné uplatnenie MO však nastáva počas zrenia syrov, kedy účinkom ich proteolytickej a/alebo lipolytickej aktivity dochádza v konečnom dôsledku ku vzniku senzorických vlastností výrobku (aróma, chuť, textúra, tvorba ôk a iné). Základnou kultúrou pre prakticky všetky druhy syrov je mezofilná (smotanová) kultúra, podľa typu syra býva doplnená ďalšími kultúrami [19]. Pri výrobe syrov s vysokodohrievanou syreninou sa do mlieka pridáva mezofilná a termofilná kultúra a v prípade ementálskych syrov aj propiónová kultúra (viď kapitola 2.1.7). Zaujímavé je, že sa z dostupnej literatúry nepodarilo bezpečne zistiť, či sú propiónové baktérie nevyhnutné aj pre výrobu syra typu Moravský bochník; tieto syry nemajú oká, nepredpokladá sa teda nutnosť ich aplikácie. Pre výrobu modelových vzoriek bola preto použitá klasická mezofilná aromatická kultúra a dva typy termofilných kultúr. Ich zloženie je uvedené v kapitole 2.1.7.

Mezofilná kultúra sa skladá z mezofilných kokov rodu *Lactococcus* a *Leuconostoc*, obvykle dominujú (> 90 %) tzv. kyselinotvorné koky, ktoré fermentujú laktózu na kyselinu mliečnu. Druhou zložkou sú tzv. koky tvoriace aróma, často nazývané tiež citrát utilizujúce, ktoré metabolizujú citrát za produkcie CO₂ a aromatických látok. Ich proteolytická schopnosť je však malá v porovnaní s termofilnými kultúrami [19]. Použitá kultúra, tzv. typu LD, obsahuje kyselinotvorné aj aróma-tvoriace koky, (viď kapitola 2.1.7); tento typ sa používa tam, kde je žiaduca produkcia CO₂ a aromatických látok, ako je tomu napr. v syroch s tvorbou ôk. Podľa výrobcu je určená pre výrobu širokého spektra syrov vrátane tvrdých syrov.

Použitá termofilná kultúra obsahovala baktérie *Lactobacillus helveticus* a *Streptococcus thermophilus*, je možné ich používať samostatne alebo v kombinácii. Tieto kultúry sú určené hlavne pri výrobe syrov s vysokodohrievanej syreniny (45-55 °C) a uplatňujú sa vo fáze dohrievania a dosušania syrov. Okrem fermentácie laktózy na kyselinu mliečnu majú aj miernu proteolytickú aktivitu a spolu s reziduálnou aktivitou syridlových enzýmov tak ovplyvňujú chuť, vôňu a textúru syrov [19].

Kultúra *Lactobacillus helveticus* podľa výrobcu navyše syrom dodáva orieškovú chuť a zabraňuje ich horkosti. Všetky kultúry sú bežne komerčne dostupné v lyofilizovanom stave, vhodné ku priamemu zaočkovaniu do mlieka.

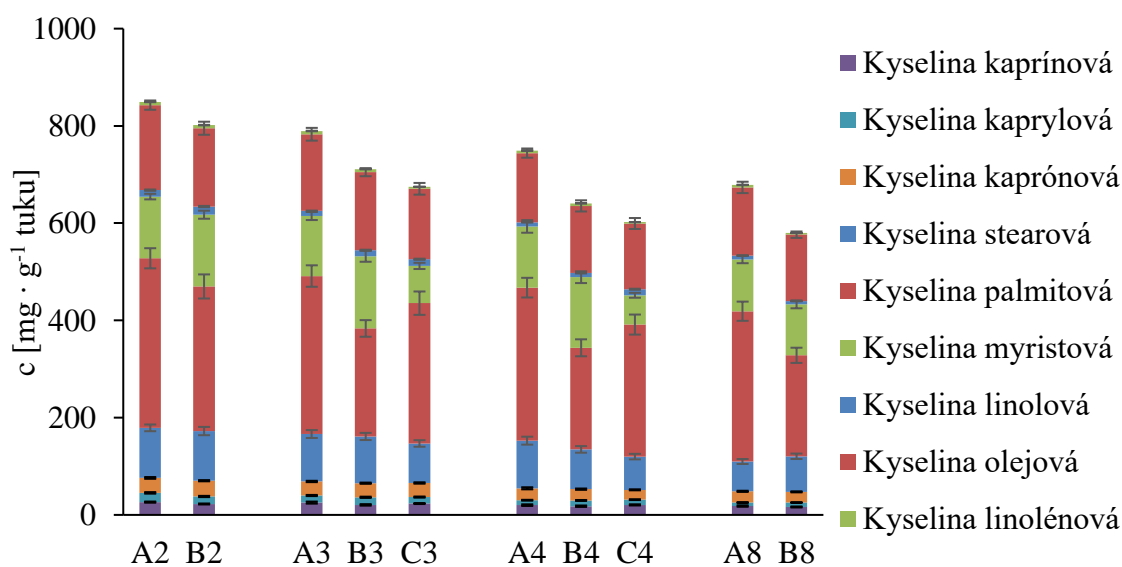
V tomto experimente boli vyrobené 3 série vzoriek (A, B, C), ktoré sa líšili kombináciou použitých mikrobiálnych kultúr (viď kapitola 4.3): A – prevaha mezofilnej kultúry, B – mierny prídavok termofilnej kultúry, C – prevaha termofilnej kultúry. Cieľom bolo zistiť, či má vyšší prídavok termofilnej kultúry vplyv na skúmané parametre, v tejto kapitole na obsah MK.

Porovnanie celkového obsahu voľných a viazaných mastných kyselín

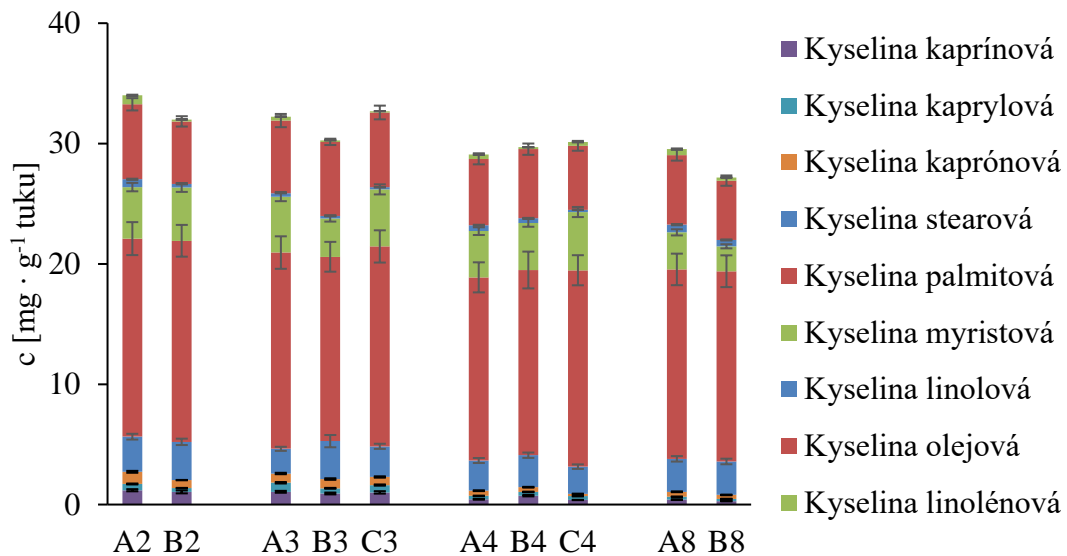
V nasledujúcich grafoch (Obrázok 6 a Obrázok 7) je uvedené porovnanie celkového obsahu MK a VMK, resp. celkového obsahu vyššie zmienených vybraných MK (kvantitatívne najvýznamnejších pre mliečny tuk) [109]. Význam ostatných MK bol považovaný za štatisticky zanedbateľný ($p < 0,05$); vzhľadom ku nízkym koncentráciám.

Vzhľadom k ekonomickej náročnosti procesu zrenia v praxi tieto syry bežne zrejú cca 2 mesiace, čo je minimálna nevyhnutná doba pre tento typ syrov [19], nasleduje expedícia do tržnej siete. To však môže mať negatívny dopad na ich senzorické vlastnosti, keďže nemôžu v dostatočnom rozsahu prebehnúť žiaduce biochemické procesy. Naše modelové vzorky boli preto ponechané zreniu po dobu 4 mesiacov pri zvyčajnej teplote ($8 - 14\text{ }^{\circ}\text{C}$), série A a B (vybrané kombinácie kultúr) dokonca po dobu 8 mesiacov.

Z grafu (Obrázok 6) je viditeľné, že s prídavkom termofilnej kultúry sa obsah viazaných MK znižuje, v neskorších fázach zrenia výraznejšie ($p < 0,05$). To je možné pripísať lipolytickej aktivite termofilných kultúr, ktorá vedie ku ich rýchlejšiemu odbúravaniu. Podľa dostupných informácií vykazujú slabú lipolytickú aktivitu niektoré druhy rodu *Lactococcus* a *Lactobacillus* [19].



Obrázok 6: Celkový obsah vybraných MK vo vzorkách syrov - použité štartovacie kultúry



Obrázok 7: Celkový obsah vybraných VMK vo vzorkách syrov - použité štartovacie kultúry

Ak vezmeme v úvahu jednotlivé MK, pre mliečny tuk je charakteristický vysoký obsah MK s krátkym reťazcom (kapronová, kaprylová, kaprínová) [109]. Obsah všetkých uvedených MK sa s prídavkom termofilnej kultúry mierne znižoval, vo všetkých vzorkách prevažovala kyselina kapronová.

U významných nasýtených kyselín (myristová, palmitová a stearová) [13], ich obsah sa s prídavkom termofilnej kultúry ($p < 0,05$) znižoval, v prípade stearovej mierne, vo všetkých vzorkách prevažovala kyselina palmitová.

Čo sa týka MK s nenasýteným reťazcom (olejová, linolová a linolénová) [13], aj ich obsah sa s prídavkom termofilnej kultúry mierne znižoval, okrem kyseliny linolovej, ktorej obsah sa naopak mierne zvýšil, čo môže súvisieť so selektivitou mikrobiálnych lipolytických enzýmov [27]; vo všetkých vzorkách výrazne prevažovala kyselina olejová.

Množstvo VMK v syroch sa mení v závislosti na zložení mlieka, použitých kultúrach a technológii výroby [19]. VMK môžu vznikáť pri heterofermentatívnom rozklade laktózy, v tomto prípade vznikajú predovšetkým malé množstvá prchavých VMK (mravenčia, octová, maslová, 3-metylbutánová, kaprínová a kaprylová). Taktiež degradáciou aminokyselín vznikajú malé množstvá. Hlavným zdrojom VMK v syroch je lipolýza avšak výsledné VMK obsahujú viac než 6 atómov uhlíku. Obsah VMK sa síce v dôsledku lipolýzy zvyšuje, na druhej strane sú postupne odbúrané za tvorby SAL [48]. Tomu odpovedajú výsledky uvedené v grafu (Obrázok 7), avšak nie je viditeľný trend, ich obsah bol premenlivý.

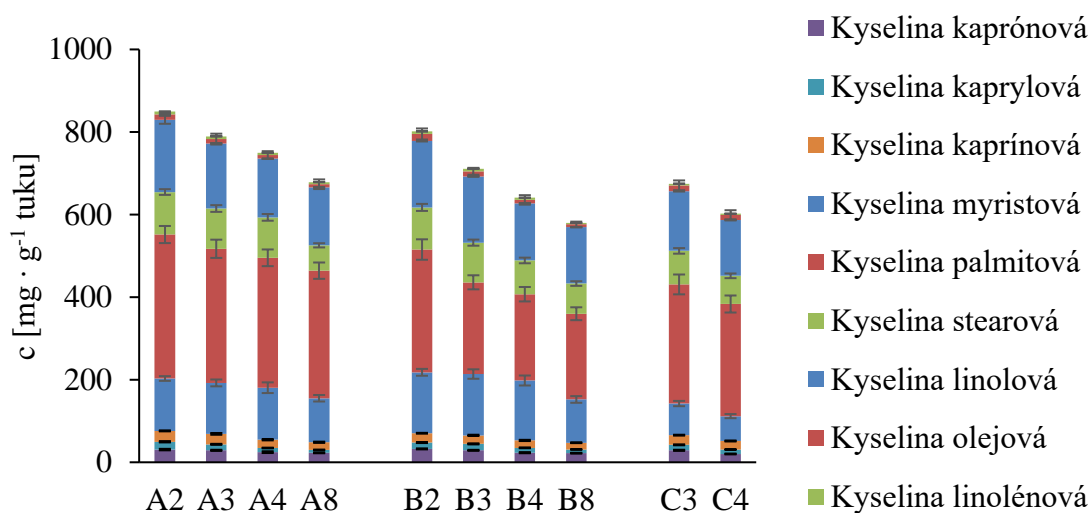
Prídavok termofilnej kultúry teda pravdepodobne neovplyvňuje rýchlejšie odbúranie VMK na SAL. VMK však môžu vznikáť aj v dôsledku inej než mikrobiálnej lipolýzy mliečného tuku; jedná sa taktiež o mliečne lipázy, príp. lipázy kultúr vyskytujúcich sa prirodzene v mlieku [19].

5.2.1.3 Porovnanie obsahu voľných a viazaných mastných kyselín vo vzorkách – priebeh zrenia

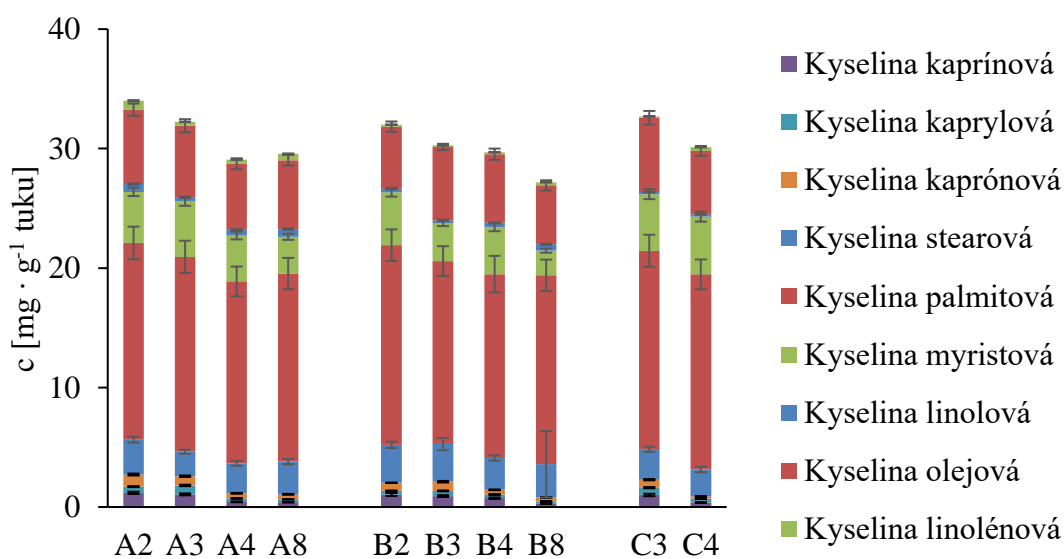
Okrem vplyvu zloženia kultúr na obsah MK v syroch, bol zároveň posúdený aj priebeh zrenia, resp. jeho vplyv na obsah MK v syroch. Ako už bolo zmienené, vzorky syrov boli analyzované v určitých intervaloch zrenia (po 2, 3, 4 a 8 mesiacoch).

Porovnanie celkového obsahu voľných a viazaných mastných kyselín

Obrázok 8 a Obrázok 9 reprezentujú zmenu celkového obsahu MK a VMK vo vzorkách syrov počas zrenia. Pri všetkých vzorkách je viditeľný ($p < 0,05$) pokles obsahu MK ako aj VMK v priebehu zrenia.



Obrázok 8: Celkový obsah vybraných MK vo vzorkách syrov - priebeh zrenia



Obrázok 9: Celkový obsah vybraných VMK vo vzorkách syrov - priebeh zrenia

Priebeh zmien MK aj VMK u všetkých sérií odpovedá očakávaniam; obsah MK v priebehu zrenia klesá v dôsledku prebiehajúcich lipolytických zmien, obsah VMK následne tiež mierne klesá, v niektorých prípadoch však dochádza ku miernemu kolísaniu, keďže VMK sú dôležitými prekurzormi ďalších zlúčenín, ktoré v konečnom dôsledku prispievajú k chuti a vôni syra [15]. Zvýšená tvorba VMK po 8 mesiacoch (vzorka A) je v zhode s literatúrou, kedy dlhší čas zrenia zvyšuje lipolytickú aktivitu BMK. Alejwin a kol. [16] merali v štyroch rôznych syroch typu Gouda obsah VMK počas 2 rokov zrenia, ktorý lineárne stúpol z počiatočných 200 – 400 mg · kg⁻¹ na 700 – 1200 mg · kg⁻¹. Obsah jednotlivých MK je bližšie diskutovaný v nasledujúcej kapitole.

Porovnanie vybraných skupín mastných kyselín

Určitou nevýhodou z hľadiska stanovenia MK s krátkym reťazcom, resp. ich metylesterov, je vysoká prchavosť (volatilita) [15]. Je pravdepodobné, že počas prípravy mohlo dôjsť k určitým stratám vytekaním a teda sú výsledky do istej miery skreslené. Napriek tomu sú výsledky v súlade s vyššie uvedeným predpokladom, teda obsah všetkých týchto MK v priebehu zrenia väčšinou klesá.

MK s krátkym reťazcom sú na TAG viazané prevažne do polohy sn-3. V množstve štúdií, napr. [27], [165], [146] bol preukázaný rýchlejší nárast obsahu VMK s kratším, popr. stredne dlhým reťazcom, počas zrenia, na úkor MK s dlhým reťazcom.

Tento jav je u lipolýzy určený nielen selektivitou mikrobiálnych lipolytických enzýmov, ale aj prístupom enzýmu k tuku. Preto lipázy spravidla hydrolyzujú najskôr MK naviazané esterovo na TAG v polohách sn-1 a sn-3 [27]. Počas zrenia došlo k ich výraznému poklesu. Najvyšší obsah tvorila kyselina kaprónová.

Najvyšší obsah kyseliny kaprónovej obsahovali vzorky v počiatočnej fáze zrenia (A2, B2, C3) a následne mierne klesala v priebehu zrenia. Obsah kyseliny kaprylovej počas zrenia taktiež výrazne klesal ($p < 0,05$); najväčší obsah mali vzorky na začiatku zrenia (A2, B2, C3), najmenší obsah mali vzorky po 4 mesiacoch (C4), respektíve po 8 mesiacoch (A8 a B8) od začiatku zrenia. Obsah kyseliny kaprínovej, zhodne s kyselinou kaprylovou, výrazne klesal ($p < 0,05$) počas zrenia; najnižší obsah mali vzorky v konečnej fáze zrenia (C4, A8 a B8); najvyšší na počiatku zrenia (A2, B2 a C3).

Obsah VMK v posledných fázach zrenia sa u všetkých vzoriek pohyboval približne okolo 30 mg · g⁻¹ tuku; obsah VMK s krátkym reťazcom, ktoré priamo ovplyvňujú flavour a ich nahromadenie môže viesť ku vzniku off-flavouru, bol cca 1 mg · g⁻¹ tuku; vzhľadom k tomu, že riziková hranica je cca 3 mg · g⁻¹ tuku, riziko žltnutého off-flavouru je minimálne. MK s dlhým reťazcom (> 12 C) pravdepodobne nemajú pre flavour syrov veľký význam vzhľadom k ich relatívne vysokému prahu vnímania (tj. najnižší obsah, ktorý sme schopní vnímať). Prispievajú teda predovšetkým ako prekurzory ďalších dôležitých SAL [87]. Všeobecne sú viazané v TAG v polohe sn-2 [10], [200]. Výnimku tvorí iba kyselina stearová, ktorá je prednostne skôr viazaná v polohe sn-1 [13], [14]. Obsah kyseliny myristovej výrazne klesal ($p < 0,05$) počas zrenia; najnižší obsah mali vzorky v konečnej fáze zrenia (C4, A8 a B8); najvyšší obsah na počiatku zrenia (A2, B2 a C3). Obsah kyseliny palmitovej a stearovej sa výrazne ($p < 0,05$) nemenil počas celej doby zrenia, čo môže byť spôsobené jednak ich tvorbou z iných dlhších/nenasýtených kyselín a taktiež ich odbúraním na SAL (viď kapitola 2.2.1.2).

Nenasýtené MK sú v molekulách TAG viazané na okrajových polohách, sn-1 a sn-3, a teda sú ľahko prístupné pre lipázy [15]. Obsah kyseliny linolovej kolísal počas doby zrenia pri vzorke A, no pri vzorke B stúpala, čo môže byť v dôsledku použitia inej zmesovej kultúry (viď kapitola 4.3). Pri vzorke C sa jej obsah výrazne ($p < 0,05$) nemenil. Obsah kyseliny linolénovej bol vo všetkých vzorkách takmer rovnaký ($p < 0,05$) počas celej doby zrenia, až na vzorky A2 a A8, kedy bol ich obsah výrazne vyšší než pri iných vzorkách, čo je pravdepodobne spôsobené tvorbou tejto MK z iných dlhších MK, resp. nemetabolizovaním pri tvorbe SAL. Obsah kyseliny olejovej klesal počas celej doby zrenia, pravdepodobne v dôsledku jej metabolizovania na SAL (viď kapitola 2.2.1.2).

Celkovo je možné povedať, že prídavok termofilných kultúr, a zvlášť *Lactobacillus helveticus* (vzorka C), má vplyv na priebeh lipolýzy a vedie ku rýchlejšiemu odbúraniu viazaných MK, zvlášť v neskorších fázach zrenia.

5.2.2 Stanovenie prchavých (senzoricky aktívnych) látok

Cieľom tejto kapitoly bolo posúdiť vplyv použitých kultúr (hlavne dodatok termofilných kultúr) na obsah SAL v modelových vzorkách syrov, zároveň bol sledovaný vplyv zrenia. Pre stanovenie SAL v syroch bola použitá metóda HS-SPME-GC-MS, optimalizovaná a validovaná pre analýzu tvrdých syrov.

5.2.2.1 Identifikácia prchavých látok v modelových vzorkách syra

Identifikácia SAL bola prevedená na základe porovnania hmotnostných spektier zlúčenín s dostupnou knižnicou spektier. Tabuľka 34 uvádza prehľad všetkých SAL identifikovaných vo všetkých vzorkách. Vzhľadom k miernym odchýlkam retenčných časov je vždy uvedený aritmetický priemer zo všetkých meraní, relatívne odchýlky sa pohybovali pod 1 %.

SAL sa zvyčajne delia pre lepšie porovnanie do skupín, ktoré korelujú s typom funkčnej skupiny v molekule organickej látky. Jedná sa o alkány, alkény, alkoholy, fenoly, aldehydy, ketóny, karboxylové kyseliny, estery, laktóny, epoxidy, furány, dusíkaté zlúčeniny, sírne zlúčeniny, terpény a terpenoidy.

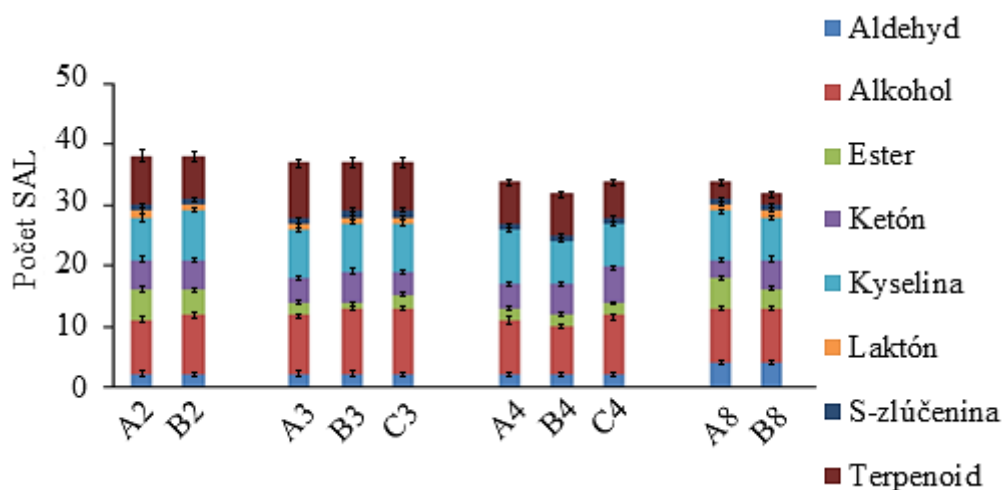
Celkovo bolo vo vzorkách identifikovaných 51 prchavých zlúčenín (Tabuľka 28): 12 alkoholov, 4 aldehydy, 7 ketónov, 6 esterov, 9 kyselín, 11 terpénov a terpenoidov, 1 laktón a 1 sírna zlúčenina. Ukážky chromatogramov vzoriek syrov v poslednej fáze zrenia sú v prílohách 9 až 11.

Identifikácii a popisu arómy SAL v rôznych typoch potravín sa v súčasnej dobe venuje rad publikácií, o Moravskom bochníku je však dostupných veľmi málo informácií, resp. žiadna publikácia, ktorá by sa venovala problematike SAL. Naše výsledky tak boli porovnané s niektorými dostupnými publikáciami zameranými na iné typy syrov: Curioni a kol.[66] analyzovali rôzne druhy syrov pomocou GC-O [210], Frank a kol. [171] analyzovali čedar, tvrdý strúhaný syr a syr s modrou plesňou, Zabaleta a kol. [226], analyzovali syry z ovčieho mlieka, Sádecká a kol. [230] analyzovali ovčí mäkký syr Bryndza, Sanchez-Palomo a kol. [241] analyzovali španielsky PDO syr z ovčieho mlieka, Thierry a kol. [92] analyzovali SAL v syroch typu Ementál.

5.2.2.2 Porovnanie identifikovaných látok vo vzorkách – použité štartovacie kultúry

Ako už bolo zmienené, hlavným cieľom tohto experimentu bolo posúdiť vplyv aplikácie rôznych mikrobiálnych kultúr použitých pre výrobu modelových syrov, v tejto kapitole na prítomnosť a následne obsah SAL.

Všeobecne sa pri výrobe syrov s vysokodohrievanou syreninou do mlieka pridáva mezofilná a termofilná kultúra a v prípade ementálskych syrov aj propiónová kultúra (viď kap. 4.2). Zaujímavé je, že dostupná literatúra nevysvetľuje nevyhnutnosť aplikácie propiónovej kultúry. Pre výrobu modelových vzoriek pre túto prácu bola preto použitá klasická mezofilná aromatická kultúra a dva typy termofilných kultúr (viď kap. 4.2). Celkovo bolo analyzovaných 10 vzoriek vyrobených s použitím 3 rôznych kombinácií uvedených mikrobiálnych kultúr (viď Tabuľka 13). A – prevaha mezofilnej kultúry, B – mierny prídavok termofilnej kultúry, C – prevaha termofilnej kultúry (hlavne *Lactobacillus helveticus*). Porovnanie celkového počtu identifikovaných zlúčenín vo vzorkách, rozdelených podľa chemických skupín, je uvedené v grafe (Obrázok 10).



Obrázok 10: Počet prchavých látok podľa chemických skupín vo vzorkách syrov - použité štartovacie kultúry. Značenie vzoriek viď Tabuľka 13

V jednotlivých vzorkách bolo identifikovaných 28 – 33 zlúčenín; medzi vzorkami nie sú významné ($p > 0,05$) rozdiely a výrazne sa nelíšili ani zastúpenia chemických skupín. Vzhľadom ku vyššej proteolytickej aktivite termofilnej kultúry (viď kap. 4.2) by bolo možné vo vzorke C4 očakávať bohatšie spektrum identifikovaných prchavých látok, čo sa nepotvrdilo, a teda prídavok termofilnej kultúry nemá vplyv na počet SAL, avšak jej prevaha mala vplyv na zvýšený obsah SAL (viď kapitola 5.2.2.5). Medzi jednotlivými vzorkami syrov sa vyskytovali rozdiely v druhu identifikovaných látok. Z pohľadu jednotlivých chemických skupín (Obrázok 10) boli vo všetkých vzorkách najviac zastúpené alkoholy a karboxylové kyseliny. Ku zlúčeninám, ktoré boli identifikované vo všetkých vzorkách modelových syrov patria z alkoholov: metanol, etanol, hexán-1-ol, okt-1-én-ol, 2-etylhexán-1-ol, bután-2,3-diol, citronellol, geraniol, 3-metylbut-2-én-1-ol, benzylalkohol; kyseliny: octová, maslová, hexánová, heptánová, oktánová, dekánová; estery: etyl butanoát, butyl etanoát, etyl hexanoát; iné zlúčeniny: biacetyl, heptán-2-ón, D-limonén, acetoín, nonán-2-ón, nonanál, benzaldehyd a dimetylsulfón.

Tabuľka 28: Prehľad prchavých látok identifikovaných vo všetkých vzorkách syrov

Názov zlúčeniny	T _R [min]	Skupina	A2	A3	A4	A8	B2	B3	B4	B8	C3	C4	Ementál	Mor. bochník	Referencie
metanol	4,11	alkohol	✓		✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	[241]
etanol	4,86	alkohol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[226]
metyl butanoát	6,12	ester				✓	✓			✓			✓	✓	[241]
bután-2,3-dión	6,14	ketón	✓				✓						✓	✓	[226]
α-pinén	11,38	terpén		✓	✓			✓	✓		✓		✓	✓	[226]
heptán-2-ón	13,12	ketón	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[226]
metyl hexanoát	13,31	ester	✓			✓	✓			✓			✓	✓	[226]
D-limonén	13,62	terpén	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[226]
3-metylbutanol	14,14	alkohol		✓		✓				✓			✓	✓	[226]
etyl hexanoát	15,25	ester	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[226]
o-cymén	16,82	terpén	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[226]
acetoín	17,63	ketón	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[66]
heptán-2-ol	18,97	alkohol		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[226]
hexanol	20,40	alkohol		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	[226]
2-hydroxypentán-3-ón	20,80	ketón	✓				✓						✓	✓	[66]
metyl oktanoát	21,97	ester								✓			✓	✓	[210]
nonán-2-ón	21,99	ketón	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[226]
nonanál	22,20	aldehyd	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[66]
β-thujón	23,31	terpenoid			✓			✓	✓		✓		✓	✓	[66]
etyl oktanoát	23,87	ester		✓									✓	✓	[210]
kyselina octová	25,19	kyselina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[226]
2-etylhexán-1-ol	26,23	alkohol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[226]
káfor	27,37	terpén							✓				✓	✓	[66]
nonán-2-ol	27,60	alkohol			✓	✓		✓	✓			✓	✓	✓	[66]
benzaldehyd	28,10	aldehyd	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[241]
bután-2,3-diol	28,94	alkohol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[241]

Značenie vzoriek vid' kapitola 4.3; T_R – retenčný čas; ✓ - látka bola v danej vzorke identifikovaná

Tabuľka 29: Prehľad prchavých látok identifikovaných vo všetkých vzorkách syrov – pokračovanie

Názov zlučiny	T _R [min]	Skupina	A2	A3	A4	A8	B2	B3	B4	B8	C3	C4	Ementál	Mor. bochník	Referencie
linalool	29,22	terpenoid	✓	✓	✓		✓	✓				✓	✓	✓	[66]
kyselina propiónová	29,50	kyselina			✓								✓	✓	[66]
oktán-1-ol	29,75	alkohol		✓				✓	✓		✓	✓	✓	✓	[226]
bután-2,3-diol (izomér)	31,11	alkohol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[226]
etyl dekanoát	35,39	ester	✓						✓	✓	✓		✓	✓	[226]
mentol	35,54	terpenoid		✓						✓			✓	✓	[66]
kyselina maslová	35,84	kyselina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[66]
karvón	41,71	terpenoid		✓			✓	✓	✓			✓	✓	✓	[66]
citral	41,88	terpenoid	✓	✓	✓							✓	✓	✓	[66]
kyselina pentánová	43,33	kyselina		✓	✓			✓				✓	✓	✓	[226]
citronellol	43,95	terpenoid	✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	[66]
α-isometyljonón	47,62	ketón	✓					✓	✓		✓		✓	✓	[66]
geraniol	47,67	terpenoid	✓	✓	✓				✓		✓	✓	✓	✓	[241]
kyselina hexánová	48,45	kyselina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[226]
benzylalkohol	49,27	alkohol	✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	[241]
dimetylsulfón	50,35	S-zlučiny	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[66]
kyselina heptánová	52,90	kyselina	✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	[66]
cinnamaldehyd	55,66	aldehyd				✓				✓			✓	✓	[66]
kumarín	56,15	ketón				✓				✓			✓	✓	[66]
kyselina oktánová	56,26	kyselina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[226]
eugenol	60,12	alkohol	✓			✓	✓						✓	✓	[241]
kyselina nonánová	60,42	kyselina											✓	✓	[66]
δ-dekalaktón	60,81	laktón	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[66]
α-pentylcinnamaldehyd	62,84	aldehyd				✓				✓			✓	✓	[66]
kyselina dekánová	63,61	kyselina		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[241]

Značenie vzoriek vid' kapitola 4.3; T_R – retenčný čas; ✓ - látka bola v danej vzorke identifikovaná

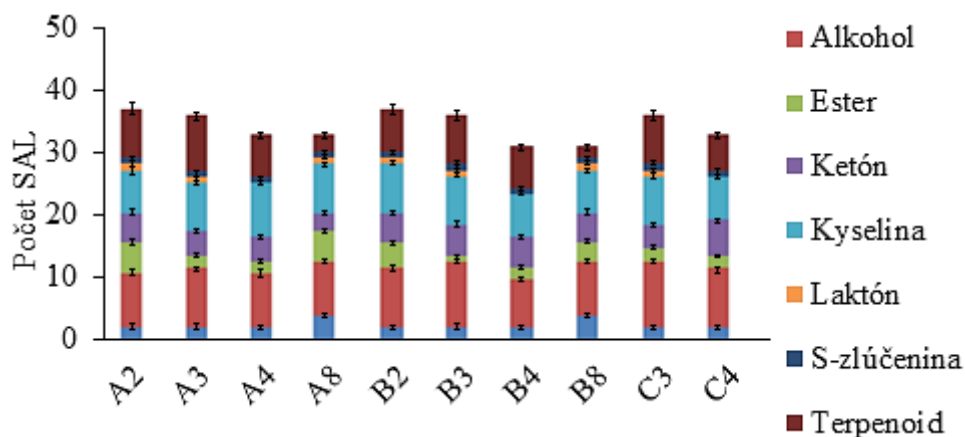
5.2.2.3 Porovnanie identifikovaných látok vo vzorkách – priebeh zrenia

Medzi kľúčové SAL ementálu podľa literatúry [21], [33], [92] patria: etyl butanoát, bután-2,3-dión, 3-metylbutanál, etyl 3-metylbutanoát, heptán-2-ón, metional, 1-okt-3-ón, etyl hexanoát, 4-hydroxy-2,5-dimetyl-3(2H)-furanón, 5-etyl-4-hydroxy-2-metyl-3(2H)-furanón, 2-sec-butyl-3-metoxypyrazín, skatol, δ -dekalaktón. Zlúčeniny boli vybrané na základe vyššej (> 10) hodnoty pachovej aktivity (OAV – odour activity value), ktorá bola vypočítaná na základe nazálneho a retro-nazálneho limitu detekcie pachu [66].

Metional a 2 furanóny spôsobujú sladkastú arómu v profile syrov ementálskeho typu [242]. Taktiež estery etyl butanoát, etyl-3-metylbutanoát a etyl hexanoát charakterizujú syr ovocnou a kvetinovou arómou [66]. V našich vzorkách boli z vyššie spomenutých kľúčových SAL identifikované: 3-metylbutanol (redukovaná forma 3-metylbutanálu), bután-2,3-dión, etyl hexanoát, heptán-2-ón a δ -dekalaktón.

Ak berieme do úvahy priebeh zrenia syrov, je možné očakávať tvorbu nových zlúčenín, a teda zvyšovanie ich počtu. Tento predpoklad sa nepotvrdil, u všetkých sérií (A, B, C) neboli pozorované významné zmeny ($p \geq 0,05$) v počtu SAL (viď Obrázok 11), resp. došlo k miernemu poklesu. Vo vzorke A bolo v počiatočnej fáze zrenia (A2) identifikovaných 38 SAL a postupne toto množstvo klesalo cez hodnoty: 37 (A3); 35 (A4) a v konečnej fáze zrenia kolísalo na 36 (A8). Počet identifikovaných SAL vo vzorke B postupne klesal z 38 (B2) na 37 (B3) a znovu klesal na 32 (B4) až na 31 (B8). Vo vzorke C klesol počet identifikovaných SAL z 37 (C3) na 35 (C4).

Zrenie teda nemá významný vplyv na počet SAL v syroch.



Obrázok 11: Počet prchavých látok podľa chemických skupín vo vzorkách syrov - priebeh zrenia. Značenie vzoriek viď Tabuľka 13

5.2.2.4 Semikvantifikácia prchavých látok v modelových vzorkách

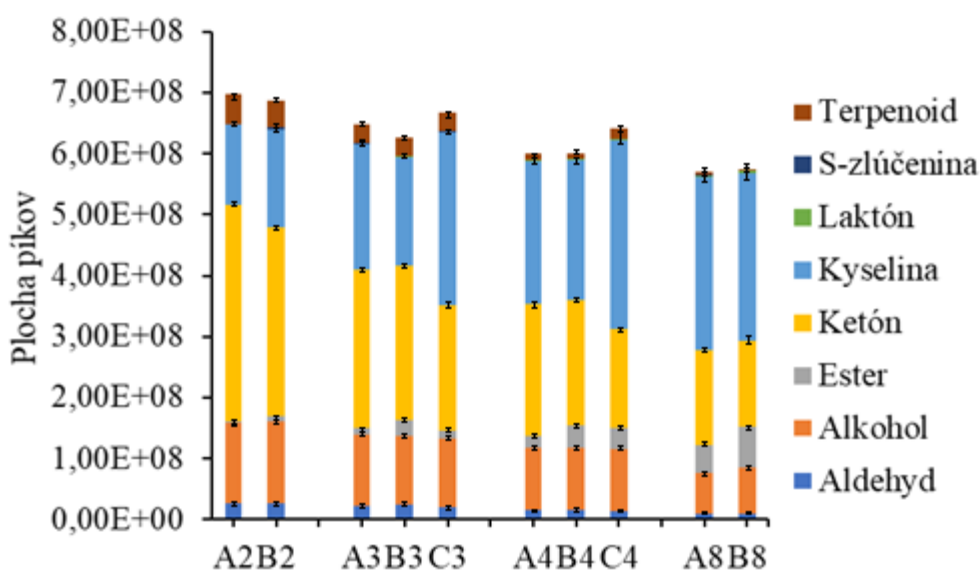
Zaujímavejšie než porovnávať iba počet identifikovaných zlúčenín je sledovanie ich obsahu v jednotlivých vzorkách. Obsah SAL vo vzorkách bol zisťovaný semikvantitatívnou analýzou, tj. porovnaním plôch píkovej jednotlivých zlúčenín. Je to síce určité zjednodušenie, ale aj tak je možné týmto spôsobom dostatočne postihnúť rozdiely medzi vzorkami.

Pre presnú kvantifikáciu by boli potrebné štandardy všetkých identifikovaných zlúčenín; cena štandardov pre analytické stanovenie sa pohybuje nad hodnotou 300 € za kus (0,5 – 1 ml), čo pri tomto počte zlúčenín predstavuje veľmi vysokú sumu - podľa výsledkov novších výskumov úplná kvantifikácia SAL vo vzorkách nie je nutná [242].

Výsledný flavour syra je výsledkom rovnováhy rady zlúčenín rôznych chemických tried o rôznych koncentráciách. Stanovenie celkového aromatického zloženia syrov však neodráža ich sensorický profil pri konzumácii, keďže stále ešte nie je presne známe, ako rôzne sú zlúčeniny kombinované, aby vytvorili celkový zmyslový dojem potravinovej matrice [31]. Pri separácii látok nie je možné vziať v úvahu interakcie zlúčenín v zmesi a javy ako maskovanie alebo synergizmus. To naznačuje, že chápanie vône/flavouru potravín taktiež vyžaduje zmyslovú charakterizáciu vône produktu, tj. kombináciu so sensorickým hodnotením [243] - [245]. V dôsledku heterogénnej povahy syrov a zložitosti ich matrice nebol doposiaľ objasnený chemický základ syrového flavouru. Napriek veľkému počtu publikácií, z ktorých väčšina kladie dôraz na prchavé zlúčeniny, je bohužiaľ stále veľmi veľa otázok spojených s touto problematikou nezodpovedaných [190]. Chuť a vôňa syra nezávisí na koncentrácii akejkoľvek konkrétnej zlúčeniny, ale na kritickej rovnováhe alebo „vyváženom pomere“ všetkých prítomných zložiek. Tento záver podporuje teória rovnováhy zložiek, ktorú uviedli už Kosikowsky a Mocquot [246].

5.2.2.5 Porovnanie obsahu identifikovaných látok vo vzorkách – použité štartovacie kultúry

V grafe (Obrázok 12) je uvedené porovnanie obsahu identifikovaných zlúčenín vo vzorkách rozdelených podľa chemických skupín. Z kvantitatívneho hľadiska boli vo všetkých syroch najviac zastúpené ketóny a kyseliny, podobne ako v práci Gunesser a kol [169] v rôznych typoch ementálskych syrov. Ich celkový percentuálny obsah sa vo vzorkách pohyboval od 59 do 84 %.



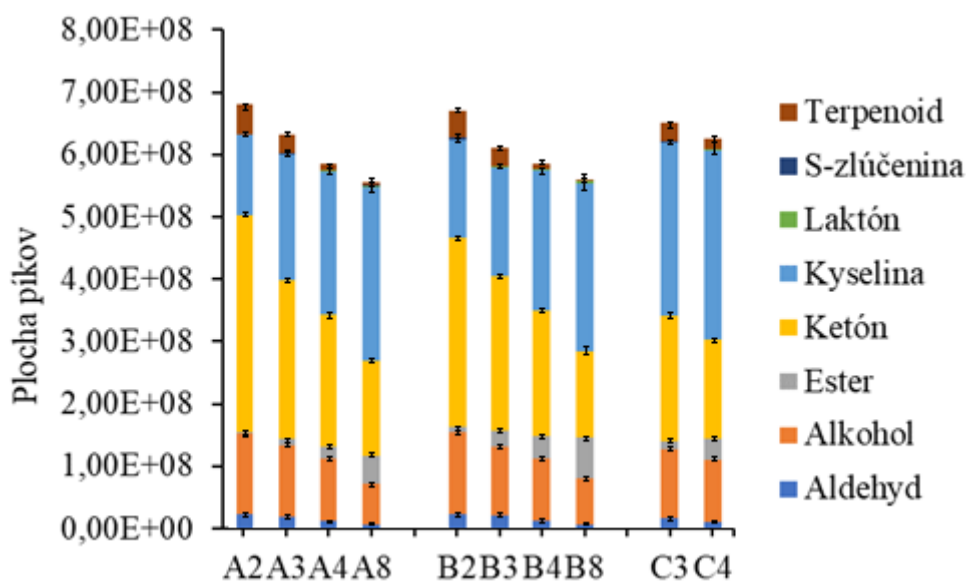
Obrázok 12: Obsah prchavých látok podľa chemických skupín vo vzorkách syrov – použité štartovacie kultúry. Značenie vzoriek vid' Tabuľka 13

Ako už bolo vyššie zmienené, u ementálskych syrov je pre vznik SAL počas zrenia najdôležitejšia proteolýza, preto je možné u vzoriek s prídavkom termofilných laktobacilov očakávať vyšší obsah SAL. Prekvapivo v prvej fáze zrenia (2 mesiace) nebol nájdený významný rozdiel v obsahu SAL ($p \geq 0,05$) medzi vzorkami A a B. Rozdiely medzi vzorkami sa zväzňovali až po 3 mesiacoch, kedy je vidieť vyšší obsah vo vzorke C (C3 a C4, prevaha termofilov). Ku významnému zvýšeniu došlo predovšetkým u kyselín a esterov. To potvrdzuje vplyv laktokokov na obsah prchavých látok v syroch.

5.2.2.6 Porovnanie obsahu identifikovaných látok vo vzorkách – priebeh zrenia

V grafe (Obrázok 13) sú vyjadrené obsahy zlúčenín príslušných chemických skupín v priebehu zrenia jednotlivých syrov.

Vzhľadom k rozsiahlym dejom, ktoré počas zrenia syrov prebiehajú, je možné očakávať výrazný nárast obsahu prchavých látok. Avšak rovnako ako klesal počet identifikovaných zlúčenín (kapitola 5.2.2.3), klesal prekvapivo aj ich obsah, a to u všetkých analyzovaných sérií (A, B, C) (viď ďalej). Pokles bol pozorovaný takmer u všetkých chemických skupín, k celkovému poklesu najviac prispievali ketóny a alkoholy; iba obsah esterov a kyselín sa počas zrenia naopak mierne zvyšoval.



Obrázok 13: Obsah prchavých látok podľa chemických skupín vo vzorkách syrov - priebeh zrenia. Značenie vzoriek vid' Tabuľka 13

V prípade série A a B boli rozdiely medzi počiatočnou a konečnou fázou zrenia štatisticky významné ($p < 0,05$), v prípade série C bol pokles mierny. Môžeme povedať, že zrenie má významný vplyv na obsah SAL v syroch.

5.2.2.7 Diskusia jednotlivých zlúčenín

V nasledujúcich oddieloch sú podrobnejšie diskutované zmeny chemických skupín SAL aj jednotlivých identifikovaných zlúčenín. Pre lepšiu prehľadnosť sú výsledky uvádzané ako relatívny obsah, tj % z celkovej plochy všetkých píkov na chromatograme, v prípade jednotlivých zlúčenín ako % z celkovej plochy píkov danej chemickej skupiny.

Alkoholy

Dráhy zodpovedné za biosyntézu alkoholov zahŕňajú metabolizmus laktózy a citrátu, katabolizmus aminokyselín, redukciu metylketónov a degradáciu niektorých MK (linolová, linolénová). Medzi významné reakcie patrí ich oxidácia na karbonylové zlúčeniny a esterifikácia [66][16].

Vo vzorkách syrov bolo identifikovaných celkovo 12 alkoholov: metanol, etanol, 3-metylbutanol, heptán-2-ol, hexanol, 2-etylhexán-1-ol, nonán-2-ol, bután-2,3-diol, oktán-1-ol, bután-2,3-diol (izomér), benzylalkohol a eugenol, z nich 3-metylbutanol je považovaný za kľúčový pre aróma ementálu [15]. Jeho prekursorom je aminokyselina leucín. Predpokladá sa, že v ementálskych syroch môže potlačovať nepríjemné aróma kyseliny maslovej a prispieva tak ku príjemnej vôni „čerstvého“ syra [44], [66]. V našom prípade však bol nájdený iba v niektorých vzorkách, z čoho nie je možné vyvodiť jednoznačné závery.

Napriek tomu, že alkoholy tvorili najpočetnejšiu skupinu identifikovaných SAL, ich relatívny obsah vo vzorkách bol nízky (13,12 – 26,08 %) a v priebehu zrenia klesal.

Vo všetkých vzorkách bol najvyšší obsah bután-2,3-diolu (31,92 – 51,05 %). Bol detegovaný vo dvoch rôznych retenčných časoch, pravdepodobne sa jedná o dva izoméry. V publikáciách je označovaný za významnú zložku arómy syrov, kde prispieva ku maslovej vôni [86]. V syroch vzniká z biacetylu, počas zrenia dochádzalo k jeho poklesu pravdepodobne v dôsledku premeny na bután-2-ón [32]. U väčšiny ostatných alkoholov bol zistený klesajúci obsah počas zrenia, z dôvodu ich oxidácie a/alebo esterifikácie.

Prídavok termofilnej kultúry nemal na obsah alkoholov významný vplyv ($p \geq 0,05$), ak vezmeme v úvahu konečnú fázu zrenia, najnižší obsah alkoholov bol identifikovaný vo vzorke A8 (13,12 %) a B8 (14,51 %).

Produkcia alkoholov sa teda u jednotlivých druhov a kmeňov použitých kultúr významne nelíšila ($p \geq 0,05$) a nie je možné tvrdiť, že prídavok termofilnej kultúry má významný vplyv na ich tvorbu.

Aldehydy

Vo vzorkách boli identifikované celkovo 4 aldehydy (cinnamaldehyd, nonanál, benzaldehyd α -pentylcinnamaldehyd); resp. iba 2, ak nebudeme brať v úvahu cinnamaldehyd a α -pentylcinnamaldehyd (viď poznámka ďalej); ich relatívny obsah v syroch bol opäť veľmi nízky (0,92 – 5,31 %) a počas zrenia výrazne klesal ($p < 0,05$).

Aj keď nasýtené aldehydy môžu prechádzať priamo z mlieka, ich prevažná väčšina vzniká počas β -oxidácie nenasýtených MK, katabolizmu aminokyselín, prípadne z metabolizmu citrátu a laktátu [55]. Nonanál, ktorého aróma je popisovaná ako čerstvo pokosenej trávy alebo byliniek, pochádza z β -oxidácie nenasýtených MK (konkrétne olejovej); je dôležitý pre aróma napr. syrov typu parmezán [32], [66].

Benzaldehyd (81,26 %) vzniká z fenylalanínu, a napriek tomu že jeho aróma je najčastejšie popisovaná horkými mandľami, je považovaný za významnú SAL pre celkovú arómu syrov [78].

Výskyt aldehydov v syroch je zvyčajne iba prechodný, pretože počas zrenia podliehajú redoxným reakciám za vzniku alkoholov alebo karboxylových kyselín [78]. Z tohto dôvodu pravdepodobne ďalšie aldehydy neboli detegované. Prídavok termofilnej kultúry nemal na obsah aldehydov jednoznačný vplyv ($p \geq 0,05$).

Ketóny

Ketóny v syroch pochádzajú z β -oxidácie VMK, prípadne z metabolizmu laktátu a citrátu [88]. Vo vzorkách bolo identifikovaných 7 ketónov (acetoín, bután-2,3-dión, heptán-2-ón, 2-hydroxypentán-2-ón, nonán-2-ón, α -isometyljonón, kumarín), resp. 5 ak nebudeme brať v úvahu posledné dva (viď nižšie). Ketóny tvorili kvantitatívne najväčšiu zložku aromatického profilu všetkých vzoriek (27,34 – 69,23 %), a počas zrenia u všetkých sérií výrazne klesal ($p < 0,05$).

Metylketóny vznikajú dekarboxyláciou MK a sú typické predovšetkým pre syry s modrou plesňou v ceste, kde sú tvorené enzýmovou činnosťou plesní [66]. Prítomné sú vo väčšine syrov, ale v nižších koncentráciách než v plesňových [78]. Nami detegovaný heptán-2-ón bol popísaný taktiež ako kľúčový pre ementálske syry [32], [66]. Ich obsah počas zrenia významne klesal ($p < 0,05$), dochádzalo k ich redukcii na sekundárne alkoholy, zvlášť nonán-2-ol sa vo vzorkách objavil až v neskorších fázach zrenia.

Taktiež bután-2,3-dión bol už skôr identifikovaný ako kľúčový pre ementálske syry [66]. V našich vzorkách bol nájdený iba na začiatku zrenia (vzorky A2 a B2), pravdepodobne bol rýchlo redukovaný na acetoín, ktorý jasne prevládal vo všetkých vzorkách (82,15 – 84,17 %). Jedná sa o typický produkt fermentácie laktózy a citrátového metabolizmu a je známy ako významná zložka aróma syrov [88].

S prídavkom termofilných kultúr došlo k významnému poklesu obsahu prakticky všetkých ketónov ($p < 0,05$) zrejme v dôsledku urýchlenia ich odbúravania.

Kumarín a α -isometyljonón, rovnako ako vyššie uvedené aldehydy cinnamaldehyd a α -pentylcinnamaldehyd, nie sú prirodzenou zložkou mlieka ani syrov. Kumarín a cinnamaldehyd sú typické skôr pre rastlinné materiály, α -isometyljonón a α -pentylcinnamaldehyd sú dokonca syntetické látky, ktoré sa používajú napr. do kozmetických výrobkov. Ich stopové množstvá sa pravdepodobne dostali do vzoriek ako kontaminanty.

Karboxylové kyseliny

MK s dlhším reťazcom vznikajú lipolýzou mliečneho tuku alebo rozkladom aminokyselín. Kratšie MK pochádzajú z degradácie laktózy, aminokyselín, príp. môžu byť tvorené oxidáciou ketónov, esterov a aldehydov [66]. Identifikovaných bolo 9 kyselín (octová, propiónová, maslová, pentánová, hexánová, heptánová, oktánová, nonánová a dekánová). Z hľadiska kvantitatívneho tvorili druhú najvýznamnejšiu skupinu (25,34 až 60,42 %). V priebehu zrenia sa u všetkých sérií výrazne zvyšoval ich obsah ($p < 0,05$).

Metódou HS-SPME-GC-MS boli identifikované VMK s krátkym reťazcom s maximálne 10 uhlíkmi, pretože prchavosť dlhších VMK klesá. Pre ich stanovenie je nutná derivatizácia, zvyčajne na MEMK [16].

Ďalšie MK sú diskutované v kapitolách 5.2.1.2 a 5.2.1.3. Vo všetkých vzorkách bol prevládajúci obsah kyseliny octovej (približne 2/3 obsahu nízko-uhlíkových VMK) (87,61 – 88,45 %). Kyselina octová vzniká u ementálskych syrov pri propiónovom kvasení a bola popísaná ako dôležitá pre vznik charakteristického jemného orieškového flavouru tohto typu syrov [66]. Pre výrobu našich vzoriek nebola použitá propiónová kultúra, je možné predpokladať jej vznik aj inými dráhami z laktózy, aminokyselín a podobne [66]. Jej obsah sa u všetkých sérií počas zrenia výrazne zvyšoval ($p < 0,05$). S tým súvisí aj fakt, že kyselina propiónová (hlavný produkt propiónového kvasenia) väčšinou nebola detegovaná vo vzorkách.

Ďalej možno zmieniť kyselinu maslovú (3,98 – 6,41 %), ktorá je taktiež dôležitou súčasťou flavouru ementálskych syrov. Pochádza z lipolýzy mliečného tuku, v nižších koncentráciách prispieva k syrovej aróme, vyššie koncentrácie, väčšinou v dôsledku činnosti kontaminujúcich baktérií maslového kvasenia, vedú ku vzniku nežiadúceho žltnutého off-flavouru [35]. Jej obsah sa počas zrenia u všetkých sérií postupne zvyšoval.

Prídavok termofilných kultúr, zrejme v dôsledku ich výraznejšej metabolickej činnosti, viedol ku zvýšeniu obsahu detegovaných kyselín. Najvyšší obsah v konečnej fáze zrenia bol nameraný u vzorky C (60,42 %) a najnižší obsah u vzorky A (25,34 %).

Estery

Estery vznikajú esterifikáciou MK a primárnych a sekundárnych alkoholov [66]. Vo vzorkách boli identifikované iba metyl- a etylestery, celkovo 6 zlúčenín: metyl butanoát, metyl hexanoát, metyl oktanoát, etyl hexanoát, etyl oktanoát, etyl dekanoát. Podobne ako v prípade alkoholov, tvorili síce početnú skupinu, ich relatívny obsah vo vzorkách bol nízky (0,21 – 13,15 %), v priebehu zrenia sa u všetkých sérií, v súlade s literatúrou [66], [32], [15], výrazne zvyšoval ($p < 0,05$).

Napriek tomu, že etanol je majoritným alkoholom v syroch, bol identifikovaný rovnaký počet metylesterov aj etylesterov (3 : 3). Z nich etyl hexanoát, napriek tomu že jeho aróma je najčastejšie popisované ako ovocná, je považovaný za kľúčový pre ementálske syry [85], vo všetkých vzorkách bol zreteľne prevládajúci a v priebehu zrenia výrazne stúpal (71,47-89,15 %).

Najvyšší obsah esterov v konečnej fáze zrenia bol nameraný vo vzorke B (s prídavkom termofilov) (13,15 %), možno povedať, že vplyvom prídavku termofilnej kultúry došlo k miernemu zvýšeniu ($p \geq 0,05$).

Laktóny

Laktóny vznikajú intramolekulárnou esterifikáciou hydroxykyselín [66]. Aj keď sú γ - a δ -laktóny chemicky príbuzné, a je teda pravdepodobné, že sú tvorené rovnakým mechanizmom [27], vo vzorkách syrov bol detegovaný iba δ -dekalaktón; to môže byť spôsobené tým, že podľa Shiota a kol. [145] sa δ -laktóny počas zrenia tvoria omnoho rýchlejšie, než γ -laktóny. Hlavné prekurzory laktónov, hydroxykyseliny, ktoré sa vo voľnej forme prakticky nevyskytujú, neboli detegované (v tukoch sú viazané v TAG). Dlhو sa tvrdilo, že tvorba laktónov počas zrenia prebieha v dvoch krokoch – hydrolýza TAG za uvoľnenia hydroxykyselín a následne ich spontánna laktinizácia. Alejwin a kol. [27] však zistili, že sa jedná o neenzymatickú reakciu, kedy hydroxykyseliny viazané v TAG podliehajú priamej trans-esterifikácii za tvorby laktónov.

Nami identifikovaný δ -dekalaktón je popísaný ako jedna z kľúčových SAL ementálu [21], [33], [92], jeho relatívny obsah vo vzorkách však bol veľmi nízky (0,09 – 0,54 %). V priebehu zrenia sa v dôsledku lipolýzy u všetkých sérií výrazne zvyšoval ($p < 0,05$). Jeho aróma je najčastejšie popisované ako ovocné, v syroch prispieva ku smotanovej a maslovej aróme [35]. Taktiež vplyvom prídavku termofilnej kultúry došlo ku miernemu zvýšeniu jeho obsahu ($p \geq 0,05$).

Sírne zlúčeniny

Pre ich vznik je kľúčová degradácia metionínu [90]. V našich vzorkách bol detegovaný dimetylsulfón (0,04 – 0,10 %), ktorý bol prítomný vo všetkých vzorkách; počas zrenia bol jeho obsah premenlivý a ani prídavok termofilnej kultúry nemal na jeho obsah jednoznačný vplyv.

Terpény, terpenoidy

Terpény nevznikajú katabolizmom mliečnych zložiek, sú charakteristické skôr pre rastlinné materiály a dostávajú sa do mlieka a syrov ako súčasť stravy dojnic [35], čo je možné využiť pre určenie geografického pôvodu syrov, ich význam pre flavour syrov je však doposiaľ kontroverzný. Medzi najčastejšie identifikované terpény v syroch patria α -pinén a linalool [66], [67].

Vo vzorkách bolo identifikovaných celkovo 11 terpénov: α -pinén, D-limonén, káfor, o-cymén, β -thujón, linalool, mentol, karvón, citral, citronellol a geraniol. Ich relatívny obsah v syroch sa pohyboval v rozmedzí 0,28 – 9,87 %. V priebehu zrenia obsah všetkých terpénov výrazne klesal ($p < 0,05$), pravdepodobne v dôsledku degradácie.

Najvyšší obsah mal vo všetkých odberoch vzoriek D-limonén (58,73 – 96,12 %). Prídavok termofilov nemal významný vplyv ($p \geq 0,05$) na obsah terpénov v syroch.

5.2.2.8 Porovnanie senzoricky aktívnych látok v modelových a komerčných syroch

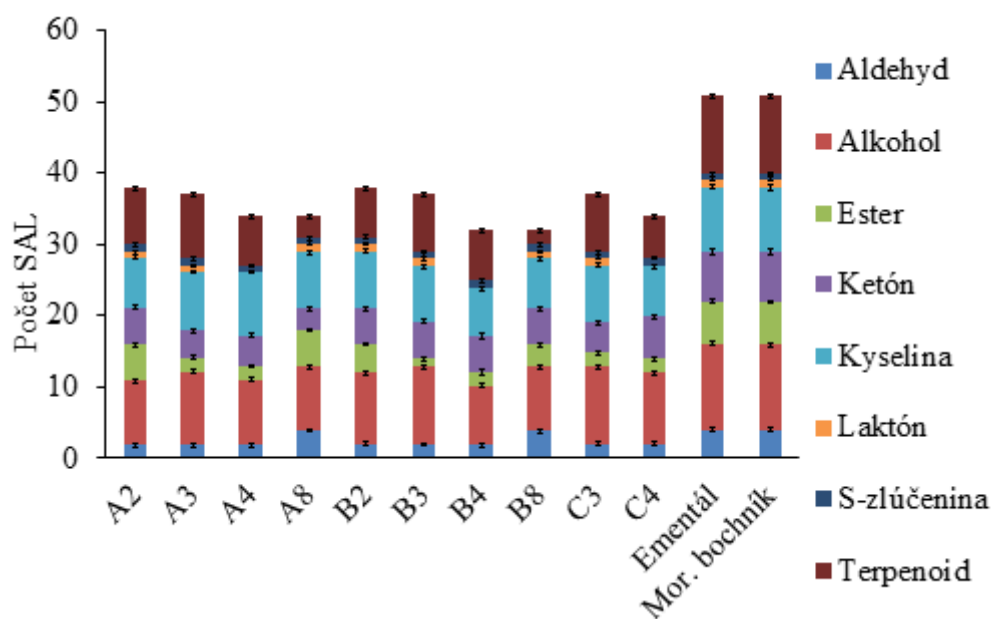
Syry typu moravský bochník patria do skupiny tvrdých syrov s vysokodohrievanou syreninou; ich výroba a vlastnosti sú podobné hlavnému zástupcovi tejto skupiny, Ementálu. Vzhľadom k tomu, že o Moravskom bochníku je dostupných málo publikácií, resp. žiadna, ktorá by sa venovala problematike SAL, boli zvolené dva komerčne vyrobené syry, klasický Ementál a Moravský bochník, ako štandardy pre porovnanie s našimi modelovými vzorkami. Tieto boli podrobené analýze za rovnakých podmienok.

Tieto vzorky by mali byť vhodné ku konzumácii; zloženie SAL bolo porovnané s našimi vzorkami po 4 mesiacoch zrenia, tj. fáza odpovedajúca optimu procesu zrenia. Deklarované zloženie oboch vzoriek komerčných syrov i vyrobených modelových vzoriek bolo rovnaké (45 % t. v s., 60 % sušina). Výsledky porovnania počtu SAL sú uvedené v grafe (Obrázok 13), porovnanie relatívneho obsahu SAL v grafe (Obrázok 15).

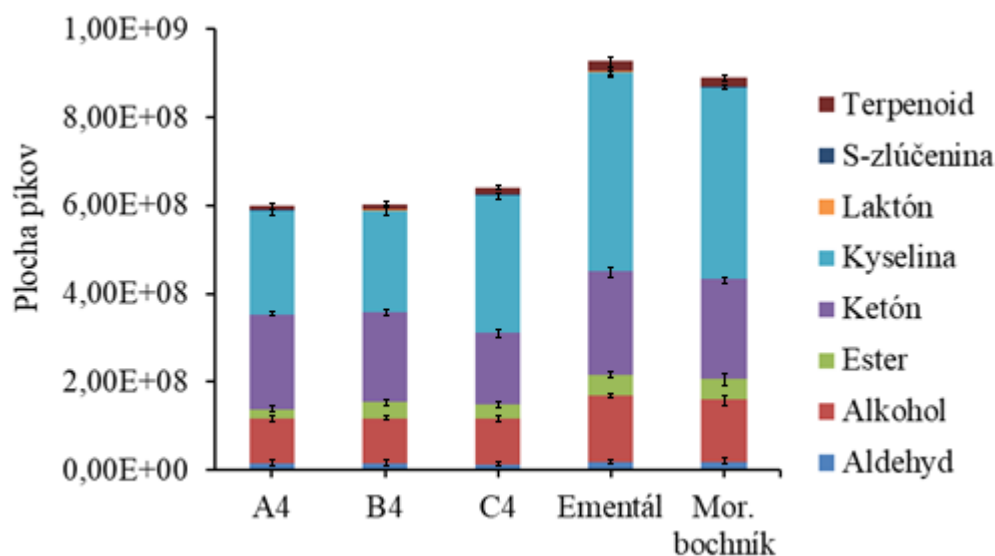
Z grafov je viditeľný výrazne ($p < 0,05$) vyšší počet aj obsah identifikovaných SAL v komerčných syroch, čo môže byť spôsobené lepším zabezpečením výrobného procesu.

V oboch komerčne zakúpených syroch Ementál a Moravský bochník bolo identifikovaných 51 SAL. Z kvalitatívneho hľadiska je teda aromatický profil oboch syrov zrovnateľný.

Rovnako v modelových a aj komerčných syroch boli zastúpené tieto SAL: etanol, heptán-2-ón, D-limonén, etyl hexanoát, o-cymén, acetoín, heptán-2-ol (okrem vzorky A2), nonán-2-ón, nonanál (okrem vzorky A4), kyselina octová, 2-etylhexán-1-ol, benzaldehyd, bután-2,3-diol, kyselina maslová, kyselina hexánová, dimetylsulfón, a kyselina oktánová. Metyl oktanoát (okrem B8), etyl oktanoát (okrem A3), káfor (okrem B4), kyselina propiónová (okrem A4), a kyselina nonánová sa nachádzali iba v komerčných vzorkách.



Obrázok 14: Počet prchavých látok podľa chemických skupín v modelových a komerčných vzorkách. Značenie vzoriek vid' Tabuľka 13



Obrázok 15: Obsah prchavých látok podľa chemických skupín v modelových a komerčných vzorkách. Značenie vzoriek vid' Tabuľka 13

Ak porovnáme komerčný Ementál a Moravský bochník, z grafu (Obrázok 15) je viditeľný mierne vyšší obsah SAL u komerčného Ementálu, rozdiely je možné pričítať pokročilejším biochemickým procesom v priebehu zrenia Ementálu [15]. Pri jeho výrobe sa používa vyššia teplota dohrievania, celková doba spracovania a zrenia je dlhšia. Taktiež časť zrenia prebieha v kvasnej pivnici, tj. pri vyššej teplote (20 – 26 °C) [34]. Je možné v ňom očakávať pokročilejšie biochemické procesy a bohatšie spektrum identifikovaných zlúčenín. Dá sa povedať, že významnú úlohu u oboch syrov hrajú predovšetkým alkoholy, ketóny a karboxylové kyseliny, ktoré sú zastúpené najviac.

5.3 Experiment II – syry eidamského typu

Tento experiment sa zaoberá sledovaním senzorickej kvality prírodných syrov eidamského typu, so zameraním predovšetkým na chuťnosť (flavour) a s ňou súvisiaci obsah SAL. Päť sérií modelových vzoriek (polotvrde syry eidamského typu z nízкодohrievanej syreniny) bolo vyrobených s použitím rôznych mikrobiálnych kultúr; konkrétne klasická mezofilná kultúra a vybrané kmene termofilných baktérií *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus plantarum*. Cieľom bolo posúdiť vplyv použitých kultúr (hlavne dodatok termofilných kultúr) na obsah prchavých látok a mastných kyselín vo vzorkách. Syry boli analyzované v rôznych fázach zrenia (14, 28 a 54 dní po výrobe).

5.3.1 Stanovenie voľných a viazaných mastných kyselín

5.3.1.1 Identifikácia a kvantifikácia mastných kyselín v modelových vzorkách syrov

MK boli identifikované na základe porovnania retenčných časov MEMK s príslušnými štandardmi. Kvantifikácia bola prevedená zrovnaním plôch píkov so štandardmi o známej koncentrácii (kapitola 4.5.4).

Vo vzorkách bolo celkovo identifikovaných 17 MK. V tabuľkách (Tabuľka 29 až Tabuľka 33) je uvedený prehľad MK a ich obsah (v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ vyextrahovaného tuku) pre každú vzorku, ukážky chromatogramov vzoriek syrov v poslednej fáze zrenia sú súčasťou príloh (Príloha 11).

Okrem toho bolo detegovaných ďalších 14 MK (arachová, arachidonová, behénová, cis-11-eicosénová, cis-11,14-eicosadiénová, cis-8,11,14-eicosatriénová, nervónová, trikosánová, lignocérová, eruková, heneicosánová, cis-5,8,11,14,17-eicosapentaénová a docosahexaénová), tieto však nebolo možné kvantifikovať (< LOQ), ich význam je možné považovať za zanedbateľný a ďalej nebudú brané v úvahu.

Tabuľka 29: Obsah MK a VMK identifikovaných vo vzorkách syrov D [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku]

Názov MK	MK			VMK		
	D14	D28	D56	D14	D28	D56
Kyselina kaprónová	18,95 ± 0,54	17,93 ± 0,35	17,3 ± 0,28	1,72 ± 0,08	1,26 ± 0,04	1,40 ± 0,03

Tabuľka 29: Obsah MK a VMK identifikovaných vo vzorkách syrov D [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku]
- pokračovanie

Názov MK	MK			VMK		
	D14	D28	D56	D14	D28	D56
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 undekánová	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	34,3 ± 0,71	196,08 ± 23,92	26,87 ± 0,34	2,36 ± 0,09	1,78 ± 0,07	1,74 ± 0,03
Kyselina tridekánová	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 pentadekánová	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 cis-10-pentadecénová	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 heptadekánová	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 -linolénová	5,00 ± 0,11	5,23 ± 0,11	4,18 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,23 ± 0,02

Značenie vzoriek vid' Tabuľka 15.

Tabuľka 30: Obsah MK a VMK identifikovaných vo vzorkách syrov G [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku]

Názov MK	MK			VMK		
	G14	G28	G56	G14	G28	G56
Kyselina kaprónová	19,29 ± 0,73	17,42 ± 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 kaprínová	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 undekánová	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 tridekánová	1,76 ± 0,07	1,35 ± 0,02	1,19 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,08 ± 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 pentadekánová	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 cis-10-pentadecénová	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	378,12 ± 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 heptadekánová	11,87 ± 0,94	11,02 ± 0,47	8,02 ± 0,16	0,87 ± 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	6,80 ± 0,01
Kyselina linolová	15,95 ± 0,53	14,21 ± 0,34	11,89 ± 0,13	1,29 ± 0,07	0,86 ± 0,02	0,70 ± 0,01
Kyselina α -linolénová	6,16 ± 0,29	5,05 ± 0,09	4,19 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,24 ± 0,01	0,27 ± 0,01

Značenie vzoriek vid' Tabuľka 15.

Tabuľka 31: Obsah MK a VMK identifikovaných vo vzorkách syrov H [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku]

Názov MK	MK			VMK		
	H14	H28	H56	H14	H28	H56
Kyselina kaprónová	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 kaprínová	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 undekánová	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 tridekánová	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 pentadekánová	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 cis-10-pentadecénová	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 heptadekánová	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 -linolénová	5,16 ± 0,12	3,29 ± 0,11	3,87 ± 0,07	0,25 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,28 ± 0,01

Značenie vzoriek vid' Tabuľka 15.

Tabuľka 32: Obsah MK a VMK identifikovaných vo vzorkách syrov I [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku]

Názov MK	MK			VMK		
	I14	I28	I56	I14	I28	I56
Kyselina kaprónová	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 kaprínová	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 undekánová	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 tridekánová	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 pentadekánová	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 cis-10-pentadecénová	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 heptadekánová	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 -linolénová	3,90 ± 0,03	3,79 ± 0,06	2,75 ± 0,11	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,25 ± 0,01

Značenie vzoriek vid' Tabuľka 15.

Tabuľka 33: Obsah MK a VMK identifikovaných vo vzorkách syrov J [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku]

Názov MK	MK			VMK		
	J14	J28	J56	J14	J28	J56
Kyselina kaprónová	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 kaprínová	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 undekánová	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 tridekánová	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 pentadekánová	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 cis-10-pentadecénová	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 heptadekánová	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 -linolénová	4,79 ± 0,07	3,82 ± 0,08	3,74 ± 0,04	0,30 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,24 ± 0,01

Značenie vzoriek vid' Tabuľka 15.

Z kvantitatívneho hľadiska boli vo všetkých vzorkách (Tabuľka 29 až Tabuľka 33) najviac zastúpené kyseliny palmitová, olejová, myristová a stearová, čo je v súlade s dosiahnutými znalosťami o zložení mliečného tuku [109]. Ako už bolo zmienené, enzymatická hydrolýza TAG (lipolýza) je jedným zo základných procesov, ktoré prebiehajú počas zrenia syrov (kapitola 2.2.1.2). Väčšina takto uvoľnených VMK (zvlášť MK s kratším a stredným reťazcom; $C < 12$) vykazuje určitú charakteristickú vôňu/pach, a tak priamo prispieva k vôni daného typu syra; ostatné sú však dôležitými prekurzormi ďalších SAL. Na druhú stranu, ak ich obsah prekročí určitú hranicu (cca $3000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), tak môžu byť príčinou väd syrov (žltnutý off-flavour). Napriek tomu, že u eidamských syrov lipolýza prebieha iba v miernom rozsahu, opäť bolo žiadúce (rovnako ako v Experimente I) sledovať nielen celkový obsah MK, ale aj obsah VMK, preto bola každá vzorka analyzovaná zvlášť pre stanovenie MK viazaných v acylglyceroloch a zvlášť pre VMK. Týmto spôsobom je možné lepšie postihnúť zmeny v priebehu zrenia syrov. Pre zjednodušenie boli pri porovnávaní vzoriek v nasledujúcich kapitolách opäť brané do úvahy iba MK považované za najvýznamnejšie pre mliečny tuk; z MK s dlhým reťazcom to boli: palmitová, myristová a stearová; z MK s krátkym reťazcom to boli: kaprónová, kaprylová a kaprínová a z nenasýtených MK olejová, linolová a α -linolénová [109]. Kyselina maslová, ktorá je považovaná dokonca za kľúčovú pre flavour eidamských syrov [78], bude diskutovaná ďalej (kapitola 5.3.2.1) v rámci stanovenia prchavých látok metódou HS-SPME-GC-MS.

5.3.1.2 Porovnanie obsahu voľných a viazaných mastných kyselín vo vzorkách – použité štartovacie kultúry

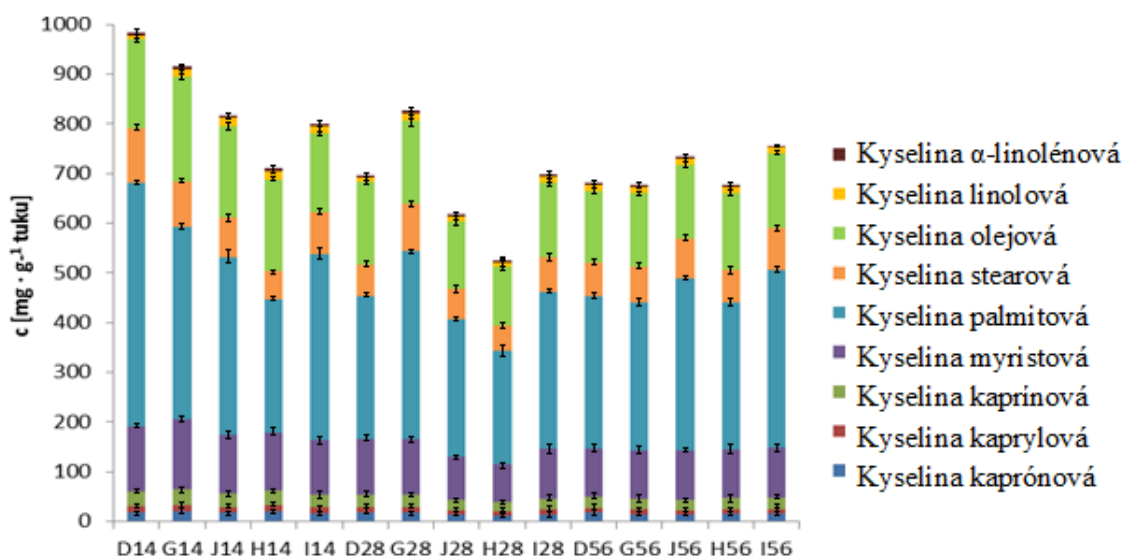
Pre výrobu eidamských syrov sa klasicky používa tzv. smotanová kultúra, ktorá je zložená z mezofilných baktérií rodu *Lactococcus* spp. a *Leuconostoc* spp. Tieto je možné kombinovať pre dosiahnutie žiadúcich senzorických vlastností výrobku.

Táto základná kultúra je doplnená vhodnou termofilnou kultúrou (väčšinou vybrané druhy *Lactobacillus* spp.), ktorá pôsobí počas dohrievania syrov a vďaka proteolytickej a mierne lipolytickej aktivite výrazne prispieva ku vzniku žiadúceho flavouru [15]. V našom prípade bol použitý „aromatický typ“ smotanovej kultúry v zložení *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* s prídavkom vybraného kmeňa *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

Lipolytická aktivita baktérií *Lactococcus* spp. a *Lactobacillus* spp. sa v eidamských syroch podieľa najviac na hydrolýze tukov. Hoci je ich lipolytická aktivita pomerne nízka, v syroch sa nachádzajú vo vysokých koncentráciách a môžu produkovať významné množstvá VMK [16].

Vzorky (Tabuľka 14) vyrobené bez prídavku termofilných laktobacilov boli označené D, ostatné boli vyrobené s prídavkom vybraných kmeňov *Lactobacillus casei* (vzorky G a J) a *Lactobacillus plantarum* (vzorky H a I). Cieľom bolo zistiť, či má prídavok termofilnej kultúry vplyv na skúmané parametre, v tejto kapitole na obsah MK.

V grafoch (Obrázok 16 a Obrázok 17) sú uvedené porovnania celkových obsahov MK a VMK, resp. celkového obsahu vyššie zmienených vybraných MK (kvantitatívne najvýznamnejších pre mliečny tuk) [109]. Význam ostatných MK, vzhľadom ku veľmi nízkym obsahom, bol považovaný za štatisticky zanedbateľný ($p < 0,05$).



Obrázok 16: Celkový obsah vybraných MK vo vzorkách syrov - použité štartovacie kultúry

Ak porovnáme obsah MK viazaných v acylglyceroloch (Obrázok 16), medzi vzorkami (aplikovanými kultúrami) sú zreteľne významné rozdiely ($p < 0,05$), zvlášť v prvých fázach zrenia (po 14 a 28 dňoch). Je možné očakávať, že s prídavkom termofilných kultúr *Lactobacillus casei* (vzorky G a J) a *Lactobacillus plantarum* (vzorky H a I) sa prejaví ich výraznejšia lipolytická aktivita (tzn. výraznejší pokles MK). Zistené výsledky tomuto odpovedajú. Najvyšší obsah MK bol zistený vo vzorke D (bez prídavku termofilnej kultúry). Toto však platí iba na počiatku zrenia; ku koncu (po 56 dňoch) už neboli zaznamenané významné rozdiely ($p \geq 0,05$) a priebeh lipolýzy sa pravdepodobne ku koncu zrenia vyrovnáva.

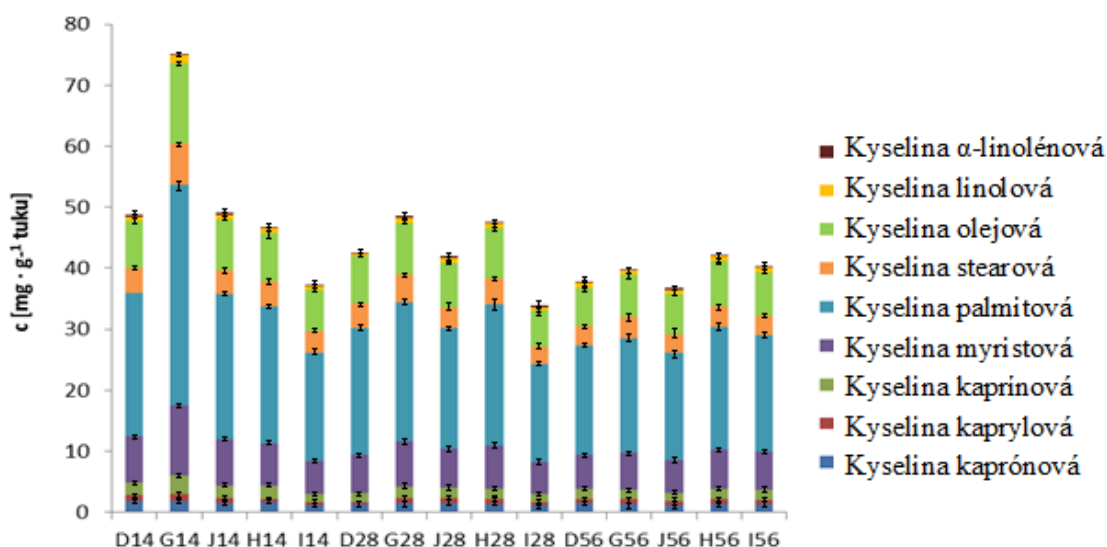
Čo sa týka jednotlivých MK s krátkym reťazcom (kapronová, kaprylová, kaprinová), nie je viditeľný jednoznačný trend, prídavok termofilov nemal na ich obsah výrazný vplyv; vo všetkých vzorkách prevažovala kyselina kaprinová.

Z MK s dlhým reťazcom (myristová, palmitová, stearová) vo všetkých vzorkách prevažovala kyselina palmitová, u ktorej sa na počiatku zrenia s prídavkom termofilov prejavil výraznejší pokles. U ostatných vzoriek nebol pozorovaný tento trend.

U nenasýtených MK (olejová, linolová, linolénová), obsah kyseliny linolovej sa mierne zvýšil na počiatku zrenia (podobne ako v experimente I), u ostatných nebol tento trend pozorovaný; vo všetkých vzorkách významne prevažovala kyselina olejová.

Pri porovnávaní použitých termofilných baktérií (*Lactobacillus casei* vs. *Lactobacillus plantarum*) vidíme, že lipolytická aktivita sa líši dokonca aj medzi kmeňmi totožného bakteriálneho druhu. Za kmene s mierne vyššou lipolytickou aktivitou je možné na základe našich výsledkov označiť *Lactobacillus casei* kmeň 422 (vzorka G) a *Lactobacillus plantarum* kmeň 187 (vzorka H).

Ako bolo skôr zmienené, v poslednej fáze zrenia sa obsah MK u všetkých vzoriek vyrovnáva, čo by mohlo naznačovať, že aj samotná smotanová kultúra (*Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp.) vykazuje dostatočnú lipolytickú aktivitu, ale s pomalším priebehom.



Obrázok 17: Celkový obsah vybraných VMK vo vzorkách syrov - použité štartovacie kultúry

Ak nebudeme brať v úvahu vysoký obsah VMK u vzorky G14, ktorý pravdepodobne súvisí s nehomogenitou syrov, pri porovnaní VMK (Obrázok 17) boli medzi vzorkami zistené nevýznamné rozdiely ($p \geq 0,05$), ale vzhľadom k tomu, že VMK sú ďalej metabolizované (ako bude diskutované nižšie), možno aktivitu použitých kultúr lepšie posúdiť zo zmien obsahu viazaných MK (Obrázok 16).

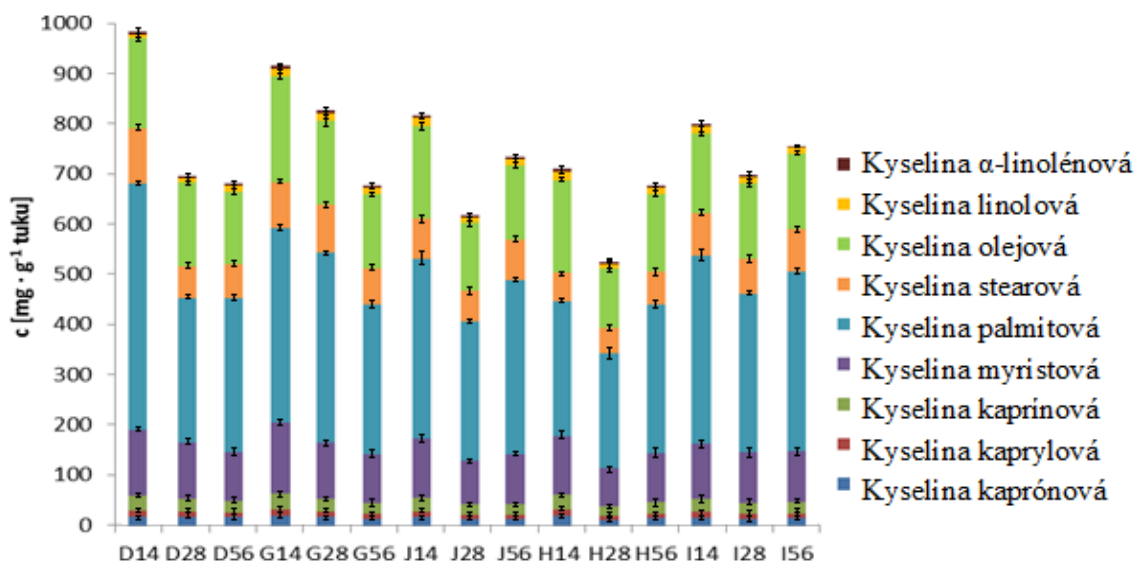
5.3.1.3 Porovnanie obsahu voľných a viazaných mastných kyselín vo vzorkách – priebeh zrenia

Ďalším cieľom tohto experimentu bolo sledovať zmeny v priebehu zrenia syrov. Eidamské syry by mali zrieť po dobu najmenej 4 týždňov, optimálna doba zrenia je však 2-5 mesiacov, v ČR zrejú (z ekonomických dôvodov) cca 2 mesiace [15], [29].

Vzorky boli odobrané a analyzované po 14, 28 a 56 dňoch zrenia a po tejto dobe sa očakáva vyvinutá typická chuť a vôňa. V nasledujúcich kapitolách bude diskutované porovnanie obsahu MK vo vzorkách v priebehu zrenia, a to pre MK aj VMK.

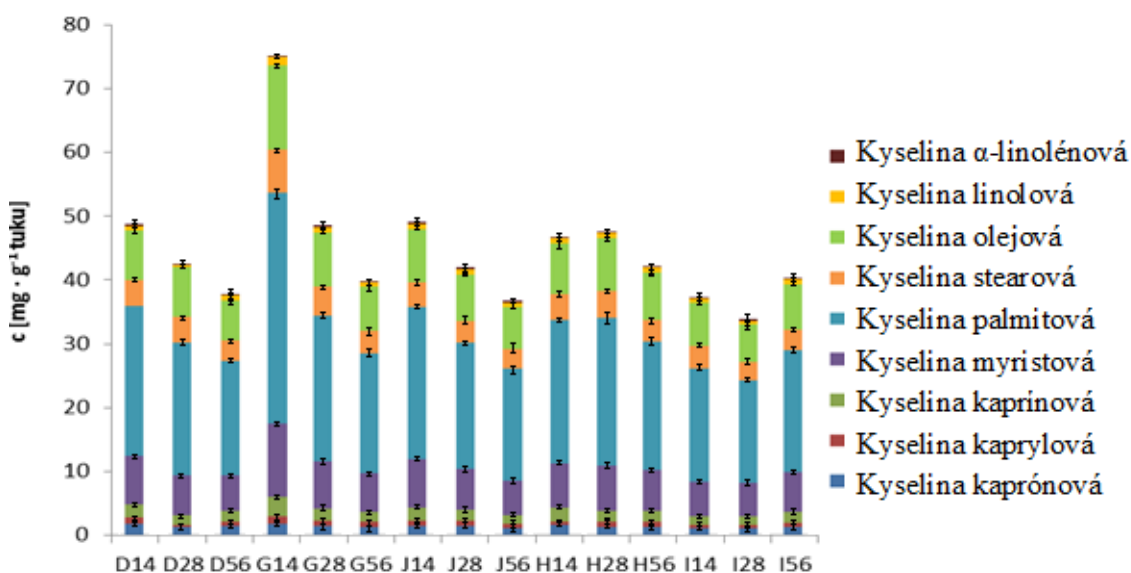
Porovnanie celkového obsahu voľných a viazaných mastných kyselín

Z grafu (Obrázok 18) je viditeľné, že na počiatku zrenia došlo u všetkých vzoriek k výraznému poklesu ($p < 0,05$); čo bolo v dôsledku lipolýzy očakávané. U niektorých vzoriek (H, I, J) však došlo v poslednej fáze ku miernemu nárastu celkového obsahu, čo môže byť spôsobené nerovnomerným priebehom zrenia jednotlivých syrov. Modelové syry boli vyrobené v poloprevádzkových podmienkach a zreli v jednoduchých boxoch na zrenie. Bolo teda náročné zabezpečiť totožný priebeh zrenia, zvlášť v neskorších fázach procesu, kedy dochádzalo ku významným zmenám. Napriek tomu, že bol syr pre zabezpečenie reprezentatívneho vzorku vždy homogenizovaný, mohla taktiež analyzovaná časť pochádzať z mierne odlišných častí syra.



Obrázok 18: Celkový obsah vybraných MK vo vzorkách syrov – priebeh zrenia

Obsah VMK by sa mal naopak podľa predpokladu v dôsledku lipolýzy v priebehu zrenia syra zvyšovať. Na druhú stranu mnohé z nich sú dôležitými prekurzormi pre produkciu SAL, čo má za následok zároveň postupné odbúravanie VMK za vzniku, napr. esterov, alkoholov, aldehydov, ketónov a predovšetkým laktónov, nevyhnutných pre charakteristický flavour eidamských syrov [44]. Tomu zodpovedá priebeh zmien VMK v grafe (Obrázok 19), ktorý ukazuje, že u väčšiny vzoriek dochádza ku ich miernemu poklesu; to znamená, že sekundárne degradačné procesy prevažujú nad uvoľňovaním MK v dôsledku lipolýzy, čo je žiadúce, keďže nedochádza ku hromadeniu VMK a ku vzniku žltnutého off-flavouru.



Obrázok 19: Celkový obsah vybraných VMK vo vzorkách syrov – priebeh zrenia

Obsah VMK sa po 56 dňoch zrenia u všetkých vzoriek pohyboval približne okolo $40 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku; obsah VMK s krátkym reťazcom, ktoré priamo ovplyvňujú flavour, bol približne $3 - 4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku (riziková hranica - $3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku); u vzoriek je mierne riziko vzniku zatuchnutého off-flavouru. Rozsiahla lipolýza je všeobecne u syrov holandského typu považovaná za nežiadúcu [93]. Profilu VMK u všetkých vzoriek dominuje kyselina palmitová. Vo významných množstvách sú zastúpené ďalej kyseliny myristová, olejová, stearová, čo je okrem kyseliny olejovej v súlade s doposiaľ publikovanými štúdiami VMK v eidamských syroch [22] - [25].

Porovnanie obsahu vybraných skupín mastných kyselín

Pre lepšiu prehľadnosť sú v tejto kapitole porovnané jednotlivé MK opäť rozdelené do skupín. Obsah MK s krátkym reťazcom v priebehu zrenia väčšinou klesal ($p < 0,05$). Mierny nárast v poslednej fáze zrenia bol opäť zaznamenaný u vzoriek H, I a J (prídavok termofilov). Obsah VMK bol premenlivý, skôr klesajúci. Aj keď sa tieto MK samé o sebe vďaka prchavosti podieľajú na flavouru syra, dochádza pravdepodobne v priebehu zrenia aj k ich odbúraniu za vzniku SAL.

V množstve štúdií, napr. [46] a [49], bol preukázaný rýchlejší nárast obsahu VMK s kratším reťazcom počas zrenia, spôsobený predovšetkým selektivitou mikrobiálnych lipolytických enzýmov [27]. Zvýšená rýchlosť produkcie týchto MK však v tomto prípade nebola preukázaná. Najvyšší obsah vo všetkých vzorkách tvorila kyselina kaprínová. MK s dlhým reťazcom ($> 12 \text{ C}$) prispievajú k flavouru predovšetkým ako prekurzory dôležitých SAL [87]. Podstatný podiel MK s dlhým uhlíkovodíkovým reťazcom u všetkých vzoriek mala vo forme esterovo viazanej aj voľnej kyselina palmitová, čo je v súlade s literatúrou [16]. Jej zmeny najviac ovplyvňujú celkový profil MK vo vzorkách. Obsah sa však výrazne ($p < 0,05$) nemenil počas celej doby zrenia; vzorka G14 obsahovala až o cca 51 % viac kyseliny palmitovej, než ostatné vzorky; pravdepodobne vďaka prítomnosti *Lactobacillus casei* (viď kapitola 4.3). Stagnáciu obsahu kyseliny palmitovej je možné pripísať jej tvorbe z iných dlhších/nenasýtených mastných kyselín a taktiež odbúraním na SAL (viď kapitola 2.2.1.2). Vysoký obsah mali taktiež kyselina myristová a stearová; ich obsah postupne klesal.

Z nenasýtených MK je v mliečnom tuku najvýznamnejšia kyselina olejová [87], ktorá bola druhou najzastúpenejšou kyselinou; jej obsah spravidla klesal s dĺžkou zrenia. Kyselina linolová a α -linolénová sa v porovnaní s ostatnými vybranými MK vyskytovali v minoritnom množstve. Ich obsah sa počas doby zrenia výrazne ($p \geq 0,05$) nemenil.

Celkovo je možné povedať, podobne ako v experimente I, že prídavok termofilných kultúr má vplyv na priebeh lipolýzy a vedie ku rýchlejšiemu odbúravaniu viazaných MK.

5.3.2 Stanovenie prchavých (senzoricky aktívnych) látok

5.3.2.1 Identifikácia prchavých látok v modelových vzorkách syra

Identifikácia SAL bola prevedená na základe porovnania hmotnostných spektier zlúčenín s dostupnou knižnicou spektier. Tabuľka 34 uvádza prehľad všetkých SAL identifikovaných vo všetkých vzorkách.

Vzhľadom k miernym odchýlkam retenčných časov je vždy uvedený aritmetický priemer zo všetkých meraní, relatívne odchýlky sa pohybovali pod 1 %. Identifikované SAL boli opäť rozdelené pre lepšie porovnanie do chemických skupín. Vo vzorkách syrov bolo identifikovaných 50 prchavých látok: 11 alkoholov, 10 esterov, 7 ketónov, 6 karboxylových kyselín, 5 aldehydov, 3 laktóny, 2 sírne zlúčeniny, 6 terpénov a terpenoidov. Ukážky chromatogramov vzoriek syrov v poslednej fáze zrenia sú v prílohách (Príloha 12). Problematikou charakterizácie arómy prchavých látok nielen v syroch sa v súčasnosti zaoberá celý rad publikácií, napr. Marilley a Casey [44], Fox a Wallace [5] alebo Hassan a kol [247] vo svojich publikáciách zhrnuli doposiaľ získané poznatky v analýze prchavých látok v rôznych druhoch syrov, pričom zdôrazňujú dôležitosť štartovacích kultúr, metabolizmu laktózy, bielkovín, di-/triglyceridov a prítomnosť enzýmov. Identifikované prchavé zlúčeniny boli porovnané s dostupnými publikáciami (viď Tabuľka 34 a Tabuľka 35), kde bola overená ich aromaticita - všetky identifikované látky je možné považovať za SAL, tj. vykazujú určitú vôňu/pach a môžu tak prispievať ku konečnému flavouru syru. Deskriptory pre popis ich arómy sú roztriedené a uvedené v prílohách (Príloha 1 až Príloha 8).

Z pohľadu jednotlivých chemických skupín boli vo všetkých vzorkách najviac zastúpené alkoholy, nasledované karboxylovými kyselinami a ketónmi. Vysokú početnosť výskytu mali aj terpény a terpenoidy. Vo všetkých vzorkách syrov sa nachádzali tieto zlúčeniny: 4 alkoholy (okt-1-én-3-ol, 2-etylhexán-1-ol, bután-2,3-diol, benzylalkohol), 3 aldehydy (hexánal, nonánal, benzaldehyd), 3 ketóny (acetoín, heptán-2-ón, nonán-2-ón), 4 karboxylové kyseliny s párnym počtom uhlíkov (octová, maslová, kaprónová, kaprylová), 1 laktón (δ -oktalaktón), 1 sírna zlúčenina (dimetylsulfón), 1 terpén (D-limonén). Všetky tieto zlúčeniny patria ku typickým pre flavour syrov [55]. Zlúčeniny, ktoré sa vyskytovali takmer vo všetkých vzorkách (okrem jedného prípadu) sú: 3 alkoholy (3-metylbut-2-én-1-ol, hexán-1-ol a fenol), 1 aldehyd (undekán-2-ón), 2 laktóny (δ -hexalaktón a δ -dekalaktón). Z kľúčových SAL, ktoré bývajú obvykle identifikované v eidamských syroch (uvedené v kapitole 2.2.3), boli v našich vzorkách nájdené hexánal, kyselina octová a maslová. Obvykle býva prítomný aj biacetyl, ten však nebol identifikovaný v žiadnej vzorke, boli ale nájdené jeho redukované formy acetoín a bután-2,3-diol. Podobne nebol identifikovaný ani typický dimetylsulfid, ale jeho oxidovaná forma dimetylsulfón. Zo zlúčenín typických pre eidamské syry, ktoré boli identifikované okrem jedinej výnimky u všetkých vzoriek, sa potom s literatúrou zhodujú ešte δ -dekalaktón a D-limonén [248].

Šesť-uhlíkový aldehyd s priamym reťazcom hexánal, vzniká s najväčšou pravdepodobnosťou pri β -oxidácii nenasýtených MK, konkrétne z kyseliny linolovej. Ďalšou možnosťou jeho tvorby sú svetlom indukované reakcie (žltnutie). Takéto reakcie v syroch bežne neprebiehajú, preto sa môže hexánal využívať ako indikátor zhoršenia kvality u nesprávne skladovaných produktov [66]. K určitému nárastu jeho obsahu v našich vzorkách tak mohlo dôjsť aj behom odberu, prevozu do laboratória a skladovania. Jedná sa o zlúčeninu s ovocnou (citrón, zelené jablko) až skôr bylinnou arómou, často sa pre popis používa spojenie „vôňa čerstvo pokosenej trávy“ [249], [250].

Všeobecne majú aldehydy s priamym reťazcom skôr negatívny dopad na flavour syra, pokiaľ ich obsah prekračuje určitú hodnotu. U hexánalu sa táto hodnota pohybuje okolo $9 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ [66] a pri jej prekročení sa vyznačuje skôr „lojovitým“ pachom [250].

Z ďalších aldehydov bol vo všetkých vzorkách identifikovaný nonanál a benzaldehyd. Nonanál s vyšším prahom vnímania (cca $40 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) [250] sa svojou arómou podobá hexanálu. Aj tento aldehyd s priamym reťazcom sa vyznačuje vôňou zelene a bylín, pre popis off-flavouru, ktorý vzniká v dôsledku vyššej koncentrácie, sa často využíva pojmov ako „špinavý, plastový, masťný, olejovitý“ [247] - [251]. Benzaldehyd, vznikajúci pri katabolizme aromatickej aminokyseliny fenylalanínu uvoľneného z bielkovín pri proteolýze, svojou vôňou typicky pripomína horké mandle, popr. pripálený cukor alebo chleba [247]. Typickými SAL eidamských syrov zo skupiny MK sú kyseliny octová a maslová, ktoré boli taktiež detegované vo všetkých našich vzorkách. Kyselina octová, ktorej prah vnímania sa pohybuje okolo $22 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [250], sa vyznačuje prenikavým, kyslým, až ostrým či drsným zápachom [247]. Táto dvojuhlíková kyselina môže vznikáť ako pri metabolizme citrátu alebo laktátu, tak aj pri katabolizme niektorých aminokyselín (alanín, serín, threonín) [83]. Zatuchnutý, nepríjemný, ostrý a kyslý zápach je charakteristický pre najviac zastúpenú VMK v syroch holandského typu – kyselinu maslovú (prah vnímania $1,4 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [250]), ktorá vzniká prevažne ako produkt hydrolytickej aktivity lipáz [96]. Nadmerná alebo nevyvážená lipolýza môže viesť k nadbytku VMK s krátkym reťazcom spôsobujúcim tzv. žltnutie syrov – sem patria aj kyseliny kaprónová a kaprylová. Ani ich flavour nepatrí k príjemným, obvykle sú spájané s ostrým, štiplavým a kozím zápachom [171]. Pre popis kyseliny kaprónovej sa ďalej používajú deskriptory napr. „spotený, štiplavý, fekálny“, u kyseliny kaprylovej napr. „zatuchnutý, pach čistiacich prostriedkov, hnilobný“ [98].

Ku kľúčovým sírnym zlúčeninám v eidamských syroch patrí dimetylsulfid. Táto zlúčenina nebola v našich vzorkách identifikovaná, bol detegovaný dimetylsulfón. Ten vzniká oxidáciou dimetylsulfidu produkovaného enzymatickou alebo chemickou oxidáciou metántiolu, ako produktu katabolizmu metionínu, prípadne cysteínu [95]. Dimetylsulfid je spojovaný so zápachom síry alebo prevareného mlieka [66].

Hlavným ketónom holandských syrov, produkovaným prevažne z pyruvátu pri metabolizme laktózy a citrátu, popr. transamináciou alanínu, je biacetyl. Ani v jednom z našich vzoriek však nebola prítomnosť tohto diketónu preukázaná, naproti tomu jeho redukovaná forma acetoín bola zastúpená vo všetkých vzorkách vo vysokých koncentráciách. Táto SAL môže mať kvetinové alebo maslové aróma, pripomínajúce kyslé mlieko alebo karamel [88]. Metylketóny, ktoré sa vyskytovali vo všetkých, resp. takmer vo všetkých vzorkách, sú heptán-2-ón, nonán-2-ón a undekán-2-ón. Tieto SAL sú, skôr než pre syry eidamského typu, typické pre plesňové syry, pre ktorých výrobu sa používajú plesňové kultúry s vysokou aktivitou enzýmov β -oxidácie, pri ktorej sú tieto zlúčeniny produkované z VMK [16]. Pri nižších koncentráciách majú príjemné ovocné až kvetinové aróma, ktoré však pri rozsiahlejšom priebehu β -oxidácie môže prejsť až v nežiadúci zápach; u heptán-2-ónu je často popisovaný ako „plastový“ alebo „pach laku“ [171]. Ďalším produktom redukcie biacetylu, resp. acetoínu, ktorý sa vyskytoval vo všetkých vzorkách vo vysokých koncentráciách, je bután-2,3-diol, ktorý významne prispieva ku maslovej až orechovej vôni syra [86].

Tabuľka 34: Prehľad prchavých látok identifikovaných (✓) vo vzorkách syrov

Názov zlúčeniny	T _R [min]	Skupina	D14	D28	D56	G14	G28	G56	H14	H28	H56	I14	I28	I56	J14	J28	J56	M20	M30	M45	Referencie	
Hexánal	8,73	aldehyd	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[93]
Metyl valerát	8,83	ester														✓		✓	✓	✓		[88]
Etyl valerát	10,57	ester		✓														✓	✓	✓		[93]
Bután-1-ol	11,23	alkohol									✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓		[93]
β-myrcén	11,65	terpén	✓	✓		✓		✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓		[88]
Heptán-2-ón	12,64	ketón	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[93]
Heptánal	12,72	aldehyd		✓														✓	✓	✓		[66]
Metyl kapronát	12,78	ester	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[252]
D-limonén	12,99	terpén	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[93]
Etyl kapronát	14,73	ester	✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[93]
Pentán-1-ol	15,55	alkohol	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[66]
Oktán-2-ón	16,97	ketón				✓									✓			✓	✓	✓		[66]
Acetoín	17,17	ketón	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[247]
Heptán-2-ol	18,49	alkohol									✓	✓	✓			✓		✓	✓	✓		[253]
3-metylbut-2-én-1-ol	18,66	alkohol		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[66]
6-metylhept-5-én-2-ón	19,31	ketón	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓		[96]
Hexán-1-ol	19,94	alkohol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[66]
Nonan-2-ón	21,44	ketón	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[66]
Nonánal	21,65	aldehyd	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[93]
Etyl kaprylát	23,30	ester				✓									✓	✓		✓	✓	✓		[93]
Okt-1-én-3-ol	24,07	alkohol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[66]
Metionál	24,44	sírna zl.					✓	✓			✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓		[98]
Kyselina octová	24,71	kyselina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[93]
2-etylhexán-1-ol	25,67	alkohol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[247]
Dekánal	26,04	aldehyd	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓		[66]

Značenie vzoriek vid' Tabuľka 15; T_R – retenčný čas; ✓ - látka bola v danej vzorke identifikovaná

Tabuľka 35: Prehľad prchavých látok identifikovaných (✓) vo vzorkách syrov (pokračovanie)

Názov zlúčeniny	Tr [min]	Skupina	D14	D28	D56	G14	G28	G56	H14	H28	H56	I14	I28	I56	J14	J28	J56	M20	M30	M45	Referencie
Benzaldehyd	27,42	aldehyd	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[247]
Bután-2,3-diol	28,19	alkohol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[87]
Linalool	28,51	terpenoid				✓			✓						✓	✓		✓	✓	✓	[66]
Metyl kaprinát	31,15	ester			✓											✓		✓	✓	✓	[226]
Undekán-2-ón	31,36	ketón		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[66]
Etyl kaprinát	34,18	ester														✓		✓	✓	✓	[98]
Kyselina maslová	35,05	kyselina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[93]
Nonán-1-ol	36,26	alkohol		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	[250]
Karvón	40,82	terpenoid	✓	✓		✓	✓		✓			✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓	[66]
Citral	41,05	terpenoid			✓	✓	✓	✓			✓			✓		✓	✓	✓	✓	✓	[39]
Kyselina valérová	42,68	kyselina									✓		✓	✓			✓	✓	✓	✓	[66]
Citronellol	43,22	terpenoid	✓	✓		✓			✓			✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[39]
δ-hexalaktón	44,14	laktón	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[39]
Metyl laurát	44,85	ester		✓							✓		✓					✓	✓	✓	[88]
Tridekán-2-ón	45,19	ketón			✓	✓		✓								✓		✓	✓	✓	[66]
Kyselina kapronová	47,88	kyselina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[93]
Benzylalkohol	48,59	alkohol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[226]
Dimetylsulfón	49,70	sírna zl.	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[66]
δ-oktalaktón	52,03	laktón	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[66]
Metyl myristát	53,75	ester				✓			✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	[39]
Fenol	54,03	alkohol		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[93]
Kyselina kaprylová	56,27	kyselina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[93]
Kyselina nonánová	59,84	kyselina			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[93]
δ-dekalaktón	60,15	laktón	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	[66]
Metyl palmitát	60,83	ester	✓	✓		✓		✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[39]

Značenie vzoriek vid' Tabuľka 15; Tr – retenčný čas; ✓ - látka bola v danej vzorke identifikovaná

Z nenasýtených alkoholov bol prítomný okt-1-én-3-ol. Prekursorami tejto 8-uhlíkovej zlúčeniny sú kyselina linolová a linolénová. Táto SAL s hubovými tónmi má veľmi nízky prah vnímania ($10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ [16]) a je kľúčovou zložkou syrov typu Camembert, ale jeho prítomnosť bola preukázaná aj u iných druhov syrov. Niektoré štúdie uvádzajú, že by mohol mať maskovací účinok na plesňový zápach metylketónov [66]. Benzylalkohol, vznikajúci redukciou benzaldehydu, má ovocnú až kvetinovú vôňu, predovšetkým po ružiach [97]. Pre 2-etylhexán-1-ol je naopak typická vôňa zelene, prípadne až nepríjemný zápach lepenky alebo zvierací pach [247]. Podobne pre alkohol 3-metylbut-2-én-1-ol je typické syrové alebo ovocné aróma, popr. vôňa zelene [66], ktorá je typická aj pre heptán-1-ol [250]. Pozitívny vplyv na aróma syrov majú pri koncentráciách blízkych prahovým aj fenolické látky. So zvyšujúcim sa obsahom je však ich prítomnosť nežiadúca, pretože vedie ku tvorbe pachutí. Pre fenol, vznikajúci degradáciou tyrozínu, sú tak pre popis jeho arómy používané výrazy ako „fekálny, dymový, kovový, zatuchnutý“ alebo v nižších koncentráciách „pikantný“ [93].

Aj keď nie je aróma laktónov typicky „syrová“, jedná sa o významné SAL, ktoré prispievajú k maslovému charakteru syrov. Ich aróma je popisované ako „broskyňová, marhuľová, kokosová a maslová“ [66]. Laktóny δ -hexalaktón, δ -oktalaktón, δ -dekalaktón a δ -dodekalaktón, ktoré sú nevyhnutné pre charakteristický flavour eidamských syrov, boli identifikované aj v našich vzorkách. Poslednou zlúčeninou, ktorá sa vyskytovala vo všetkých vzorkách je D-limonén. Obsah tohto cyklického monoterpénu s vôňou mäty závisí predovšetkým na zložení použitého krmiva [226].

5.3.2.2 *Identifikácia senzoricky aktívnych látok pomocou GC-olfaktometrie*

Hlavnou nevýhodou ostatných techník z hľadiska merania SAL je fakt, že merajú všetky prchavé látky, aj keď iba časť z nich je senzoricky aktívna. Tento problém je možné prekonať použitím GC-O, kedy sú jednotlivé látky separované pomocou GC a následne identifikované čuchom. Trénovaný hodnotiteľ je schopný popísať vôňu každej zlúčeniny, ktorá opúšťa kolónu GC [117].

Preto bola identifikácia prchavých látok metódou HS-SPME-GC-MS pre zaujímavosť doplnená GC-O analýzou v kombinácii s extrakčnou metódou SAFE, čo je relatívne nová, univerzálna, rýchla, šetrná extrakčná technika, ktorá poskytuje vysoké výťažky prchavých zlúčenín (viď kapitola 2.5.6) [136]. Pre tento experiment bol použitý syr eidamského typu (60 % sušina, 45 % t. v s.) zakúpený v bežnej tržnej sieti.

Metódou SAFE bola pripravená vzorka eidamského syru, ako referenčný materiál pre stanovenie SAL. Celkovo 10 zlúčenín bolo po separácii na dvoch kolónach identifikovaných tromi hodnotiteľmi-expertami pri násobnej analýze vzorky ($n = 5$), ktoré boli následne potvrdené porovnaním s literatúrou [66]. Všetky nižšie vymenované prchavé látky (Tabuľka 36) boli už skôr nájdené v rôznych typoch syrov [66], či už ide o syry typu Camembert, Grana Padano, Mozzarella, Eidam, Gouda, Gruyère, Čedar a iné [66]; mali rozmanité subjektívne pachy, častokrát opakujúc sa. Popis pachov všetkých zlúčenín sa zhoduje s literatúrou (Príloha 1 až Príloha 7). Retenčné indexy sa zhodujú s knižnicou NIST/EPA/NIH, Verzia 2.0 (Gaithersburg, USA) a taktiež s literatúrou, v ktorej napr. Dan a kol. [242] extenzívne opísali identifikované SAL vo vzorkách fermentovaného mlieka s príslušnými retenčnými indexmi.

Tabuľka 36: Sensoricky aktívne látky (a popis ich pachu) identifikované vo vzorke komerčného syru eidamského typu pomocou GC-olfaktometrie

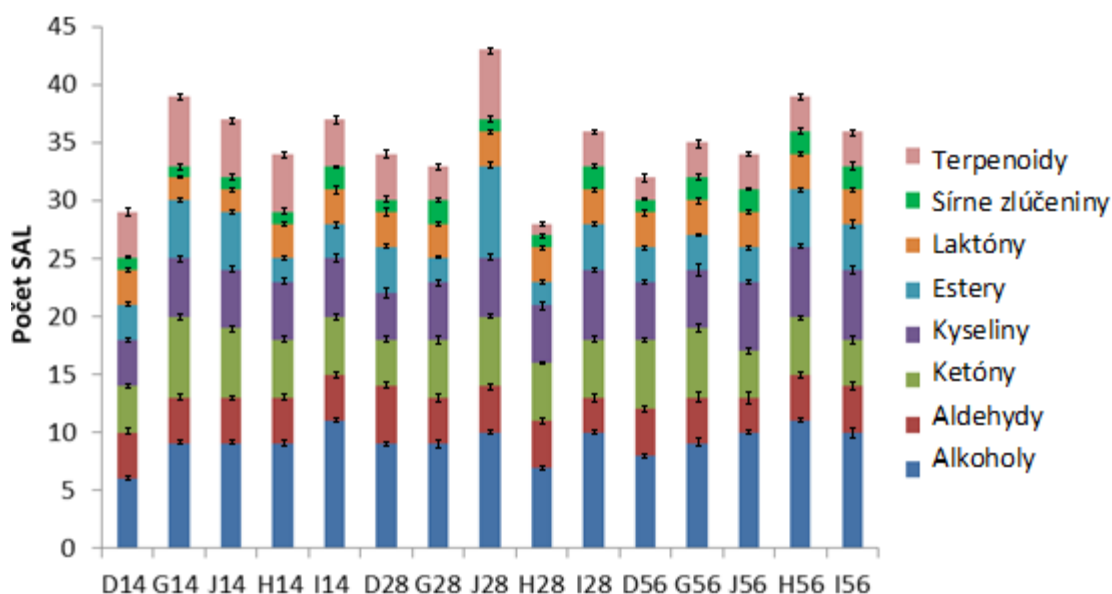
	Pach	Zlúčenina	RI SPB-5	RI Supelcowax 10
1	maslový	bután-2,3-dión	580	990
2	octový	kyselina octová	600	1450
3	sladový	2 (3) – metyl butanál	658	940
4	ovocný	metyl butanoát	725	990
5	ovocný	etyl butanoát	804	1020
6	syrový	kyselina maslová	836	1620
7	syrový	2(3)-metylbutánová kyselina	860	1660
8	varené zemiaky	3-(metyltio)-propanál	906	1455
9	kapustový	dimetyl trisulfid	965	1367
10	hubový	1-oktén-3-ón	978	1298

SPB-5 – nepolárna kolóna s 5% PDPS/95% PDMS; Supelcowax 10 – polárna kolóna s PEG; RI – retenčný index

5.3.2.3 Porovnanie identifikovaných látok vo vzorkách – použité štartovacie kultúry

Hlavným cieľom experimentu bolo posúdiť vplyv aplikácie rôznych mikrobiálnych kultúr použitých pre výrobu modelových syrov, v tejto kapitole na prítomnosť a následne obsah SAL. Porovnanie celkového počtu identifikovaných zlúčenín vo vzorkách, rozdelených podľa chemických skupín, je uvedené na grafe (Obrázok 20).

Hlavnou funkciou mezofilnej smotanovej (*Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp.) kultúry pri výrobe syrov je fermentácia laktózy, zatiaľ čo termofilné laktobacily prispievajú skôr svojou proteolytickou a lipolytickou aktivitou [15].



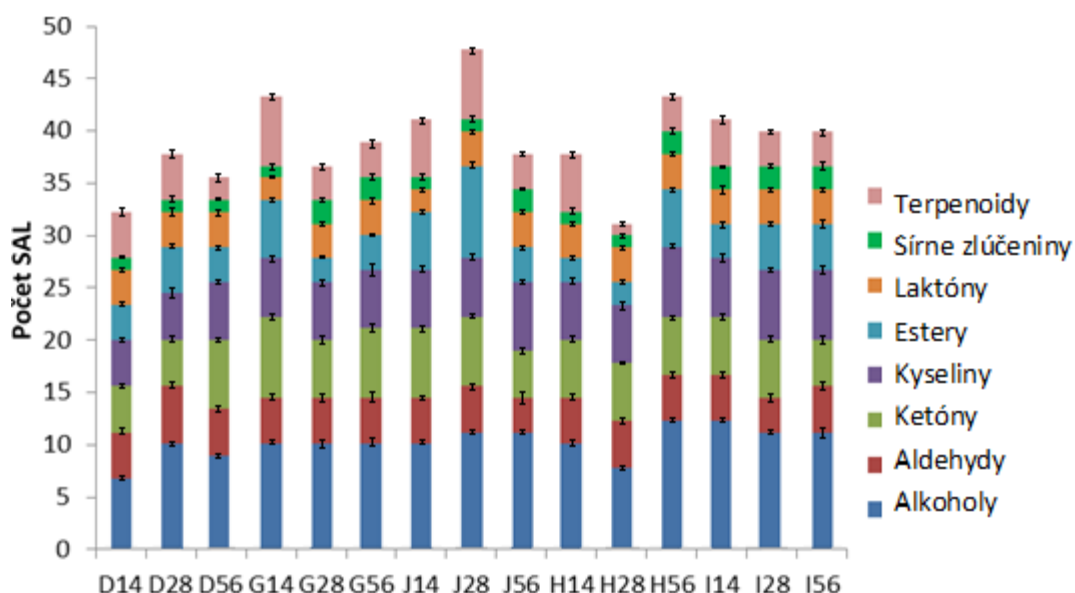
Obrázok 20: Celkový počet prchavých látok podľa chemických skupín vo vzorkách syrov - použité štartovacie kultúry. Značenie vzoriek vid' Tabuľka 15

Vzhľadom k tomu, že u eidamských syrov je pre vznik SAL počas zrenia najdôležitejšia proteolýza, je možné u vzoriek s prídavkom termofilných laktobacilov (G, H, I, J) očakávať bohatšie a pestrejšie spektrum identifikovaných prchavých zlúčenín. Z grafu (Obrázok 20) je zreteľný najnižší počet identifikovaných zlúčenín vo vzorke D (bez prídavku termofilných laktobacilov) v prvej fáze zrenia. V poslednej fáze zrenia je tento rozdiel zanedbateľný ($p < 0,05$). V strednej fáze zrenia je počet identifikovaných zlúčenín premenlivý, tu je pravdepodobne potrebné brať do úvahy zmeny jednotlivých zlúčenín, napr. premena aldehydov, ketónov alebo kyselín na alkoholy, reakcie kyselín a alkoholov za vzniku esterov a iné (viď kapitola 2.2.1).

Počet identifikovaných SAL vo vzorkách sa pohyboval v rozmedzí 28 – 43. Najviac zastúpené boli alkoholy, nasledované ketónmi a karboxylovými kyselinami. Medzi vzorkami nie sú dôležité ($p > 0,05$) rozdiely; zastúpenia chemických skupín sa taktiež nelíšili. Prídavok termofilov teda pravdepodobne nemá vplyv na počet SAL v syroch.

5.3.2.4 Porovnanie identifikovaných látok vo vzorkách – priebeh zrenia

Ak berieme do úvahy priebeh zrenia syrov, je možné očakávať tvorbu nových zlúčenín, a teda zvyšovanie ich počtu. Ako je viditeľné z grafu (Obrázok 21), tento predpoklad sa nepotvrdil. Iba u vzorky D (bez prídavku termofilných laktobacilov) je zrejмый mierny nárast a u vzorky H (*Lactobacillus plantarum*) je v poslednej fáze viac detegovaných zlúčenín. V ostatných vzorkách počet prekvapivo skôr klesá, resp. na konci zrenia je menej zlúčenín než na začiatku. Spektrum zlúčenín v nezrelých syroch je odlišné od zrelých syrov a zrejme sa počas zrenia niektoré zlúčeniny, pochádzajúce z mlieka, príp. vznikajúce v prvých fázach výroby pri fermentácii laktózy, odbúravajú až na jednoduché zlúčeniny (kapitola 2.2.1), ktoré nie sú našou metódou detegované.



Obrázok 21: Celkový počet prchavých látok podľa chemických skupín vo vzorkách syrov - priebeh zrenia. Značenie vzoriek viď Tabuľka 15

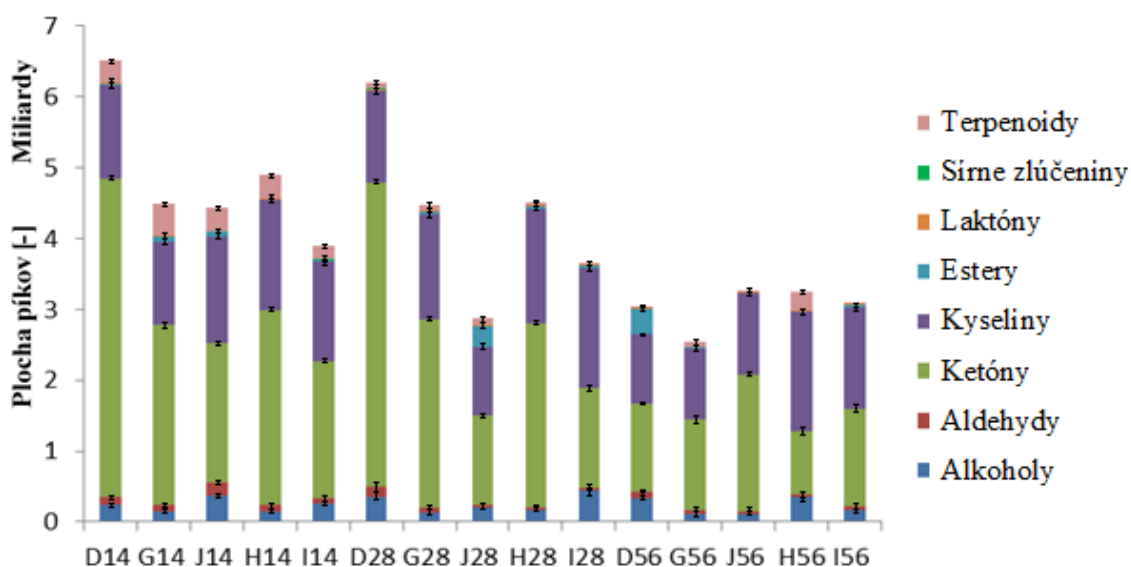
5.3.2.5 Semikvantifikácia prchavých látok v modelových vzorkách syra

Vzhľadom ku veľkému počtu identifikovaných zlúčenín a ich chemickej rozmanitosti bol obsah SAL vo vzorkách zisťovaný semikvantitatívnou analýzou, tj. porovnaním plôch píkov jednotlivých zlúčenín, čím sú dostatočne postihnuté rozdiely medzi vzorkami.

5.3.2.6 Porovnanie obsahu identifikovaných látok vo vzorkách – použité štartovacie kultúry

V grafe (Obrázok 22) je uvedené porovnanie obsahu identifikovaných zlúčenín vo vzorkách rozdelených podľa chemických skupín. Z kvantitatívneho hľadiska boli vo všetkých syroch najviac zastúpené ketóny a karboxylové kyseliny, podobne ako napr. v práci Dirincka [146] v rôznych typoch komerčnej Goudy. Ich celkový obsah sa vo vzorkách pohyboval od 72 do 94 %. Ako už bolo vyššie zmienené, u eidamských syrov je pre vznik SAL počas zrenia najdôležitejšia proteolýza, preto je možné u vzoriek s prídavkom termofilných laktobacilov očakávať vyšší obsah SAL. Prekvapivo v prvej fáze zrenia bol nájdený najvyšší obsah ($p < 0,05$) u vzorky D (bez prídavku termofilných laktobacilov). Až ku konci zrenia sa rozdiely medzi vzorkami vyrovnávali. To potvrdzuje vplyv laktokokov na obsah prchavých látok v syroch. Prídavok termofilov teda má vplyv na obsah SAL, ale iba v počiatočnej fáze zrenia, napodiv sa obsah skôr znížil.

Čo sa týka rôznych kmeňov *Lactobacillus casei* (vzorky G a J) a *Lactobacillus plantarum* (vzorky H a I), boli aj medzi nimi štatisticky významné rozdiely ($p < 0,05$).

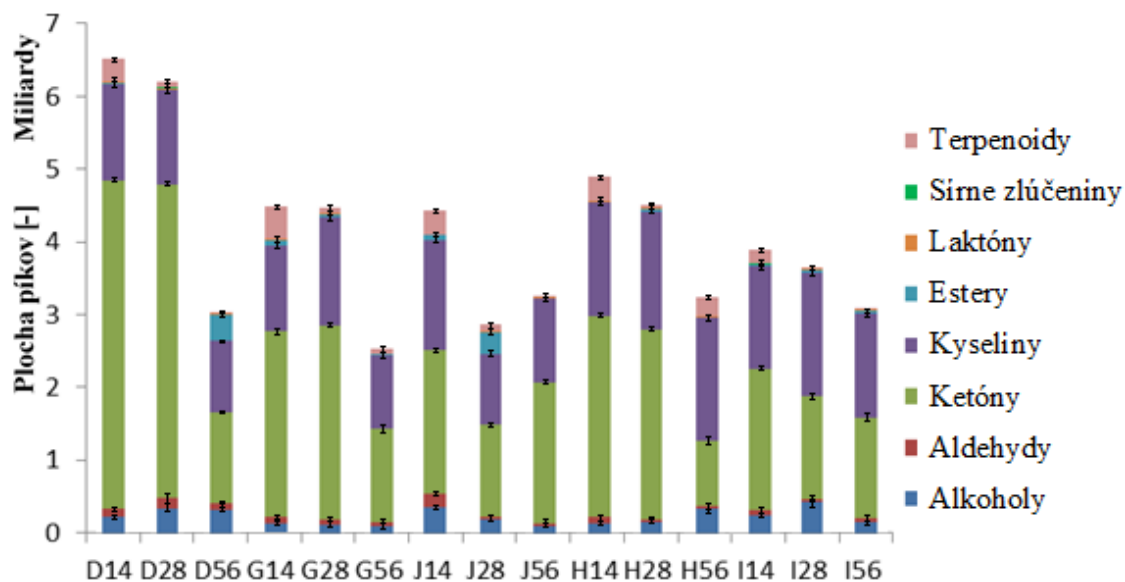


Obrázok 22: Obsah prchavých látok podľa chemických skupín vo vzorkách syrov - použité štartovacie kultúry. Značenie vzoriek vid' Tabuľka 15

5.3.2.7 Porovnanie obsahu identifikovaných látok vo vzorkách – priebeh zrenia.

V grafe (Obrázok 23) sú vyjadrené zmeny v obsahu zlúčenín príslušných chemických skupín v priebehu zrenia jednotlivých syrov. Vzhľadom k rozsiahlym dejom, ktoré počas zrenia syrov prebiehajú, je možné očakávať výrazný nárast obsahu prchavých látok.

Avšak rovnako ako klesal počet identifikovaných zlúčenín (kapitola 5.3.2.4), klesá aj ich obsah. Vysoký obsah niektorých zlúčenín v nezrelých syroch (Obrázok 23), predovšetkým ketónov (viď ďalej), je odbúravaný až na jednoduché zlúčeniny, ktoré nie sú našou metódou detegované.



Obrázok 23: Obsah prchavých látok podľa chemických skupín vo vzorkách syrov - priebeh zrenia. Značenie vzoriek viď Tabuľka 15

5.3.2.8 Diskusia jednotlivých zlúčenín

V tejto kapitole sú podrobnejšie diskutované zmeny chemických skupín SAL aj jednotlivých identifikovaných zlúčenín. Pre lepšiu prehľadnosť sú výsledky uvádzané ako relatívny obsah, tj. % z celkovej plochy všetkých píkov na chromatograme, v prípade jednotlivých zlúčenín ako % z celkovej plochy píkov danej chemickej skupiny.

Alkoholy

Biosyntéza alkoholov sa skladá z metabolizmu laktózy, citrátu a aminokyselín, redukcie metylketónov a degradácie niektorých MK (linolová, linolénová) [66], [70].

Vo vzorkách syrov bolo identifikovaných celkovo 11 alkoholov: 2-etylhexán-1-ol, bután-1-ol, pentán-1-ol, heptán-2-ol, 3-metylbut-2-én-1-ol, hexán-1-ol, okt-1-én-3-ol, bután-2,3-diol, nonán-1-ol, benzylalkohol a fenol. Napriek tomu, že tvorili najpočetnejšiu skupinu identifikovaných SAL, ich relatívny obsah vo vzorkách bol nízky (2,9 – 12,4 %).

Vo všetkých vzorkách bol najvyšší obsah bután-2,3-diolu (35,7 – 89,5 %), ktorý je známy ako významná zložka arómy eidamských syrov (prispieva ku maslovej až orechovej vôni [86]). Jeho vývoj sa medzi vzorkami výrazne líšil ($p < 0,05$). V syroch vzniká z biacetylu, u vzoriek D, G a I najprv dochádza k nárastu a neskôr k poklesu, ale napr. u vzorky H po celú dobu rástol a u vzorky J nepretržite klesal pravdepodobne v dôsledku ďalšieho odbúravania. U väčšiny ostatných alkoholov bol zistený klesajúci obsah vo všetkých vzorkách, z dôvodu ich oxidácie a/alebo esterifikácie [66], [70].

Ak vezmeme v úvahu konečnú fázu zrenia, najnižší obsah alkoholov bol identifikovaný vo vzorke G (4,0 %) a J (3,6 %) (*Lactobacillus casei*), naopak najvyšší vo vzorke H (10,7 %) (*Lactobacillus plantarum*). Produkcia alkoholov sa teda u jednotlivých druhov a kmeňov použitých kultúr významne líšila ($p < 0,05$) a nie je možné tvrdiť, že prídavok termofilnej kultúry má jednoznačný vplyv na ich tvorbu.

Shiota a kol. [145] identifikovali priaznivý vplyv benzylalkoholu na prijateľnosť syrov typu Gouda u japonských hodnotiteľov, vďaka jeho príjemnej ovocnej až kvetinovej vôni [97]. Jo a kol. [93] taktiež skúmali vplyv na syry typu Gouda senzorickým panelom 10 školených hodnotiteľiek a detegovali priaznivý vplyv fenolu na tvorbu flavouru. Jeho aróma je v nízkych koncentráciách opisovaná ako pikantná alebo dymová [93], [93].

Aldehydy

Aldehydy vznikajú počas β -oxidácie nenasýtených MK, katabolizmu aminokyselín, prípadne z metabolizmu citrátu a laktátu (viď kapitola 2.2.1.2).

Vo vzorkách bolo identifikovaných celkovo 5 aldehydov (hexanál, heptanál, nonanál, dekanál a benzaldehyd); ich relatívny obsah v syroch bol opäť veľmi nízky (0,8 – 4,3 %). Jo a kol. [93] detegovali v syroch typu Gouda benzaldehyd, hexanál a heptanál.

Výskyt aldehydov v syroch je zvyčajne iba prechodný, pretože počas zrenia podliehajú redoxným reakciám za vzniku alkoholov alebo karboxylových kyselín [78]. Tomu zodpovedajú aj zmeny v priebehu zrenia všetkých syrov. Celkový obsah aldehydov väčšinou klesal, pričom vyššia rýchlosť degradácie bola v počiatočných fázach zrenia. Rovnako tomu je aj u väčšiny jednotlivých aldehydov. Vyšší obsah hexanálu u vzorky J (*Lactobacillus casei*) (57,89 %) na začiatku zrenia, môže byť spôsobený včasnou oxidáciou syra tesne po výrobe, kedy z kyseliny linolénovej vznikajú 14- a 13-hydroperoxydy, ktoré sa ďalej metabolizujú na pentanál a hexanál.

Hexanál je považovaný za významnú zložku arómy eidamských syrov [78], ale pri jeho vyšších koncentráciách je jeho aróma nepríjemná a vyšší obsah by mohol signalizovať nesprávny priebeh zrenia; v ďalších fázach zrenia bol však odbúravaný.

V konečnej fáze zrenia bol najvyšší obsah aldehydov vo vzorke D - bez prídavku termofilov (3,5 %), vďaka vysokému obsahu významnej SAL benzaldehydu (78,26 %), ktorý vzniká z fenylalanínu (aróma horkých mandlí) [78]. V ostatných vzorkách bol rýchlejšie odbúravaný. Najnižší obsah aldehydov bol vo vzorke J (*Lactobacillus casei*) (0,8 %) a I (1,4 %) (*Lactobacillus plantarum*). Produkcia aldehydov sa u jednotlivých druhov a kmeňov použitých kultúr významne líšila ($p < 0,05$), prídavok termofilov spôsobil zníženie ich obsahu, v dôsledku rýchlejšieho odbúravania.

Ketóny

Ketóny v syroch pochádzajú z β -oxidácie VMK a metabolizmu laktátu a citrátu [88].

Vo vzorkách bolo identifikovaných 7 ketónov: heptán-2-ón, oktán-2-ón, acetoín, nonán-2-ón, 6-metylhept-5-én-2-ón, undekán-2-ón a tridekán-2-ón; tvorili kvantitatívne najväčšiu zložku aromatického profilu všetkých vzoriek (27,3 – 69,2 %).

Shiota a kol. [145] identifikovali acetoín, heptán-2-ón, nonán-2-ón, undekán-2-ón a tridekán-2-ón. Detegovaný bol nárast koncentrácie metylketónov (undekán-2-ón a tridekán-2-ón) až do 40 týždňa zrenia, naopak klesala koncentrácia acetoínu. Dirinck a kol. [146] identifikovali heptán-2-ón, nonán-2-ón, undekán-2-ón a tridekán-2-ón.

Jo a kol. [93] detegovali v syroch typu Gouda taktiež acetoín, ktorý mal priaznivý vplyv pri prijateľnosti pre hodnotiteľov.

Celkový obsah ketónov sa v priebehu zrenia znižoval u všetkých vzoriek. Nebolo však preukázané, že dochádza k ich redukcii na sekundárne alkoholy, pretože z týchto zlúčenín bol detegovaný iba heptán-2-ol. Ako už bolo zmienené, mohli byť pravdepodobne odbúrané až na nami nedetegované jednoduché zlúčeniny. Najvyšší celkový obsah ketónov bol nájdený u vzorky D (bez prídavku termofilov) na začiatku zrenia, ktorý sa prudko znížil až po viac ako mesiaci zrenia, dovtedy sa významne nemenil.

Vo všetkých vzorkách jasne prevládal obsah acetoínu (redukovaná forma biacetylu) (92,05 – 97,11 %), čo je typický produkt fermentácie laktózy a citrátového metabolizmu a je známy ako významná zložka aróma eidamských syrov [88]. Počas zrenia sa jeho obsah znižoval, podobne ako uvádza Shiota a kol. [145].

Metylketóny sa v syroch eidamského typu vyskytujú celkovo v omnoho nižších koncentráciách než v plesňových syroch a pravdepodobne tak chuť/flavour týchto syrov významne neovplyvňujú. U baktérií mliečneho kvasenia je nepravdepodobné, že budú schopné prevádzať β -oxidáciu, ktorá je kľúčovým krokom pri produkcii metylketónov [27]. Alewijn a kol. [27] vo svojej práci uvádzajú zvýšenie obsahu metylketónov v priebehu zrenia u modelových syrov typu Gouda, podobne, ako tomu bolo v našom prípade. Predpokladajú, že produkcia týchto zlúčenín by mohla byť spôsobená pomalou enzymatickou alebo chemickou reakciou, ktorá doposiaľ nebola popísaná.

Prídavkom termofilných kultúr došlo ku významnému ($p < 0,05$) poklesu obsahu ketónov v počiatočnej fáze zrenia, v dôsledku urýchlenia ich odbúravania. Najnižší obsah ketónov v konečnej fáze zrenia bol vo vzorke H (*Lactobacillus plantarum*) (27,3 %), naopak najvyššia vo vzorke J (*Lactobacillus casei*) (59,2 %). Produkcia ketónov sa teda u jednotlivých druhov a kmeňov použitých kultúr významne líšila ($p < 0,05$).

Karboxylové kyseliny

MK s dlhším reťazcom v syroch vznikajú lipolýzou mliečneho tuku alebo rozkladom aminokyselín. Kratšie MK pochádzajú z degradácie laktózy, aminokyselín, príp. môžu byť tvorené oxidáciou ketónov, esterov a aldehydov [66].

Vo vzorkách bolo identifikovaných 6 kyselín (octová, maslová, valérová, kaprónová, kaprylová a nonánová). Z hľadiska kvantitatívneho tvorili druhú najvýznamnejšiu skupinu (20,3 – 51,7 %). Aj v tomto experimente boli identifikované metódou HS-SPME-GC-MS iba VMK s krátkym reťazcom s maximálne 9 uhlíkmi, pretože prchavosť VMK so zvyšujúcim sa počtom uhlíkov klesá, a pre ich stanovenie je nutná derivatizácia, obyčajne na MEMK [16]. Ostatné MK sú diskutované v kapitolách 5.3.1.2 a 5.3.1.3.

Shiota a kol. [145] identifikovali kyseliny butánovú, kaprónovú, kaprylovú, hexánovú a oktánovú, pričom bol významný nárast obsahu hexánovej a oktánovej kyseliny počas zrenia. Dirinck a kol. [146] taktiež identifikovali kyseliny hexánovú a oktánovú.

Vo všetkých vzorkách bol prevládajúci obsah kyseliny octovej (84,61 – 90,25 %) a vysoký obsah kyseliny maslovej (4,52 – 8,31 %). Toto zistenie sa zhoduje s výsledkami štúdie Ruggirello a kol. [254], ktorí taktiež namerali najvyššie hodnoty u zmienených kyselín v modelových syroch. Kyselina maslová je považovaná dokonca za kľúčovú pre flavour eidamských syrov [255], [253], jej obsah sa počas zrenia u všetkých syrov postupne zvyšoval.

Jo a kol. [93] zistili, že na tvorbe flavouru syrov holandského typu sa podieľa aj kyselina octová. Kyselina maslová v zrejúcich syroch pochádza z lipázovej selektivity a preferencie pre tvorbu krátkych VMK alebo syntetizovaných mikroflórou v syre.

Celkový obsah kyselín sa väčšinou behom zrenia znižoval v dôsledku ich degradácie na ďalšie SAL. Prídavok termofilnej kultúry, zrejme v dôsledku jej výraznejšej metabolickej činnosti, viedol k miernemu zvýšeniu obsahu detegovaných kyselín. Najvyšší obsah v konečnej fáze zrenia bol nameraný u vzorky H (*Lactobacillus plantarum*) (51,7 %) a najnižší obsah u vzorky D (bez prídavkov termofilov) (32,5 %) a G (*Lactobacillus casei*) (39,1 %). Produkcia kyselín sa teda u jednotlivých druhov a kmeňov použitých kultúr taktiež významne líšila ($p < 0,05$).

Estery

Estery vznikajú esterifikáciou MK, primárnych a sekundárnych alkoholov [66].

Vo vzorkách bolo identifikovaných 10 metyl- a etylesterov: metyl valerát, metyl kapronát, metyl kaprinát, metyl laurát, metyl myristát, metyl palmitát, etyl valerát, etyl kapronát, etyl kaprylát, etyl kaprinát,. Podobne ako v prípade alkoholov, tvorili síce početnú skupinu, ich relatívny obsah vo vzorkách bol nízky (0,1 – 11,9 %).

Vo vzorkách bol identifikovaný väčší počet metylesterov než etylesterov (6 : 4). Metyl kapronát (78,52 – 98,54 %), ktorého aróma je popisovaná ako sladká, ovocná, ale taktiež vôňa teplého mlieka, bol prevládajúcim [147], [252], [250], [255]. Shiota a kol. [145] identifikovali iba acetáty. Jo a kol. [93] detegovali etyl- valerát, hexanoát a oktanoát.

Na rozdiel od niektorých autorov [55], [66], ktorí uvádzajú dynamický nárast, v našom prípade sa celkový obsah esterov v priebehu zrenia u všetkých vzoriek mierne znižoval. Najvyšší obsah esterov v konečnej fáze zrenia bol nameraný vo vzorke D (bez prídavku termofilov) (11,9 %), z čoho je možné usúdiť, že prídavok termofilov viedol pravdepodobne k výraznejšiemu odbúraniu prekursorov syntézy esterov. V ostatných vzorkách bol konečný obsah esterov veľmi nízky, v rozsahu 0,2 – 0,8 %. Prídavok termofilnej kultúry nemal jednoznačný vplyv ($p \geq 0,05$).

Laktóny

Laktóny vznikajú intramolekulárnou esterifikáciou hydroxykyselín [66].

Vo vzorkách syrov boli identifikované: δ -hexalaktón, δ -oktalaktón a δ -dekalaktón. Shiota a kol. [145] zistili, že δ -laktóny sa počas zrenia tvoria rýchlejšie než γ -laktóny. Ich relatívny obsah vo vzorkách bol veľmi nízky (0,1 – 0,5 %). Hlavné prekursorov laktónov, hydroxykyseliny, neboli vo vzorkách detegované. Shiota a kol. [145] detegovali v syroch typu Gouda δ -oktalaktón a δ -dekalaktón; obsah oboch laktónov prudko rástol až do 20 týždňa zrenia. Dirinck a kol. [146] identifikovali δ -dekalaktón. Jo a kol. [93] zistili, že v dlhšie zrejúcej Goude má δ -dekalaktón častokrát vyšší obsah. Okrem toho zistili, že obsah δ -oktalaktónu a δ -dekalaktónu v syroch rastie rýchlejšie než u γ -laktónov. Collins a kol. [16] uvádzajú, že γ -laktóny sú typické skôr pre rastlinné materiály, ako aj pre živočíšne. Na druhú stranu, práve δ -laktóny sú kľúčové pre flavour eidamských syrov [44], vďaka čomu bola predpokladaná ich prítomnosť vo vzorkách.

Najvyšší obsah po celú dobu zrenia bol prekvapivo vo vzorkách D (bez prídavku termofilov); v konečnej fáze zrenia bol vo vzorke D (0,5 %) a I (0,5 %) (*Lactobacillus plantarum*) a najnižší vo vzorke G (0,4 %) a J (0,4 %) (*Lactobacillus casei*).

Produkcia laktónov sa výrazne líšila ($p < 0,05$) u jednotlivých druhov a kmeňov použitých kultúr, ich prídavok nemal na obsah laktónov jednoznačný vplyv.

Sírne zlúčeniny

V syroch vznikajú degradáciou metionínu [90]; detegované boli metionál a dimetylsulfón. Ich relatívny obsah v syroch sa pohyboval v rozmedzí 0,03 – 0,09 %.

Taktiež Jo a kol. [93] vo svojej práci o syroch typu Gouda identifikovali metionál, ktorý bol skôr opísaný ako jeden z kľúčových sírnych zlúčenín prítomných v syroch typu Gouda. Vyšší celkový obsah sírnych zlúčenín bol v dlhšie zrejúcich syroch.

Dimetylsulfón bol prítomný vo všetkých vzorkách, pričom jeho obsah počas zrenia klesal. Prítomnosť metionálu bola preukázaná iba u syrov s prídavkom termofilnej kultúry v neskorších fázach zrenia, pravdepodobne v dôsledku výraznejšej proteolýzy.

Celkový obsah sírnych zlúčenín v priebehu zrenia bol premenlivý, avšak v konečnej fáze zrenia bol najnižší obsah nájdený vo vzorke D (0,05 %), čo by mohlo indikovať, že jednotlivé druhy a kmene použitých kultúr sa síce významne líšia aj v produkcii sírnych zlúčenín ($p < 0,05$), ale prídavok termofilnej kultúry môže mať vplyv na ich zvýšenú tvorbu, zrejme v dôsledku zmienenej vyššej proteolytickej aktivity.

Terpény, terpenoidy

Tieto látky sa do syrov dostávajú ako súčasť stravy dojníc [15].

Do tejto skupiny (0,3 – 9,9 %) boli zaradené 2 terpény: β -myrcén, D-limonén a 4 terpenoidy - linalool, karvón, citral a citronellol. Najvyšší obsah mal prakticky vo všetkých odberoch vzoriek D-limonén (53,45 – 98,11 %). Shiota a kol. [145] vo svojej práci o syroch typu Gouda, detegovali limonén. Taktiež Jo a kol. [93] identifikovali limonén ako kľúčovú zložku pri tvorbe profilu syru.

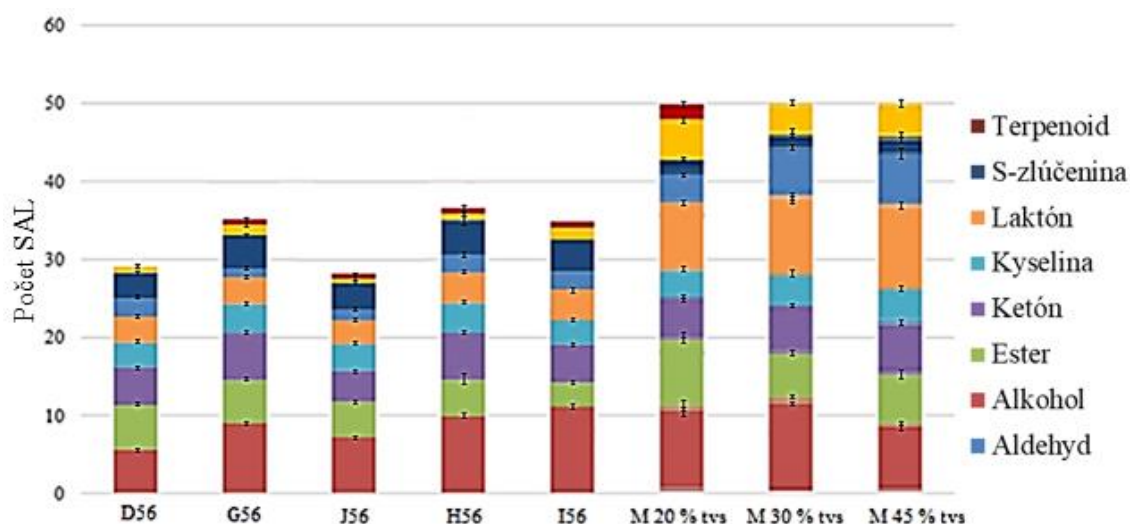
U ostatných látok bol ich výskyt vo vzorkách syrov skôr nepravidelný. Okrem citralu sa obsah týchto látok vo vzorkách v priebehu zrenia výrazne znižoval, pravdepodobne v dôsledku degradácie. Zvyšujúci sa obsah citralu je spôsobený chemickou premenou citronellolu. Prídavok termofilnej kultúry nemal na obsah terpenoidov jednoznačný vplyv. V konečnej fáze zrenia bol najnižší obsah vo vzorke D (0,34 %).

5.3.2.9 Porovnanie senzoricky aktívnych látok vo vzorkách komerčných a modelových syrov

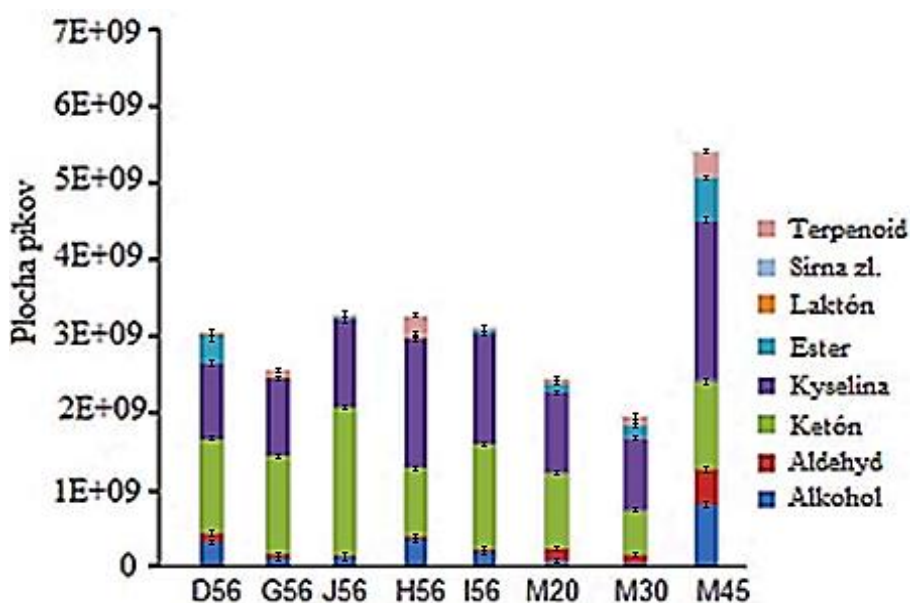
Ako štandardy pre porovnanie s našimi modelovými vzorkami boli zvolené 3 druhy syrov eidamského typu s rôznym obsahom t. v s. (20, 30 a 45 %) zakúpené v bežnej tržnej sieti, u ktorých sa predpokladá plne vyvinutý flavour. Vzorky boli podrobené analýze za rovnakých podmienok a porovnané s modelovými vzorkami v konečnej fáze zrenia (56 dní). Modelové vzorky majú deklarovanú hodnotu 45 % t. v s. Porovnanie počtu identifikovaných SAL je uvedené v grafe (Obrázok 24), porovnanie obsahu SAL v grafe (Obrázok 25). Rovnako ako v experimente I, bolo identifikovaných v komerčných vzorkách cca o polovičné množstvo viac SAL, ako v modelových vzorkách.

Ako je vidieť v grafe (Obrázok 24), zloženie SAL všetkých 3 komerčných syrov je podobné. Rozmanitý profil komerčných syrov je v poriadku, keďže sa u nich očakáva kompletný a pestrejší vývoj flavouru.

V modelových vzorkách boli identifikované rovnaké SAL ako v komerčných, okrem: heptanálu (D28), metyl valerátu (J28), etyl valerátu (D28), metyl kaprinátu (D56 a J28), etyl kaprinátu (J28) a oktán-2-ónu (G14 a J14), ktoré boli nájdené iba v ojedinelých prípadoch aj v modelových vzorkách. Ich prítomnosť je spôsobená metabolizmom spomenutých látok na ďalšie SAL [32] v procese zrenia (viď kapitola 2.2.1).



Obrázok 24: Porovnanie jednotlivých chemických skupín identifikovaných vo vzorkách (celkový počet); značenie vzoriek viď Tabuľka 15; M - komerčné syry



Obrázok 25: Obsah prchavých látok podľa chemických skupín vo vzorkách syrov. Značenie vzoriek viď Tabuľka 15

Z grafu (Obrázok 25) je viditeľný výrazne vyšší obsah SAL v komerčnom syre M45 (45 % t. v. s.), a to konkrétne alkoholov, aldehydov, kyselín, esterov a terpenoidov.

Ak porovnáme obsah SAL, vzhľadom k tomu, že tuk je významným zdrojom SAL, je možné predpokladať, že vyšší obsah t. v s., bude znamenať vyšší obsah SAL. V uvedených chemických skupinách prevládali: bután-2,3-diol, benzaldehyd, metyl kapronát, kyselina octová a D-limonén, tj. látky, ktoré sa nachádzali vo významných množstvách aj v našich vzorkách, pričom kyselina octová a D-limonén sú považované za kľúčové pre flavour eidamských syrov [256]. Zloženie modelových vzoriek (45 % t. v s) odpovedalo komerčným syrom s nižším obsahom t. v s. (M20 a M30). V týchto vzorkách bol nižší obsah alkoholov a ďalších chemických skupín okrem laktónov a sírnych zlúčenín. To potvrdzuje kompletný a pestrejší vývoj flavouru u komerčných syrov.

5.4 Štatistické vyhodnotenie výsledkov merania pomocou metódy PCA

Výsledky boli na záver podrobené štatistickému testovaniu s použitím metódy PCA. Analýza hlavných komponent (PCA) je viacrozmerná štatistická metóda, pomocou ktorej je možné zredukovať veľký počet pôvodných dát a vysvetliť variabilitu a závislosť pôvodných premenných. Cieľom PCA je transformácia dát z pôvodných znakov či premenných do menšieho počtu latentných (skrytých) premenných. Nové premenné majú vhodnejšie vlastnosti, nižší počet, vystihujú premenlivosť znakov a sú vzájomne nekorelované. Tieto latentné premenné sa nazývajú hlavné komponenty [237].

5.4.1 Experiment I

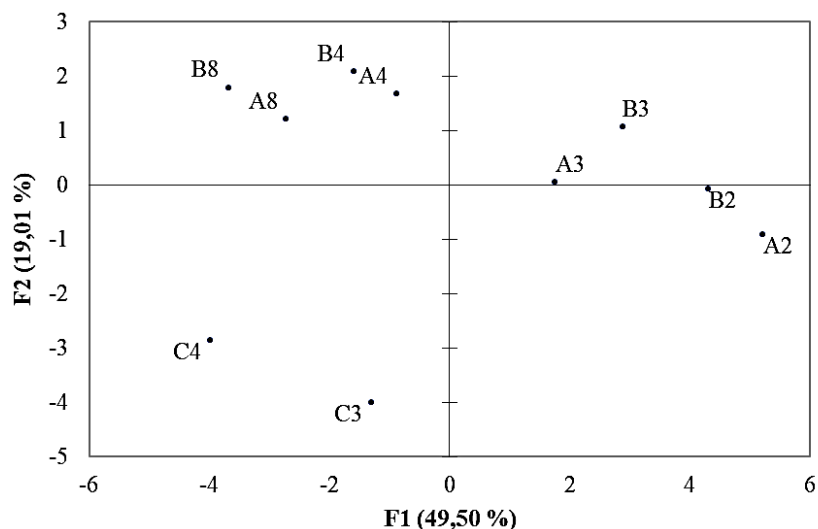
Pre štatistické spracovanie boli použité výsledky merania všetkých modelových (3 kombinácie kultúr, 4 fáze zrenia, resp. 2 fáze u série C – celkovo 10 vzoriek) a komerčných vzoriek. K interpretácii dát bolo využité grafické vyjadrenie (vždy prvé dve komponenty) – tzv. graf komponentných váh, ktorý zobrazuje sledované znaky (tj. zlúčeniny), a tzv. rozptylový diagram komponentného skóre, ktorý zobrazuje objekty (tj. vzorky). Vzorky umiestnené blízko/ďaleko od seba sú si podobné/odlišné, zlúčeniny s vysokou mierou premenlivosti, a teda dôležité pre rozlíšenie vzoriek, ležia ďaleko od počiatku, zlúčeniny s malou dôležitosťou ležia blízko počiatku.

Testované boli výsledky merania obsahu SAL, MK a VMK. Cieľom bolo zistiť, či je možné od seba odlíšiť jednotlivé vzorky na základe identifikovaných zlúčenín, podľa priebehu zrenia, ale aj podľa použitých štartovacích kultúr.

5.4.1.1 Vyhodnotenie merania viazaných a voľných mastných kyselín

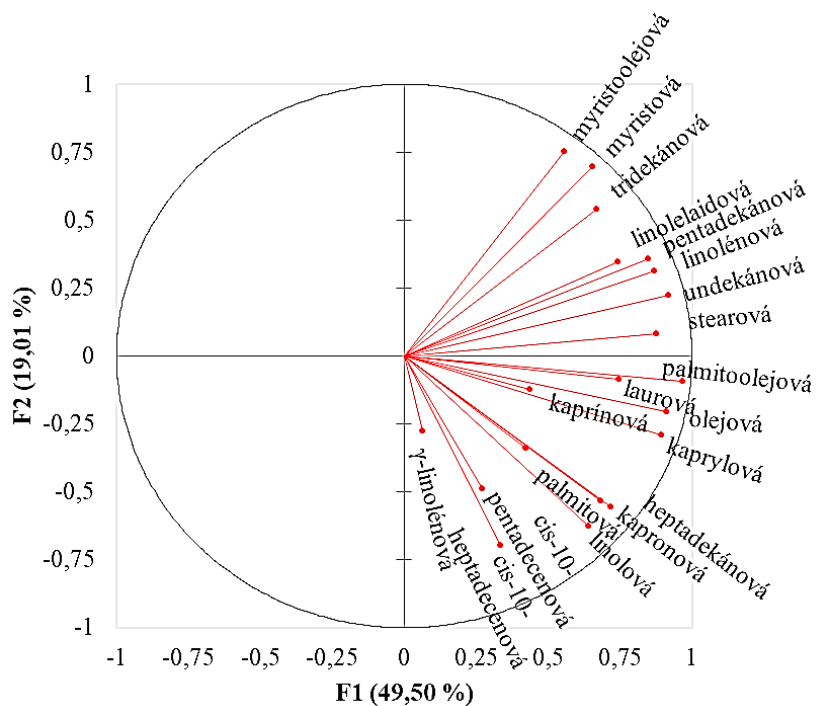
V prípade MK boli pre spracovanie použité priemerné hodnoty zo všetkých meraní obsahu identifikovaných MK a VMK (celkovo 20; v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku).

Na grafu (Obrázok 26) je znázornená diferenciacia jednotlivých vzoriek na základe obsahu MK. Z grafu je viditeľné rozdelenie vzoriek pozdĺž prvej hlavnej komponenty (F1) podľa doby zrenia. Nezrelé vzorky sa nachádzajú v pravej časti a zrelé modelové vzorky sa nachádzajú v ľavej časti grafu.



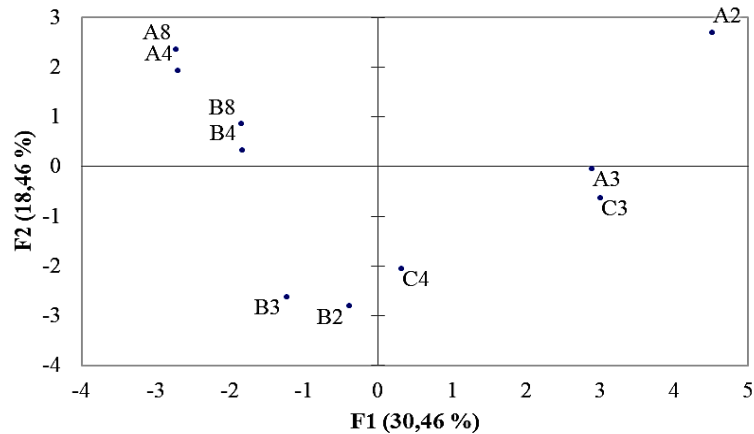
Obrázok 26: Rozptylový diagram komponentného skóre - diferenciácia jednotlivých vzoriek na základe obsahu viazaných MK; značenie vzoriek vid' Tabuľka 13

Prvé dve komponenty popisujú dostatočných 68,51 % z celkovej variability systému. Všetky identifikované MK pozitívne korelujú s prvou hlavnou komponentou – ich obsah sa v priebehu zrenia znižoval. Pre konštrukciu F1 (Obrázok 27) sú najdôležitejšie kyseliny kaprónová (0,89), kaprylová (0,95), kaprínová (0,95), myristová (0,98) a olejová (0,95). Čo sa týka použitých kultúr, diferenciácia vzoriek nie je jednoznačná, z grafu (Obrázok 26) je možné pozorovať podobnosť vzoriek A a B (ležia blízko seba vo všetkých fázach zrenia), sú medzi nimi malé rozdiely v obsahu MK. Odlišné sú vzorky C (prevaha termofilnej kultúry), ktoré sú umiestnené oddelene v ľavej dolnej časti grafu.



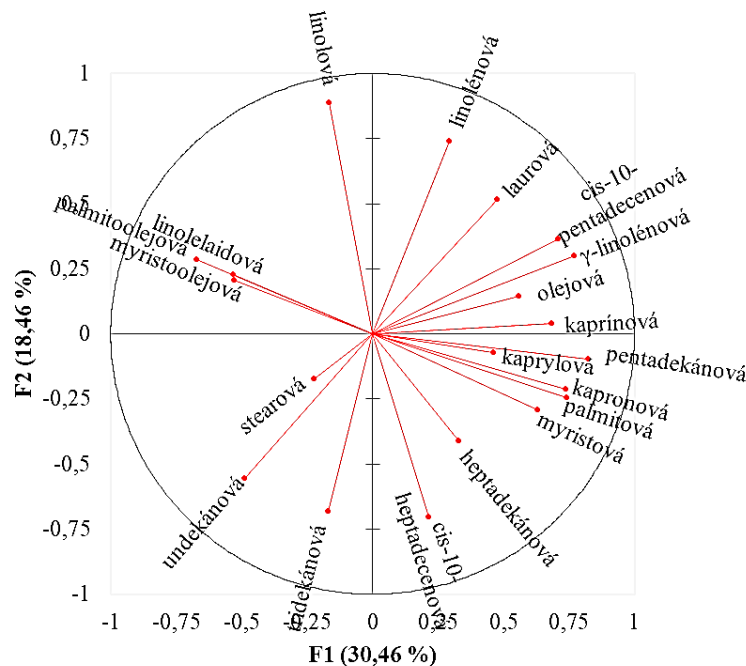
Obrázok 27: Graf komponentných váh všetkých identifikovaných MK – Exp I

V grafu (Obrázok 28) je znázornená diferenciacia jednotlivých vzoriek na základe obsahu VMK. Prvé dve komponenty popisujú iba 48,92 % z celkovej variability systému. Väčšina identifikovaných VMK koreluje pozitívne s F1. Aj v prípade VMK dochádzalo počas zrenia k ich miernemu poklesu. Najdôležitejšími zlúčeninami (viď Obrázok 29) pre konštrukciu F1 sú kyseliny kaprínová (0,98), myristová (0,99), laurová (0,99), myristoolejová (0,98), palmitová (0,99) a olejová (0,96).



Obrázok 28: Rozptylový diagram komponentného skóre - diferenciacia jednotlivých vzoriek na základe obsahu VMK; značenie vzoriek viď Tabuľka 13

Výsledky nie sú jednoznačné, ale do určitej miery naznačujú podobnosť ako v prípade MK. Ku konci zrenia vzorky A a B tvoria zhuk v ľavej hornej časti grafu a nie sú teda medzi nimi významné rozdiely ($p < 0,05$). Vzorky C sú umiestnené v pravej spodnej časti.



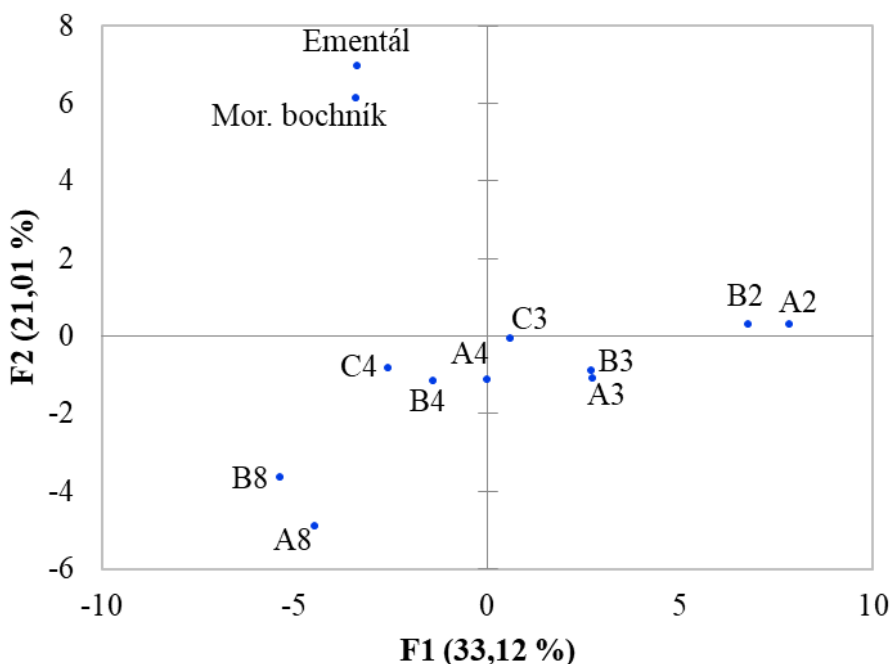
Obrázok 29: Graf komponentných váh všetkých identifikovaných VMK – Exp I

Z výsledkov vyplýva, že je možné na základe obsahu MK dobre odlišiť rôzne fáze zrenia. Na druhú stranu použité štartovacie kultúry vykazujú podobný priebeh lipolýzy a nedajú sa takto odlišiť. Aj keď v prípade MK je vzorka C4 osamostatnená od vzoriek A8 a B8, z čoho možno usúdiť, že vďaka vyššiemu prídavku termofilov je lipolýza mierne rýchlejšia.

5.4.1.2 Vyhodnotenie výsledkov merania prchavých látok

V prípade SAL boli pre spracovanie použité priemerné plochy pík (n = 3) všetkých identifikovaných zlúčenín (celkovo 51). V grafe (Obrázok 30) je znázornená diferenciacia jednotlivých vzoriek na základe obsahu všetkých identifikovaných zlúčenín pomocou F1 a F2. Prvé dve komponenty popisujú 54,13 % z celkovej variability systému, prvé tri 65,4 % a prvé štyri 73,2 % premenlivosti systému.

Pre konštrukciu F1 boli najdôležitejšími parametrami bután-2,3-dión (0,88), nonanál (0,93), heptán-2-ón (0,83), acetoín (0,90), nonán-2-ón (0,94), D-limonén (0,84) a benzaldehyd (0,90). Pre konštrukciu F2 boli najdôležitejšími parametrami heptán-2-ón (0,92), nonán-2-ol (0,80), cinnamaldehyd (0,94) a α -pentylcinnamaldehyd (0,94), pre F3 eugenol (0,74) a metanol (0,68) a pre F4 benzylalkohol (0,62). Tieto zlúčeniny vykazovali najväčšiu premenlivosť a najlepšie tak vyjadrujú rozdiely medzi vzorkami.

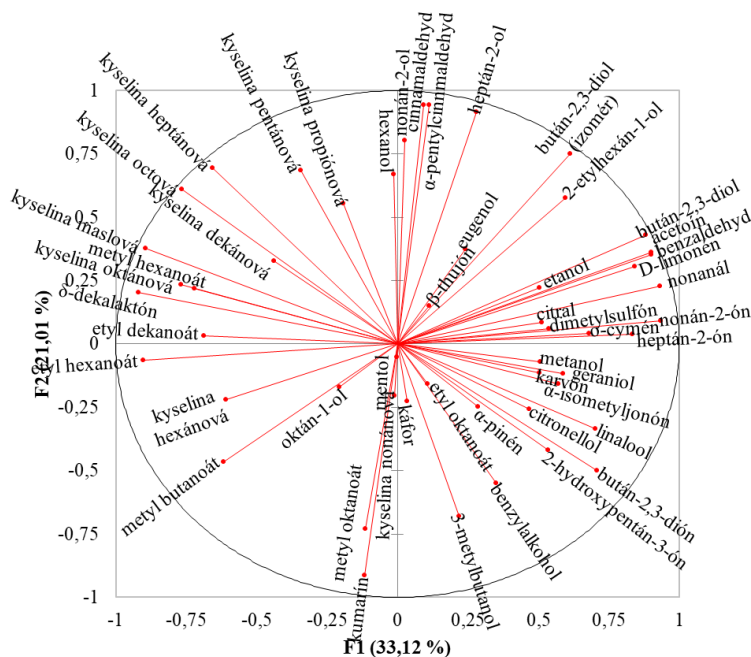


Obrázok 30: Rozptylový diagram komponentného skóre - diferenciacia jednotlivých vzoriek na základe obsahu SAL; značenie vzoriek vid' Tabuľka 13

Z grafu (Obrázok 30) je viditeľné rozdelenie vzoriek podľa doby zrenia pozdĺž F1. V tomto prípade sú zrelé vzorky v ľavej časti grafu a nezrelé vzorky v pravej časti grafu.

Z grafu (Obrázok 31) je zrejme rozmiestnené identifikovaných SAL, pričom tie umiestnené v pravej časti grafu (pozitívne korelujú s F1) sú typické pre menej zrelé syry, tie v ľavej časti skôr pre zrelšie – ich obsah sa v priebehu zrenia zvyšoval.

Čo sa týka použitých kultúr, diferenciácia vzoriek nie je jednoznačná; odpovedajúce vzorky (A, B, C) v jednotlivých fázach zrenia sú umiestnené pomerne blízko seba, z čoho vyplýva, že prídavok termofilnej kultúry nemá významný vplyv na vývoj prchavých látok v syroch. Komerčné vzorky Ementál a Moravský bochník tvoria samostatný zhluk v ľavej hornej časti grafu, čo potvrdzuje skôr zistené významne odlišné zloženie SAL od modelových vzoriek. Z grafu (Obrázok 31) je možné vyčítať, že je pre ne typický predovšetkým vyšší obsah prchavých kyselín – octová, maslová, propiónová, pentánová, a heptánová.



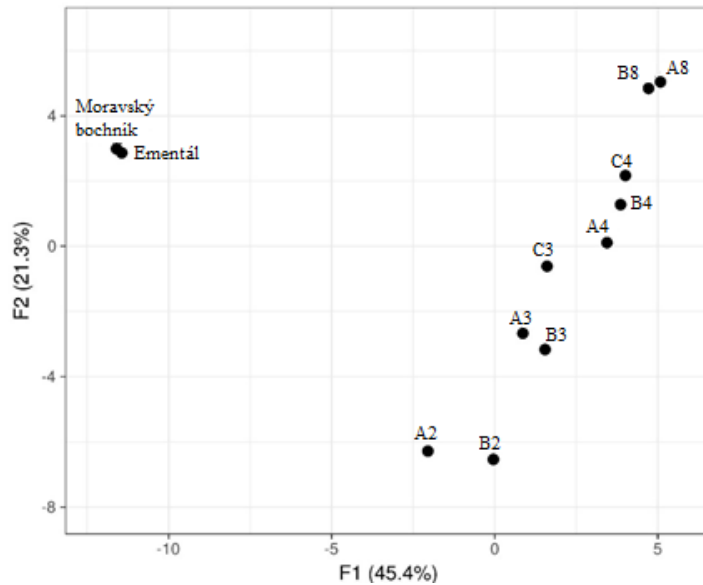
Obrázok 31: Graf komponentných váh všetkých identifikovaných SAL – Exp I

5.4.1.3 Korelácia obsahu mastných kyselín a prchavých látok

Pre kompletné štatistické vyhodnotenie bola prevedená analýza všetkých nameraných dát zo všetkých meraní obsahu identifikovaných MK a VMK (celkovo 20; v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ tuku) a SAL (celkovo 51; plochy píkov). V grafu (Obrázok 32) je znázornená diferenciácia jednotlivých vzoriek, v tomto prípade prvé dve komponenty popisujú 66,7 % z celkovej variability systému. Viditeľné je vynikajúce odlišenie komerčných vzoriek, ktoré sú v ľavej časti grafu, a modelových vzoriek v pravej časti grafu, čo opäť potvrdzuje ich kompletne odlišné zloženie od modelových vzoriek, zároveň sú si ale obidva komerčné vzorky (Ementál, Moravský bochník) z hľadiska sledovaných látok prekvapivo veľmi podobné, napriek rozdielom vo výrobe a zreniu (viď kapitoly 2.1.5.2 a 2.1.6.2).

Rovnako významné je rozdelenie vzoriek na základe dĺžky zrenia pozdĺž komponenty F2; vzorky na začiatku zrenia sú v dolnej časti grafu a vzorky na konci zrenia sú v hornej časti grafu. Zároveň sú vzorky rozlíšené aj pozdĺž komponenty F1 podľa dĺžky zrenia.

Menej zrelé vzorky sa nachádzajú v ľavej a zrelé vzorky sa nachádzajú v pravej časti. Vplyv použitých kultúr sa ukázal ako nevýznamný, zvlášť v poslednej fázy zrenia (A8, B8); vzorky sú umiestnené veľmi blízko seba a sú si teda veľmi podobné.



Obrázok 32: Rozptylový diagram komponentného skóre - diferenciácia jednotlivých vzoriek na základe obsahu MK, VMK a SAL; značenie vzoriek vid' Tabuľka 13

5.4.2 Experiment II

Pre štatistické spracovanie boli použité výsledky merania všetkých modelových (5 kombinácií kultúr, 3 fáze zrenia – celkovo 15) a komerčných vzoriek. K interpretácii dát bolo využité grafické vyjadrenie, rovnako ako v experimentu I (vždy prvé dve komponenty) graf komponentných váh, rozptylový diagram komponentného skóre [237].

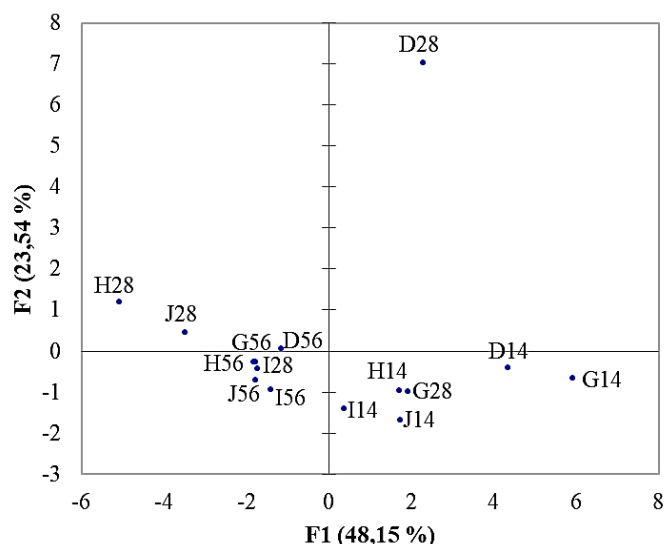
Testované boli výsledky merania obsahu SAL, MK a VMK. Cieľom bolo zistiť, či je možné od seba odlíšiť jednotlivé vzorky na základe týchto parametrov, podľa priebehu zrenia, ale aj podľa použitých štartovacích kultúr.

5.4.2.1 Vyhodnotenie merania viazaných a voľných mastných kyselín

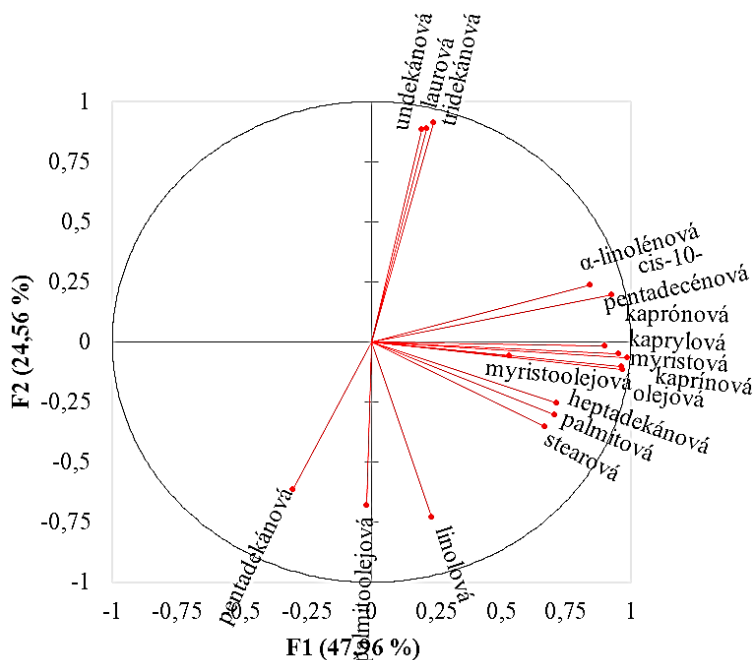
V prípade MK boli pre spracovanie použité priemerné hodnoty ($n = 3$) obsahu všetkých identifikovaných MK a VMK (celkovo 17; v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku).

Z grafu (Obrázok 33) je viditeľné rozdelenie vzoriek pozdĺž prvej hlavnej komponenty (F1) podľa doby zrenia. Menej zrelé vzorky sa nachádzajú v pravej a zrelé vzorky v ľavej časti grafu. Prvé dve komponenty popisujú 71,69 % z celkovej variability systému. Väčšina identifikovaných MK pozitívne korelovala s komponentou F1 (Obrázok 34) – ich obsah sa v priebehu zrenia znižoval. Pre konštrukciu F1 sú najdôležitejšie kyseliny kaprónová (0,90), kaprylová (0,95), kaprínová (0,97), myristová (0,99) a olejová (0,96).

Čo sa týka použitých kultúr, diferenciácia vzoriek nie je jednoznačná, z grafu (Obrázok 33) je možné pozorovať podobnosť všetkých vzoriek v poslednej fáze zrenia (tvoria zhhluk v ľavej časti grafu), avšak v počiatkovej fáze zrenia sú vzorky od seba viac vzdialené (pravá časť grafu) - sú medzi nimi rozdiely v obsahu MK. Vzorka D28 (bez prídavku termofilov), obsahovala na počiatku zrenia najväčšie množstvo MK, čo by mohlo naznačovať pomalší nástup lipolýzy - umiestnená samostatne v hornej časti grafu.



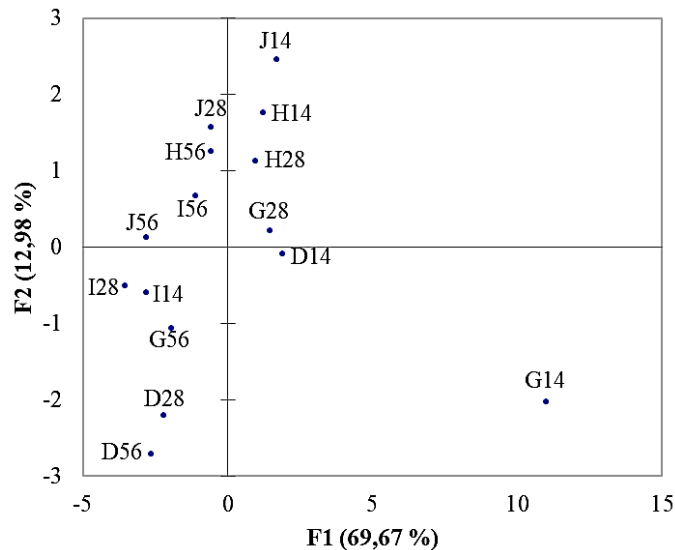
Obrázok 33: Rozptylový diagram komponentného skóre - diferenciácia jednotlivých vzoriek na základe obsahu viazaných MK; značenie vzoriek vid' Tabuľka 15



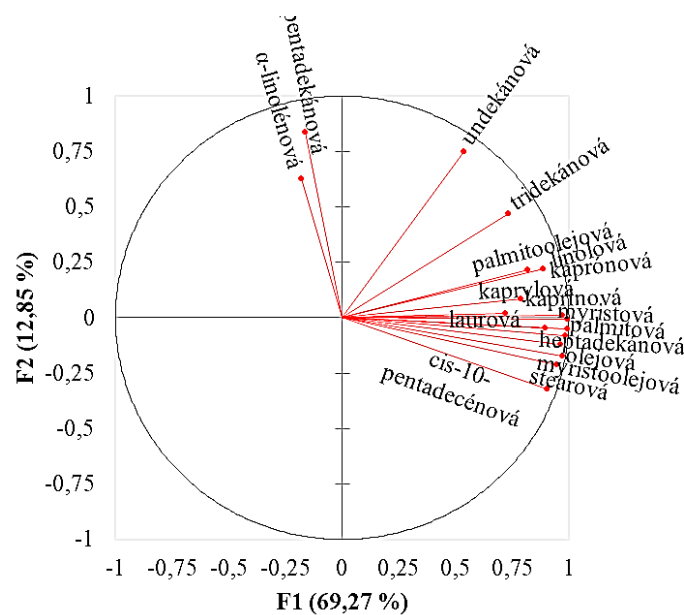
Obrázok 34: Graf komponentných váh všetkých identifikovaných MK – Exp II

Na grafu (Obrázok 35) je znázornená diferenciácia jednotlivých vzoriek na základe obsahu VMK. Prvé dve komponenty popisujú 82,65 % z celkovej variability systému. Aj tu je do určitej miery viditeľné rozdelenie vzoriek podľa zrenia pozdĺž komponenty F1. Väčšina identifikovaných VMK koreluje výrazne pozitívne s F1 (Obrázok 36). Aj v prípade VMK dochádzalo počas zrenia k ich miernemu poklesu.

Najdôležitejšími zloženinami pre konštrukciu F1 (Obrázok 36) sú kyseliny kaprinová (0,95), myristová (0,99), palmítová (0,97), stearová (0,90) a olejová (0,93).



Obrázok 35: Rozptylový diagram komponentného skóre - diferenciácia jednotlivých vzoriek na základe obsahu VMK; značenie vzoriek vid' Tabuľka 15

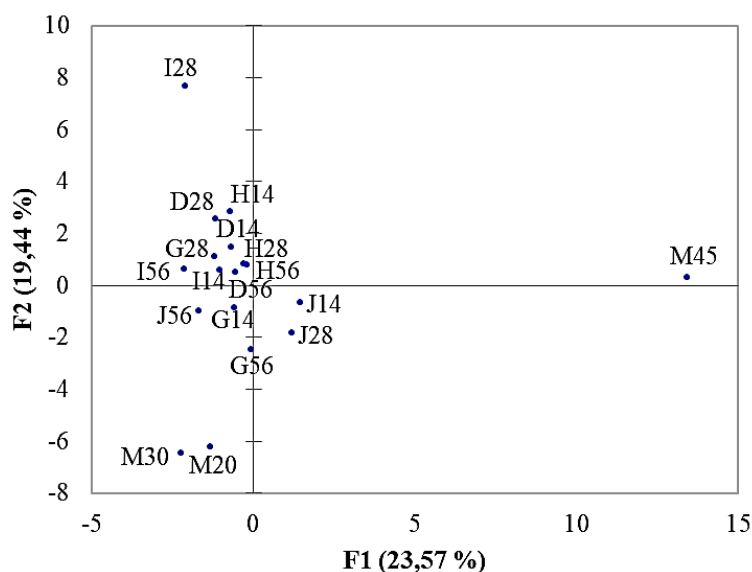


Obrázok 36: Graf komponentných váh všetkých identifikovaných VMK – Exp II

Z výsledkov vyplýva, že je možné na základe obsahu MK a VMK dobre odlišiť rôzne fázy zrenia. Na druhú stranu použité štartovacie kultúry vykazujú podobný priebeh lipolýzy a nedajú sa takto odlišiť.

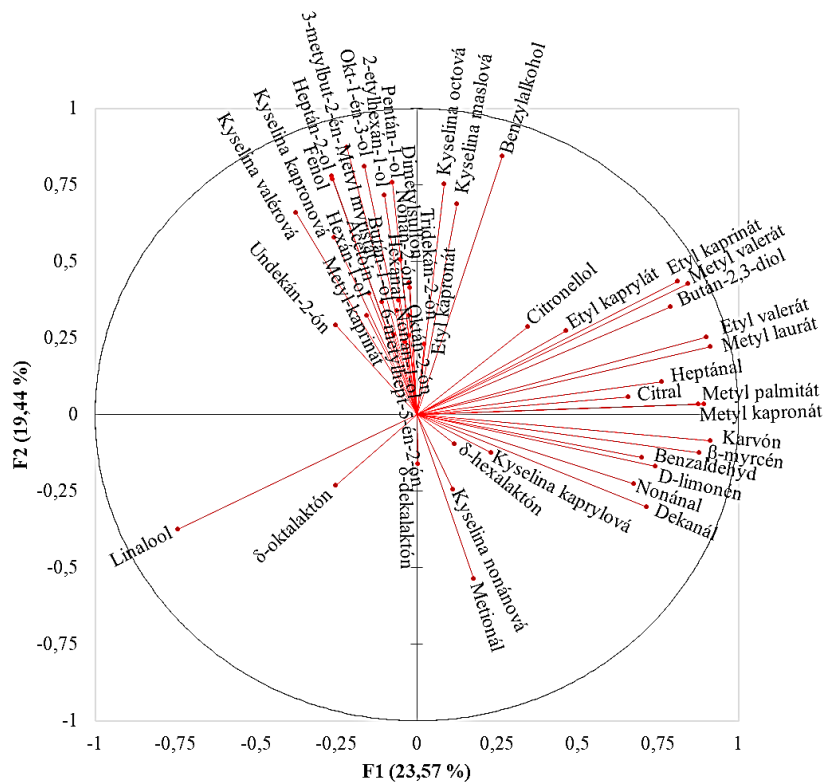
5.4.2.2 Vyhodnotenie výsledkov merania prchavých látok

V prípade SAL boli pre spracovanie použité priemerné plochy pík (n = 3) všetkých identifikovaných zlúčenín (celkovo 50). Pre vysvetlenie 75,04 % z variability pôvodného systému bolo treba päť komponent; prvé tri komponenty vysvetľujú 54,94 % a prvé štyri 62,68 % premenlivosti systému.



Obrázok 37: Rozptylový diagram komponentného skóre SAL vo všetkých vzorkách - diferenciacia jednotlivých vzoriek na základe obsahu prchavých zlúčenín; značenie vzoriek vid' Tabuľka 15

V grafe (Obrázok 37) je znázornená diferenciacia jednotlivých vzoriek na základe obsahu všetkých identifikovaných zlúčenín pomocou F1 a F2. Metóda PCA sa v tomto prípade príliš neosvedčila, prvé dve komponenty vysvetľujú iba 43,02 % z celkového rozptylu pôvodných premenných a z grafu nie je možné vyčítať zreteľné rozdelenie modelových vzoriek.



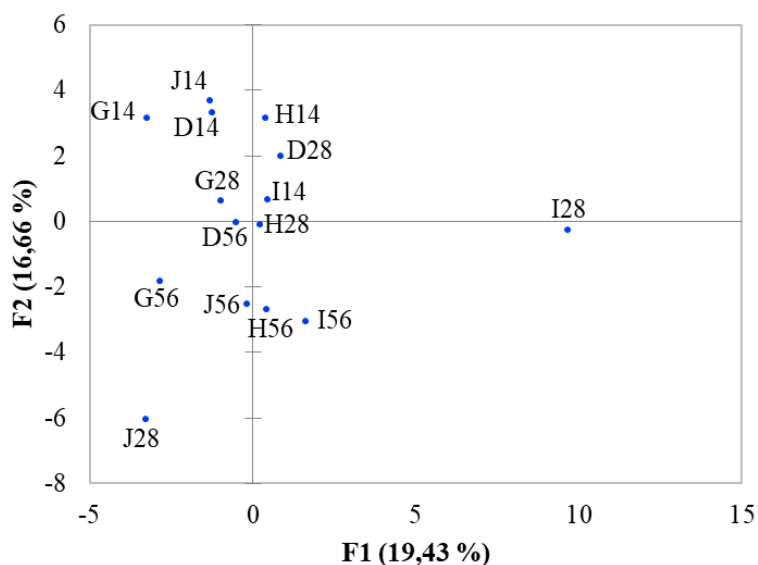
Obrázok 38: Graf komponentných váh všetkých identifikovaných SAL – Exp II

Dobre oddelené sú iba komerčné vzorky, vzorky s nižším obsahom t. v s. (M20 a M30) tvoria zhhluk v ľavej dolnej časti. Vzorka s 45 % t. v s. je umiestnená samostatne v pravej časti, disponovala najvyšším obsahom SAL.

Všetky tri komerčné vzorky sa svojím zložením výrazne odlišovali od modelových vzoriek. Z tohto dôvodu bola prevedená ďalšia PCA (Obrázok 39) iba pre modelové vzorky. Ani takto sa PCA príliš neosvedčila, prvé dve komponenty vysvetľujú iba 36,09 % z celkového rozptylu pôvodných premenných. Pre vysvetlenie 74,24 % z variability pôvodného systému bolo potrebných šesť komponent; prvé tri komponenty vysvetľujú 47,69 %, prvé štyri 57,25 % a prvých päť 66,67 % premenlivosti systému.

Napriek tomu je možné z grafu vyčítať určité rozdelenie modelových vzoriek podľa zrenia pozdĺž komponenty F2.

Vzorky na začiatku zrenia, po 14 dňoch, sú umiestnené v hornej časti grafu. Naopak zrelé vzorky, po 56 dňoch, sa nachádzajú v dolnej časti grafu. Vzorky s prídavkom termofilov (G56, H56, I56, J56) v neskorších fázach zrenia tvoria zhhluk v ľavej dolnej časti grafu (Obrázok 39), zatiaľ čo na začiatku zrenia tvoria zhhluk v hornej časti spoločne so vzorkou D, z čoho vyplýva, že prídavok termofilov má vplyv na vývoj prchavých látok v syroch, ale skôr ku konci zrenia.

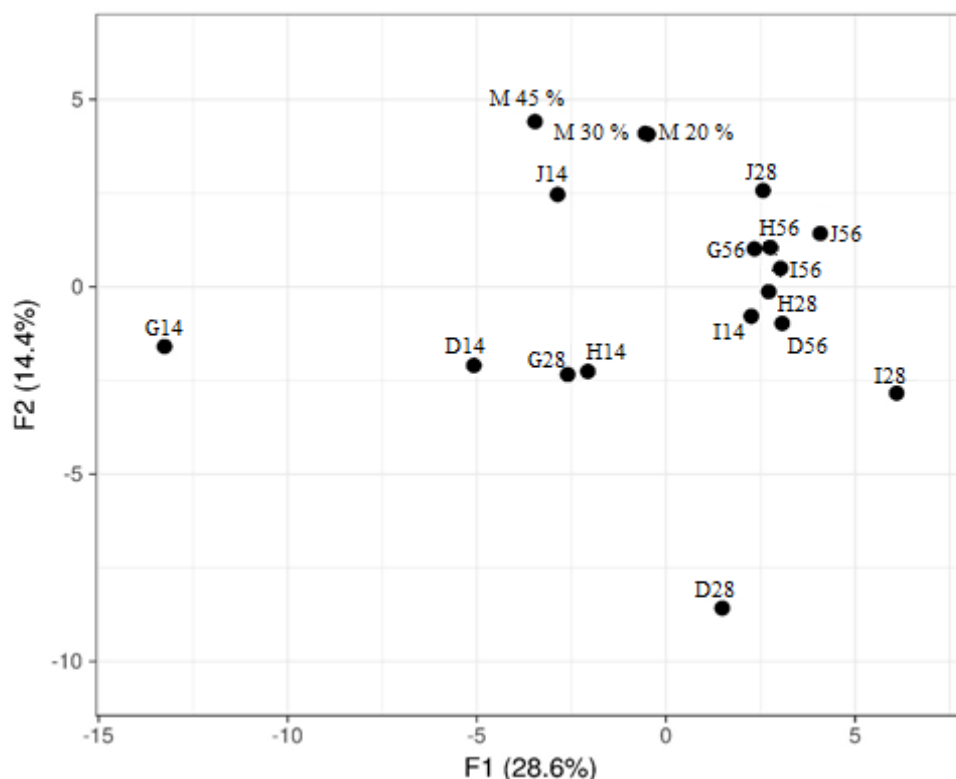


Obrázok 39: Rozptylový diagram komponentného skóre SAL v modelových vzorkách - diferenciácia jednotlivých vzoriek na základe obsahu prchavých zlúčenín; značenie vzoriek vid' Tabuľka 15

Pre konštrukciu F1 sa ukázali byť najdôležitejšími parametrami β -myrcén (0,77), karvón (0,83), metyl kaprylát (0,77), etyl valerát (0,81), metyl laurát (0,83), etyl kaprinát (0,71) a metyl palmitát (0,80). Pre konštrukciu F2 boli najdôležitejšími parametrami 3-metylbut-2-én-1-ol (0,76), benzylalkohol (0,71) a kyselina octová (0,57), pre F3 kyselina nonánová (0,45), nonan-2-ón (0,50) a acetoín (0,51) a pre δ -hexalaktón (0,23).

5.4.2.3 Korelácia obsahu mastných kyselín a prchavých látok

Pre kompletné štatistické vyhodnotenie bola opäť prevedená analýza všetkých MK a VMK (celkovo 17; v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ tuku) a SAL (celkovo 50; plochy píkov).



Obrázok 40: Rozptylový diagram komponentného skóre - diferenciacia jednotlivých vzoriek na základe obsahu MK/VMK, plôch píkov SAL; značenie vzoriek vid' Tabuľka 15

Prvé dve komponenty (Obrázok 40) popisujú 43,0 % z celkovej variability systému. Komerčné vzorky tvoria zhluk v hornej časti grafu, vzorky M 20 % a M 30 % sú si z hľadiska zloženia veľmi podobné. Modelové vzorky sú rozdelené pozdĺž komponenty F1 na základe dĺžky zrenia. Vzorky na začiatku zrenia sú v ľavej časti grafu a sú od seba pomerne vzdialené, vzorky zrelejšie tvoria zhluk v pravej hornej časti grafu.

Vplyv prídavku termofilných kultúr sa teda prejavuje v počiatočnej fázy zrenia, v neskorších fázach sú rozdiely medzi vzorkami nevýznamné ($p < 0,05$).

6 PRÍNOS PRÁCE PRE VEDU A PRAX

Prírodné syry patria vzhľadom ku svojmu zloženiu k najhodnotnejším potravinám, keďže v sebe koncentrujú základné zložky sušiny mlieka; obsahujú vysoký podiel lipidov, vitamínov a minerálnych látok. Zo spotrebiteľského hľadiska je však vedľa nutričných vlastností syrov často určujúca ich sensorická kvalita, teda vzhľad, farba, textúra a predovšetkým chuť a vôňa („chutnosť“, angl. „flavour“). Každý typ syra má svoj unikátny flavour, ktorý je z chemického hľadiska tvorený obsahom tzv. sensoricky aktívnych látok a je výsledkom chemických a mikrobiálnych vlastností mlieka, jednotlivých krokov výroby, a predovšetkým podmienok v priebehu zrenia.

Široký sortiment a rôzne chuťové vlastnosti syrov vedú neustále ku zvyšovaniu spotreby mliečnych výrobkov. Zvýšenie záujmu spotrebiteľov o syry tuzemskej výroby by určite prospelo rozšíreniu sortimentu a kvality našej produkcie, ktorá by sa potom mohla lepšie uplatniť aj na zahraničnom trhu. V tomto ohľade nevyhnutný výskum a mnohostranná laboratórna kontrola produktu u našich výrobcov bohužiaľ zaostáva. Je preto žiadúce aby sa výskumu a vývoju príslušných laboratórnych metód pre tieto technológie spracovania mlieka venovala pozornosť aspoň na príslušných ústavoch vysokých škôl.

Hlavným prínosom tejto práce bolo zhodnotenie sensorickej kvality (flavouru) modelových vzoriek vybraných typov prírodných syrov (eidamský syr a Moravský blok/bochnik) pomocou inštrumentálne stanoveného profilu prechavých (sensoricky aktívnych) látok a voľných/viazaných mastných kyselín.

Za prínos tejto práce pre vedu je možné považovať:

- overenie, optimalizáciu a validáciu analytických metód vhodných pre stanovenie voľných a viazaných mastných kyselín a sensoricky aktívnych látok v prírodných syroch a ich zavedenie do laboratórnej praxe, metódy budú na ÚCHPBT ďalej využívané pri riešení vedeckých prác,
- výrobu modelových vzoriek syrov s využitím rôznych štartovacích kultúr za štandardných, vzájomne porovnateľných podmienok,
- vyvodenie záverov o vplyvu použitých štartovacích kultúr na profil mastných kyselín a sensoricky aktívnych látok vyrobených syrov; doterajšie výskumy viedli iba ku vypracovaniu rozsiahlych zoznamov zlúčenín bez priamej súvislosti s ich produkciou použitými kmeňmi baktérií,
- zhodnoteniu vplyvu zrenia na kvalitu/flavour syrov,
- širší náhľad na danú problematiku z pohľadu vzájomne sa ovplyvňujúcich faktorov a ich interakcií.

Za prínos práce pre prax je možné považovať:

- potvrdenie dôležitosti stanovenia sensoricky aktívnych látok a mastných kyselín ako podstaty flavouru syrov,
- potvrdenie ich možného použitia ako doplnkov sensorického hodnotenia,
- potvrdenie ich možného použitia pri klasifikácii a prípadnej identifikácii syrov.

Doposiaľ nebola v podmienkach ČR/SR a ani v širšom priestore realizovaná tak obsahla experimentálna štúdia s priamou aplikáciou/overením výsledkov v podmienkach polovičnej prevádzky, čo je jeden z hlavných originálnych prínosov predloženej dizertačnej práce.

Akékoľvek nové poznatky v tejto oblasti sú významným prínosom pre potravinársky priemysel. Ak sa podarí porozumieť chemickému zloženiu flavouru a mechanizmu ich tvorby, umožní to lepšiu praktickú kontrolu, štandardizáciu výroby, riadenie kvality a odhalenie potenciálne nezhodných produktov a v konečnom dôsledku výrobu kvalitnejších a chutnejších výrobkov.

7 ZÁVERY

Predložená práca je štúdiou zameranou na charakterizáciu sensorickej kvality, predovšetkým flavouru, modelových vzoriek prírodných tvrdých syrov. Pozornosť je venovaná zloženiu a obsahu sensoricky aktívnych látok ako významných markerov flavouru a voľných/viazaných mastných kyselín ako ich prekurzorov.

Experimentálna časť je rozdelená do dvoch experimentov; v rámci experimentu I boli analyzované syry typu Moravský bochník (45 % t. v s., 60 % sušina), v experimentu II syry eidamského typu (45 % t. v s., 50 % sušina). U všetkých vzoriek bola ako základ použitá klasická mezofilná aromatická kultúra obsahujúca *Lactococcus* spp. a *Leuconostoc* spp., ktorá bola vždy doplnená vhodnou monokultúrou termofilných baktérií. Podstatou oboch experimentov bolo posúdenie vplyvu použitých mikrobiálnych kultúr na zmienené parametre, zároveň boli sledované ich zmeny v priebehu zrenia syrov.

Z prevedených experimentov vyplývajú nasledujúce závery:

Celkovo bolo vo vzorkách syrov identifikovaných v exp. I 20 MK, v exp. II 17 MK, voľných a viazaných v triacylglyceroloch. V súlade s literatúrou boli vo vzorkách z kvantitatívneho hľadiska najviac zastúpené kyseliny myristová, palmitová, stearová, olejová, z nízkouhlíkatých kaprónová, kaprylová a kaprínová – charakteristické pre mliečny tuk. Prídavok termofilných kultúr ani priebeh zrenia nemali vplyv na počet identifikovaných MK v syroch, významné rozdiely však boli nájdené v ich obsahu.

Obsah viazaných MK v syroch v priebehu zrenia klesal v dôsledku prebiehajúcich lipolytických zmien pri súčasnom zvyšovaní obsahu VMK a ich následnom odbúravaní na prchavé SAL, ktoré v konečnom dôsledku prispievajú k chuti a vôni syra.

Vplyv kombinácie použitých štartovacích kultúr sa menil v závislosti na fáze zrenia. Prídavok termofilnej kultúry sa síce prejavil výraznejšou lipolytickou aktivitou, ale následné metabolické procesy – odbúravanie VMK na prchavé SAL, tieto rozdiely vyrovnávajú. Z výsledkov je možné usúdiť, že aj použitá mezofilná kultúra vykazovala miernu lipolytickú aktivitu.

Čo sa týka prchavých látok, po porovnaní s dostupnou literatúrou boli všetky identifikované zlúčeniny považované za sensoricky aktívne. V syroch typu Moravský bochník (experiment I) bolo identifikovaných celkovo 51 SAL: 12 alkoholov, 4 aldehydy, 7 ketónov, 6 esterov, 9 kyselín, 11 terpénov a terpenoidov, 1 laktón a 1 sírna zlúčenina. Zo zlúčenín považovaných za kľúčové pre tento typ syrov boli vo vzorkách identifikované bután-2,3-dión, δ -dekalaktón, heptán-2-ón, 3-metylbutanol, etyl hexanoát.

V syroch eidamského typu (experiment II) bolo identifikovaných 50 prchavých látok, z toho 11 alkoholov, 5 aldehydov, 7 ketónov, 6 karboxylových kyselín, 10 esterov, 3 laktóny, 2 sírne zlúčeniny a 6 terpénov a terpenoidov. Zo zlúčenín považovaných za kľúčové pre tento typ syrov boli vo vzorkách identifikované hexanál, kyselina octová a maslová, metional, δ -hexa-, okta- a dekalaktón.

Vo všetkých vzorkách boli kvantitatívne najviac zastúpené ketóny a kyseliny.

Z výsledkov oboch experimentov vyplýva, že prídavok termofilných kultúr nemá významný vplyv na počet prchavých látok v syroch, v jednotlivých vzorkách sa pohyboval v rozmedzí 28 – 33 (exp. I) a 28 – 43 (exp. II).

Počas zrenia počet identifikovaných látok prekvapivo skôr klesal, pokles však nebol štatisticky významný, ani zrenie teda nemá významný vplyv na počet prchavých látok v syroch. Nevýznamné rozdiely boli nájdené v obsahu prchavých zlúčenín. V exp. I bol zaznamenaný mierny nárast v neskorších fázach zrenia, v exp. II naopak pokles v počiatkovej fáze zrenia. Prídavok termofilných kultúr nemá jednoznačný vplyv ani na obsah SAL a potvrdzuje to vplyv laktokokov na obsah prchavých látok v syroch.

Výsledky však preukázali významný vplyv procesu zrenia na obsah SAL v syroch. Rovnako ako klesal počet identifikovaných zlúčenín, tak klesal aj ich obsah, pravdepodobne v dôsledku ich odbúravania až na jednoduché zlúčeniny.

Výsledky prevedenej PCA analýzy potvrdzujú uvedené závery. Stanovenie MK a VMK sa ukázalo byť vhodným nástrojom pre diferenciáciu modelových vzoriek syrov; možno veľmi dobre rozlíšiť rôzne fáze zrenia. Vplyv štartovacích kultúr bol nejednoznačný a nie je možné tvrdiť, že prídavok termofilnej kultúry má významný vplyv na MK či SAL.

Namerané výsledky poskytujú zaujímavý komplexný pohľad na pôvod, zloženie a zmeny SAL vybraných druhov tvrdých syrov; v ďalšom výskume by bolo vhodné zamerať sa na senzorické hodnotenie, čo umožní hlbšie, a v praxi lepšie použiteľné, posúdenie vplyvu uvedených faktorov na senzorickú kvalitu (flavour) syrov.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] ŠNICKR, J., GOLIAN, J., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., ČANIGOVÁ, M., HERIAN, K., ČERNÍKOVÁ, M., PACHLOVÁ, V. *Mlieko a mliečne výrobky*. 1.vydanie Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2016, ISBN 978-80-552-1451-1.
- [2] *Vyhláška č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje*.
- [3] BŘEZINA, P., JELÍNEK, J. *Chemie a technologie mléka*. Praha: VŠCHT, 1990, ISBN 80-7080-075-5
- [4] KILCAWLEY, K. N., NONGONIERMA, A., HANNON, J. A. WILKINSON, M. G. 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.
- [5] FOX, P. F., WALLACE, J. M. Formation of flavour compounds in cheese. In: NEIDLEMAN S., LASKIN A. *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.
- [6] ALEXANDER, J. Some colloid-chemical aspects of digestion, with ultramicroscopic observation. *Journal of the American Chemical Society*. 1910, vol. 32, no. 5, pp. 680-687. ISBN 0002-7863. DOI: 10.1021/ja01923a015.
- [7] ALEXANDER, J. The rennin coagulation of milk from colloid – chemical standpoint. In: *Eight 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.
- [8] 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/B19590479.
- [9] DELFOUR, A., JOTTES, J., ALAIS, C., JOLLES, P. 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 0006-291-X.
- [10] KONGO, J. M., MALCATA, F. X. Cheese: Chemistry and Microbiology. In: CABALLERO, B. P., FINGLAS, M., TOLDRÁ, F. *Encyclopedia of Food and Health Volume 1*. Cambridge: Academic Press 2015, pp. 735-740. ISBN 978-0-12-384947-2.
- [11] DÜSTERHÖFT, E. M., VAN DEN BERG, G. Dutch-type cheeses. In: MCSWEENEY, P. L. H. *Cheese problems solved*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2007, pp. 230-245. ISBN 978-1-84569-060-1. DOI: 10.1533/9781845693534.230.
- [12] O'CALLAGHAN, T. F., MANNION, D. T., HENNESSY, D. Effect of pasture versus indoor feeding systems on quality characteristics, nutritional composition, and sensory and volatile properties of full-fat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 2017, DOI: 10.3168/jds.2016-12508.

- [13] TAYLOR, M. W., MACGIBBON, A. K. H. Milk lipids: General Characteristics. In: FUGUOY, J. W., FOX, P. F., MCSWEENEY, P. H. L. *Encyclopedia of dairy sciences*. 2nd ed. Cambridge: Academic Press, 2011, pp. 649-654. ISBN 978-0-12-374402-9.
- [14] MARKIEWICZ-KESZYCKA, M. CZYZAK-RUNOWSKA, G. LIPÍŃSKA, P. WÓJTOWSKI, J. 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.
- [15] FOX, P. F. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3rd edition, London, Elsevier, 2004, ISBN 978-0-12-263653-0.
- [16] COLLINS, Y. F., MCSWEENEY, P. L. H., WILKINSON, M. G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 2005, DOI: 10.1016/s0958-6946(03)00109-2.
- [17] OLŠAVSKÝ, Č., KNĚZ, V. *Výroba tvrdých syrů eidamského a ementálského typu*. Praha: Česká akademie zemědělská, 1971. Technické publikace.
- [18] DRDÁK, M., STUDNICKÝ J., MÓROVÁ, E., KAROVIČOVÁ, J. *Základy potravinářských technologií: spracovanie rostlinných a živočišných surovín cereálne a fermentačné technológie uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*, Bratislava: Malé centrum, 1996, ISBN 80-967-0641-1.
- [19] GABRIEL, J. *Směrné technologické postupy*. Mlékarenský průmyslový koncern. Praha: TOMOS, 1987
- [20] BUŇKA, F., HRABĚ, J., KRÁČMAR, S. The effect of sterilization on amino acid content in processed cheese. *International Dairy Journal*. 2004, vol. 14, no. 9, pp. 829-831. ISBN 0958-6946. DOI: 10.1016/j.dairy.j.2004.02.008.
- [21] CHAMBA, J. F., PERREARD, E. Contribution of propionic acid bacteria to lipolysis of Emmental cheese. *Le Lait*, 2002, vol. 82, pp. 33-44. DOI: 10.1051/lait:2001003.
- [22] DÜSTERHÖFT, E. M., ENGELS, M. W., VAN DEN BERG. Dutch type cheeses. In: FUGUOY, J. W., FOX, P. F., MCSWEENEY, P. H. L. *Encyclopedia of dairy sciences*. Cambridge: Academic Press, 2011, pp. 721-727. ISBN 978-0-12-374402-9.
- [23] SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchlippes. *Dinglers polytechnisches Journal*. 1879, vol. 232, pp. 441-465. ISSN 0366-9572.
- [24] GUINEE, T. P., FOX, P. F. Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. In: FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H., COGAN, T. M., GUINEE, T. P. *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.
- [25] ADDA, J. J. C. GRIPON, L. VASSAL. The chemistry of flavour and texture generation in cheese. *Food Chemistry*. 1982, vol. 9, pp. 115-129. ISSN 0308-8146. DOI: 0308-8146/82/90073-5.
- [26] ANDĚL, M. *Sýry a tvarohy ve výživě*. Praha: Česká technologická platforma pro potraviny: Potravinářská komora České republiky, 2012. ISBN 978-80-905096-2-7.

- [27] ALEWIJN, M., SLIWINSKI, E. L., WOUTERS, J. T. M. Production of fat-derived (flavour) compounds during ripening of Gouda cheese. *International Dairy Journal*, 2005, DOI: 10.1016/j.dairyj.2004.09.009.
- [28] RODRIGUEQ-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.
- [29] BINTSIS, T. PAPADEMAS, P. 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.
- [30] POWELL, I. B., BROOME, M. C., LIMSOWTIN, G. K. Y. Starter Cultures: General Aspects, In: FUQUAY, J. W. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd ed., Elsevier, 2016, pp 552-558. ISBN 978-0123744029.
- [31] LE QUÉRÉ, J.-L. *Cheese Flavour: Instrumental Techniques*. 2004, DOI: 10.1016/s1874-558x(04)80079-4.
- [32] MCSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Tech.*, 2004, DOI: 10.1111/j.1471-0307.2004.00147.x.
- [33] PILLONEL, L., AMPUERO, S., TABACCHI, R., BOSSET, J. O. Analytical methods for the determination of the geographic origin of Emmental cheese: Volatile compounds by GC/MS-FID and electronic nose. *EFRT*, 2003, vol. 216, no.2, pp. 179-183. DOI: 10.1007/s00217-002-0629-4.
- [34] KADLEC, P., MELZUCH, K., VOLDŘICH, M. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?* 1.vydanie, Ostrava: Key Publishing, 2009, ISBN 978-80-7418-051-4.
- [35] BELITZ, H. D., GROSCH, W., SCHIEBERLE, P. *Food Chemistry, 4th edition*, Berlin: Springer, ISBN 978-3-540-69933.
- [36] DRDÁK, M. *Základy potravinářských technologií*. Bratislava: Malé centrum, 1996, ISBN 80-967-0641-1.
- [37] MALLIA, S., ESCHER, F., SCHLICHTERLE-CERNY, H. Aroma-active compounds of butter: a review. *European Food Research and Technology*, 2008, DOI: 10.1007/s00217-006-0555-y.
- [38] FUNAHASHI, H., HORIUCHI, J. Characteristics of the churning process in continuous butter manufacture and modeling using an artificial neural network, *International Dairy Journal*, 2008, DOI: 10.1016/j.dairyj.2007.08.001.
- [39] BURDOCK, G. A. *Fenaroli's Handbook of Flavour Ingredients*. 6th ed. Florida: CRS Press, 2016 ISBN 978.1420090864.
- [40] POVOVO, M., CONTARINI, G. Comparison of solid-phase microextraction and purge-and-trap methods for the analysis volatile fraction of butter. *Journal of Chromatography A.*, 2003, DOI: 10.1016/s0021-9673(02)01395-x.
- [41] PETERSON, D. G., REINECCIUS, G. A. Characterization of the volatile compounds that constitute fresh sweet cream butter aroma, *Flavour and Fragrance Journal*, 2003, DOI: 10.1002/ffj.1192.
- [42] GRUEN, I. *Chemistry and technology of flavour and fragrances*. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2004. ISBN 0-8493-2372-X.
- [43] KRAMER, A., SZCZESNIAK, A. S. *Texture Measurement of Foods*. Dordrecht: D. Reidel Publishing Company, 1973, ISBN 9027703078.

- [44] MARILLEY, L., CASEY, M. G. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools, and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, DOI: 10.1016/s0168-1605(03)00304-0.
- [45] SOUSA, M. J., ARDÖ, Y., MCSWEENEY, P. L. H. Advance in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 2001, DOI: 10.1016/s0958-6946(01)00062-0.
- [46] FOLKERTSMA, B., FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H. Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperature. *International Dairy Journal*, 1996, DOI: 10.1016/0958-6946(95)00066-6.
- [47] AL-OTAIBI, M. M., WILBEY, A. Effect of temperature and salt on the maturation of white-salted cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 2004, DOI: 10.1111/j.1471-0307.2004.00123.x.
- [48] FOX, P. F., GUINEE, T. P., COGAN, T. M., MCSWEENEY, P. L. H. *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg, 2000, ISBN 0-83-42-1260-9.
- [49] IRLINGER, F., MOUNIER, J. Microbial interactions in cheese implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 2009, DOI: 10.1016/j.copbio.2009.02.016.
- [50] ZAMBONELLI, C., CHIAVARI, C., BENEVELLI, M., COLORETTI, F. Effects of lactic acid bacteria autolysis on sensorial characteristics of fermented foods. *Food Technology and Biotechnology*, 2002, UDC: 579.864.1:543.92:664.8/9.
- [51] BROOME, M. C., LIMSOVTIN, G. K. Y. Starter peptidase activity in maturing cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 1998, AGR: IND21978636
- [52] SETTANI, L., MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 2010, DOI: 10.1016/j.fm.2010.05.023.
- [53] MCSWEENEY, P. L. H., HAYALOGLU, A. A., O'MAHONY, J. A., BANSAL, N. Perspectives on cheese ripening. *Australian Journal of Dairy Technology*, 2006, URL: <https://search.proquest.com/docview/199503875?accountid=17115>
- [54] HUGENHOLTZ, J. Citrate metabolisms in lactic acid bacteria. *FEMS Microbial societies*. 1993, DOI: 10.1016/0168-6445(93)90062-E.
- [55] KELLER, H. J. Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products, 3rd edition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* DOI: 10.1002/jsfa.1709.
- [56] WILKES, J. G., CONTE, E. D., KIM, Y., HOLCOMB, M., SUTHERLAND, J. B., MILLER, D. W. Sample preparation for the Analysis of Flavors and Off-flavors in Foods. *Journal of Chromatography*, 2000, DOI: 10.1016/s0021-9673(00)00318-6.
- [57] ALBERTS, B. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky, 2. vydání*, Přeložil KOTYK, A., BOUZEK, B., HOZÁK, P., Ústí nad Labem: Espero, 1998, ISBN 80-902606-2-0.
- [58] ROMANO, A. H., CONWAY, T. Evolution of carbohydrate metabolic pathways. *Res Microbiol*, 1996, DOI: 10.1016/0923-2508(96)83998-2.

- [59] AGARWAL, S., POWER, J. R., SWANSON, B. G., CHEN, S., CLARK, S. Cheese pH, protein concentration, and formation of calcium lactate crystals. *Journal of Dairy Science*, 2006, DOI: 10.3168/jds.s0022-0302(06)72459-6.
- [60] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie, 2. opr. vyd.* Praha:Academia, 1996, ISBN 80-200-0600-1.
- [61] MCSWEENEY, P. L. H. *Cheese Problems Solved*, Elsevier, 2007, ISBN 9781845693534
- [62] BERTUZZI, S., MCSWEENEY, P. L. H., REA, M. C., KILCAWLEY, K. N. 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.
- [63] BERTOLA, N. C., CALIFANO, A. N., BEVILACQUA, A. E., ZARITZKY, N. E. Effects of ripening conditions on the texture of Gouda cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 2000, DOI: 10.1046/j.1365-2621.2000.00347.x.
- [64] PARTIDÁRIO, A. M., BARBOSA, M., VILAS BOAS. Free fatty acids, triglycerides and volatile compounds in Serra de Eestrela 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.
- [65] WOLF, I. V., PEROTTI, M. C., BERNAL, S. M., ZALAZAR, C. A. Study of chemical composition proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggianito Argentino cheese. Characterization of Reggianito Argentino cheese. *Food Research International*, 2010, DOI: 10.1016/j.foodres.2010.02.018.
- [66] CURIONI, P. M. G., BOSSET, J. O. Key Odorants in Various Cheese Types as Determined by Gas Chromatography-Olfactometry. *International Dairy Journal*, 2002, DOI: 10.1016/s0958-6946(02)00124-3.
- [67] PREININGER, M., GROSCH, W. Evaluation of key odorants of the neutral volatiles of emmentaler cheese by the calculation of odour activity values. *LWT – Food Science and Technology*, 1994, vol. 27, no. 3, pp. 237-244, DOI: 10.1006/fstl.1994.1048
- [68] BERGAMI, C. V., WOLF, I. V., PEROTTI, M. C., ZALAZAR, C. A. Characterisation of biochemical changes during ripening in Argentinean sheep cheeses. *Small Ruminant Research*, 2010, DOI: 10.1016/j.smallrumres.2010.07.004.
- [69] STAHL, A. A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 2004, DOI: 10.1007/d00424-003-1106-z.
- [70] ANDERSON, C. M., STAHL, A. SLC27 fatty acid transport proteins. *Molecular Aspects of Medicine*, 2013, DOI: 10.1016/j.mam.2012.07.010.
- [71] NELSON, D. L., COX, M. M. *Lehninger principles of Biochemistry*, 4th edition, New York: W. H. Freeman and Company, ISBN 0-7167-4339-6.
- [72] CHARNEY, A. N, MICIC, L., EGNOR, R. W. Nonionic diffusion of short-chain fatty acids across rat colon. *The American Journal of Physiology*, 1997, DOI: 10.1152/ajpgi.1998.274.3.g518.

- [73] KING, M. *Gluconeogenesis: Synthesis of New Glucose*. 13-02-2018, URL: <http://themedicalbiochemistrypage.org/gluconeogenesis.php>
- [74] TEHLIVETS, O., SCHEURINGER, K., KOHLWEIN, S. D. Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica et biophysica acta*, 2007, DOI: 10.1016/j.bbali.2006.07.004.
- [75] SINGH, T. K., DRAKE, M. A., CADWALLADER, K. R. Flavor of Cheddar Cheese: A chemical and Sensory Perspective. *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety*, 2003, DOI: 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00021.x.
- [76] VAN KRANENBURG, R., KLEEREBEZEM, M., VAN HYLCKAMA VLJEG, J., URSING, B. M., BOEKHORST, J., SMIT, B. A., AYAD, E. H. E., SMIT, G., SIEZEN, R. J. 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.
- [77] HABIBI-NAJAFI, M. B., LEE, B. H. Bitterness of cheese: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1996, DOI: 10.1080/1040839960.9527733.
- [78] SMIT, G., SMIT, B., ENGELS, W. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, DOI: 10.1016/j.fensre.2005.04.002.
- [79] JAKOBSSON, A., WESTERBERG, R., JACOBSSON, A. Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Progress in Lipid Research*, 2006, DOI: 10.1016/j.plipres.2006.01.004.
- [80] VAN HOORDE, K., VAN LEUVEN, I., DIRINCK, P. Selection, application and monitoring of *Lactobacillus paracasei* strains as adjunct cultures in the production of Gouda-type cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.007.
- [81] NORONHA, N., CRONIN, D. A., O'RIORDAN, E. D., O'SULLIVAN, M. Flavouring of imitation cheese with enzyme-modified cheeses (EMCs): Sensory impact and measurement of aroma active short chain fatty acids (SCFAs). *Food Chemistry*, 2008, DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.06.059.
- [82] MOLIMARD, P., SPINLER, H. E. Compounds involved in the Flavour of Surface Mold-Ripened Cheeses. *International Dairy Journal*, 2008, DOI: 10.3168/jds.s0022-0302(96)76348-8.
- [83] GÓMEZ-TORRES, N., ÁVILA, M., DELGADO, D., GARDE, S. 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. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.031.
- [84] THIERRY, A., COLLINS, Y. F., ABEIJÓN MIKDSI, M. C., MCSWEENEY, P. L. H., WILKINSON, M. G., SPINLER, H. E. Lipolysis and Metabolism of Fatty Acids in Cheese. In: FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H., COGAN, T. M., GUINEE, T. P. *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.

- [85] CADWALLADER, K. R., SINGH, T. K. Flavour and off-flavours in milk and dairy products. In: MCSWEENEY, P. L. H., FOX, P. F. *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.
- [86] HOU, J., HANNON, J. A., MCSWEENEY, P. L. H., BERESFORD, T. P., GUINEE, T. P. 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.
- [87] GANESAN, B., WEIMER, B. C. Amino Acid Catabolism and Its Relationship to Cheese Flavor Outcomes. In: FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H., COGAN T. M., GUINEE, T. P. *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.
- [88] CHRISTIE, W. W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In: *Advances in Liquid Methodology*. 2nd ed. Dundee: Oily Press, 1993, pp. 69-111. ISBN 978-0951417133.
- [89] 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.
- [90] SMID, E. J., KLEEREBEZEM, M. 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.
- [91] RYCHLIK, M., BOSSET, J. O. Flavour and off-flavour compounds of Swiss Gruyère cheese. Evaluation of potent odorants. *International Dairy Journal*, 2001, DOI: 10.1016/s0958-6946(01)00108-x.
- [92] THIERRY, A., MAILLARD M. B., HERVÉ, C., RICHOUX, R., LORTAL, S. Varied volatile compounds are produced by *Propionibacterium freudenreichii* in Emmental cheese. *Food Chemistry*, 2004, vol. 87, no. 3, pp. 439-446. DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.12.018.
- [93] ZABALETA, L., GOURRAT, K., BARRON, J. R., ALBISU, M., GUICHARD, E. Identification of odour-active compounds in ewe's raw milk commercial cheeses with sensory defects. *International Dairy Journal*. 2016, vol. 58, pp. 25-30 ISSN 0958-6946. DOI: 10.1016/j.dairyj.2016.01.018.
- [94] JO, Y., BENOIST, D. M., AMEERALLY, A., DRAKE, M. A. 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.
- [95] 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.
- [96] SYMPOURA, F., CORNU, A., TOURNAYRE, P., MASSOURAS, T., BERDAGUÉ, J. L., MARTIN, B. 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

- [97] BARBA, C., BENO, N., GUICHARD, E., THOMAS-DANGUIN, T. Selecting odorant compounds to enhance sweet flavour 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.
- [98] SÁDECKÁ, J., ŠAKOVÁ, N., PANGALLO, D. 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, DOI: 10.1016/j.lwt.2016.02.048.
- [99] KATAOKA, H., LORD, H. L., PAWLISZYN, J. 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.
- [100] TUNICK, M. H., IANDOLA, S. K., VAN HEEKEN, D. L. 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.
- [101] FOLCH, J., LEES, M., SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 1957, vol. 225, no. 1, pp. 497-509. ISSN 0021-9258.
- [102] PROULX, J. M., AGUSTIN, M., SULLIVAN, G. Short communication: Influence of pulsed light treatment on the quality and sensory characteristics of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 2017, DOI: 10.3168/jds.2016-11579.
- [103] THORPE, L. *The book of cheese: the essential guide to discovering cheeses you'll love*. New York: Flatiron Books, 2017, ISSN 00220302.
- [104] REINECCIUS, G. Choosing the correct analytical technique in aroma analysis. *Flavour in Food*, 2006, DOI: 10.1533/9781845691400.1.81.
- [105] VARMING, C., ANDERSEN, L. T., PETERSEN, M. A., ARDÖ, Y. Flavour compounds and sensory characteristics of cheese powders made from matured cheeses. *International Dairy Journal*, 2013, DOI: 10.1016/j.idairyj.2012.11.002.
- [106] YVON, M., RIJNEN, L. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 2001, DOI: 10.1016/s0958-6946(01)0049-8.
- [107] VAN LEUVEN, I., VAN CAELENBERG, T., DIRINCK, P. Aroma Characterisation of Gouda type Cheeses. *International Dairy Journal*, 2008, DOI: 10.1016/j.dairyj.2008.01.001.
- [108] 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. ISB 978-0-12-374407-4.
- [109] BERTRAND, E., MACHADO-MATURANA, E., CHEVARIN, C., PORTANGUEN, S., MERCIER, F., TOURNAYRE, P., ABOUELKARAM, S., GUILLARD, A. S., KONDIOVAN, A., BERAGUÉ, J. L. 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.
- [110] SAMPATH, H., NTAMBI, J. M. The fate and intermediary metabolism of stearic acid. *Lipids*, 2005, DOI: 10.1007/s11745-005-1484-z.

- [111] VAS, G., VÉKEY. K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*. 2004, vol. 39, no. 3, p. 233-254. ISSN 1076-5174. DOI: 10.1002/jms.606.
- [112] O'MAHONY, J. A., LUCEY, J. A., MCSWEENEY, P. L. H. Chymosin-Mediated proteolysis, Calcium Solubilization and Texture Development During the Ripening of Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science*, 2005, DOI: 10.3168/jds.s0022-0302(05)72992-1.
- [113] THAGE, B. V., RATTRAY, F. P., LAUSTSEN, M. W., ARDO, Y., BARKHOLT, V., HOULBERG, U. Purification and characterization of a branched-chain amino acid aminotransferase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CHCC 2215. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02163.x.
- [114] MARIACA, R., BOSSET, J. O. Instrumental analysis of volatile (flavour) compounds in milk and dairy products. *Le Lait*, 1997, DOI: 10.1051/lait:199712.
- [115] D'ACAMPORA ZELLNER, B., DUGO, P., DUGO, G., MONDELLO, L. Gas chromatography-olfactometry in food flavour analysis. *Journal of Chromatography A.*, 2008, DOI: 10.1016/j.chroma.2007.09.006.
- [116] SUNESEN, L. O., LUND, P., SORENSEN, J., HOLMER, G. Development of Volatile Compounds in Processed Cheese During Storage. *Food Science and Technology – LWT*, 2002, DOI: 10.1006/fstl.2001.0815.
- [117] MARSILI, R. Flavour, fragrance, and odor analysis. *Food Science and Technology*, 2002, DOI: 10.1007/s10337-013-2563-y.
- [118] DRDÁK, M. *Základy potravinárskych technológií: spracovanie rastlinných a živočíšnych surovín, cereálne a fermentačné technológie, uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. Bratislava: Malé centrum, 1996, ISBN 80-967-0641-1.
- [119] DOMAGALA, J. The influence of cheese type and fat extraction method on the content of conjugated linoleic acid. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, DOI: 10.1016/j.jfca.2009.11.002.
- [120] GRATZIONIS, K., LINFORTH, R. S. T., DODD, C. E. R. Volatile profile of Stilton cheeses: Differences between zones within a cheese and dairies. *Food Chemistry*, 2009, DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.07.092.
- [121] OSORIA-TOBÓN, J. F., ANGELA, M., MEIRELES, A. Recent Applications of Pressurized Fluid Extraction: Curcuminoids Extraction with Pressurized Liquids. *Food and Public Health*. 2013, vol. 3, no. 6, pp. 289-303. DOI: 10.5923/j.fph.20130306.05.
- [122] CARUNCHIA WHETSTINE, M. E., CADWALLADER, K. R., DRAKE, M. A. Characterisation of Aroma Compounds Responsible for the Rosy/Floral Flavor in Cheddar Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, DOI: 10.1021/jf048278o.
- [123] LIAW, I. W., MIRACLE, R. E., JERVIS, S. M., LISTIYANI, M. A. D., DRAKE, M. A. Comparison of the Flavor Chemistry and Flavor Stability of Mozzarella and Cheddar Wheys. *Journal of Food Science*, 2011, DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02360.x.

- [124] SANCHÉZ-CAMARGO, A. P. MARTINEZ-CORREA, H. A., PAVIANI, L. C., CABRAL, F. A. Supercritical CO₂ extraction of lipids and astaxanthin from Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*). *The Journal of Supercritical Fluids*, 2011, DOI: 10.1016/j.supflu.2010.12.009.
- [125] SANCHÉZ-VICENTE, Y., CABANAS, A., RENUNCIO, J. A. R., PANDO, C. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) seed oil using carbon dioxide and ethanol. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2009, DOI: 10.1016/j.supflu.2009.01.001.
- [126] SAHENA, F., ZAIDUL, I. S. M., JINAP, S., KARIM, A. A. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. *Journal of Food Engineering*, 2009, DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2009.06.026.
- [127] DOMAGAŁA, J., SADY, M., GREGA, T., PUSTKOWIAK, H., FLORKIEWICZ, A. The influence of cheese type and fat extraction method on the content of conjugated linoleic acid. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, DOI: 10.1016/j.jfca.2009.11.002.
- [128] LARRAYOZ, P., IBANEC, F. C., ORDONEZ, A. I., TORRE, P., BARCINA, Y. Evaluation of supercritical fluid extraction as sample preparation method for the study of Roncal cheese aroma. *International Dairy Journal*, 2000, vol. 10, no. 11, pp. 755-759, DOI: 10.1006/s0958-6946(00)00109-6.
- [129] TOUMALA, T., KALLIO, H. Identification of free fatty acids and some other volatile flavour compounds from Swiss cheese using on line supercritical fluid extraction – Gas chromatography. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, 1996, vol. 203, no. 3, pp. 236-240, DOI: 10.1007/bf01192870.
- [130] YEE, J. L., WALKER, J., KHALIL, H., JIMENEZ-FLORES, R. Effect of variety and maturation of cheese on supercritical fluid extraction efficiency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, vol. 56, no. 13, pp. 5153-5157. DOI: 10.1021/jf703673n.
- [131] YEE, J. L., KHALIL, H., JIMENEZ-FLORES, R. Flavor partition and fat reduction in cheese by supercritical fluid extraction: processing variables. *Le Lait*, vol. 87, no. 4-5, pp. 269-285. DOI: 10.1051/lait:2007020.
- [132] LARRÁYOZ, P. CARBONELL, M., IBÁÑEZ, F., TORRE, P., BARCINA, Y. Optimization of indirect parameters which affect the extractability of volatile aroma compounds from Idiazábal cheese using analytical supercritical fluid extractions (SFE). *Food Chem.*, 1999, DOI: 10.1016/s0308-8146(98)00055-7.
- [133] POMBAL, S., LOURENÇO, J. G., ROCHA, P., ETTLIN, D., RODILLA, J. M. L. Comparison of a New Total Fat Quantification Method in Cheese using Microwave Assisted Extraction (MAE) and Soxhlet. *Brazilian Journal of Analytical Chemistry*, vol. 4, no. 17, pp. 10-15. DOI: 10.1002/ejlt.201600108.
- [134] JIANMING, W., YUAN, G., PING, L., FENG, H., LIYING, L. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction Procedure to Determine Total Isoflavones in Chinese Soybean Cheese by Box-Bohnken Design. *Food Analytical Methods*. 2012, vol. 6, no. 1, pp. 221-226. DOI: 10.1007/s12161-012-9434-2.
- [135] SARAFAZ-YAZDI, A., AMIRI, A. Liquid-phase microextraction. *TrAC*. 2010, vol. 29, no. 1, pp. 1-14. DOI: 10.1016/j.trac.2009.10.003.

- [136] CHEMAT, F., ROMBAUT, N., SICAIRE, A.-G., MEULLEMIESTRE, A., FABIANO-TIXIER, A.-S., ALBERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2017, vol. 37, pp. 540-560. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2016.06.035.
- [137] ENGELS, W. J. M., DEKKER, R. DE JONG, C., NEETER, R., VISSER, S. A comparative study of volatile compounds in the water-soluble fraction of various types of ripened cheese. *International Dairy Journal*, 1997, DOI: 10.1016/s0958-6946(97)00003-4.
- [138] JANUSZKIEWICZ, J., SABIK, H., AZARNIA, S., LEE, B. Optimization of headspace solid-phase microextraction for the analysis of specific flavors in enzyme modified and natural Cheddar cheese using factorial design and response surface methodology. *Journal of Chromatography A.*, 2008, DOI: 10.1016/j.chroma.2008.04.067.
- [139] SONMEZDAG, A. S. Characterization of aroma and aroma-active composition of Gaziantep cheese by solvent-assisted flavor evaporation (SAFE) and aroma extract dilution analysis (AEDA). *Jouranal of Food Processing and Preservation*. 2019, vol. 43, no. 6, e13840. DOI: 10.1111/jfpp.13840.
- [140] MAJCHER, M. A., MYSZKO, K., GRACKA, A., GRYGIER, A., JELEŃ, H. H. Key Odorants of Lazur, a Polish Mold-Ripened Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018, vol. 66, no. 10, pp. 2443-2448.
- [141] CERPA, M. G., MATO, R. B., COCERO, M. J. Modeling steam distillation of essential oils: Application to lavandin super oil. *American Institute of Chemical Engineers*. 2008, DOI: 10.1002/aic.11438.
- [142] O'Riordan, P. J., DELAHUNTY, C. M. Comparison of volatile compounds released during the consumption of Cheddar cheese with compounds extracted by vacuum distillation using gas chromatography-olfactometry. *Flavour and Fragrance Journal*. 2001, vol. 16, no. 6, pp. 425-434. DOI: 10.1002/ffj.1034.
- [143] POLLIEN, P., CHAINTREAU, A. Simultaneous Distillation-Extraction: Theoretical Model and Development of a Preparative Unit. *Analytical Chemistry*, 1997, DOI: 10.1021/ac9701905.
- [144] SIEGMUND, B., LEITNER, E., MAYER, I., PFANNHAUSER, W., FARKAŠ, P., SÁDECKÁ, J., KOVÁČ, M. 5,6-Dihydro-2,4,6-trimethyl-4H-1,3,5-dithiazine – an aroma-active compound formed in course of the Likens-Nickerson extraction. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 1997, DOI: 10.1007/s002170050126.
- [145] SHIOTA, M. IWASAWA, A., SUZUKI-IWASHIMA, A., IIDA, F. Effects of Flavor and Texture on the Sensory Perception of Gouda-Type Cheese Varieties during Ripening Using Multivariate Analysis. *Journal of Food Science*, 2015, DOI. 10.1111/1750-3841.13135
- [146] DIRINCK, P., DE WINNE, A. Flavour characterisation and classification of cheeses by gas chromatographic-mass spectrometric profiling. *Journal of Chromatography A.*, 1999, DOI: 10.1016/s0021-9673(99)00193-4.

- [147] MAJCHER, M. JELEŇ, H. H., Comparison of suitability of SPME, SAFE and SDE methods for isolation of flavor compounds from extruded potato snacks. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2009, DOI: 10.1016/j.fca.2008.11.006.
- [148] VÍTOVÁ, E., LOUPANCOVÁ, B., ZEMANOVÁ, J., ŠTOUDKOVÁ, H., BŘEZINA, P., BABÁK, L. Solid-Phase Microextraction for Analysis of Mold Cheese Aroma. *Czech Journal of Food Science*, 2006, URL: <http://publikace.k.utb.cz/handle/10563/1002463>
- [149] ZANG, X., LIANG, W., CHANG, Q., WU, T., WANG, Ch., WANG, Z. Determination of volatile organic compounds in pen inks by a dynamic headspace needle trap device combined with gas chromatography-mass spectroscopy. *Journal of Chromatography A*, 2017, DOI: 10.1016/j.chroma.2017.07.030.
- [150] ENGEWALRD, W., DETTER-WILDE, K., ROTZSCHE, H. 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.
- [151] HANNON, J. A., KILCAWLEY, K. N., WILKINGSON, M. G., DELAHUNTY, C. M., BERESFORD, T. P. Flavour precursor development in Cheddar cheese due to lactococcal starter and the presence and lysis of *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*, 2007, DOI: 10.1016/j.dairyj.2006.03.001.
- [152] JEONG, S.-H., YUN, S.-E., MUN, S.-P., The role of immobilized rennet on carbon cloth in flavor development during ripening of Gouda cheese. *Food Science and Biotechnology*, 2016, DOI: 10.1007/s10068-016-0241-1.
- [153] RUIZ-GUTIÉRREZ, V., PÉREZ-CAMINO. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*. 2000, vol. 885, no. 1-2, s. 321-341. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)00181-3.
- [154] HEAVEN, M. W., NASH, D. Recent analyses using solid phase microextraction in industries related to food made into or from liquids. *Food Control*, 2012, DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.03.018.
- [155] AMPUERO, S., BOSSET, J. O. The Electronic Nose Applied to Dairy Products: A Review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2003, DOI: 10.1016/s0925-4005(03)00321-6.
- [156] PERRY, R. H. *Perrys chemical engineers handbook*. 17th ed. New York: McGraw-Hill, 1997, ISBN 00-711-5448-5.
- [157] BALASUBRAMANIAN, S., PANIGRAHI, S. 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.
- [158] HAUFF, S., VETTER, W. 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.

- [159] WARDENCKI, W., MICHULEC, M., CURYŁO, J. 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.
- [160] BEZERRA, T. K. A., ARAÚJD, A. R. R., ARCANJD, N. M. D., DA SILVA, F. L. H., QUEIRDGA, R. C. R. E., MADRUGA, M. S. 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.
- [161] 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.
- [162] VUCKOVIC, D., ZHANG, X., CUDJOE, E., PAWLISZYN, J. 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
- [163] SPIETELUN, A., PILARCZYK, M., KLOWSKOWSKI, A., NAMIESNIK J. 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.
- [164] VERZERA, A., ZIINO, M., CONDURSO, C., ROVEO, V., ZAPPALA, M. Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for rapid characterisation of semihard cheeses. *Anal. Bioanal. Chem*, 2004, DOI: 10.1007/s00216-004-2879-4.
- [165] BERGAMINI, C. V., WOLF, I. V., PEROTTI, M. C., ZALAZAR, C. A. Characterisation of biochemical changes during ripening in Argentinian sheep cheeses. *Small Ruminant Research*, 2010, DOI: 10.1016/j.smallrumres.2010.07.004.
- [166] URGEGHE, P. P., PIGA, C., ADDIS, M., DI SALVO, R., PIRREDDA, G., SCINTU, M. F., WOLF, I. V., SANNA, G. SPME/GC-MS Characterisation of the Volatile Fraction of an Italian PDO Sheep Cheese to Prevalent Lypolitic Ripening: the Case of Fiore Sardo. *Food. Anal. Methods*, 2012, DOI: 10.1007/s12161-011-9302-5.
- [167] DELGADO, F. J., GONZÁLEZ-CRESPO, J., RAMÍREZ, R. Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME-GC-MS. *Food Chemistry*, 2011, DOI: 10.1016/j.foodchem.2001.05.096.
- [168] DELGADO, F. J., GONZÁLEZ-CRESPO, J., CAVA, R., GARCÍA-PARRA, J., RAMÍREZ, R. Characterisation by SPME-GC-MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese P. D. O. Torta del Carsar during ripening. *Food Chemistry*, 2010, DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.04.081.
- [169] GUNESER, O., YUCEER, K. Y. Characterisation of aroma-active compounds chemical and sensory properties of acid-coagulated cheese: Circassain cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 2011, DOI: 10.1111/j.1471-0307.2011.00703.x.

- [170] TRUJILLO-RODRÍGUEZ, M. J., YU, H., COLE, W. T. S., HO, T. D., PINO, V., ANDERSON, J. L., AFONSO, A. M. Polymeric ionic liquid coatings versus commercial solid-phase microextraction coatings for the determination of volatile compounds in cheeses. *Talanta*, 2014, DOI: 10.1016/j.talanta.2013.12.046.
- [171] PINHO, O., PÉRÈS, C., FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Solid-phase microextraction of volatile compounds in „Terrincho“ ewe cheese. Comparison of different fibers. *J. of Ch.*, 2003, DOI: 10.1016/s0021-9673(03)01066-5.
- [172] FRANK, D. C., OWEN, C. M., PATTERSON, J. Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *LWT*, 2004, DOI: 10.1016/s0023-6438(03)00144-0.
- [173] DAVID, F., SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction for trace analysis. *Journal of Chromatography A*. 2007, vol. 1152, no. 1-2, pp. 54-69. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.01.032.
- [174] MORO, A., LIBRAN, C. M., BERRUGA, M. I., CARMONA, M., ZALACAIN, A. Dairy matrix effect on the transference of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil compounds during cheese making. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 2015, vol. 95, no. 7, pp. 1507-1513. DOI: 10.1002/jsfa.6853.
- [175] LUQUE DE CASTRO, M. D., PRIEGO-CAPOTE, F. 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.
- [176] DE JONG, C., BADINGS, H. T. 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.
- [177] MANNION, D. T., FUREY, A., KILCAWLEY, K. N. 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.
- [178] KIM HA, J., LINDSAY, R. C. 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.
- [179] ICHIHARA, K., FUKUBAYASHI, Y. 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.
- [180] SIMPSON, N. J. K. *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*. 1st ed. Florida: CRC Press, 2000. ISB 978-0824700218.
- [181] KALUZNY, M. A., DUNCAN, L. A., MERRITT, M. V., EPPS, D. E. 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.

- [182] CHAVARRI, F., VIRTO, M., MARTIN, C., NÁJERA, A. I., SANTISTEBAN, A., BARRÓN, L. J. R., RENOBALLES, M. 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.
- [183] VOIGT, D. D., CHEVALIER, F., QUAN, M. C., KELLY, A. L. 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.
- [184] DULLEY, J. R., GRIEVE, P. A. Volatile fatty acid production in Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*. 1974, vol. 29, pp. 120-123. ISSN 0004-9433.
- [185] LASHKARI, S. JENSEN, K. 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 2652-3409. DOI: 10.1016/j.dib.2017.09.022.
- [186] MONDELLO, L., COSTA, R., TRANCHIDA, P. Q., CHIOFALO, B., ZUMBO, A., DUGO, P., DUGO, G. Determination of flavour 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.
- [187] SOMMER, L. *Základy analytické chemie 2. 1.vyd.* Brno: VUTIUM, 2000, ISBN 80-214-1742-0.
- [188] VAZQUEZ-ROIG, P., PICO, Y. Gas chromatography and mass spectroscopy techniques for the detection of chemical contaminants and residues in foods, In: SCHRENK, D., CARTUS, A. *Ch. C. and R. in F.* 2nd ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2017, pp. 17-61. ISBN: 978-0-08-100674-0.
- [189] SPARKMAN, O. D., PENTON, Z., KITSON, F. G. 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.
- [190] JENNINGS, W., MITTFELDLT, E., STREMPLE, P. P. *Analytical gas chromatography. 2nd ed.* San Diego: Academic Press, 1997, ISBN 978-0-12-384357-9.
- [191] MCNAIR, H. M., MILLER, J. M. *Basic gas chromatography*. New York: Wiley, 1998, ISBN 0-471-17261-8.
- [192] LAWLOR, J. B., DELAHUNTY, C. M., SHEEHAN, J., WILKINSON, M. G. Relationships between sensory attributes and the volatile compounds, non-volatile and gross compositional constituents of six blue-type cheeses. *International Dairy Journal*, 2003, DOI: 10.1016/s0958-6946(03)00048-7.
- [193] CHION, A. R., TABACCO, E., GIACCONE, D., PEIRETTI, P. G., BATTELLI, G., BORREANI, G. Variation of fatty acid and terpene profiles in mountain milk and „Toma piemontese“ cheese as affected by diet composition in different season. *Food Chemistry*, 2010, DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.12.048.
- [194] NORONHA, N., CRONIN, D., O'RIORDAN, D., O'SULLIVAN, M. Flavouring reduced fat high fibre cheese products with enzyme modified cheeses (EMCs). *Food Chemistry*, 2008, DOI:10.1016/j.foodchem.2008.03.011

- [195] O'BRIEN, E., MILLS, S., DOBSON, A. Contribution of the novel sulfur-producing adjunct *Lactobacillus nodensis* to flavor development in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, 2017, DOI: 10.3168/jds.2016-11726.
- [196] 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.
- [197] PAUL, W., STEINWEDEL, H. Ein Neues Massenspektrometer Ohne Magnetfeld. *Zeitschrift für Naturforschung A.*, 1953, ISSN 0340-4811. DOI: 10.1515/zna-1953-0710.
- [198] SPARKMAN, O. D., PENTON, Z., KITSON, F. G. 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.
- [199] KARASEK, F. W., CLEMENT, R. E. *Basic Gas Chromatography – Mass Spectrometry*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2012. ISBN 978-0-08-092906-4.
- [200] ŠTULIK, K. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004, ISBN 80-246-0852-9.
- [201] MAJCHER, M. A., JELEŃ, H. H. Key odorants of Oscypek, a traditional Polish ewe's milk cheese. *J. Agricultural Food Chem.*, 2011, DOI: 10.1021/jf2002602.
- [202] PANSERI, S., GIANI, I., MENTASTI, T., BELLAGAMBA, F., CAPRINO, F., MORETTI, V. M. Determination of flavour compounds in mountain cheese by headspace sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry. *LWT*, 2008, DOI: 10.1016/j.lwt.2007.02.011.
- [203] HAYALOGLU, A. A., KARABULUT, I. *SPME/GC-MS* Characterization and Comparison of Volatiles of Eleven Varieties of Turkish Cheeses. *International Journal of Food Properties*, 2013. DOI: 10.1080/10942912.2011.587625.
- [204] SALUM, P., ERBAY, Z., KELEBEK, H., SELLI, S. Optimization of Headspace Solid-Phase Microextraction with Different Fibers for the Analysis of Volatile Compounds of White-Brined Cheese by Using Response Surface Methodology. *Food Analytical Methods*, 2017, DOI: 10.1007/s12161-016-0774-1.
- [205] KAVAZ, A., BAKIRCI, İ., KABAN, G. Otlu Peynirlere Ait Uçucu Bileşenler Profilinin Depolama Süresince Değişimi. *Kafkas Univeritesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2013, DOI: 10.9775/kvfd.2012.7509.
- [206] OZTURKOGLU-BUDAK, S., GURSOY, A., AYKAS, D. P. Volatile compound profiling of Turkish Divle Cave cheese during production and ripening. *Journal of Dairy Science*, 2016, DOI: 10.3168/jds.2015-10828.
- [207] BEZZERA, T. K. A., ARAÚJO, A. R. R., ARCANJO, N., MADRUGA, M. 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 (Campinas)*, 2016, DOI: 10.1590/1678-457x.0035.
- [208] BEZZERA, T. K. A., ARCANJO, N., ARAÚJO, A. R. R. Volatile profile in goat Coalho cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. *LWT*, 2017, DOI: 10.1016/j.lwt.2016.03.041.

- [209] CAPORASO, N., ARMENTO, V., SACCHI, R. Volatile profile of Conciato Romano cheese, a traditional Italian cheese, during ripening. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2015, DOI: 10.1002/ejlt.201400153.
- [210] IWASAWA, A. SUZUKI-IWASHIMA, A., IIDA, F., SHIOTA, M. Effects of Flavor and Texture on the Desirability of Cheddar Cheese during Ripening. *Food Science and Technology Research*, 2014, DOI: 10.3136/fstr.20.23.
- [211] SBERVEGLIERI, V. Validation of Parmigiano Reggiano Cheese Aroma Authenticity, Categorized through the Use of an Array of Semiconductors Nanowire Device (S3). *Materials*, 2016, DOI: 10.3390/ma9020081.
- [212] SBERVEGLIERI, V., BHANDARI, M., NÚÑEZ CARMONA, E. A novel MOS Nanowire Gas Sensor Device (S3) and GC-MS-Based Approach for the Characterization of Grated Parmigiano Reggiano Cheese. *Biosensors*, 2016, DOI: 10.3390/bios6040060.
- [213] SULEJMANI, E., HAYALOGLU, A. A. Influence of curd heating on proteolysis and volatiles of Kashkaval cheese. *Food Chemistry*, 2016, DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.05.054.
- [214] SULEJMANI, E., RAFAJLOVSKA, V., GUNESER, O. Characterization of volatiles in Beaten cheese (bieno sirenje) by SPME/GC-MS: Influence of geographical origin. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2014, DOI: 10.2298/jsc130917135s.
- [215] CERUTI, R. J., ZORRILLA, S. E., SIUFE, G. A. Volatile profile evolution of Reggianito cheese during ripening under different temperature-time combinations. *European Food Research and Technology*, 2016, DOI: 10.1007/s00217-016-2640-1.
- [216] HAMAMA, O., CARPINO, S., RAPISARDA, T., LICITRA, G., ZIDOUNE, M. Use of Smart Nose and GC/MS/O analysis to define volatile fingerprint of a goatskin bag cheese Bouhezza. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 2016, DOI: 10.9755/ejfa.2016-02-184.
- [217] BERGAMASCHI, M., APREA, E., BETTA, E. Effects of dairy system, herd within dairy system and individual cow characteristics on the volatile organic compound profile of ripened model cheeses. *Journal of Dairy Science*, 2015, DOI: 10.3168/jds.2014-8807.
- [218] SUZZI, G., SACCETTI, G., PATRIGNANI, F. Influence of pig rennet on fatty acid composition, volatile molecule profile, texture and sensory properties of Pecorino di Farindola cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, DOI: 10.1002/jsfa.6944.
- [219] BOVOLENTA, S., ROMANZIN, A., CORAZZIN, M. Volatile compounds and sensory properties of Montasio cheese made from the milk of Simmental cows grazing on alpine pastures. *Journal of Dairy Science*, 2014, DOI: 10.3168/jds.2014-8396.
- [220] BOLTAR, I., ČANŽEK MAJHENIČ, A., JARNI, K., JUG, T., BACON KRALJ, M. Volatile compounds in Nanos cheese: their formation during ripening and seasonal variation. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, DOI: 10.1007/s13197-014-1565-6.

- [221] AMINIFAR, M., EMAM-DJOME, Z. Investigation on the microstructural and textural properties of Lighvan cheese produced from bovine milk fortified with protein and gum tragacanth during ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 2015, DOI: 10.1111/1471-0307.12243.
- [222] PALENCIA, G., IBARGOITIA, M., FRESNO, M. Complexity and Uniqueness of the Aromatic Profile of Smoked and Unsmoked Herreño Cheese. *Molecules*, 2014, DOI: 10.3390/molecules19067937.
- [223] MILOSAVLJEVIĆ, N. P., BLAGOJEVIĆ, P. D., SAVIĆ, D. S., RADULOVIĆ, N. S. Application of HS-SPME-GC-MS-derived variables for monitoring ripening-induced changes in cheese volatile compounds. *Dairy Science & Technology*, 2011, DOI: 10.1007/s13594-012-0070-9.
- [224] DEL MAR CAJA, M., DEL CASTILLO, M. L. R., BLANCH, G. P. Solid-Phase Microextraction to the Study of the Stability of Selected Volatile Constituents in Irradiated Manchego Cheese. *Food Analytical Methods*, 2011, DOI: 10.1007/s12161-011-9215-3.
- [225] FERNÁNDEZ, M., HOSPITAL, X. F., ARIAS, K., HIERRO, E. Application of Pulsed Light to Sliced Cheese: Effect on *Listeria* Inactivation, Sensory Quality and Volatile Profile. *Food and Bioprocess Technology*, 2016, DOI: 10.1007/s11947-016-1721-2.
- [226] ZABALETA, L., ALBISU, M., BARRON, L. J. R. Volatile compounds associated with desirable flavour and off-flavour generation in ewe's raw milk commercial cheeses. *EFRT*. 2017, DOI: 10.1007/s00217-017-2851-0.
- [227] CORNU, A., RABIAU, N., KONDJAYAN, N., VERDIER-METZ, I. P., PRADEL, P., TOURNAYRE, P., BERDAGUÉ, J. L., MARTIN, B. Odour-active compound profiles in Cantal-type cheese: Effect of cow diet, milk pasteurization and cheese ripening. *International Dairy Journal*, 2009, DOI: 10.1016/j.idairyj.2009
- [228] FUCHSMANN, P., STERN, M. T., BRÜGGER, Y. – A., BREME, K. Olfactometry profiles and quantitation of volatile sulfur compounds of Swiss Tilsit cheeses. *J. of Agr. and Food Chem.* 2015, DOI: 10.1021/acs.jafc.5b02536.
- [229] YALMAN, M., GÜNEŞER, Y., KARAGÜL, Y. Evaluation of Some Physical, Chemical and Sensory Properties of Kasar Cheese and Its Processed and Analogue Types. *Journal of Agricultural Sciences*, 2017, URL: <http://dergipark.ulakbim.gov.tr/ankutbd/article/view/5000120610/5000180598>
- [230] SÁDECKÁ, J., KOLEK, E., PANGALLO, D., VALÍK, L., KUČHTA, T. Principal volatile odorants and Dynamics of their formation during the production of May Bryndza cheese. *Food Chemistry*, 2014, DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.10.163.
- [231] VALDIVIELSO, I., BUSTAMANTE, M. A., ALDEZABAL, A. Case study of a commercial sheep flock under extensive mountain grazing> Pasture derived lipid compounds in milk and cheese. *Food Chemistry*, 2016, DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.10.133.
- [232] SIEFARTH, C., BUETTNER, A. The Aroma of Goat Milk> Seasonal Effects and Changes through Heat Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, DOI: 10.1021/jf5040724.

- [233] MORITA, A., ARAKI, T., IKEGAMI, S. Development of Quality Evaluation Model to Predict Sensory Scores from Measured Viscoelastic Characteristics and Aroma Components for Cheddar Cheese. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 2016, DOI: 10.3136/nskkk.63.1.
- [234] RAPISADA, T., PASTA, C., BELVEDERE, G. Variability of volatile profiles in milk from the PDO Ragusano cheese production zone. *Dairy Science & Technology*, 2013, DOI: 10.1007/s13594-012-0104-3.
- [235] ČSN EN ISO 1735:2005 Sýry a sýrové výrobky – Stanovení obsahu tuku – Gravimetrická metoda (Referenční metoda).
- [236] ČSN EN ISO 12966-4 (588767): Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Stanovení methylesterů mastných kyselin plynovou chromatografií – Část 4: Metoda kapilární plynové chromatografie. Praha: Český normalizační institut, 2016.
- [237] MELOUN, M., MILITKÝ, J. *Kompendium štatistického spracovania dat*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2012, 982 s. ISBN 978-80-246-2196-8.
- [238] VÍTOVÁ, E., LOUPANCOVÁ, B., SKLENAŘOVÁ, K., DIVIŠOVÁ, R., BUŇKA, F. Identification of volatile aroma compounds in processed cheese analogues based on different types of fat. *Chemical Papers*, 2013, DOI: 10.2478/s11696-012-0181-z.
- [239] BURDEJOVÁ, L., VÍTOVÁ, E. Assessment of volatile compounds with emphasis on volatile allergens in selected dried medicinal plants using solid phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Chemical Papers*, 2020, vol. 74, no. 2, pp. 1679-1690. DOI: 10.1007/s11696-019-01020-4.
- [240] VÍTOVÁ, E., LOUPANCOVÁ, B., ŠTOUDKOVÁ, H., MACKŮ, I., ZEMANOVÁ, J., BABÁK, L. Effect of fat composition on some physico-chemical parameters and sensorial evaluation of dark chocolate. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2009, vol. 48, no. 2, pp. 72-79.
- [241] SANCHEZ-PALOMO, E., GARCIA-CARPINTERO, E. G., ALONSO-VILLEGAS, R., GONZALEZ-VINAS, M. A. Comparison of dynamics headspace methods used for the analysis of the volatile composition of Spanish PDO ewe's raw milk cheeses. *Le Lait*, 2005, vol. 85, no. 6, pp. 491-513. DOI: 10.1051/lait:2005036.
- [242] DAN, T., WANG, D., JIN, R. L., ZHANG, H. P., ZHOU, T. T., SUN, T. S. Characterization of volatile compounds in fermented milk using solid-phase microextraction methods coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 2017, vol. 100, no. 4, pp. 2488-2500, DOI: 10.3168/jds.2016-11528
- [243] DÜSTERHÖFT, E. M., ENGELS, W., HUPPERTZ, T. Gouda and Related Cheeses. In: FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H., COGAN, T. M., GUINEE, T. P. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1. Cambridge Academic Press, 2004, pp. 865-888. ISBN 978-0-12-263562-3. DOI: 10.1016/b978-0-12-417012-4.00001-6.
- [244] DÜSTERHÖFT, E. M., ENGELS, W., HUPPERTZ, T. 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.

- [245] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin I*. Rozš. a přepřac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, xxii, 580 s. ISBN 9788086659176.
- [246] KOSIKOWSKI, F. V., MOCQUT, G. Le mode de formation de la saveur du fromage. *Progrés de la technologie du fromage. Etudes agricoles de la FAO*. 1958, vol. 38, pp. 151-167.
- [247] HASSAN, F. A. M., ABD EL-GAWARD, M. A. M., ENAB, A. K. 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.
- [248] PAPADAKIS, E. N., POLYCHRONIADOU, A. Application of microwave-assisted extraction method for the extraction of organic acids from Greek cheeses and sheep milk yoghurt and subsequent analysis by ion-exclusion liquid chromatography. *International Dairy Journal*. 2005, vol. 15, no. 2, pp. 165-172, DOI: 10.1016/j.dairyj.2004.06.006.
- [249] THOMSEN, M., MARTIN, CH., MERCIER, F., TOURNAYRE, P., BENDAGUÉ, J. L., THOMAS-DAGUIN, T., GUICHARD, E. Investigating semi-hard cheese aroma: Relationship between sensory profiles and gas chromatography-olfactometry data. *International Dairy Journal*. 2012, vol. 29, no. 1, pp. 41-49. ISSN 0958-6946. DOI: 10.1016/j.dairyj.2016.01.018.
- [250] ZHU, J. C., WANG, L. Y., XIAO, Z. B., NIU, Y. W. Characterization of key aroma compounds in mulberry fruits by application of gas chromatography-olfactometry (GC-O), odor activity (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.
- [251] OLIVEIRA, E. W., ESMERINO, E. A., CARR, B. T. Reformulating Minas Frescal cheese using consumers' perceptions: Insights from intensity scales and check-all-that-apply questionnaires. *Journal of Dairy Science*, 2017, DOI: 10.3168/jds.2016-12508.
- [252] KARAGUL YUCEER, Y., TUNCEL, B., GUNESER, O., ENGIN, B., INLETEN, M., YASAR, K., MENDES, M. 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.
- [253] QIAN, M., REINECCIUS, G. A. 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.
- [254] RUGGIRELLO, M., GIORDANO, M., BERTOLINO, M., FERROCINO, I., COCOLIN, L., DOLCI, P. Study of *Lactococcus lactis* during advanced ripening stages of modal cheeses characterized by GC-MS. *Food Microbiology*. 2018, vol. 74, pp. 132-142. ISSN 0740-0020. DOI: 10.1016/j.fm.2018.03.012

- [255] CURNU, A., RABIAU, N., KONDJAYAN, N., VERDIER-METZ, I., PRADEL, P., TOURNAYRE, P., BERDAGUÉ, J. L., MARTIN, B. 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
- [256] DELAHUNTY, C.M., DRAKE, M.A. Sensory character of cheese and its evaluation. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 2004, DOI: 10.1016/S1874-558X(04)80078-2.

9 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ATP	adenosíntrifosfát
BMK	baktérie mliečneho kvasenia
CAR	karboxén
CCDM	Česká zbierka mliekarenských mikroorganizmov
CoA	koenzým A (Coenzym A)
CW	carbowax
DVB	divinylbenzén
EI	elektrónová ionizácia (Electron Ionization)
FID	plameňovo-ionizačný detektor (Flame-Ionization Detector)
GC	plynová chromatografia (Gas Chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (High-Powered Liquid Chromatography)
HS	headspace
LC	kvapalinová chromatografia (Liquid Chromatography)
LOD	limit detekcie (limit of detection)
LOQ	limit kvantifikácie (limit of quantification)
MO	mikroorganizmy
MK	mastné kyseliny
MS	hmotnostná spektroskopia (Mass Spectrometry)
m/z	podiel hmotnosť a náboj (Mass-to-Charge)
NAD(P)H	nikotínamidadenín-dinukleotid(fosfát)
NBMK	neštartérové baktérie mliečneho kvasenia
O	olfaktometria
PA	polyakrylát
PDPS	polydifenylsiloxán
PDMS	polydimetylsiloxán
PEG	polyetylénglycol
SAL	senzoricky aktívne látky
SAFE	odparovanie flavouru za pomoci rozpúšťadla (Solvent-assisted Flavour Evaporation)
SE	extrakcia rozpúšťadlom
SDE	simultánna destilácia/extrakcia
SFE	superkritická fluidná extrakcia (Supercritical Fluid Extraction)
SPE	extrakcia na pevnej fáze (Solid-Phase Extraction)
SPME	mikroextrakcia pevnou fázou (Solid-Phase Microextraction)
TAG	triacylglycerol
TLC	tenkovrstvá chromatografia (Thin Layer Chromatography)
TS	tavené syry

t. v s.	tuk v sušine
VAK	voľné aminokyseliny
VMK	voľné mastné kyseliny

10 PRÍLOHY

Príloha 1	Prehľad deskriptorov vôní/pachov aktívnych látok – alkoholy	vybraných	senzoricky
Príloha 2	Prehľad deskriptorov vôní/pachov aktívnych látok – aldehydy	vybraných	senzoricky
Príloha 3	Prehľad deskriptorov vôní/pachov aktívnych látok – ketóny	vybraných	senzoricky
Príloha 4	Prehľad deskriptorov vôní/pachov aktívnych látok – mastné kyseliny	vybraných	senzoricky
Príloha 5	Prehľad deskriptorov vôní/pachov aktívnych látok – estery	vybraných	senzoricky
Príloha 6	Prehľad deskriptorov vôní/pachov aktívnych látok – laktóny	vybraných	senzoricky
Príloha 7	Prehľad deskriptorov vôní/pachov aktívnych látok – sírne zlúčeniny	vybraných	senzoricky
Príloha 8	Prehľad deskriptorov vôní/pachov aktívnych látok – terpeny a terpenoidy	vybraných	senzoricky
Príloha 9	Ukážka chromatogramov viazaných MK identifikovaných vo vzorkách syrov v poslednej fáze zrenia (exp I Moravský bochník, 10x riedené); zhora A8, B8, C4 (značenie vzoriek vid' Tabuľka 13).		
Príloha 10	Ukážka chromatogramov prchavých látok identifikovaných vo vzorkách syrov v poslednej fáze zrenia; zhora A8, B8 a C4 (značenie vzoriek vid' Tabuľka 13). Identifikácia vid' Tabuľka 28)		
Príloha 11	Ukážka chromatogramov viazaných MK identifikovaných vo vzorkách syrov v poslednej fáze zrenia (exp. II eidamský syr, 100x riedené); zhora D56, G56, H56 (značenie vzoriek vid' Tabuľka 15)		
Príloha 12	Ukážka chromatogramov prchavých látok identifikovaných vo vzorkách syrov v poslednej fáze zrenia (exp. II eidamský syr); zhora D56, G56, H56 (značenie vzoriek vid' Tabuľka 15). Identifikácia vid' Tabuľka 34		

Príloha 1: Prehľad deskriptorov vôní/pachov vybraných senzoričky aktívnych látok – alkoholy (prevzaté z literatúry)

Názov alkoholu	Deskriptory charakterizujúce vôňu/pach danej zlúčeniny	Referencie
Etanol	Kvetinová, jemná, suchá, alkoholová	[237], [66], [95], [96], [247]
Propán-1-ol	Sladká, vínové tóny	[66], [190]
Propán-2-ol	Ovocná, citrusová, oriešková, alkoholová	[66], [255]
Propán-1,3-diol	Syrová	[66]
2-metylpropán-1-ol	Ovocná, alkoholová, varová, čokoládová, vôňa whisky, zápach plastu	[53], [66], [93],
Bután-1-ol	Sladká, zápach rozpúšťadla	[93]
Bután-2-ol	Ovocná, sladká, vínové tóny, zápach plastu	[93], [190]
Bután-2,3-diol	Ovocná, maslová, orechová, zápach kyslého mlieka	[86], [87], [93]
2-metylbután-1-ol	Ovocná, alkoholová, kovová, zápach plastu, zápach rozpúšťadla	[93], [255], [243]
3-metylbután-1-ol	Ovocná, jemná, kvetinová, bylinná, alkoholová, čokoládová, vôňa whisky, spálená, zápach chodidiel	[42], [93], [247], [250], [243]
3-metylbut-2-én-1-ol	Ovocná, syrová, vôňa zelene	[66]
2-metylbut-3-én-2-ol	Mandľová, sladová	[93]
Pentán-1-ol	Ovocná, jemná, alkoholová, vôňa zelene, vôňa Balsamica	[66], [95], [250]
2-metylpentán-3-ol	Grilovaná, vôňa chleba	[93]
Pent-1-én-3-ol	Sladká	[93]
Hexán-1-ol	Bylinná, vôňa zelene	[66], [250]
2-etylhexán-1-ol	Vôňa zelene, zápach lepenky, zvierací pach	[247], [250]
Hex-3-én-1-ol	Vôňa trávy	[250]
Heptán-2-ol	Ovocná, bylinná, vôňa zelene, vôňa pôdy, suchá, olejovitá, kovová	[98], [88], [93], [252], [253]
Oktán-2-ol	Vôňa zelene	[95]
Okt-1-én-3-ol	Hubová, kovová	[85], [250]
Okta-1,5-dién-3-ol	Vôňa pôdy	[66]
Nonán-2-ol	Vôňa zelene, masťná	[66]
Non-1-én-3-ol	Hubová	[109]
Benzylalkohol	Ovocná, kvetinová, vôňa ruží, vôňa sušienok	[93], [97]

Príloha 1: Prehľad deskriptorov vôní/pachov vybraných senzoričky aktívnych látok – alkoholy (prevzaté z literatúry) - pokračovanie

Názov alkoholu	Deskriptory charakterizujúce vôňu/pach danej zlúčeniny	Referencie
2-fenyletanol	Sladká, ovocná, kvetinová, vôňa ruží, vôňa fialiek, vínové tóny	[66], [98], [93], [96]
Fenol	Pikantná, dymová, kovová, zatuchnutá, fekálna	[93], [93]
3-metylfenol (m-kresol)	Ovčia, grilovaná	[93]
3-propylfenol	Zápach dezinfekcie	[171]
4-metylfenol (p-kresol)	Fenolický, pach kravská, fekálna	[93], [243]
4-etylfenol	Bylinná, vôňa dreva, vôňa slaniny, dymová	[98]

Príloha 2: Prehľad deskriptorov vôní/pachov vybraných senzoričky aktívnych látok – aldehydy (prevzaté z literatúry)

Názov aldehydu	Deskriptory charakterizujúce vôňu/pach danej zlúčeniny	Referencie
Metanál	Štiplavá, ostrá	[147]
Etanál (Acetaldehyd)	Sladká, jablčná, vôňa trávy, vôňa zelene, ostrá, štiplavá, prenikavý	[66], [147], [95], [252]
Propanál	Štiplavá	[147]
Prop-2-énál	Syrová	[66]
2-metylpropanál (Isobutanál)	Sladká, kvetinová, čokoládová, oriešková, maslová, syrová, vôňa popcornu, vôňa suchého salámu, sladová, vôňa zelene, štiplavá	[66], [147], [85], [88], [93], [109], [96], [255]
Butanál	Zápach ovčieho tuku	[255]
2-metylbutanál	Ovocná, sladká, čokoládová, oriešková, mandľová, ľahko karamelová, syrová, sladová, vôňa zelene, kyslá	[66], [171], [85], [86], [88], [252], [250]
3-metylbutanál (Isopentanál)	Ovocná, sladká, jablčná, čokoládová, oriešková, syrová, sladová, bylinná, vôňa zelene, štiplavá	[66], [79], [85], [88], [93], [109], [243], [250],
3-metylbut-2-énál	Bylinná, kovová	[95]
Pentanál	Pomarančová, mandľová, sladová, bylinná, vôňa trávy, štiplavá, prenikavý	[66], [147], [109], [250]
Pent-2-énál	Kvetinová, vôňa zelene, masťná	[147], [255]

Príloha 2: Prehľad deskriptorov vôní/pachov vybraných sensoricky aktívnych látok – aldehydy (prevzaté z literatúry) - pokračovanie

Názov aldehydu	Deskriptory charakterizujúce vôňu/pach danej zlúčeniny	Referencie
Hexanál	Ovocná, jablčná, citrónová, bylinná, vôňa zelene, vôňa trávy, lojovitý	[93], [109], [247] [252], [250]
Hex-3-énál	Vôňa zelene	[147]
Hexa-2,4-diénál	Vôňa zelene, tuková	[250]
Heptanál	Ovocná, sladká, citrusová, bylinná, vôňa zelene, mydlová, tuková, zatuchnutá	[66], [95], [109], [252], [250], [255]
Hept-2-énál	Olejovitá, masná	[147]
Hept-4-énál	Vôňa sušienok, zápach zažltnutého tuku, kovová	[66], [93], [252]
Hepta-2,4-diénál	Olejovitá, masná, zápach po smaženom tuku	[78], [147]
Oktanál	Ovocná, citrusová, pomarančová, citrónová, grapefruitová, vôňa zelene, masná, tuková	[66], [109], [247], [252], [250], [255]
Okt-2-énál	Ovocná, oriešková, vlašské orechy, cibuľová, tuková	[147], [88], [250]
Nonanál	Ovocná, sladká, citrusová, hrášková, bylinná, vôňa zelene, vôňa trávy, masná, tuková, kožená, zápach plastu	[66], [93], [95], [109], [247], [252]
Non-2-énál	Uhorková, vôňa zelene, vôňa dreva, vôňa sena, masná, tuková, lojovitý, zápach lepenky	[171], [127], [96], [252], [250]
Nona-2,4-diénál	Ovocná, uhorková, sladko-drievková, tuková, smažená	[66], [88], [93], [250]
Nona-2,6-diénál	Uhorková, maslová, melónová, vôňa zelene, smažená, masná, mydlová, vosková	[66], [147], [88], [252], [250]
Nona-3,6-diénál	Uhorková	[147]
Dekanál	Oriešková, vôňa zelene	[66]
Deka-2,4-diénál	Sladká, vôňa zelene, grilovaná, smažená, kovová	[78], [147], [93], [93]
Deka-2,4,7-triénál	Zápach rybieho tuku	[147]
Dodeka-2,4-diénál	Mliečna	[66]
Hexadekanál	Chemický, fekálna	[93]
Benzaldehyd	Čerešňová, vôňa chleba, horko mandľová, spálená	[98], [190], [247], [250]
2-fenyletánál (Fenylacetaldehyd)	Sladká, medová, kvetinová, vôňa ruží, vôňa sedmokrásky, karamelová, pražená	[66], [78], [98], [88]

Príloha 3: Prehľad deskriptorov vôní/pachov vybraných senzoricky aktívnych látok – ketóny (prevzaté z literatúry)

Názov ketónu	Deskriptory charakterizujúce vôňu/pach danej zlúčeniny	Referencie
Propán-2-ón (Acetón)	Ovocná, sladká, vôňa sena, zápach kyslého mlieka, zápach buničiny	[66], [95], [252]
Bután-2-ón	Ovocná, sladká, maslová, zápach laku, zápach odpadkov	[98], [93], [95]
1-hydroxybután-2-ón	Kvetinová, bylinná	[93]
3-hydroxybután-2-ón (Acetoín)	Kvetinová, maslová, karamelová, zápach kyslého mlieka	[86], [88], [93], [247]
Bután-2,3-dión (Biacetyl)	Sladká, oriešková, maslová, karamelová, vanilková	[171], [98], [88], [247], [252]
Pentán-2-ón	Ovocná, sladká, karamelová, syrová, vôňa pomarančové šupky, zatuchnutá	[66], [88], [93], [95]
3-hydroxypentán-2-ón	Bylinná, vôňa pôdy, vôňa hl'uzovka	[66]
3-metylpentán-2-ón	Vôňa bonbónov	[66]
Pentán-2,3-dión	Maslová, krémová, karamelová, vanilková	[78], [90], [93], [109]
Hexán-2-ón	Ovocná, kvetinová, nemocniční zápach	[93], [95]
Hex-1-én-3-ón	Zápach plastu	[109]
Heptán-2-ón	Sladká, kvetinová, vôňa plesňového syra, masná, plesnivý, zápach laku, zápach plastu	[66], [171], [93], [93], [252]
6-metylhept-5-én-2-ón	Vôňa dreva, vôňa machu	[96]
Oktán-2-ón	Ovocná, kvetinová, vôňa trávy	[66], [171]
6-metyloktán-2-ón	Vôňa dreva, vôňa machu	[96]
Oktán-3-ón	Ovocná, hubová, vôňa pôdy	[66], [95]
Okt-1-én-3-ón	Silná hubová, vôňa pôdy	[66], [95]
Okta-1,5-dién-3-ón	Zápach plastu, olejovitá, masná, kovová	[147], [109]
Nonán-2-ón	Ovocná, kvetinová, čajová, broskyňová, syrová, hubová, vôňa pôdy, vôňa trávy, vôňa maggi, vôňa plesňového syra, masná, zápach zhnitého jablka	[66], [171], [98], [86], [96], [252]
Non-1-én-3-ón	Hubová	[247]
Non-8-én-2-ón	Pečená, údená, vôňa plesňového syra	[66], [98]
Dekán-2-ón	Ovocná, kvetinová	[66]
Undekán-2-ón	Ovocná, kvetinová, bylinná, vôňa ruží, plesnivá	[66], [95]

Príloha 3: Prehľad deskriptorov vôní/pachov vybraných senzoričky aktívnych látok – ketóny (prevzaté z literatúry) - pokračovanie

Názov ketónu	Deskriptory charakterizujúce vôňu/pach danej zlúčeniny	Referencie
Tridekán-2-ón	Bylinná, korenená, kyslá, nepríjemná, kozia	[66], [93]
Pentadekán-2-ón	Vlhká	[66]
Acetofenón	Vôňa varenej ryže	[93]

Príloha 4: Prehľad deskriptorov vôní/pachov vybraných senzoričky aktívnych látok – MK (prevzaté z literatúry)

Názov MK	Deskriptory charakterizujúce vôňu/pach danej zlúčeniny	Referencie
Kyselina etánová (octová)	Octová, drsná, prenikavá, ostrá, kyslá	[171], [93], [95], [247], [252]
Kyselina propánová (propiónová)	Ovocná, kvetinová, syrová, kyslé mlieko, ostrá, kyslá, prenikavá, spálená, sírna, zápach chodidiel, rozpúšťadla	[66], [87], [95], [247]
Kyselina 2-metylpropánová (isomaslová)	Ovocná, sladká, syrová, maslová, karamelová, horko mandľová, kyslá, štiplavá, zatuchnutá, zápach zažltnutého masla, zápach zhnitého ovocia, zápach potu, zápach zvratkov	[78], [87], [88], [93], [93], [96], [247]
Kyselina butánová (maslová)	Ovocná, sladká, syrová, gaštanová, kyslá, nepríjemná, ostrá, zatuchnutá, hnilá, fekálna, zápach kvasenia, zápach potu, zápach chodidiel, zápach zvratkov	[66], [171], [98], [87], [93], [109], [96], [247], [252]
Kyselina 2-metylbutánová (2-metylmaslová)	Ovocná, syrová, ovčia, kozia, vosková, ostrá, kyslá, zatuchnutá, fekálna, zápach potu, zápach zhnitého ovocia	[66], [78], [98], [87], [93], [93], [247]
Kyselina 3-metylbutánová (isovalérová)	Syrová, mierna, kyslá, nepríjemná, ostrá, zatuchnutá, fekálna, zápach zhnitého ovocia, zápach potu, zápach chodidiel, zápach zvratkov	[66], [98], [88], [95], [247], [255]
Kyselina 2-etylbutánová (2-etylmaslová)	Ovocná, príjemná	[87]
Kyselina pentánová (valérová)	Oriešková, syrová, zeleninová, korenená, vôňa dreva, vôňa obilia, vôňa zelene, nepríjemná, kyslá, zápach potu	[66], [171], [87], [93], [97], [247]
Kyselina 4-metylpentánová (isokaprónová)	Syrová, bylinná, kyslá, štiplavá	[88], [93]

Príloha 4: Prehľad deskriptorov vôní/pachov vybraných senzoričky aktívnych látok – MK (prevzaté z literatúry) - pokračovanie

Názov MK	Deskriptory charakterizujúce vôňu/pach danej zlúčeniny	Referencie
Kyselina hexánová (kaprónová)	Syrová, kyslá, masťná, prenikavá, ostrá, štipľavá, kozia, pach potu, pach chodidiel, spálená, fekálna	[98], [87], [93], [93], [95],
Kyselina heptánová (enenthová)	Syrová, mydlová, kozia, zatuchnutá, fekálna	[171], [87], [93]
Kyselina oktánová (kaprylová)	Údená, nepríjemná, masťná, mydlová, vosková, kaučuková, zatuchnutá, kozia, hnilobná, zápach potu, zápach čistiacich prostriedkov, fekálna	[66], [98], [84], [87], [88], [93], [93],
Kyselina 4-metyloktánová (4-metylkaprylová)	Kozia	[66]
Kyselina 4-etyloktánová (4-etylkaprylová)	Kozia	[66]
Kyselina nonánová (pelargónová)	Ovocná, bylinná, masťná, kozia, spálená, zatuchnutá, fekálna	[66], [98], [93], [93],
Kyselina dekánová (kaprínová)	Vôňa trávy, vôňa kyslého ovocia, masťná, vosková, kozia, nepríjemná, spálená	[66], [98], [88], [93], [93]
Kyselina dec-9-énová (kaprolejová)	Sladká, kvetinová, vôňa zelene	[87], [93]
Kyselina undekánová (undecylová)	Mydlová, vosková	[87]
Kyselina dodekánová (laurová)	Vôňa horkého mlieka, mydlová, masťná, vosková, kovová	[66], [87], [88], [93]
Kyselina tetradekánová (myristová)	Masťná, hnilobná, zápach potu, zvierací pach	[66], [88]
Kyselina fenyletánová (fenyloctová)	Sladká, medová, vôňa ruží	[66], [93]
Kyselina fenylpropánová (fenylpropiónová)	Kvetinová	[66]

Príloha 5: Prehľad deskriptorov vôní/pachov vybraných senzoricke aktívnych látok – estery (prevzaté z literatúry)

Názov esteru	Deskriptory charakterizujúce vôňu/pach danej zlúčeniny	Referencie
Metyl-butyrát	Ovocná, sladká, jablčná	[171], [250]
Metyl-2-metylbutyrát	Sladká, kvetinová, hroznová, karamelová	[66], [97], [250]
Metyl-3-metylbutyrát	Medová	[147]
Metyl-hexanoát (Metyl-kapronát)	Ovocná, jablčná, ananásová, lieskovoriešková, karamelová, vôňa horkého mlieka	[147], [252], [250], [255]
Metyl-oktanoát (Metyl-kaprylát)	Karamelová, vôňa Balsamica, vôňa exotických kvetov	[98]
Metyl-dekanoát (Metyl-kaprinát)	Ovocná, kvetinová, kokosová, bylinná	[93]
Etyl-acetát	Ovocná, ananásová, jablčná, spálená	[66], [93]
Etyl-2-metylpropionát	Vôňa nezrelého ovocia, vôňa zelene	[66]
Etyl-butyrát	Ovocná, sladká, kvetinová, jablčná, kokosová, banánová, vôňa žuvačky	[171], [88], [93], [95], [97], [252], [250]
Etyl-2-metylbutyrát	Ovocná, sladká	[66], [93]
Etyl-3-metylbutyrát	Ovocná, olivová, syrová	[66], [93], [93]
Etyl-pentanoát (Etyl-valerát)	Ovocná, sladká, melónová	[171], [93], [252]
Etyl-hexanoát (Etyl-kapronát)	Ovocná, sladká, kvetinová, jahodová, jablčná, melónová, pomarančová, kokosová, ananásová, banánová	[171], [88], [93], [93], [95], [96], [255]
Etyl-oktanoát (Etyl-kaprylát)	Ovocná, sladká, kvetinová, jablčná, pomarančová, ananásová, hrušková, banánová, karamelová, vôňa pôdy, mydlová, spálená	[66], [98], [93], [93], [95], [250]
Etyl-nonanoát	Ovocná, syrová	[93]
Etyl-dekanoát (Etyl-kaprinát)	Ovocná, kvetinová, jablčná, hroznová, vôňa brandy, zápach rozpúšťadla	[98], [250]
Etyl-dodekanoát (Etyl-laurát)	Kvetinová, vanilková	[93]
Etyl-benzoát	Kvetinová, arašidová, grilovaná	[66], [93]
Etyl-laktát	Mandarínková	[147]
Propyl-butyrát	Ovocná, sladká	[66], [93]

Príloha 5: Prehľad deskriptorov vôní/pachov vybraných senzoričky aktívnych látok – estery (prevzaté z literatúry) - pokračovanie

Názov esteru	Deskriptory charakterizujúce vôňu/pach danej zlúčeniny	Referencie
Propyl-oktanoát (Propyl-kaprylát)	Bylinná	[97]
Butyl-acetát	Citrónová, ananásová, zápach rozpúšťadla	[147], [95], [97]
Butyl-2-metylpropionát	Ananásová	[147]
Butyl-pentanoát (Butyl-valerát)	Jablčná	[147]
Butyl-hexanoát (Butyl-kapronát)	Ovocná, kvetinová	[93]
Isobutyl-acetát	Vôňa žuvačky	[93]
Isobutyl-butykrát	Ovocná	[66]
Isobutyl-oktanoát (Isobutyl-kaprylát)	Ovocná	[98]
Pentyl-acetát	Ovocná, hrušková	[66], [147]
Pentyl-oktanoát (Pentyl-kaprylát)	Vôňa brandy, vôňa whisky	[147]
Isoamyl-acetát	Ovocná, sladká, banánová	[66]
Isoamyl-butykrát	Ovocná, sladká, karamelová	[98]
Isoamyl-hexanoát (Isoamyl-kapronát)	Sladká, medová, mäťová, vôňa divokej ruže	[66], [98]
Hexyl-acetát	Ovocná, vôňa červených bobúľ	[250]
2-fenyletyl-acetát	Sladká, kvetinová, bylinná, vôňa ruží	[66], [98], [42]
2-fenyletyl-butykrát	Kvetinová	[42]
S-metyl-thioacetát	Vôňa vareného karfiolu	[87]
S-metyl-thiopropionát	Syrová	[87]
S-metyl-thiobutykrát	Vôňa pažitky	[87]
Allyl-hexanoát (Allyl-kapronát)	Ananásová	[147]

Príloha 6: Prehľad deskriptorov vôní/pachov vybraných senzoričky aktívnych látok – laktóny (prevzaté z literatúry)

Názov laktónu	Deskriptory charakterizujúce vôňu/pach danej zlúčeniny	Referencie
γ -butyrolaktón	Sladká, lieskovoriešková, slabo maslová, karamelová, vôňa horkého mlieka	[147], [255]
γ -hexalaktón	Sladká, kokosová, zeleninová, pečená	[171], [93], [93]
γ -heptalaktón	Ovocná, sladká, vôňa zelene	[247], [255]
γ -oktalaktón	Sladká, kokosová, melónová	[171]
δ -oktalaktón	Ovocná, sladká, kvetinová, broskyňová, kokosová, kozia	[66], [93], [97]
γ -nonalaktón	Ovocná, sladká, kvetinová, kokosová, bylinná, maslová, karamelová	[93], [93], [250]
γ -dekalaktón	Ovocná, kvetinová, marhuľová, broskyňová, jahodová, krémová	[147], [93], [93]
δ -dekalaktón	Sladká, kvetinová, kokosová, broskyňová, maslová, krémová	[66], [98], [90]
γ -dodekalaktón	Ovocná, sladká, broskyňová, slivková, kokosová, maslová	[147], [93], [95], [252]
(Z)- γ -dodek-6-énolaktón	Sladká, citrónová, broskyňová, karamelová	[66]
δ -dodekalaktón	Ovocná, sladká, bylinná, marhuľová, broskyňová, mandľová, kokosová, maslová, syrová	[66], [171], [93]

Príloha 7: Prehľad deskriptorov vôní/pachov vybraných senzoričky aktívnych látok – sírne zlúčeniny (prevzaté z literatúry)

Názov sírnej zlúčeniny	Deskriptory charakterizujúce vôňu/pach danej zlúčeniny	Referencie
Metántiol	Vôňa varenej kapusty, sírna, cesnaková, kyslá kapusta, benzínová	[171], [87], [252], [250]
Etántiol	Sírna, cesnaková	[250]
Propántiol	Sírna, cesnaková	[250]
2-metylthioetanol	Vôňa kuracieho vývaru, vôňa pečeného kurat'a, sírna	[171], [250]
3-metylthiopropánál (Metionál)	Vôňa varených zemiakov, vôňa pôdy, cibuľová, štipľavá	[98], [88], [250]
Allylmetylsulfid	Mierne sírna, cesnakový, pikantná	[171]
Dimetylsulfid	Vôňa kapusty/kukurice, sírna, pokazený cesnaku	[66], [87], [252]
Diallyldisulfid	Sírna, cesnaková	[147], [93]

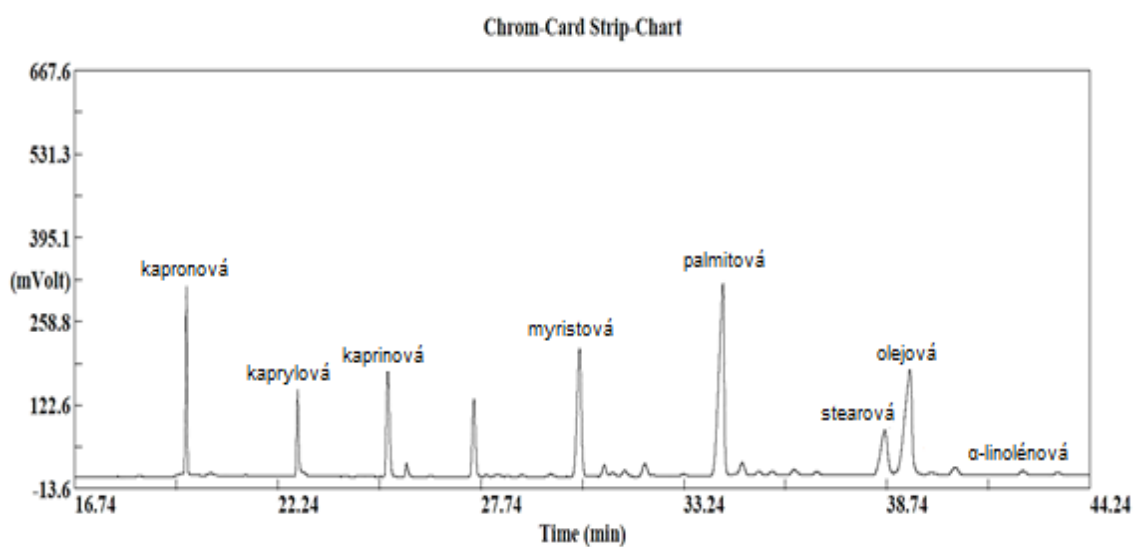
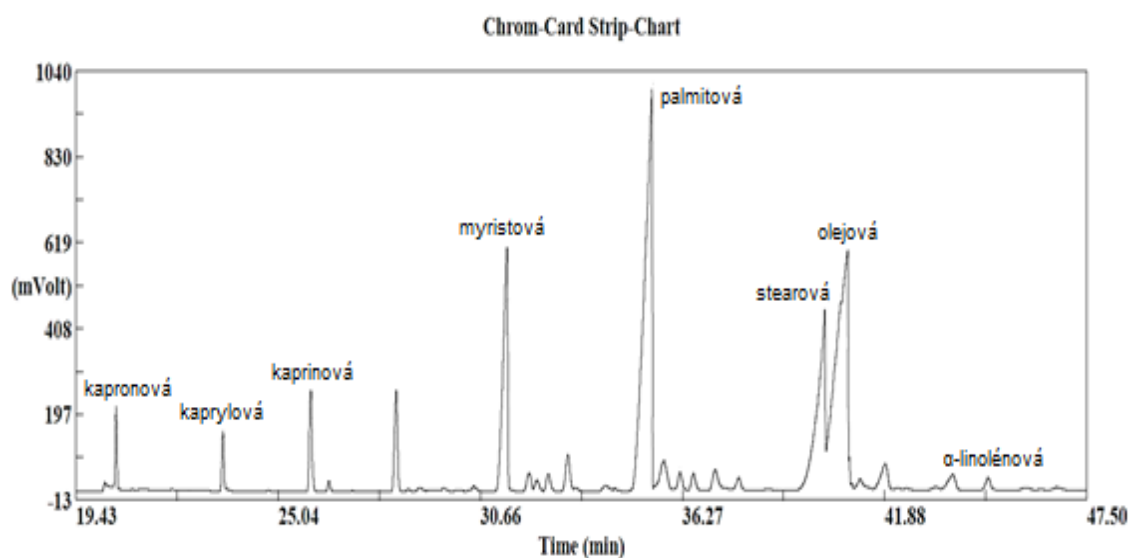
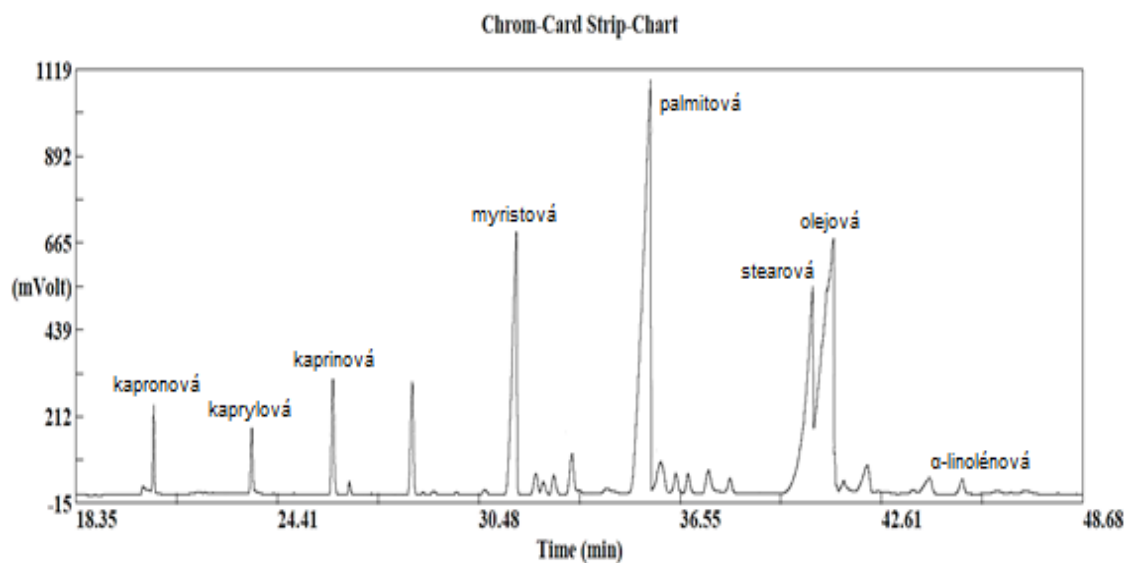
Príloha 7: Prehľad deskriptorov vôní/pachov vybraných sensoricky aktívnych látok – sírne zlúčeniny (prevzaté z literatúry) - pokračovanie

Názov sírnej zlúčeniny	Deskriptory charakterizujúce vôňu/pach danej zlúčeniny	Referencie
Dimetyldisulfid	Vôňa varenej kapusty/vareného karfiolu, sírna, cesnakový, cibuľová	[66], [86], [87], [95]
Dimetyltrisulfid	Zeleninová, vôňa trávy/zeleru/brokolice, vôňa vareného karfiolu/ kapusty/kukurice, sírna, cesnakový, cibuľová, štiplavá, hnilobná	[66], [171], [87], [88], [93], [109]
Dimetyltetrasulfid	Vôňa varenej kapusty, cesnaková, karfiolová, hnilobná	[66], [171]
Dietyldisulfid	Vôňa dreva	[93]
Dimetylsulfón	Vôňa horkého mlieka, sírna, spálená	[66]

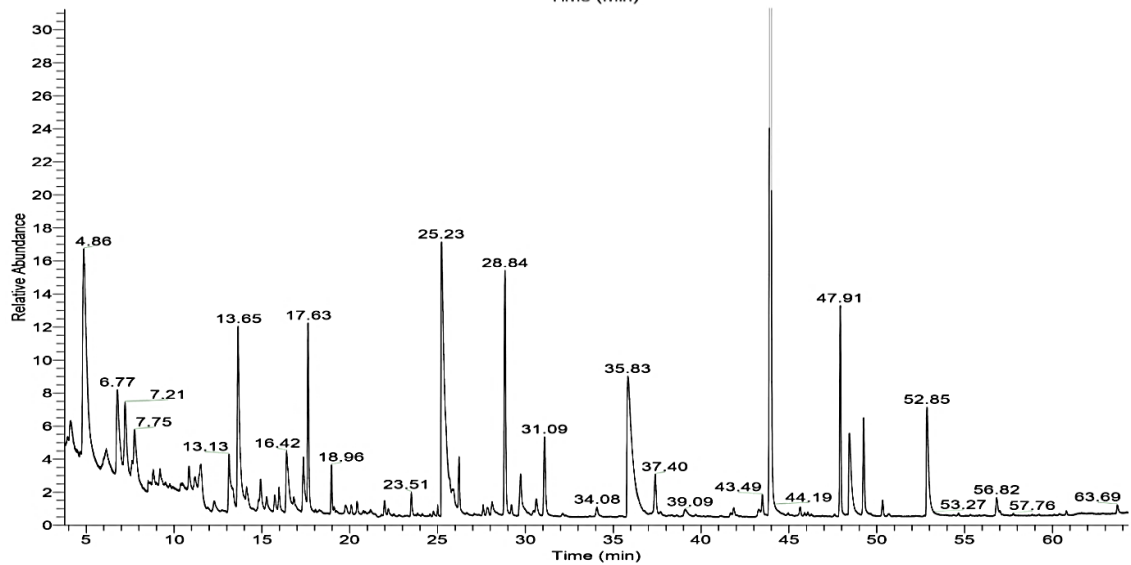
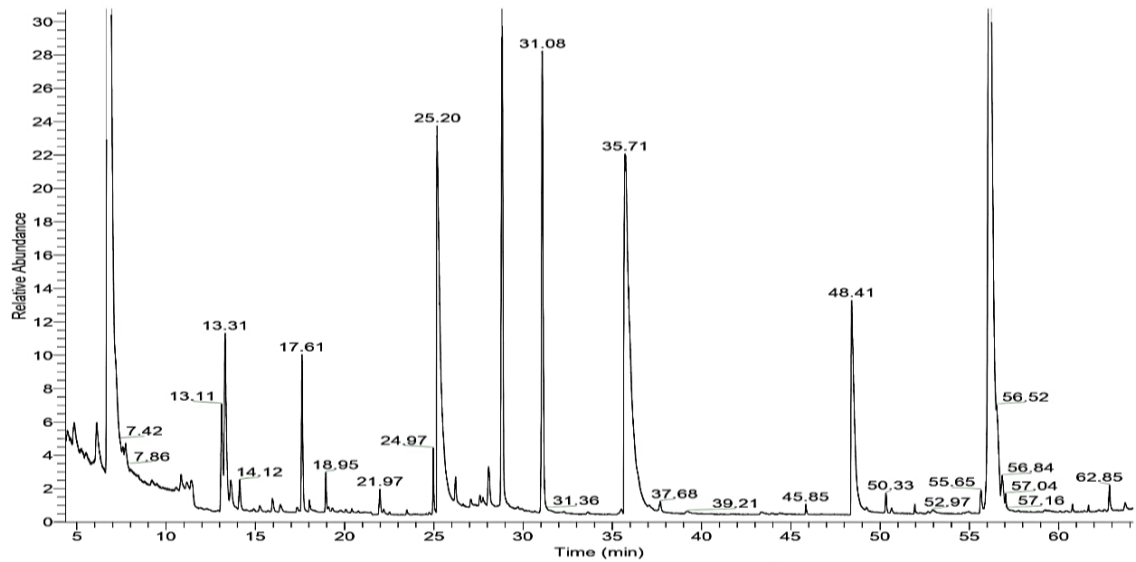
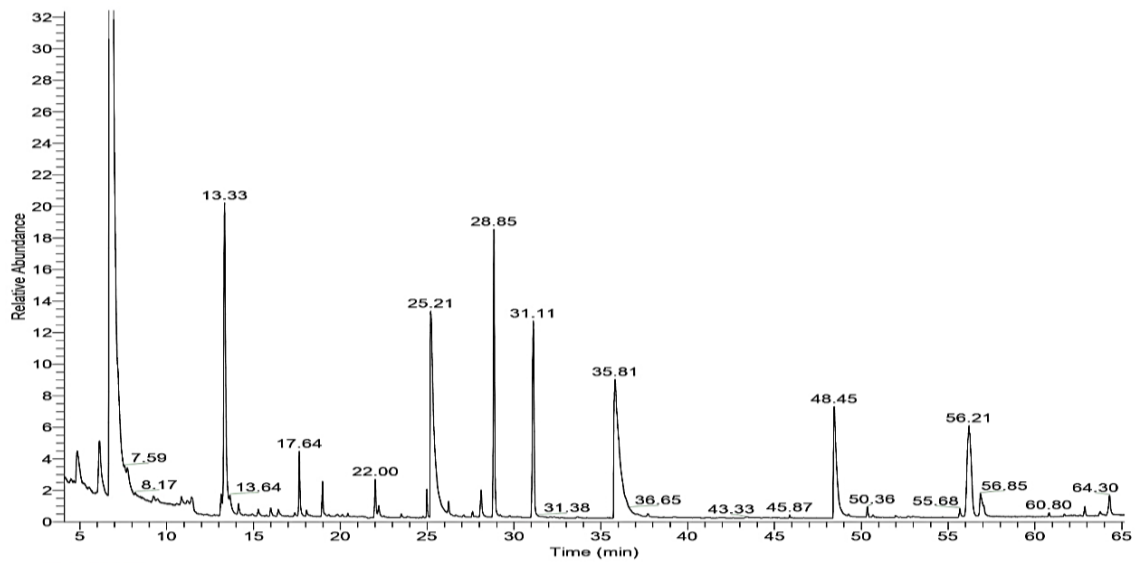
Príloha 8: Prehľad deskriptorov vôní/pachov vybraných sensoricky aktívnych látok – terpény a terpenoidy (prevzaté z literatúry)

Názov terpenoidu	Deskriptory charakterizujúce vôňu/pach danej zlúčeniny	Referencie
Linalool	Sladká, kvetinová, citrusová, pomarančová	[66], [97]
Isoborneol	Terpénovitá	[66]
β -damascenón	Ovocná, sladká, kvetinová, jablčná, broskyňová	[66], [93], [97]
β -ionón	Kvetinová, vôňa dreva	[97]
L-karvón	Bylinná, kmínova	[66], [147]
D-limonén	Mätová	[93]
Citral	Citrónová, horkosladá, silná	[146]
Citronellol	Vôňa ruží	[146]

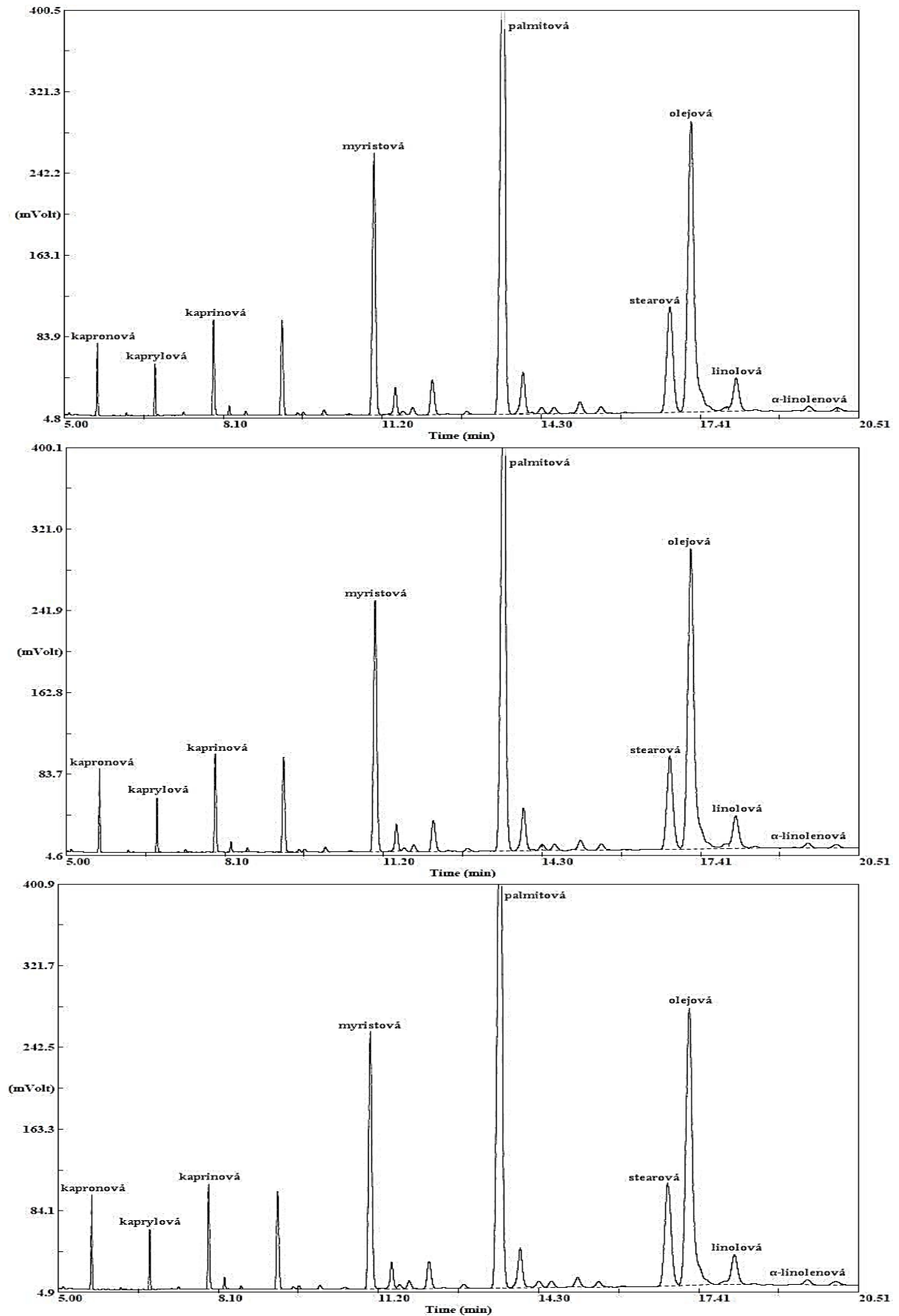
Príloha 9: Ukážka chromatogramov viazaných MK identifikovaných vo vzorkách syrov v poslednej fáze zrenia (exp I Moravský bochnik, 10x riedené); zhora A8, B8, C4 (značenie vzoriek vid' Tabuľka 13).



Príloha 10: Ukážka chromatogramov prchavých látok identifikovaných vo vzorkách syrov v poslednej fáze zrenia (exp I Moravský bochník); zhora A8, B8 a C4 (značenie vzoriek vid' Tabuľka 13). Identifikácia vid' Tabuľka 28)



Príloha 11: Ukážka chromatogramov viazaných MK identifikovaných vo vzorkách syrov v poslednej fáze zrenia (exp. II eidamský syr, 100x riedené); zhora D56, G56, H56 (značenie vzoriek vid' Tabuľka 15)



Príloha 12: Ukážka chromatogramov prchavých látok identifikovaných vo vzorkách syrov v poslednej fáze zrenia (exp. II eidamský syr); zhora D56, G56, H56 (značenie vzoriek vid' Tabuľka 15). Identifikácia vid' Tabuľka 34

