



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

ZMĚNY SENZORICKÉ KVALITY A PROFILU TĚKAVÝCH LÁTEK SÝRŮ ZRAJÍCÍCH POD MAZEM V PRŮBĚHU SKLADOVÁNÍ

CHANGES IN THE SENSORY QUALITY AND VOLATILE COMPOUNDS PROFILE OF SMEAR RIPENED
CHEESE DURING STORAGE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Adéla Šebestová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1983/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Adéla Šebestová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Chemie a analýza přírodních látek
Vedoucí práce: **doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Změny sensorické kvality a profilu těkavých látek sýrů zrajících pod mazem v průběhu skladování

Zadání bakalářské práce:

- Zpracujte literární rešerši dané problematiky: sýry zrající pod mazem – technologie výroby, sensorické vlastnosti, těkavé látky, mikrobiální profil a možnosti jejich stanovení.
- Pomocí vhodných metod sledujte sensorickou kvalitu a profil těkavých látek komerčních vzorků sýrů zrajících pod mazem během skladování.
- Stanovte mikrobiální profil sýrů a posuďte vliv mikrobiálního složení na uvedené parametry a jejich změny během skladování.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:

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

Adéla Šebestová
studentka

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá změnami sensorické kvality, profilu těkavých látek a mikrobiálního profilu dvou sýrů zrajících pod mazem, Olomouckých tvarůžků a Romaduru, během jejich skladování po dobu čtyř týdnů.

Senzorická analýza, konkrétně hodnocení vzhledu, barvy, textury, vůně a chuti, prokázala rozdíly mezi oběma sýry, které se zvětšovaly v průběhu skladování (dozrávání). Největší rozdíly byly zaznamenány v hodnocení chuti, u tvarůžků se během prozrávání zlepšovala, u Romaduru naopak zhoršovala.

Analýza těkavých látek pomocí headspace mikroextrakce na pevnou fázi ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostní detekcí odhalila přítomnost 57 látek, patřících do 9 chemických skupin. Složení sýrů se lišilo z hlediska počtu i obsahu sloučenin, nejpočetnější byly alkoholy, ketony a kyseliny. V Romaduru kvantitativně převažovaly estery, v tvarůžcích sirné sloučeniny. Během dozrávání se celkové množství těkavých látek v tvarůžku zvyšovalo, u Romaduru tomu bylo naopak.

Mikrobiální rozbor prokázal přítomnost rozmanitého mikrobiomu na povrchu sýrů. Mezi mikrobiálním složením sýrů byly mírné rozdíly. Nebyla dokázána změna mikrobiomu v průběhu zrání. Metoda qPCR byla použita pro identifikaci přítomných mikroorganismů.

KLÍČOVÁ SLOVA

sýry zrající pod mazem, mikrobiální profil, sensorická kvalita, těkavé látky, PCR, SPME, GC-MS

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the changes in sensory quality, volatile compounds profile and microbial profile of two smear ripened cheese, Olomoucké tvarůžky and Romadur, during their storage for four weeks.

The sensory analysis, specifically the assessment of appearance, colour, texture, aroma and taste, showed differences between the two cheese, which increased during storage (ripening). The greatest differences were observed in the assessment of taste, which improved during ageing for Olomoucké tvarůžky and deteriorated for Romadur.

Analysis of volatile compounds by headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography and mass detection revealed the presence of 57 substances belonging to 9 chemical groups. The composition of the cheeses varied in terms of number and content of compounds, with alcohols, ketones and acids being the most abundant. In Romadur, esters predominated quantitatively, and in Olomoucké tvarůžky, sulphur compounds. The total amount of volatile substances in tvarůžky increased during maturation, whereas the opposite was true for Romadur.

Microbial analysis showed the presence of a diverse microbiome on the surface of the cheese. There were slight differences between the microbial composition of the cheese. There was no evidence of change in the microbiome during ripening. The qPCR method was used to identify the microorganisms present.

KEYWORDS

smear ripened cheese, microbial profile, sensory quality, volatile compounds, PCR, SPME, GC-MS

ŠEBESTOVÁ, Adéla. *Změny senzorické kvality a profilu těkavých látek sýrů zrajících pod mazem v průběhu skladování* [online]. Brno, 2024 [cit. 2024-05-20]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156585>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Vítová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Evě Vítové, Ph. D. a své konzultantce Ing. Štěpánce Trachtové, Ph. D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování této práce věnovaly. Velké díky patří i mé rodině a blízkým za podporu během studia.

OBSAH

1	ÚVOD.....	5
2	TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1	Sýry zrající pod mazem	6
2.1.1	Spotřeba sýrů v České republice	6
2.2	Technologie výroby sýrů zrajících pod mazem	7
2.2.1	Technologie výroby tvarůžků	8
2.2.2	Technologie výroby Romaduru	8
2.3	Zrání sýrů	9
2.4	Mikrobiologický profil sýrů zrajících pod mazem	9
2.4.1	Bakterie (sekundární mikrobiota).....	10
2.4.2	Kvasinky.....	11
2.4.3	Kontaminanty	11
2.4.4	Mikrobiologická kontrola kvality.....	12
2.5	Senzorické vlastnosti sýrů zrajících pod mazem	14
2.5.1	Funkční role mazové kultury.....	14
2.6	Aromatické látky sýrů.....	15
2.7	Metody pro stanovení těkavých látek	16
2.7.1	Extrakční techniky.....	16
2.7.2	Chromatografické metody	17
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
3.1	Laboratorní vybavení.....	19
3.1.1	Chemikálie	19
3.1.2	Kultivační média	19
3.1.3	Přístroje	19
3.1.4	Pracovní pomůcky	20
3.1.5	Roztoky	20
3.2	Analyzované vzorky	21
3.3	Použité metody	23
3.3.1	Chromatografické stanovení těkavých látek	23
3.3.2	Senzorická analýza	24
3.3.3	Stanovení mikrobiálního profilu	24
3.3.4	Agarosová gelová elektroforéza.....	29

4	VÝSLEDKY A DISKUZE	30
4.1	Senzorická analýza.....	30
4.1.1	Vizuální změny při skladování vzorků sýra	30
4.1.2	Senzorické hodnocení	33
4.1.3	Změny během skladování (dozrávání)	37
4.2	Stanovení těkavých látek	39
4.3	Mikrobiální profil sýrů.....	44
4.3.1	Kultivační vyšetření	44
4.3.2	Izolace DNA, spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty	48
4.3.3	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase	50
5	ZÁVĚR.....	54
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	56
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	60
8	PŘÍLOHY	61

1 ÚVOD

Výroba sýru, fermentované potraviny na bázi mléka, umožňuje nejen zachování (bioprezervaci) nutričně bohatého produktu pro výživu člověka v lépe přepravitelné podobě, ale zároveň transformuje mléko na potravinu s lepší stravitelností. Sýr obecně nese velkou výživovou hodnotu, díky vysokému obsahu bílkovin, tuků, vitaminů (A, B2, B12 a v menší míře folátu, neboli kyseliny listové), esenciálních aminokyselin, minerálů (vápník, fosfor, hořčík, s malým obsahem železa a chloridu sodného) a nízkému obsahu sacharidů (v stopových množstvích). Celkově lze říct, že výroba sýra představuje efektivní způsob, jak přeměnit mléko na potravinu s vynikající výživovou hodnotou.

Pastevci v Alpách vyráběli z mléka získaného od pasoucích se krav na vymezeném prostoru v horách typické sýry ve tvaru velkých bochníků s tvrdou kůrkou a přítomností ok. Tyto sýry se vyznačují svým dlouhým zráním, nízkým obsahem vlhkosti a dlouhou trvanlivostí, proto jim bylo umožněno tyto bochníky dopravovat z hor do údolí a absolvovat dlouhé cesty. Oproti tomu měkké zrající sýry byly menší velikosti s měkkou strukturou vhodné pro prodej na vesnicích a domácí spotřebu, nemusely tím pádem podstupovat dlouhé cesty.

Ve Francii vznikaly kvetoucí měkké sýry s kůrkou, přesněji sýry porostlé plísní jako je *Penicillium camemberti*, nazývané se Camembert či Brie. Vedle toho vznikaly další měkké sýry s kůrkou, avšak místo plísně byly porostlé komplexní bakteriální kulturou a spadají do kategorie sýrů zrajících pod mazem. Tento druh sýra (Münster, Limburger nebo Tête de Moine) se poprvé objevil v Evropě v kláštorech, kde sloužil jako náhrada masa u mnohých mnišských řádů, protože konzumace masa byla striktně zakázána.

Mezi nejznámější druhy patří Tilsit, Comté, Trappist, Havarti, Taleggio a již zmíněný Limburger a Münster pocházející především z Rakouska, Belgie, Německa, Francie a také ze Švýcarska.

V Německu se vyrábí hned několik sýrů z kyselého tvarohu (např. Harzer, Mainzer a Handkäse), nechá se vyvinout mazová kultura a sýr podléhá zrání. V České republice jsou jim příbuzné Olomoucké tvarůžky.

Sýry zrající pod mazem jsou známy svou charakteristickou aromatickou vůní. Z tohoto důvodu je tato práce zaměřena na identifikaci látek způsobujících tuto vůni v průběhu zrání českých sýrů Olomoucké tvarůžky a Romadur. Dále jakým způsobem zrání ovlivňuje sensorické vlastnosti a mikrobiální profil těchto sýrů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Sýry zrající pod mazem

Pod pojmem sýry zrající pod mazem se rozumí skupina přírodních měkkých nebo poloměkkých sýrů s lesklou naoranžovělou kůrkou. Jsou charakteristické vývojem komplexních mikrobiálních kultur (mikrobiom je tvořen halotolerantními kvasinkami a grampozitivními bakteriemi, především koryneformní bakterie, stafylokoky a mikrokoky) na svém povrchu během zrání. Zrání postupuje od kůrky do středu. Nejběžněji je povrch ostříkovan solným roztokem bakterií *Brevibacterium linens* a kvasinek *Debaryomyces hansenii*, a *Geotrichum candidum*. Jejich působením během zrání je pozitivně ovlivněn vývoj charakteristické pikantní vůně a chuti a měknutí sýrového těsta [1; 2; 3]

V českých zemích je můžeme najít pod názvem Jihočeský syreček, Romadur, Romadůžek, Blaťácké zlato či Pivní sýr [4]. Svou tradici u nás mají již od 16. století i Olomoucké tvarůžky, kdy je v Lošticích nedaleko Olomouce začal vyrábět pan Josef Wessels i se svými potomky, kteří jsou dnes jedinými výrobci a výroba tvarůžků vydržela dodnes. [5]

měkké a poloměkké sýry	polotvrdé sýry	tvrdé sýry
Brick (US)	Appenzeller (CH)	Bergkäse (AT, CH, DE)
Epoisses (FR)	Danbo (DK)	Comté (FR)
Langres (FR)	Havarti (DK)	Esrom (DK)
Limburger (DE)	Jurakäse (CH)	Gruyère (CH, FR)
Livarot (FR)	Kenhem (NL)	
Maroilles (FR)	Mutschli (CH)	zrající sýry z kyselého tvarohu
Mont d'Or (FR)	Raclette (CH, FR)	Harzer, Mainzer (DE)
Münster (DE, FR)	Ridder (NO)	Quargel (CZ, DE, AT)
Port de Salut (FR)	Salers (F)	
Romadur (DE, BE)	St. Paulin (Suisse) (CH, FR)	sýry zrající pod mazem s plísní
Saint Nectaire (FR)	Tête de Moine (CH)	Chaumes (FR)
Trappiste (FR)	Tilsit (CH, DE)	Pont l'Évêque (FR)
Vacherin Mont-d'Or (CH)	Vacherin Fribourgeois (CH)	Reblochon (de Savoie) (FR)
	Winzerkäse (CH)	Taleggio (IT)

AT- Rakousko; CH - Švýcarsko; CZ - Česká republika; BE - Belgie; DE - Německo; DK - Dánsko; FR - Francie; IT - Itálie; NL - Holandsko; NO - Norsko; US - Spojené státy americké

Obrázek 1: Přehled druhů sýrů zrajících pod mazem produkovaných převážně v Evropských zemích; převzato a upraveno z [6]

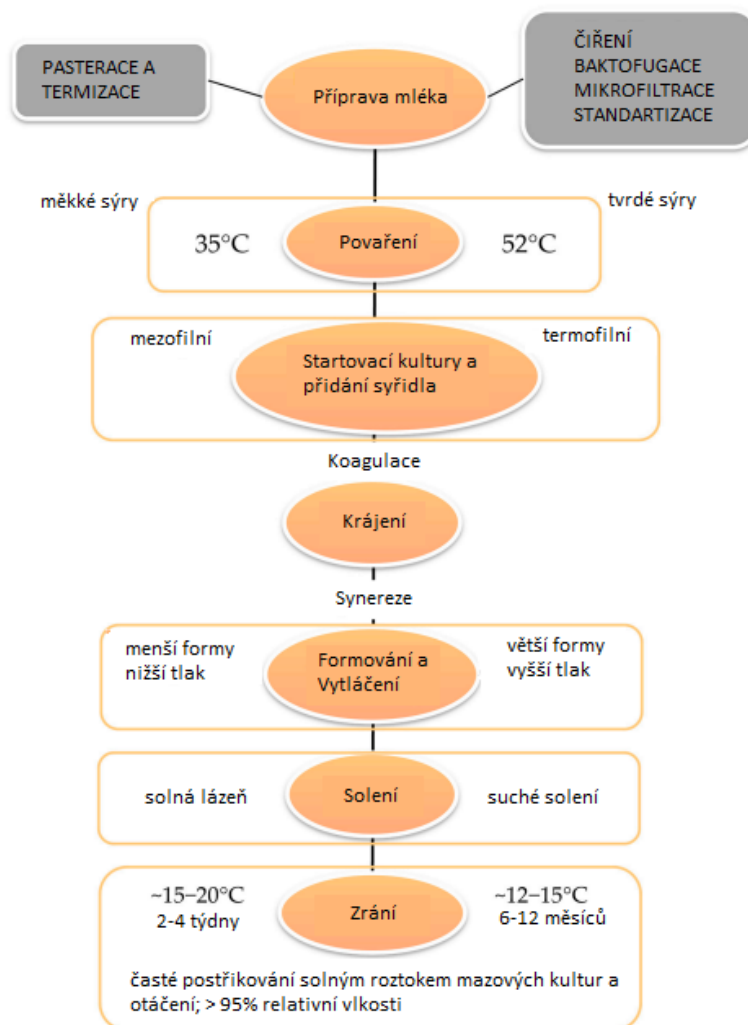
2.1.1 Spotřeba sýrů v České republice

Podle Českého statistického úřadu je za posledních deset let průměrná spotřeba sýrů v kg na jednoho obyvatele za rok velmi podobná. V roce 2022 byla celková spotřeba sýrů 13,8 kg sýrů na jednoho obyvatele za rok, z toho 11,7 kg tvořily přírodní sýry. Rok 2010 je posledním rokem ve statistice, pro který jsou známa data pro přírodní měkké sýry, kam se řadí i sýry zrající pod mazem. Z celkových 13,2 kg na obyvatele za rok činila spotřeba přírodních měkkých sýrů 2,7 kg na obyvatele za rok, tedy 20,45 %. [7]

2.2 Technologie výroby sýrů zrajících pod mazem

Výroba sýrů zrajících pod mazem se skládá z několika stěžejních kroků, jako je příprava mléka a jeho ohřátí, přidání startovací kultury a syřidla, krájení, formování a lisování s následným solením (koncentrace roztoku chloridu sodného okolo 18 %) a proces konečného zrání (udržení vhodné vlhkosti vzduchu nad 95 % a teploty okolo 8-15 °C). Jednotlivé kroky jsou mírně odlišné pro měkké a tvrdé sýry zrající pod mazem, jak je znázorněno na Obrázek 2. [6]

Solení je prováděno buď ručně obalením v soli (převážně tvrdé sýry) nebo pomocí stroje rozstříkujícího solný aerosol anebo v solné lázni. Měkké sýry se louhují v solné lázni 1,5-4 hodiny, poloměkké až tvrdé sýry mohou být ponechány louhovat i více než 24 hodin podle obsahu vlhkosti sýra a jeho velikosti. U sýrů vyráběných z tvarohu je tvaroh promíchán s tzv. zracími solemi, jako například hydrogenuhličitan sodný a uhličitan vápenatý.



Obrázek 2: Typické kroky výroby povrchově zrajícího sýru s mazem sestávající se z ohřevu mléka, přidání startovacích kultur, formování a lisování sýřeniny s následným solením, i proces konečného zrání v podmínkách prostředí, které se liší pro výrobu sýra s tvrdou nebo měkkou finální strukturou; upraveno a převzato z [6]

2.2.1 Technologie výroby tvarůžků

Celý proces začíná příjmem tzv. nesýřeného průmyslového tvarohu z odstředěného mléka, který je vyroben kyselým srážením, od dodavatelů. Je provedena kontrola kvality dodaného tvarohu v laboratoři a schválení jeho kvality. [2; 8]

Pro nastartování celého procesu je potřeba tvaroh odkyselit. To se provádí přidáním minerálních solí (Na_2CO_3 , CaCO_3) [3,8]. Zde ještě nějakou dobu probíhá zrání tvarohu. Aby byla konečná směs tvarohu optimálně kyselá a měla správný obsah sušiny, je nezbytné vybírat tvaroh ve správném čase. [8]

Po navážení tvarohu je směs tvarohu převezena ve vozíku do formovací místnosti. Kultury jsou aplikovány v průběhu přepravy do formovacího stroje, což zajišťuje transformaci tvarohové hmoty na tvarůžkovinu. Na formovacím stroji probíhá formování do požadovaného tvaru. Nerezové rošty poskládané do stohu s jednotlivými tvarůžky jsou přemísťovány do sušárny, kde započne celý proces zrání. [8]

Zrání postupuje směrem od povrchu ke středu tvarůžků. Potom následuje koupání neboli omývání tvarůžků vodní clonou se provádí za účelem omytí tvarůžků od kvasinek vzniklých během prvních dnů nazrávání. Po koupání jsou celé stohy převezeny do sušárny. Celý objem sušárny se chladí. Jakmile tvarůžky oschnou, stohy jsou převezeny do chlazených boxů, v nichž se v závislosti na stavu pro zrání a teploty vnějšího prostředí volí teplota v rozmezí od 6 °C do 15 °C. [8]

Skládání tvarůžků se nazývá rolování. Jednotlivé tvarůžky se z nerezových roštů seskládají do malých stůžků, ty se následně uschovají do beden v chladicím zařízení, zde probíhá zrání. Tvarůžky se balí do speciální fólie, která je propustná pro plyny a umožní tvarůžku „dýchat“. [8]

2.2.2 Technologie výroby Romaduru

Výchozí surovinou pro výrobu Romaduru je kravské mléko. Nejprve dochází k ošetření mléka pasterací (72 °C po dobu 15 s nebo 63 °C po dobu 30 min). Sýr je vyráběn v několika menších vanách o objemu 1200 litrů pro zachování pružnosti a měkkosti sýrového těsta. [9]

Na druhý den se mléko zahřeje na teplotu 33 °C jsou přidány základní kultury mléčného kvašení rozkládající laktózu a také syřidlo pro sladké srážení mléka. Tím dochází k vytváření sýřeniny a sýr prokysává. [9]

Sýřenina se krájí ručně za použití tzv. harf (horizontální harfa a vertikální harfa), aby se sraženina nakrájela na stejně velké kousky a tím dala vzniknout sýrovému zrnu. Nejdřív se tato směs opatrně přetahuje ručně (pokrájení, 10 minut odpočinek, přetahnutí, 10 minut odpočinek), potom se automaticky míchá 10 minut, kdy dochází k vytužování zrna. Směs je vypouštěna na odkapní pás, který zajišťuje odkapání syrovátky. [2; 9]

Pak dochází k formování, štosování a odkapávání sýrů na odkapní dráze. Zrno padá do zařízení, které formuje malé hranolky do plastových tvořítek. Tvořítko sestavená do stohu

putují na odkapní dráhu, kde je automaticky celý stoh během 17-20 hodin otáčen a sýr prokysává. [2; 9]

Solení je prováděno na druhý den v solné lázni a trvá cca 60 minut až několik hodin. Po vysolení jsou hranolky rozloženy na zrací paletky, skládající se z nerezových drátů tak, aby se sýru dotýkaly co nejmenším povrchem. Paletky jsou převezeny na dva dny do zracího sklepa, kde se na povrch sýrů aplikuje kultura kvasinky *Geotrichum candidum*, která má za úkol odkyselit povrch sýra, dochází tedy ke zvýšení pH. Následně je na povrch aplikována mazová kultura *Brevibacterium linens* spolu se solným roztokem, která na povrchu vytváří oranžový maz. Ošetření solným roztokem s mazovou kulturou je provedeno vícekrát pro dosažení kvalitního povrchu. [9]

Sýry zrají 2 týdny (14-15 dnů) ve zracím sklepě, kde se udržuje optimální teplota 14 °C a vlhkost okolo 80 %. V závěru zrání je provedeno poslední ošetření v ošetrovací lince, sýry jsou osušeny a vychlazeny. [9]

Romadur je balen do speciální kaširované fólie, která má vliv na zrání výrobku během skladování a na udržení čerstvosti výrobku a výsledný zabalený výrobek je připraven k expedici ke spotřebiteli. Narozdíl od limburgského sýra, kde se mazová kultura důsledně omyje a poměrně dlouho suší až do zaschnutí povrchu, je mazová kultura na povrchu Romaduru ponechána a sýr si své vlastnosti udrží i během uchovávání v lednici. Celá výroba od mléka po zabalený výrobek trvá 17 dnů. [9]

2.3 Zrání sýrů

Procesem zrání se označuje změna v rozvoji aroma, chuti a textury a tento proces se vyznačuje změnou mikroflóry zrajícího produktu. Probíhá smrt a lyze startovacích buněk, rozvoj sekundárního mikrobiomu (komplexní grampozitivní bakterie u sýrů zrajících pod mazem) a měknutí sýrového těsta. [3]

Je to poměrně pomalý a cenově náročný proces, který nelze plně kontrolovat a předpovídat. Doba zrání se liší pro jednotlivé druhy sýrů, u sýrů srážených sýřidlem se doba zrání pohybuje od dvou týdnů až po dva roky. Pro sýry například cheddarového typu (6-12 měsíců) znamená delší doba zrání jeho výslednou vyšší cenu, nárůst ceny sýru se pohybuje od 1,5 % do 3 % za jeden měsíc zrání. [10; 3]

V minulosti se sýry nechávaly zrát v jeskyních, kde se teplota pohybovala okolo 15-20 °C, dnes je tomu již jinak. Proces vyžaduje udržování určité teploty a vlhkosti, proto se využívají speciální místnosti, kde je možné docílit konstantních hodnot. Teplotní optimum se liší pro každý typ sýru. Gouda a Eidam zraje při 10-14 °C. Modré sýry, Camembert nebo sýry zrající na povrchu při 10-15 °C. [10]

2.4 Mikrobiologický profil sýrů zrajících pod mazem

Povrch sýru je velmi různorodý, nachází se na něm bakterie, kvasinky i plísně. Každý mikroorganismus má svou roli v rámci zrání, ať už se jedná o přímou metabolickou aktivitu nebo uvolňování enzymů do sýrové matrice prostřednictvím autolýzy. Mikroorganismy se dají rozdělit na tzv. startovací bakterie mléčného kvašení a sekundární mikrobiotu. [11]

Úkolem startovacích kultur, kam se dají zařadit především *Lactococcus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, a *Lactobacillus helveticus*, je snížení pH na požadovanou hodnotu díky produkci dostatečného množství kyselin. Mají dosah i při zrání, kdy se jejich enzymy účastní proteolýzy, lipolýzy a tvorby aromatických látek z aminokyselin. [11]

2.4.1 Bakterie (sekundární mikrobiota)

Na povrchu převažují zejména koryneformní bakterie (*Agrococcus*, *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Curtobacterium*, *Leucobacter*, *Mycetocola*, *Microbacterium*, *Rothia* a *Rhodococcus* spp.) a mnoho druhů bylo nalezeno v různých sýrech, zejména Tilsit. [12; 13]

Všechny koryneformní bakterie se jeví pod mikroskopem jako grampozitivní, nepravidelně tvarované tyčinky nevytvářející spory. Druhy některých těchto rodů jako je *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, a *Curtobacterium* procházejí během růstu přeměnou tyčinka/kok, přičemž tyčinkovitý tvar dominuje ve fázi exponenciálního růstu a kokovitý dominuje ve fázi zpomaleného růstu nebo ve stacionární fázi. [12; 14]

Jejich dalšími vlastnostmi je, že jsou halotolerantní, mezofilní, aerobní a dobře nesnášející kyselé prostředí. Někdy můžou být až alkalofilní. Z důvodu špatné snášenlivosti nízkého pH jsou bakteriální kultury aplikovány až po působení kvasinek v brzké zrací fázi. [10]

Předpokládalo se, že *Brevibacterium linens* je nejvíce dominantní bakterií na povrchu sýrů. Nedávno ale došlo k rozdělení *B. linens* na dva druhy, a to *Brevibacterium linens* a *Brevibacterium aurantiacum*. I podle Obrázek 3 je patrné, že *B. aurantiacum* se stává dominantnějším druhem a nacházel se ve všech 5 testovaných sýrech studie. [12]

	<i>Limburger</i>	<i>Reblochon</i>	<i>Livarot</i>	<i>Tilsit</i>	<i>Gubbeen</i>
Tyčinky					
<i>Agrococcus casei</i>			+	+	+
<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	+	+	+	+	+
<i>Brachybacterium alimentarium</i>			+	+	
<i>Brachybacterium faecium</i>			+		
<i>Brachybacterium tyrofermentans</i>		+			
<i>Brevibacterium aurantiacum</i>	+	+	+	+	+
<i>Brevibacterium helvolum</i>					+
<i>Brevibacterium linens</i>		+		+	+
<i>Corynebacterium casei</i>		+	+	+	+
<i>Corynebacterium variabilis</i>		+		+	+
<i>Corynebacterium flavescens</i>		+		+	+
<i>Curtobacterium flaaccumfaciens</i>					+
<i>Leucobacter</i> spp.			+		
<i>Microbacterium gubbeenense</i>		+	+	+	+
<i>Microbacterium lacticum</i>		+		+	
<i>Mycetocola reblochonii</i>		+			
<i>Rothia</i> spp.		+			
Koky					
<i>Kockuria kristinia</i>				+	
<i>Kocuria varians</i>				+	
<i>Macrococcus</i> spp.	+		+		
<i>Staphylococcus aureus</i>					+
<i>Staphylococcus capitis</i>					+
<i>Staphylococcus equorum/cohnii</i>			+	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+			+
<i>Staphylococcus hominis</i>					+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		+	+	+	+
<i>Staphylococcus sciuri</i>				+	
<i>Staphylococcus xylosus</i>			+		

+ indikace MO na povrchu sýra

Obrázek 3: Přehled koryneformních bakterií na povrchu různých sýrů zrajících pod mazem; převzato a přeloženo z [12]

2.4.2 Kvasinky

Kvasinky jako je *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Yarrowia lipolytica* a *Candida* spp. jsou přidávány na povrch za účelem jeho odkyselení z pH 5 až na pH 6,5, čímž podporují růst mazových kultur (katabolismus laktátu produkovaného startovacími kulturami na propionát, acetát, CO₂ a H₂O; deaminace aminokyselin glutamátu a aspartátu; tvorba amoniaku), a to z důvodu, že bakterie *Brevibacterium linens* nerostou při hodnotě pH nižší než 6. Dále také podporují růst *Brevibacterium linens* produkcí některých vitaminů. Avšak je potřeba kontrolovat růst kvasinek, jelikož jejich přemnožení by znamenalo inhibici růstu ostatní mikroflóry a nedostatečný růst by znamenal snížení chuťového profilu sýru. [10; 3; 15]

2.4.3 Kontaminanty

Při výrobě sýra je hlavním cílem zachovat nezávadnost a udržet kvalitu sýrů. Naneštěstí se mohou vyskytnout určité patogenní druhy bakterií, a to zejména u sýrů zrajících na povrchu vyráběných tradiční metodou, které se snadno mohou dostat do přirozeného mikrobiomu. Jedná se zejména o *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes*. Vedle bakterií se mezi kontaminanty dají zařadit i plísňe produkující mykotoxiny. [3]

V Evropské unii je množství těchto patogenů ve výrobcích kontrolováno pomocí Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 (aktualizováno o ES č. 1441/2007) [16]. „Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 stanoví mikrobiologická kritéria pro některé mikroorganismy a prováděcí pravidla, která musí provozovatelé potravinářských podniků dodržovat při provádění obecných a zvláštních hygienických opatření.“ Je to tedy souhrn postupů a pravidel, podle kterých se majitelé provozoven musí řídit, aby dodrželi nezávadnost svých výrobků.

V České republice platí ČSN 56 9609 a „je určena jako návod pro stanovení a aplikaci mikrobiologických kritérií pro potraviny v kterémkoliv stadiu potravinového řetězce, od prvovýroby až ke konečnému spotřebiteli“. [17]

Mléčné výrobky kontaminované bakterií *Listeria monocytogenes* představují až polovinu případů propuknutí listeriózy související s potravinami. *L. monocytogenes* je všudypřítomná bakterie a dokáže přežít i ve špatných životních podmínkách a adaptovat se. Není pro ni problém nízké pH, velmi slané prostředí (až 12 % NaCl) ani nízké teploty. Kontaminace může pocházet přímo z mléka (pasterizací je ale inaktivována) nebo jako postkontaminace na povrchu třeba z důvodu špatných hygienických podmínek. [14; 18]

Staphylococcus aureus je další z patogenů vytvářející zdravotní riziko pro lidi, kvůli produkci enterotoxinů způsobujících otravu (projevem je nevolnost, zvracení, bolest břicha). Opět je to všudypřítomná bakterie, mikrobiom na povrchu pro ni vytváří příhodné podmínky pro rozmnožování, a tak se snadno její počet zvýší přes limit udávaný v ES č. 1441/2007 nad 10^3 KTJ/g, nastane produkce enterotoxinů, jež zůstanou aktivní a jsou odolné vůči nízkému pH, termostabilní a odolávají proteolytickým dějům. [14]

2.4.4 Mikrobiologická kontrola kvality

Na povrchu sýrů je rozmanitý mikrobiom. Pro jejich identifikaci ať už při výzkumu nebo při výrobě, pro stanovení čistoty kultur a zjištění patogenů byly dlouhou dobu používány kultivační metody. Tyto metody mají nevýhodu v tom, že musí být přesně dodrženy postupy kultivace a správné teploty, jinak může dojít k nepřesné identifikaci (záměna fenotypových vlastností) a zaberou více času. Také je nutno mít hluboké znalosti v oboru mikrobiologie při jejich identifikaci. Pro zlepšení je to spojeno s mikroskopickým vyšetřením. [19]

Nejčastěji využívané metody ke stanovení mikroorganismů jsou molekulárně diagnostické metody. Všechny tyto metody jsou založeny na některé z variant analýzy DNA neboli deoxyribonukleové kyseliny, jež se amplifikuje (namnožuje) metodou zvanou polymerázová řetězová reakce. [19]

Oproti kultivačním metodám je PCR specifická, rychlá a citlivá. PCR využívá tzv. primery (syntetické oligonukleotidy – krátké, jednovláknové úseky DNA). Primer lze laicky nazvat jako výchozí bod pro vytvoření komplementárního řetězce DNA, který je hybridizován ve směru 5' až 3' enzymem zvaným DNA polymeráza. [20]

PCR se skládá ze tří kroků[20]:

1. Denaturace – při teplotě vyšší než 95 °C; dochází k rozpletení dvoušroubovice
2. Annealing (navázání) – při teplotě 50-60 °C; dochází k nasednutí primeru na jednotlivé cílové úseky DNA
3. Elongace (prodloužení) – obvykle při teplotě 72 °C; připojení DNA polymerázy a syntéza nového řetězce DNA

Tyto 3 kroky se opakují do nasyntetizování dostatečného množství DNA, toto opakování lze nazvat jako cyklus a obvykle jich proběhne 20-40. [20]

Metoda PCR nazývaná konvenční neobsahuje v amplikonu žádné fluorescenční barvivo a je kombinovaná s gelovou elektroforézou pro vizuální zobrazení PCR produktu za použití např. ethidium bromidu pod UV zářením. [20]

Metoda Real time PCR využívá fluorescenční sondy a barviva a lze tak amplikony sledovat v průběhu reakce. Lze to sledovat právě díky navázání těchto fluorescenčních sond na amplifikovanou DNA. Fluorescenční signál je následně detekován a lze tak určit množství DNA v původním vzorku. [20] Na konci polymerázové řetězové reakce může být nastavena tzv. melt analýza (analýza pomocí křivek tání). Teplota tání (T_M) označuje teplotu, při které zůstává hybridizována pouze polovina DNA řetězce. Sleduje se změna fluorescence za pomocí fluorescenčních sond jako SYBR Green (které jsou přidávány v množství, které neovlivňuje samotnou reakci) při lineárním zvyšování teploty. [21]

Mikrobiální kontroly mléčných výrobků ať už kultivačně nebo pomocí PCR se týkají tyto zákony a normy:

- 132/2004 Sb. o mikrobiologických požadavcích na potraviny
- ČSN EN ISO 7218 Mikrobiologie potravin a krmiv - Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení
- ČSN ISO 6887 Mikrobiologie potravinového řetězce - Příprava analytických vzorků, výchozí suspenze a desetinasobných ředění pro mikrobiologické zkoušení (obsahuje více částí a týká správných postupů přípravy vzorku, specifických pravidel pro vzorky mléka a mléčných výrobků a další)
- ČSN EN ISO 11133 Mikrobiologie potravin, krmiv a vody - Příprava, výroba, uchovávání a zkoušení výkonnosti kultivačních půd
- ČSN ISO 21527-1 Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísní - Část 1: Technika počítání kolonií u výrobků s aktivitou vody vyšší než 0,95
- ČSN EN ISO 22174 Mikrobiologie potravin a krmiv - Polymerázová řetězová reakce (PCR) k průkazu mikroorganismů působících onemocnění z potravin - Všeobecná ustanovení a definice
- ČSN P CEN/TS 17329 Obecné směrnice pro validaci kvalitativních PCR metod v reálném čase - Část 1: Validace v jedné laboratoři; část 2: Společná studie

2.5 Senzorické vlastnosti sýrů zrajících pod mazem

Sýry jsou především konzumovány pro jejich vysoce ceněnou výživovou hodnotu a vychutnávány pro jejich komplexní a rozmanitou chuť. Senzorické vlastnosti sýrů určující jejich konzumní kvalitu jsou vlastnosti, které jsou vnímány lidskými smysly převážně při konzumaci. Tyto vlastnosti lze popsat jako vzhled a barva, vůně neboli aroma, chuť a textura. [10; 3; 15]

2.5.1 Funkční role mazové kultury

Mikroflóra sýrů zrajících pod mazem hraje významnou funkční roli ve vývoji již zmíněných sensorických vlastností. Tyto vlastnosti jsou výsledkem dobře vyváženého růstu a metabolických aktivit mikroorganismů tvořících povrch. [10]

Vzhled a barva

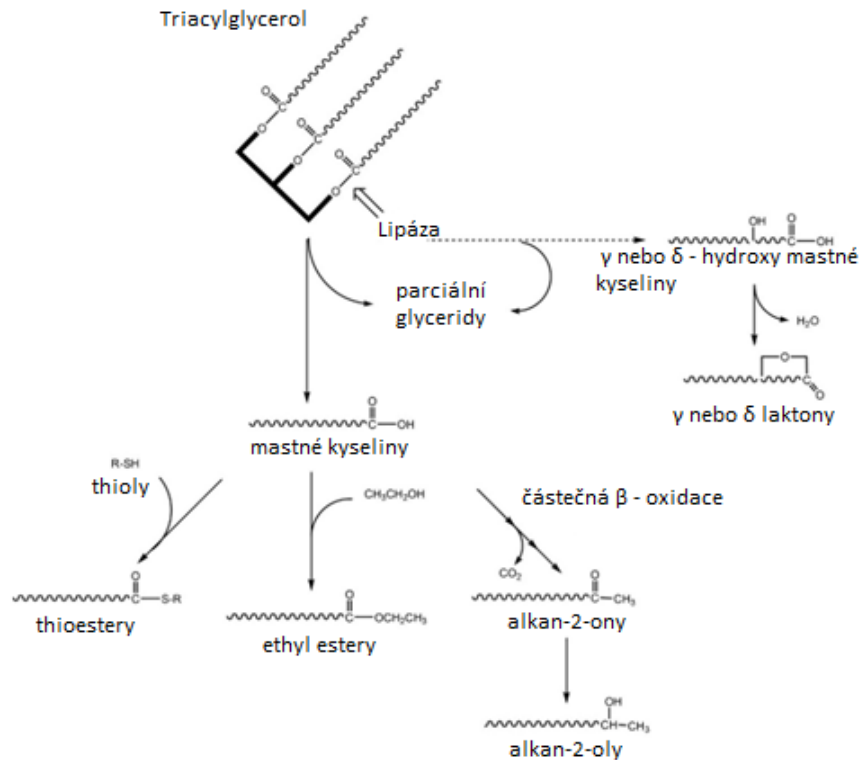
Povrch sýrů zrajících pod mazem se vyznačuje svým lesklým vzhledem a oranžově hnědou barvou, která je způsobována produkcí pigmentů bakterií jako *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*. Sama *Brevibacterium linens* produkuje tři aromatické karotenoidní pigmenty – isorenieraten, 3-hydroxy-isorenieraten, 3,30-dihydroxy isorenieraten. [10]

Textura

Mezi různými faktory ovlivňujícími texturu sýra je klíčovým prvkem pH. Zvýšení pH, typické zejména pro měkké sýry, při zrání vede k postupnému zjemnění textury, která získává krémovější konsistenci. Vedle pH ovlivňuje texturu také intenzivní proteolytická a lipolytická aktivita mikroflóry. [10]

Aroma, chuť

Sýrové aroma souvisí s tvorbou těkavých a polotěkavých látek, jako jsou kyseliny, aldehydy, alkoholy, estery, ketony a sirné sloučeniny. Tyto látky způsobující aroma vznikají metabolickými cestami (zejména glykolýza, proteolýza, lipolýza a utilizace citrátu) a také katabolickými procesy aminokyselin. Methanthiol je běžným prekurzorem sirných sloučenin, který zásadně přispívá k typickému aroma a pochází zejména z katabolismu L-methioninu působením mikroorganismů. L-methionin může být přeměněn i na další sirné sloučeniny jako je dimethyldisulfid nebo spolu s dalšími aromatickými aminokyselinami mohou být transaminovány na α -ketokyseliny, jež jsou dále přeměňovány na aldehydy, alkoholy, karboxylové kyseliny, hydroxykyseliny. Kromě toho je také za rozvoj typického aroma a chuti zodpovědná enzymatická hydrolýza triglyceridů (triacylglycerolů) na mastné kyseliny a příbuzné těkavé látky (např. methylketony, sekundární alkoholy)[10]. Vznik aromatických látek z triacylglycerolů je graficky znázorněn na Obrázek 4.



Obrázek 4: Schéma vzniku chuťových látek z mastných kyselin během zrání; upraveno a převzato z [10]

Dále se tomuto tématu věnuji v 2.6 Aromatické látky sýrů.

Prostřednictvím různých obranných systémů jako je kompetice (např. o základní živiny nebo prostor) a amensalismus (produkce antimikrobiálních látek) je mikroflóra schopna bránit sýr proti nežádoucím mikroorganismům. Tím je ovlivněna i trvanlivost sýrů. Mezi takové ochranné mikroorganismy můžeme zařadit *Pediococcus acidilacti* díky produkci bakteriocinů. [10; 22]

2.6 Aromatické látky sýrů

Jak již bylo popsáno, zráním, a tedy působením přítomných mikroorganismů na povrchu sýrů (koryneformní bakterie, gram-pozitivní koky a kvasinky) dochází k produkci mnoha aromatických látek. Děje se tak důsledkem metabolické a enzymatické aktivity, kdy jsou rozkládány makronutrienty na aminokyseliny, mastné kyseliny a kyselinu mléčnou, jež jsou prekurzory celé řady sensoricky aktivních látek. Působí převážně peptidasy, proteinasy, lipasy, esterasy a další. [22; 23]

Jedná se o širokou skupinu látek. Aromatické sloučeniny jsou převážně hydrofobní (lipofilní) a v důsledku toho mají tendenci koncentrovat se v sýrovém tuku. [10; 15; 24]

Aromatické látky tvoří alkoholy, estery, ketony a aldehydy, karboxylové kyseliny, sirné sloučeniny, dusíkaté látky, fenolické sloučeniny (například p-kresol, m-kresol), v menší míře také terpeny a laktony. Obecně se celková koncentrace těkavých aromatických látek ve většině sýrů zvyšuje v průběhu zrání. Ale může se měnit složení a koncentrace jednotlivých chemických skupin, jako jsou například aldehydy přeměňující se na příslušné

alkoholy a kyseliny, nebo může stoupat koncentrace esterů díky esterifikaci alkoholů a kyselin. Ketony mohou být redukovány na sekundární alkoholy, a tak se koncentrace ketonů může v průběhu zrání snižovat. [23]

Volné aminokyseliny v průběhu zrání díky aktivitě jak startovací kultury, tak i sekundárního mikrobiomu svou koncentraci zvyšují, a to především lysin, γ -aminomáselná kyselina, valin, leucin a prolin. Arginin svou koncentraci může snížit. Hlavními prekurzory sensoricky aktivních látek jsou phenylalanin, tyrosin, tryptofan a také větvené aminokyseliny jako je valin, leucin a izoleucin. [22]

Methionin je považován za hlavní zdroj TSS, jako je methional a methanthiol odpovědný za štiplavou až česnekovitou vůni. Phenylalanin může být metabolicky přeměněn na 2-phenylethanol. Těkavé mastné kyseliny, jako jsou octová, 2-methylpropanová, máselná, 3-methylmáselná a 2-methylmáselná, vznikají oxidativní dekarboxylací z α -ketokyselin původem z větvených aminokyselin. [22]

Některé těkavé látky, přestože jsou ve velké míře v sýru zastoupeny, nemusí způsobovat silnou aromatickou vůni (pachy). Proto je možné těkavé látky nevýznamné (neutrální) a aromaticky aktivní. Ty mohou mít i ve velmi malé koncentraci velký vliv na vůni. Může se jednat o vůně zemité (2-ethyl-3,5-dimethylpyrazin), trávové (nonanal), kouřové, karamelové (butan-2,3-dion), sladké, kokosové (δ -dekalakton), alkoholové, ovocné (ethylbutyrát), vůně růže (fenylethylalkohol), vůně hub nebo plísní (okt-1-en-3-ol, okt-1-en-3-on), po česneku, cibuli a zelí (sirné sloučeniny jako dimethyldisulfid) a řada dalších. [25; 26]

2.7 Metody pro stanovení těkavých látek

Za účelem identifikace těkavých látek způsobujících vůni (pach) byli vyvinuty techniky, umožňující je detekovat, popřípadě i určit charakter vůně. Existuje přes 600 těkavých látek identifikovaných v různých sýrech. [23]

Pro extrakci těkavých látek se používá hned několik technik.

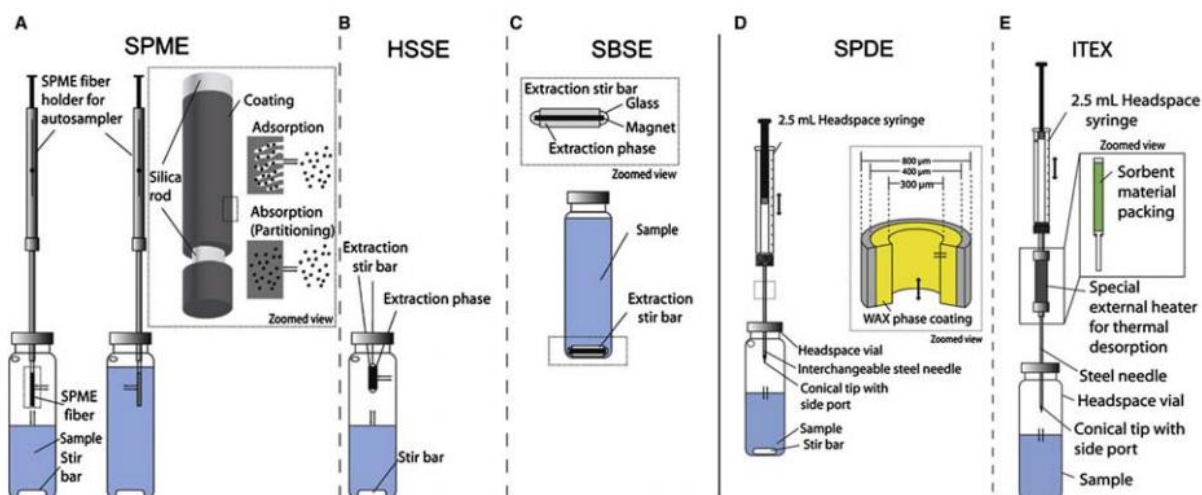
2.7.1 Extrakční techniky

V 70. a 80. letech 20. století byly vyvinuty destilační techniky ve vakuu. Ty jsou vhodné pro extrakci sýrové těkavé fáze, protože operace za sníženého tlaku je zajímavou alternativou k použití vysokých denaturujících extrakčních teplot. Pomocí těchto technik se těkavé sloučeniny extrahují ze sýrové matrice aplikací vakua při mírných teplotách a jejich kondenzací v lapačích obvykle chlazených kapalným dusíkem. Nevýhodou těchto metod je, že je potřeba větší množství vzorku (cca 50-150 g) a jsou časově náročné, ať už se jedná o přípravu tak o samotný destilační cyklus (několik hodin). Vodné destiláty je nutné extrahovat do vhodného rozpouštědla, jako je dichlormethan. Od této metody se opouští z důvodu její nízké reprodukovatelnosti a opakovatelnosti. [10]

Solid-phase microextraction (SPME), neboli mikroextrakce tuhou fází byla vyvinuta v 90. letech 20. století pro vyextrahování těkavých organických sloučenin ve vodě. V současné době je to nejrozšířenější technika pro extrakci těkavých látek sýru díky své jednoduchosti, rychlosti, flexibilitě a nízké ceně ručního zařízení. [10]

SPME využívá rozdělování analytů mezi roztok nebo parní fázi a tenký povrch křemenného vlákna tvořený adsorbujícím polymerním materiálem. Tento proces je obvykle spojen s injekční stříkačkou, která slouží přímo jako nástroj pro vstřikování. Jde o rovnovážnou techniku, kterou lze snadno automatizovat, ale získávání analytů závisí na jejich těkavosti, polaritě, rozdělovacích koeficientech, objemu vzorku, teplotě a na vlastnostech materiálu pokrývajícího vlákno. Kompozitní materiály spojené s polydimethylsiloxanem (PDMS), jako například Carboxen (CAR)/PDMS a divinylbenzen (DVB)/CAR/PDMS, představují nejvhodnější kombinace polymerů pro extrakci těkavých sloučenin v síru. Vzhledem k malému objemu a tenkému filmu adsorbentu je citlivost omezena nízkými dosažitelnými koncentračními faktory a v průběhu extrakce může dojít k určitým konkurenčním jevům mezi extrahovanými sloučeninami. Výhodou je, že se nepoužívají rozpouštědla a je potřeba menších objemů vzorku. [10]

Nově vznikají i techniky založené na SPME, které mají za cíl vylepšit omezení této techniky (zlepšení citlivosti a snížení konkurenčních jevů mezi extrahovanými sloučeninami). Mezi tyto metody patří HSSE – high capacity headspace sorptive extraction; SBSE – stir bar sorptive extraction; SPDE – solid-phase dynamic extraction; ITEX – in-tube extraction.[10; 24]



Obrázek 5: Mikroextrakce tuhou fází (přímá nebo headspace) (A), vysokokapacitní sorpční headspace extrakce (B), sorpční extrakce na míchadélko (C), dynamická extrakce pevnou fází, extrakce ve zkumavce (E); upraveno a převzato z [24]

2.7.2 Chromatografické metody

Plynová chromatografie (GC) je nejběžněji používaná analytická metoda pro separaci a identifikaci těkavých sloučenin. Techniky GC používají mobilní fázi, což je inertní nosný plyn (jako je helium, vodík, dusík nebo argon), který nese extrahované těkavé sloučeniny přes GC kolonu. Uvnitř kolony tvoří těkavé sloučeniny slabé elektrostatické interakce se stacionární fází na základě polaritativy sloučenin. Polarita stacionární fáze se mění, obvykle v závislosti na analytech, které mají být separovány. K eluci jednotlivých sloučenin dochází za různou dobu, závisí na těkavosti analytu a na stupni interakce se stacionární fází. Analyty jsou následně identifikovány detektorem. Při problémech detekce látek elujících v podobný čas je

využíváno tandemových technik jako je dvojdimenzionální plynová chromatografie GCxGC. [10; 24]

2.7.2.1 *Kapilární kolony*

Kapilární kolony mohou mít polární stacionární fáze (jako je polyethylenglykol nebo polyethylenglykol modifikovaný kyselinou nitrotereftalovou), což vede k velmi účinné separaci polárních sloučenin, jako jsou kyseliny a některé alkoholy. Alternativně mohou mít kolony nepolární stacionární fáze (jako je PDMS, fenyl-methylpolysiloxan) pro separaci sloučenin s nízkou polaritou, jako jsou aldehydy, ketony, estery, aminy, uhlovodíky a fenoly. Nepolární kolony bývají mnohem stabilnější než polární kolony. V posledních letech jsou populárnější kolony se středními stacionárními fázemi (fenyl-methylpolysiloxan, kyanopropylfenyl-methylpolysiloxan nebo kyanopropylfenyldimethylpolysiloxan), které jsou vhodnější pro detekci širšího spektra polárních a nepolárních těkavých látek. [24]

2.7.2.2 *Detektory*

Po oddělení na koloně GC je nezbytné identifikovat a měřit těkavé sloučeniny. Detekční systémy, které jsou používány, jsou různorodé a sofistikované, a výběr vhodné technologie závisí na analyzovaném produktu a rozsahu sledovaných analytů. Detektory, které jsou nejčastěji využívány ve výzkumu v mlékárnách pro identifikaci a měření, zahrnují: hmotnostní spektrometrický detektor, plamenově ionizační detektor, dále také plamenový fotometrický detektor a pulzní plamenový fotometrický detektor, tyto jsou charakteristické plamenovou emisí putující do fotonásobiče, což je způsobeno spalováním těkavých sloučenin. Poté může být plamenová emise každé sloučeniny elektronicky oddělena a zpracována jako signál. Další možností je provádět analýzu pomocí lidského čichu GC-olfaktometrie (GC-O). [10; 24] Pomocí GC-O lze také stanovit prahové hodnoty vnímání a intenzita vůně při různých koncentracích. [25]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Laboratorní vybavení

3.1.1 Chemikálie

- Agaróza pro gelovou elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Destilovaná voda (FCH VUT Brno, ČR)
- Destilovaný fenol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethanol 96% pro UV (Penta Chemicals, Chrudim, ČR)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Helium, čistota 4.8., v tlakové lahvi s redukčním ventilem, SIAD, Česká republika
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Lachema, Brno, ČR)
- Imerzní olej (Lachema, Brno, ČR)
- Isoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)
- Jod (Sigma, St. Louis, USA)
- Jodid draselný (Sigma, St. Louis, USA)
- Krystalová violet (Sigma, St. Louis, USA)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová – EDTA (Serva, Heidelberg, SRN)
- Lysozym (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Midori Green Advance DNA-Stain (Nippon Genetics Europe GmbH, Duren, Německo)
- Nanášecí pufr Yellow load (Top-bio, Praha, ČR)
- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- Polyetylenglykol (PEG) 6 000 (Sigma, St. Louis, USA)
- Proteinasa K (100 µg/ml) (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- SDS – dodecylsulfát sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- SYTO-9 qPCR 2x Master mix (Top-Bio, Praha, ČR)
- Taq DNA polymeráza 1.1, 1 U/µl (Top-Bio, Praha, ČR)
- Tris-báze (Tris-hydroxymethyl-aminomethan) (Serva, Heidelberg, Německo)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan – Tris-báze (Ampresco, Solon, USA)

3.1.2 Kultivační média

- Agar s dichloranem, bengálskou červení a chloramfenikolem – Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (HiMedia Laboratories, Mambai, Indie)
- Czapkův agar – Czapek-Dox Modified agar (Condalab, Madrid, Španělsko)
- Masopeptonový agar – Nutrient agar No. 2 (HiMedia Laboratories, Mambai, Indie)
- Sladinový agar – Malt Extract Agar Base (w/ Mycological Peptone) (HiMedia Laboratories, Mambai, Indie)

3.1.3 Přístroje

- Analytické váhy KERN EW (Novot, SK)
- BagSystem (Interscience Saint-Nom-la-Bretèche, Francie)
- Centrifuga Mini spin plus (Eppendorf, Hamburg, SRN)

- Eksikátor (KARTELL)
- Hmotnostní detektor ISQTM LT Single Quadrupole (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Knihovna spekter NIST/EPA/NIH, Verze 2.0, Gaithersburg, Maryland, USA
- Magnetický separátor life (Dynal Biotech, Oslo, Norsko)
- NanoDrop 2000 UV-VIS spektrofotometr (Thermo Scientific, Wilmington, USA)
- Optický mikroskop
- Plynový chromatograf TraceTM 1310 se split/splitless injektorem, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Rotor-Gene 6000 (Corbett Research UK Ltd, Cambridge, United Kingdom)
- Termostat
- UltraLum EB-20E UV transilluminator (Paramount, USA)
- Vortex (BioSan, Lotyšsko)
- Zařízení pro elektroforézu Mini gel unit 12x14 cm (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

3.1.4 Pracovní pomůcky

- Automatické pipety
- Běžné laboratorní sklo a vybavení
- SPME vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30 μm , Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA
- Sterilní Eppendorfovy zkumavky

3.1.5 Roztoky

0,5 M EDTA (186,1g EDTA \cdot 2H₂O rozpuštěno v 800ml destilované vody za stálého míchání, pomocí NaOH bylo pH upraveno na hodnotu 8,0. Roztok byl doplněn destilovanou vodou do 1000 ml. Sterilizace probíhala 20 minut při 121 °C)

1 M Tris-HCl (12,1 g Tris-báze rozpuštěno v 80 ml destilované vody, pomocí HCl bylo pH upraveno na hodnotu 7,8. Roztok byl doplněn destilovanou vodou do 100 ml. Sterilizace probíhala 20 minut při 121 °C)

20 % SDS (20 g SDS rozpuštěno v 80 ml destilované vody při teplotě 68 °C; upraveno HCl na pH 7,8; doplněno destilovanou vodou do 100 ml. Sterilizace probíhala 20 minut při 121 °C)

Proteinasa K (1 mg/ml) (10 mg proteiny K bylo rozpuštěno v 10 ml sterilní destilované vody. Roztok byl rozdělen do zkumavek a uchováván v mražáku.)

Lyzační roztok A (Roztok byl připraven ze zásobních roztoků 1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,5 M EDTA (pH 8,0). Bylo smícháno 1 ml 1M Tris-HCl (pH 7,8), 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplněn destilovanou vodou do objemu 100 ml.)

Lyzační roztok B (K lyzačnímu roztoku A byl přidán lysozym na výslednou koncentraci 3,0 mg/ml.)

3 M octan sodný (V 800 ml destilované vody bylo rozpuštěno 408,1 g trihydrátu octanu sodného. Pomocí ledové kyseliny octové bylo pH upraveno na hodnotu pH 5,2. Roztok byl doplněn destilovanou vodou do 1 000 ml. Sterilizace probíhala 20 minut při 121 °C)

TE pufr (Roztok byl připraven sterilně ze zásobních roztoků 1M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,5M EDTA (pH8,0). Byl smíchán 1 ml Tris-HCl (pH 7,8), 200 µl EDTA (pH 8,0) a 98,8 ml destilované vody.)

Fenol (Destilovaný fenol nasycený v TE pufru, pH 7,8, uchováván v chladničce)

CIZ (Směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1. Uchováván při laboratorní teplotě)

5M NaCl (58,4 g NaCl bylo rozpuštěno ve 150 ml destilované vody. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 200 ml. Sterilizace probíhala 20 minut při 121 °C.)

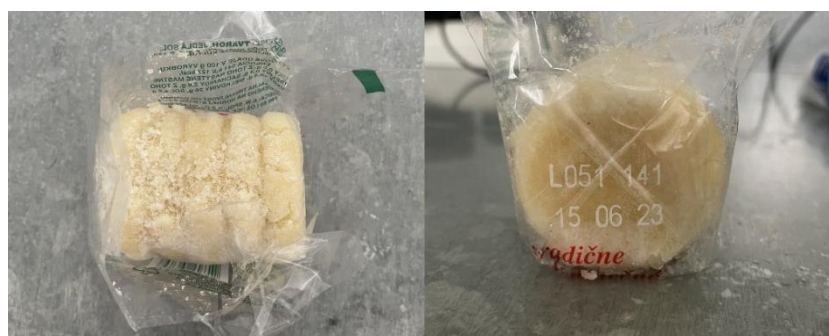
70% Ethanol (70 ml 96% ethanolu bylo smícháno s 26 ml sterilní destilované vody.)

40% PEG 6000 (40 g polyethylenglykolu 6000 bylo rozpuštěno v 60 ml sterilní destilované vody. Po rozpuštění byl celkový objem doplněn na 100 ml. Roztok byl uchováván v chladničce.)

5 × TBE pufr (54 g Tris-báze a 27,5 g kyseliny borité bylo rozpuštěno v 600 ml destilované vody. Poté bylo přidáno 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplněno destilovanou vodou do 1000 ml. Před použitím byl TBE pufr 10x ředěn na výslednou koncentraci.)

3.2 Analyzované vzorky

V rámci této práce byly analyzovány dva typy sýrů zrajících pod mazem: Olomoucké tvarůžky, A.W. spol. s r.o., zakoupené v běžné tržní síti nebo získané přímo z výroby v Lošticích, zmrazené, a Romadur, Madeta a.s., zakoupený v běžné tržní síti. Sýry jsou vyrobeny v České republice. Informace o vzorcích Olomouckých tvarůžků jsou uvedeny v Tabulka 1 a o vzorcích Romaduru jsou uvedeny v Tabulka 2.



Obrázek 6: Zmražený vzorek Olomouckého tvarůžku



Obrázek 7: Vzorek Olomouckých tvarůžků, ukázka šarže L016 122

Tabulka 1: Informace o vzorcích Olomouckých tvarůžku [27]

Produkt	Olomoucké tvarůžky, A.W. spol. s r.o.		
Šarže	L051 141, L112 161, L016 122		
Složení	Tvaroh, Jedlá sůl, Regulátory kyselosti: E 500, E 170, Mlékařské kultury		
Hodnoty	Sušina (%)	TVS (%)	Obsah soli (g)
	34	-	4,5



Obrázek 8: Vzorek Romaduru, ukázka šarže L1 20.11.2023 15:37

Tabulka 2: Informace o vzorcích Romaduru [28]

Produkt	Romadur, Madeta a.s.		
Šarže	L1; L2 30.3.2024 15:51		
Složení	Mléko, jedlá sůl, mlékařské kultury. Sýr byl vyroben bez použití syřidla živočišného původu.		
Hodnoty	Sušina (%)	TVS (%)	Obsah soli (g)
	44	40	2,5

Pro senzorickou analýzu a detekci těkavých látek byla použita šarže L016 122 (Olomoucký tvarůžek) a L2 30.3.2024 15:51 (Romadur), dále bude používáno označení T1, T2, T3 a R1, R2, R3 viz Tabulka 3.

Pro kultivační vyšetření a qPCR byly použity všechny šarže uvedené v Tabulka 1, Tabulka 2. Podrobné značení je uvedeno v Tabulka 3.

Tabulka 3: Vysvětlivky k označení analyzovaných vzorků

FT	zmražený tvarůžek (1 – 0. týden; 2 - po 2 týdnech; 3 – po 4 týdnech)
R	romadur (1 - po zakoupení; 2 - po 2 týdnech; 3 – po 4 týdnech)
T	tvarůžek (1- po zakoupení; 2 - po 2 týdnech; 3 – po 4 týdnech)
TO	tvarůžek okraj (1 - po zakoupení; 2 - po 2 týdnech; 3 – po 4 týdnech)
TS	tvarůžek střed (1 - po zakoupení; 2 - po 2 týdnech; 3 – po 4 týdnech)
RO	romadur okraj (1 - po zakoupení; 2 - po 2 týdnech; 3 – po 4 týdnech)
RS	romadur střed (1 - po zakoupení; 2 - po 2 týdnech; 3 – po 4 týdnech)

3.3 Použité metody

3.3.1 Chromatografické stanovení těkavých látek

Byla použita metoda headspace mikroextrakce na pevnou fázi ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (HS-SPME-GC-MS).

Na předvážkách byly naváženy 2,0 g vzorku (rozdělen na výseče a rozkrájen na malé kousky) do 10 ml skleněné vialky, septum bylo vloženo do víčka a vialka byla uzavřena. Podmínky analýzy jsou uvedeny v Tabulka 4 Tabulka 5.

Identifikace probíhala za pomoci programu Xcalibur 2.2, kdy byly látky identifikovány pomocí knihovny hmotnostních spekter NIST/EPA/NIH (s nimiž jsou porovnávána naměřená hmotnostní spektra). Množství detekovaných látek byla vyjádřeno pomocí ploch píků a rel. % zastoupení.

Tabulka 4: Podmínky SPME extrakce

Doba inkubace (temperování)	25 min
Doba extrakce	15 min
Teplota agitátoru (teplota extrakce a inkubace)	40 °C
Agitátor zapnutý	5 s
Agitátor vypnutý	60 s
Množství vzorku	2 g
Hloubka ponoření vlákna do vialky	20 mm

Tabulka 5: Podmínky GC-MS analýzy

Kapilární kolona	ZB–Wax	Teplota injektoru (teplota desorpce)	240 °C
Doba desorpce	5 min	Dávkování: splitless	ventil uzavřen 10 min
Ionizace	EI	Energie ionizačních elektronů	70 eV
Hloubka ponoření vlákna do injektoru	40 mm	Teplota iontového zdroje	200 °C
Nosný plyn	helium	Skenovací rozsah m/z	30–300 amu
Průtok nosného plynu	1 ml/min	Čas skenu	3,0 min
Celková doba analýzy	60 min	Rychlost skenování	0,2 s
Teplotní program	40 °C s výdrží 2 min		
	Vzestupný gradient 3 °C/min do 110 °C s výdrží 10 min		
	Vzestupný gradient 5 °C/min do 200 °C s výdrží 0 min		
Parametry kolony	30 m × 0,25 mm × 0,5 μm		

3.3.2 Senzorická analýza

Na každou senzorickou analýzu bylo přítomno 15 hodnotitelů. Dotazník pro hodnocení výrobku se skládal ze tří částí. První část se týkala hodnocení vzhledu a barvy, konzistence, chuti a vůně. Druhá část byla zaměřena na profil výrobku – byla tedy hodnocena slaná, kyselá, hořká a případně „jiná“ chuť a intenzita vůně. Ve třetí části byla hodnocena celková přijatelnost zakoupených vzorků. K hodnocení byly použity grafické stupnice o délce 10 cm.

Hodnotitelům bylo k ohodnocení podáno vždy 40-50 g každého sýra. Jako neutralizátor chuti byl hodnotitelům poskytnut tukový rohlík a pitná voda.

Výsledky senzorické analýzy jsou zobrazeny jako průměr hodnocení všech hodnotitelů (n = 15) a jsou znázorněny graficky. Chybové úsečky jsou vyjádřeny jako směrodatná odchylka měření. Dotazník je uveden v Příloha 8.

3.3.3 Stanovení mikrobiálního profilu

Všechny návody byly převzaty z materiálů Ing. Štěpánky Trachtové, Ph.D, pokud není uvedeno jinak.

3.3.3.1 Příprava homogenizátu pro mikrobiologický rozbor a izolaci DNA

Sterilně bylo naváženo 10 g vzorku reálného výrobku, který byl vložen do sterilního sáčku s membránou BagFilter. K naváženému vzorku byl přidán 10násobek sterilní vody (100 ml). Sáček BagFilter se vzorkem je vložen do stomacheru a vzorek byl homogenizován 10 minut za občasného zastavení a promíchání obsahu sáčku. Po ukončení homogenizace bylo z prostoru za membránou sterilní pipetou odebráno 20-30 ml homogenizátu do sterilních plastových zkumavek. Takto připravené homogenizáty byly dále použity ke kultivaci nebo zamrazeny pro další použití.

3.3.3.2 *Kultivace mikroorganismů na agarových plotnách*

Pomocí desítkového ředění byly z homogenizátů výrobků připraveny do Eppendorfových zkumavek vzorky o ředění 10^0 a 10^{-2} . Vzorky byly naředěny sterilní vodou. Vzorky byly zaočkovány po 100 μ l na předem připravené plotny se čtyřmi typy médií (SA, MPA, DRBC, CZA) a kultivace probíhala při 25 °C. Vycházelo se z ČSN ISO 21527-1. Pro každý vzorek a médium byla paralelní stanovení. Kultivace probíhala v týdnu po zakoupení, po dvou týdnech a poté po 4 týdnech od zakoupení.

Příprava médií

Použitá kultivační média MPA (širokospektrální médium), SA (médium ke stanovení počtu kvasinek a plísní), DRBC (médium ke stanovení počtu kvasinek a plísní) a CZA (médium ke kultivaci vláknitých mikroskopických hub včetně některých půdních bakterií) byla připravena dle návodu výrobce.

3.3.3.3 *Mikroskopické vyšetření*

Návod byl převzat portálu E-learning předmětu Praktikum z mikrobiologie vyučovaném na FCH VUT v Brně.

Příprava nativního preparátu

Na opálené podložní skličko byla do středu sklička nanesa kapka sterilní vody a vyžíhanou kličkou bylo do ní přeneseno malé množství kultury. To bylo důkladně rozmícháno a suspenze byla překryta krycím sklíčkem. Připravený preparát byl ihned pozorován pod mikroskopem pod zvětšením 40x10.

Příprava fixovaného preparátu

Na opálené podložní skličko byla do středu sklička nanesa kapka sterilní vody a vyžíhanou kličkou bylo do ní přeneseno malé množství kultury. Po důkladném rozmíchání suspenze byl vytvořen nátěr o ploše cca 2 cm². Preparát byl ponechán uschnout a následně zafixován nad plamenem (3x protáhnut nad nesvitivým plamenem). Po vychladnutí byl preparát obarven nad umyvadlem.

Gramovo barvení

Na preparát bylo kápnuto pár kapek krystalové violeti, ponecháno 30 sekund a omyto vodou. Pak bylo na preparát kápnuto pár kapek Lugolova roztoku, ponecháno 60 sekund a tento roztok byl nejprve omyt vodou a poté ethanolem, dokud z něj odchází barvivo. Pak byl nakápnut karbolfuchsin, který byl ponechán 60 sekund. Preparát byl opláchnut vodou a usušen vzduchem. Buňky byly pozorovány imerzním objektivem. Se zvětšením 1000x. Při G⁺ byly buňky fialové, při G⁻ byly buňky růžové.

3.3.3.4 *Příprava hrubých lysátů buněk*

1 ml homogenizátu byl napipetován do 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky a suspenze byla centrifugována při 14 500 ot/min po dobu 5 minut. Následně byl supernatant opatrně slit a k sedimentu byl opět napipetován 1 ml homogenizátu. Suspenze byla znovu zcentrifugována při 14 500 ot/min po dobu 5 minut. Sediment byl ponechán důkladně okapat a dále

resuspendován v 1 ml roztoku A. Suspenze byla centrifugována při 14 500 ot./min po dobu 5 minut. Poté byl supernatant opatrně slit a k sedimentu bylo přidáno 500 μ l lyzačního roztoku B s lysozymem. Všechny vzorky byly důkladně rozsuspendovány a za občasného promíchání inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 1 hod. K suspenzi buněk bylo přidáno 12,5 μ l 20 % SDS a 5 μ l proteinasy K (100 μ g/ml). Vše bylo promícháno a ponecháno k inkubaci do druhého dne při 55 °C. Pokud bylo potřeba s lyzáty pracovat později než další den, byly uchovány při -20 °C.

3.3.3.5 Izolace DNA fenolovou extrakcí

K 500 μ l hrubého lyzátu buněk bylo přidáno 500 μ l fenolu. Směs byla kývavým pohybem promíchávána 4 minuty a poté centrifugována 5 minut při 14 500 ot/min. Po centrifugaci byla do čisté Eppendorfovy zkumavky odebrána vodní fáze obsahující DNA. K vodní fázi s DNA bylo přidáno 700 μ l roztoku CIZ (chloroform:isoamylalkohol, 24:1) a směs byla opět kývavým pohybem míchána po dobu 4 minut. Směs byla opět centrifugována při 14 500 ot/min po dobu 5 minut a poté byla odebrána vodní fáze do čisté Eppendorfovy zkumavky.

Ke vzorku DNA získaného fenolovou extrakcí bylo přidána 1/20 objemu 3 M octanu sodného (30 μ l) a vzorek byl promíchán. Do každé zkumavky bylo přidáno 1 ml 96% ethanolu, směs byla promíchána a DNA byla srážena při -20 °C po dobu 30 minut. Následně byla směs centrifugována při 14 500 ot/min po dobu 15 minut a supernatant byl opatrně slit. Po slítí supernatantu byl sediment DNA vysušen v exikátoru 30 min. DNA byla rozpuštěna v 50 μ l TE pufru. Takto přečištěná DNA byla uchovávána v chladničce při teplotě 8 °C.

3.3.3.6 Izolace DNA magnetickými částicemi

Pro izolaci DNA byly použity magnetické mikročástice poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate-co-[2-(methacryloyloxy)ethoxy]acetic acid)-coated iron oxide, nadále označované jako Fkol7. Jedná se o superparamagnetické částice, které byly syntetizovány týmem Ing. Daniela Horáka, Ph. D. na Ústavu makromolekulární chemie, Akademie věd ČR v Praze.

Separční směs byla namíchána v přesném pořadí, které uvádí Tabulka 6.

Tabulka 6: Jednotlivé složky separční směsi pro izolaci magnetickými částicemi

	Složka v daném pořadí	Objem (μ l)
1	5 M NaCl	400
2	DNA (lyzáte buněk)	100
3	PEG 6000 (40%)	400
4	Magnetický nosič (2·mg·ml ⁻¹)	100
	Celkem	1000

Výsledná koncentrace PEG 6000 je 16% hm, NaCl 2M. Směs všech složek v Eppendorfově zkumavce byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě. Poté byla krátce stočena na minicentrifuze a umístěna do magnetického separátoru. Magnetické částice byly separovány 10-15 minut při laboratorní teplotě. Po odebrání supernatantu bylo do zkumavky

přidáno 1 000 µl 70% etanolu, vzorek byl promíchán a magnetické částice byly separovány pomocí magnetického separátoru. Ethanol byl odpipetován a DNA navázaná na magnetické nosiče byla znovu promyta ethanolem (70%, 500 µl). Zbýlý ethanol byl odpařen v exsikatoru a DNA adsorbovaná na magnetické nosiče byla eluována do 50 µl TE pufru. Zkumavky obsahující nosiče s DNA byly do následujícího dne uchovány v chladničce. Další den byly pomocí magnetického separátoru magnetické částice odseparovány a eluát obsahující DNA byl odebrán do čistých Eppendorfových zkumavek. Takto přečištěná DNA byla uchovávána v chladničce při teplotě 8 °C.

3.3.3.7 Příprava bakteriální DNA z jedné kolonie

Sterilní plastovou kličkou byla nabrána jedna kolonie z Petriho misky. Kolonie byla rozsuspendována v Eppendorfově zkumavce s 50 µl sterilní vody. Zkumavky byly krátce stočeny na centrifuze a povařeny v cycleru při 99 °C po dobu 10 minut. Vzorek byl vychlazen na laboratorní teplotu.

3.3.3.8 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Pomocí přístroje NanoDrop 2000 byla proměřena absorbance izolované DNA. Jako blank pro kalibraci byl použit TE pufr. Do přístroje byl pro proměření koncentrace a čistoty vzorků pipetován objem 3 µl roztoku DNA. Byla měřena absorbance pro vlnové délky 230 nm, 260 nm a 280 nm. 230 nm značí minimum absorbance pro DNA, 260 nm značí maximum absorbance pro DNA a 280 nm značí maximum absorbance pro proteiny. Z hodnoty absorbance pro 260 nm byla stanovena koncentrace DNA ve vzorku. Hodnoty A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} značí, jak čistá vyizolovaná DNA je.

3.3.3.9 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

PCR v reálném čase (qPCR) byla použita pro amplifikaci specifických sekvencí DNA, za použití primerů pro doménu *Bacteria* (primery Feub a Reub) ((Haarman, Knol 2006)) a pro celkové kvasinky (primery NL1F/NL4R). Sekvence primerů a velikost specifického produktu je uvedena v Tabulka 7.

Tabulka 7: Informace týkající se specifických primerů pro provedení PCR reakce pro doménu *Bacteria* (Feub/Reub) a celkové kvasinky (NL1F/NL4R)

Specifita	Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost specifického produktu (bp)	Zdroj
Doména <i>Bacteria</i>	F eub	5'- TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-3'	466	[29]
	R eub	5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT-3'		
Celkové kvasinky	NL1F	5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3'	500	[30]
	NL4R	5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'		

PCR byla provedena pomocí komerčního qPCR 2x SYTO-9 Master Mixu (Top-Bio), který je určen pro náročnější analýzu vzorků pomocí metody qPCR pomocí interkalačního

barviva SYTO-9. Výsledný objem pro PCR byl 25 μ l. Stejným postupem byla připravena i negativní kontrola, aby se mohla vyloučit případná kontaminace. Místo DNA matrice bylo použito ekvivalentní množství PCR vody. Množství komponent do qPCR směsi je uvedena v Tabulka 8.

Tabulka 8: Příprava qPCR směsi za použití primerů specifických pro doménu Bacteria (Feub/Reub) a primerů specifických pro celkové kvasinky (NL1F/NL4R)

		Primery Feub/Reub	Primery NL1F/NL4R
PCR komponenty v daném pořadí		Objem komponent (μ l)	Objem komponent (μ l)
1	voda pro PCR	10,5	9,5
2	qPCR 2 \times SYTO-9 Master Mix (Top bio)	12,5	12,5
3	Primer 1	0,5	1,0
4	primer 2	0,5	1,0
5	DNA matrice	1,0	1,0

PCR byla provedena pomocí cycleru Rotor-Gene 6000 dle programu uvedeném v Tabulka 9. PCR byla optimalizována tak, aby byla citlivá, specifická, rychlá a úsporná. Použitá teplota hybridizace (55 $^{\circ}$ C) a počet cyklů (30) vede ke snížení amplifikace nesespecifických produktů PCR.

Tabulka 9: Nastavení pro provedení PCR reakce za použití primerů pro doménu Bacteria (Feub/Reub) a primerů specifických pro celkové kvasinky ((NL1F/NL4R)

Stanovení	Doména Bacteria	Celkové kvasinky
Primer	Feub/Reub	NL1F/NL4R
Prodloužená denaturace	95 $^{\circ}$ C/5'	94 $^{\circ}$ C/5'
Denaturace	95 $^{\circ}$ C/30''	94 $^{\circ}$ C/20''
Připojení primerů	55 $^{\circ}$ C/30''	55 $^{\circ}$ C/20''
Syntéza DNA	72 $^{\circ}$ C/60''	72 $^{\circ}$ C/20''
Prodloužená syntéza	72 $^{\circ}$ C/5'	72 $^{\circ}$ C/3'
Melt analýza	50-99 $^{\circ}$ C (1 $^{\circ}$ C/5'')	50-95 $^{\circ}$ C (1 $^{\circ}$ C/5'')
Počet cyklů	30	40

Melt analýzou neboli analýzou křivek tání se dá ověřit, zda je PCR produkt totožný s ampliconem hledaných druhů bakterií a kvasinek za použití teploty tání (T_m). K tomuto účelu byly vybrány některé rody bakterií a kvasinek uvedených v Tabulka 10, jejichž DNA byla použita jako pozitivní kontrola.

Tabulka 10: Mikroorganismy použité pro pozitivní kontrolu

Mikroorganismus	Sbírkové číslo
<i>Bifidobacterium animalis</i>	CCM 4988
<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCDM 121
<i>Brevibacterium linens</i>	CCDM 200
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	CCY 21-6-3
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i>	CCY 26-12-6
<i>Candida vini</i>	CCY 29-39-3
<i>Pichia farinosa</i>	CCY 39-4-2
<i>Geotrichum candidum</i>	CCF 5692

3.3.4 Agarosová gelová elektroforéza

Specifické produkty PCR o velikosti 466 bp pro doménu *Bacteria* a 500 bp pro celkové kvasinky byly detekovány pomocí gelové elektroforézy na agarose (1,8%, 0,5xTBE pufir).

Do Erlenmayerovy baňky byl připraven 1,8% agarosový gel rozpuštěním 2,7 g agarosy ve 150 ml 0,5 × TBE pufiru. Směs byla rozvařena v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění. Po vychladnutí na cca 60 °C byla směs promíchána a bylo přidáno 5 µl fluorescenčního Midori Green Advance Strain barviva. Směs byla nalita do vaniček s hřebínkem, kde byla ponechána nejméně 30 minut ztuhnout. Po uplynutí času byl z gelu vyjmut hřebínek. PCR produkty byly promíchány a krátce centrifugovány. Ke každému bylo přidáno 5 µl nanášecího pufiru. Do komůrky gelu bylo nanášeno vždy 10 µl směsi produktu PCR s nanášecím pufrem. Do jedné z komůrek bylo nanášeno 5 µl DNA standardu (100 bp žebříček). Vanička s gelem byla vložena do elektroforetické vany a gel byl přelit 0,5 × TBE pufrem. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 60 V po dobu 1 hodiny a 45 minut. Po skončení elektroforézy byl gelový bloček vyhodnocen v UV světle na transilluminátoru. Byla pořízena fotografie.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Předkládaná práce je zaměřena na chemickou, mikrobiologickou a senzorickou analýzu sýrů zrajících pod mazem. Tyto sýry jsou charakteristické žluto-oranžovým mazem, který se za aerobních podmínek tvoří na jejich povrchu, a výraznou, pikantní chutí a vůní. Byly analyzovány dva vybrané druhy těchto sýrů, Olomoucké tvarůžky a Romadur. Přestože patří do stejné kategorie sýrů, existují určité odlišnosti v jejich výrobě, které by se měly projevit i v jejich rozdílných vlastnostech.

Vzhledem k tomu, že tyto sýry mohou prozrávat ještě dlouhou dobu po expedici, byl proveden skladovací pokus trvající 4 týdny, kdy v pravidelných intervalech byly vzorky podrobeny analýzám. Cílem bylo vyhodnotit jednak rozdíl mezi oběma druhy sýrů, a jednak jejich změny v průběhu skladování (dozrávání). Sledované parametry: senzorické vlastnosti, mikrobiální profil a profil těkavých látek.

4.1 Senzorická analýza

Senzorická analýza byla zaměřena na hodnocení jednotlivých senzorických vlastností – vzhledu a barvy, konzistence, chuti a vůně vzorků, zároveň byly hodnoceny vybrané deskriptory chuti – slaná, kyselá, hořká a případně „jiná“ chuť; vzhledem k tomu, že během prozrávání lze očekávat zvýraznění vůně díky pokračujícím rozkladným pochodům, byl tento deskriptor hodnocen samostatně. Na závěr byla hodnocena celková senzorická přijatelnost vzorků. Na Obrázek 9 je ukázka sýrů připravených na senzorické hodnocení.



Obrázek 9: Ukázka vzorků sýrů pro hodnotitele.; vlevo tvarůžek, vpravo Romadur

4.1.1 Vizuální změny při skladování vzorků sýra

Nejprve byly vzorky podrobeny jednoduchému vizuálnímu hodnocení (fotografie na Obrázek 10-15).



Obrázek 10: Vzorek tvarůžku po zakoupení ($t = 0$ týdnů)



Obrázek 11: Vzorek tvarůžku po dvou týdnech od zakoupení ($t = 2$ týdny)



Obrázek 12: Vzorek tvarůžku po čtyřech týdnech od zakoupení ($t = 4$ týdny)

Nejvýraznějším rozdílem na první pohled při porovnání vzorku Olomouckého tvarůžku v průběhu skladování je, že po čtyřech týdnech byl tvarůžek na povrchu oranžový, místy až červenooranžový, lesklý a na povrchu se objevily bílé tečky. Při skladování docházelo nejen ke změně na povrchu (změna barvy, vzhledu a tvaru), ale také ke změně uvnitř. Postupem času se zmenšovalo tvarohové jádro a po čtyřech týdnech již bylo špatně viditelné. Vzorek se stával méně pružným a měknul (od okraje po střed). Chuť a vůně byla předmětem provedené sensorické analýzy. Detailní popis změn v průběhu zrání je uveden v Tabulka 11.

Tabulka 11: Změny v průběhu skladování Olomouckých tvarůžků

	T1	T2	T3
Tvar	nedeformovaný	nedeformovaný	lehce deformovaný
Vzhled	matný	lesklý	lesklý
Barva povrchu	zlatožlutá	oranžovožlutá	oranžová, tvorba bílých teček na povrchu
Průřez na lomu	výrazné bílé tvarohové jádro	nažloutlé jádro	skoro nepatrné tvarohové jádro
	pevná zralá vrstva	zralá vrstva	měkčí zralá vrstva skoro v celém průřezu
Pružnost omakem	pevná	pružná	pružná až měkčí
Chuť	*	*	*
Vůně	Charakteristická*	Charakteristická*	Intenzivní*

* Předmětem sensorické analýzy



Obrázek 13: Vzorek Romaduru po zakoupení ($t = 0$ týdnů)



Obrázek 14: Vzorek Romaduru po dvou týdnech od zakoupení ($t = 2$ týdny)



Obrázek 15: Vzorek Romaduru po čtyřech týdnech od zakoupení ($t = 4$ týdny)

I v případě Romaduru v průběhu skladování došlo ke změně barvy. Běžová barva se změnila na béžovo-oranžovou. Vzhled povrchu z původní matné přešel na vlhký. Po čtvrtém týdnu se stal střed Romaduru krémovější. Chuť a vůně byla předmětem provedené senzorycké analýzy. Detailní popis změn v průběhu zrání je uveden v Tabulka 12.

Tabulka 12: Změny v průběhu skladování Romaduru

	R1	R2	R3
Tvar	nedeformovaný	nedeformovaný	lehce deformovaný
Vzhled	matný	vlhký	vlhký
Barva povrchu	běžová	běžová, mírně namodralá místa	běžovo-oranžová, mírně namodralá místa
Průřez na lomu	pevný	pevný	pevný, lehce krémový
Pružnost omakem	pevná	pevná	pevná
Chuť	*	*	*
Vůně	Charakteristická*	Charakteristická*	Intenzivní*

* Předmětem senzorycké analýzy

4.1.2 Senzorycké hodnocení

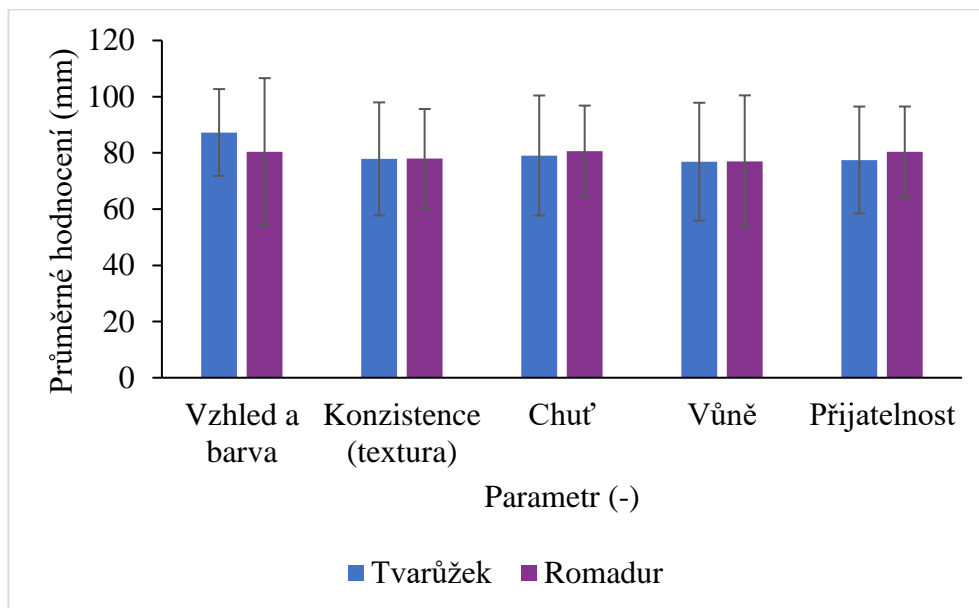
Pro srovnání byly vytvořeny grafy pro jednotlivé senzorycké analýzy. Odchylka v hodnocení se pohybovala od 15 do 30 mm (tj. 15–30 %), což je u senzorycké analýzy přijatelné, zvláště u méně zkušených hodnotitelů.

Pokud srovnáme oba sýry (tvarůžky vs. Romadur), z grafů 16–21 je patrné, že rozdíly mezi nimi nejsou výrazné, a to v průběhu celého skladovacího pokusu.

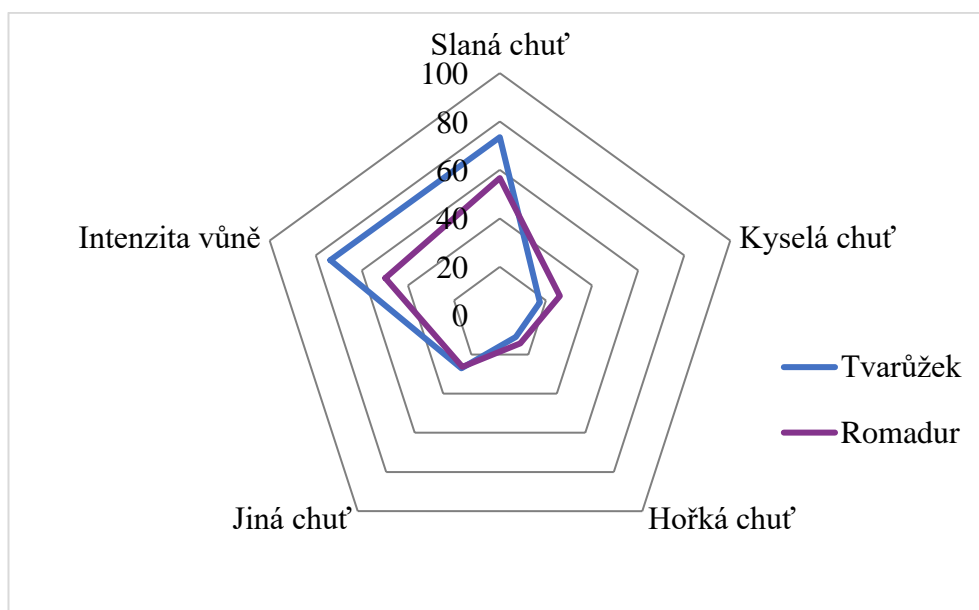
Senzorycké hodnocení po zakoupení

Okamžitě po zakoupení (Obrázek 16) jsou jejich vzhled, barva, konzistence, chuť i vůně hodnoceny podobně, zhruba jako velmi dobré. Markantnější rozdíly byly v profilovém testu, kdy byl tvarůžek hodnocen jako slanější a s výraznější vůní (Obrázek 17).

Tvarůžek byl okomentován jako s ostřejší a vtíravou vůní, Romadur jako s velmi příjemnou a intenzivní sýrovou vůní, avšak slabší oproti tvarůžkům. Konzistence hodnotitelům připadala u tvarůžku příliš tuhá.

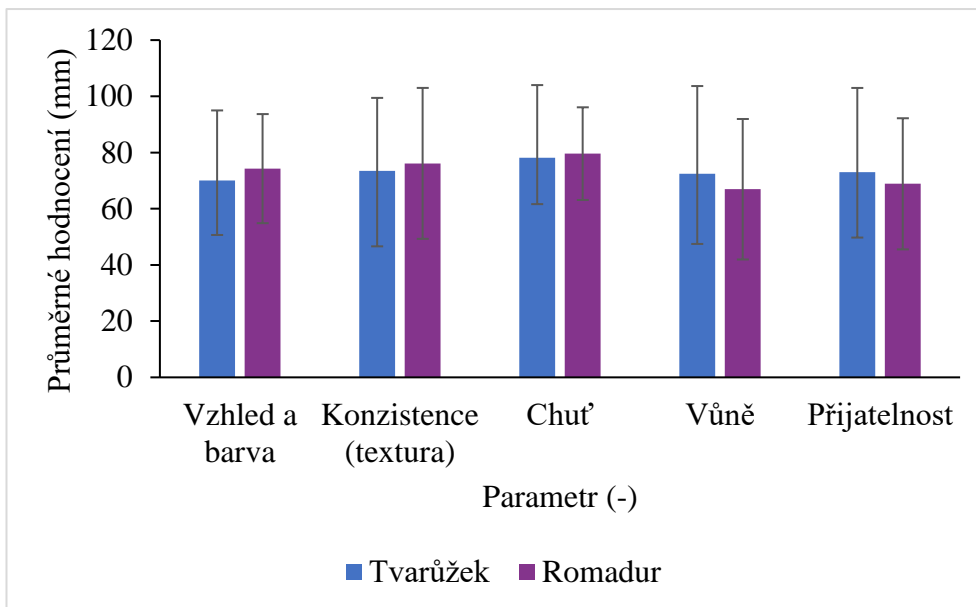


Obrázek 16: Výsledky sensorické analýzy obou vzorků T1 a R1 pro "vzhled a barva", "konzistence (textura)", "chuť", „vůně“ a „přijatelnost“ (t = 0 týdnů)

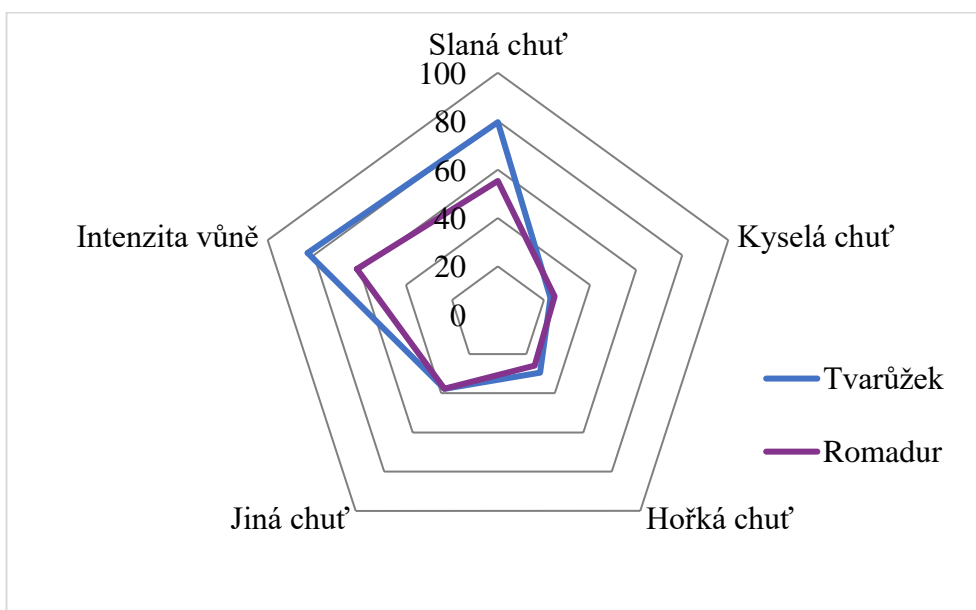


Obrázek 17 Výsledky profilového testu obou vzorků T1 a R1 (t = 0 týdnů)

Senzorické hodnocení po dvou týdnech od zakoupení



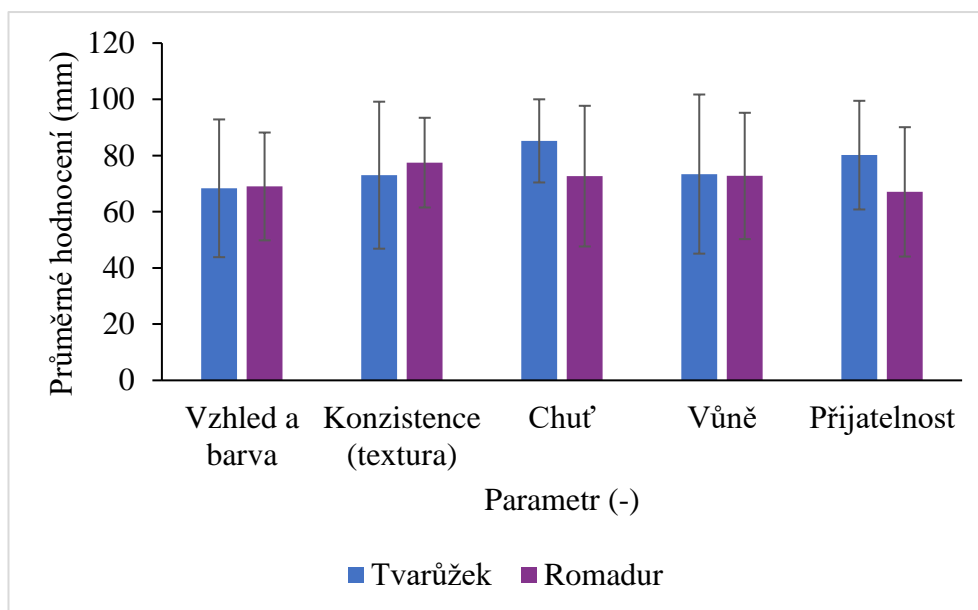
Obrázek 18: Výsledky sensorické analýzy obou vzorků T1 a R1 pro "vzhled a barva", "konzistence (textura)", "chuť", "vůně" a "přijatelnost" (t = 2 týdny)



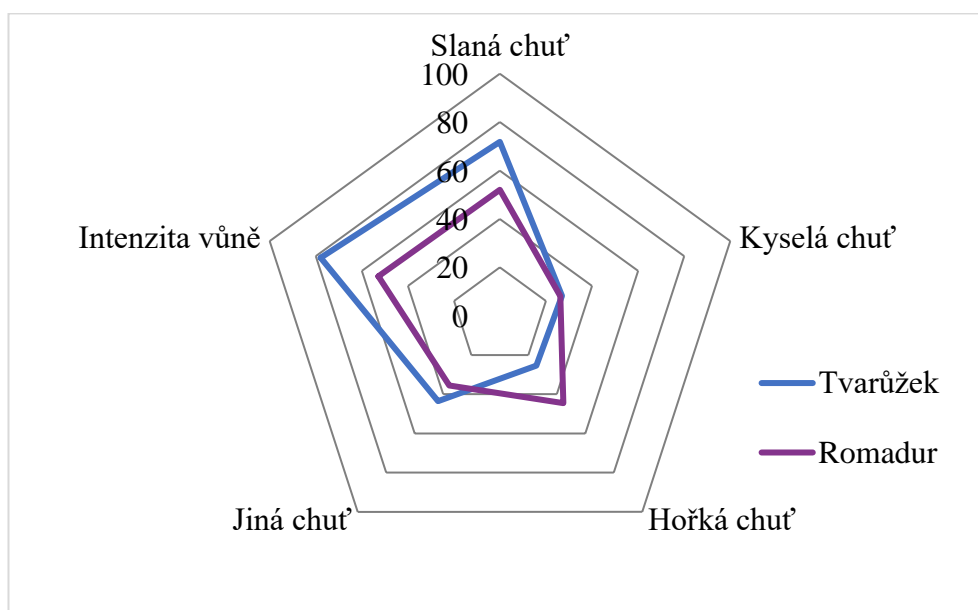
Obrázek 19: Výsledky profilového testu obou vzorků T2 a R2 (t = 2 týdny)

Po dvou týdnech se hodnocení mírně zhoršilo, vzorky lze označit jako dobré ve všech sledovaných vlastnostech (Obrázek 18), a zvětšil se i rozdíl v intenzitě vůně a slané chuti (Obrázek 19).

Senzorické hodnocení po čtyřech týdnech od zakoupení



Obrázek 20: Výsledky senzoričké analýzy obou vzorků T3 a R3 pro "vzhled a barva", "konzistence (textura)", "chuť", "vůně" a "přijatelnost" (t = 4 týdny)



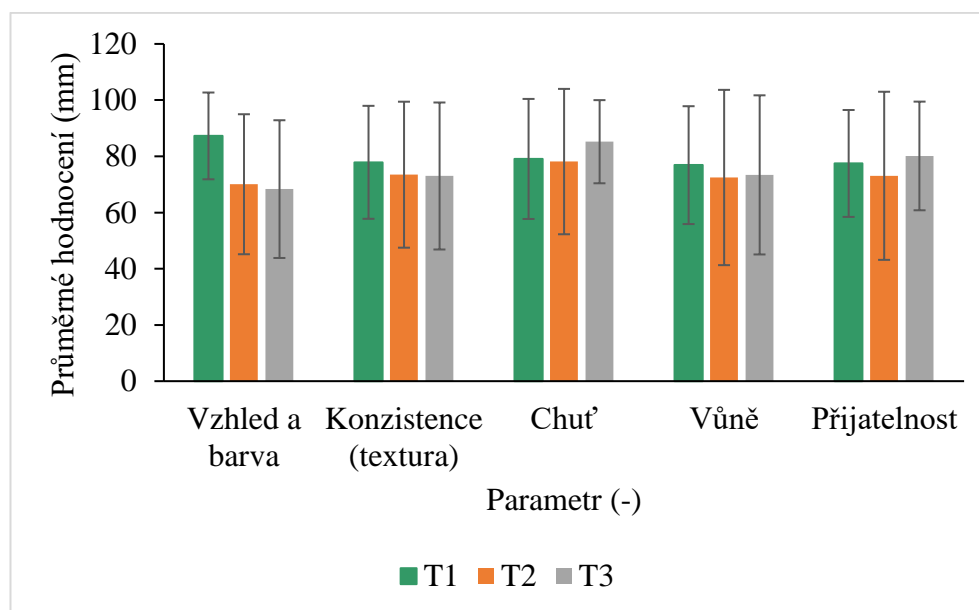
Obrázek 21: Výsledky profilového testu obou T3 a R3 vzorků (t = 4 týdny)

Po dalších dvou týdnech skladování (t=4) (Obrázek 20) se výsledky příliš nezměnily, u tvarůžků se ale objevila „jiná“ chuť, kterou hodnotitelé nazvali kvasničná a u Romaduru naopak zaznamenali chuť hořkou (Obrázek 21). Tvarůžek byl komentován stále jako moc slaný a poměrně lepivý, avšak vynikající. Někteří hodnotitelé by tvarůžek dokonce nechali zrát o týden déle.

Zajímavé je, že z hlediska celkové přijatelnosti byl na začátku pokusu jako lepší hodnocen Romadur, už po druhém týdnu to ale byly tvarůžky.

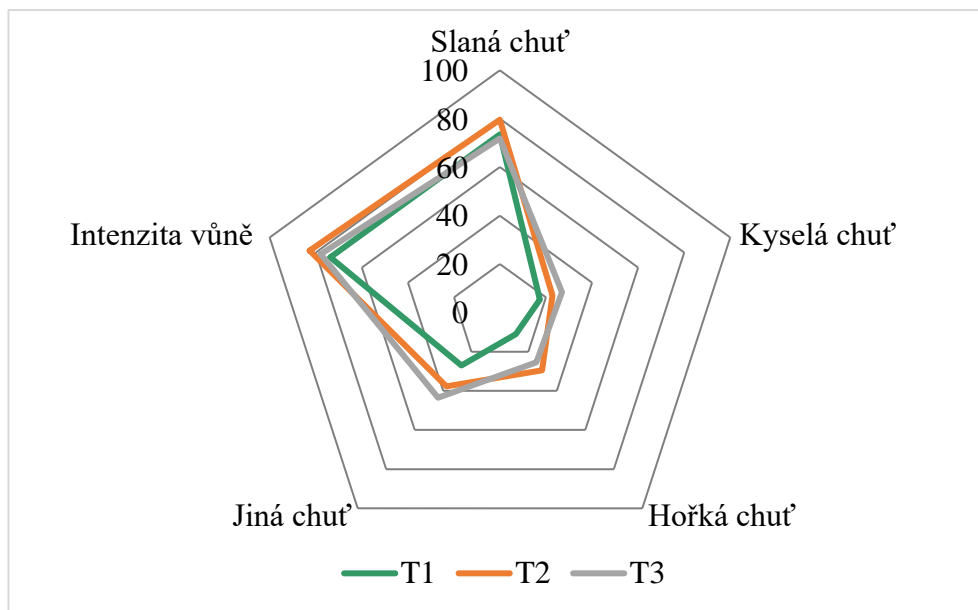
4.1.3 Změny během skladování (dozrávání)

U vzorku Olomouckých tvarůžků v průběhu skladování podle hodnotitelů klesala příjemnost vzhledu a barvy sýru, méně se jim zamlouvala konzistence. Avšak chuť ohodnotili jako nejlepší po čtvrtém týdnu skladování. Po čtvrtém týdnu skladování se zlepšila i celková přijatelnost vzorku. Vůně se podle hodnotitelů po nultém týdnu stala méně intenzivní. Jako nejpříjemnější byl zvolen vzorek po čtvrtém týdnu nicméně rozdíly jsou malé, a tak nelze tvrdit, že by se chutnost/celková přijatelnost tvarůžků během skladování výrazněji zlepšovala, nebo zhoršovala. (Obrázek 22)



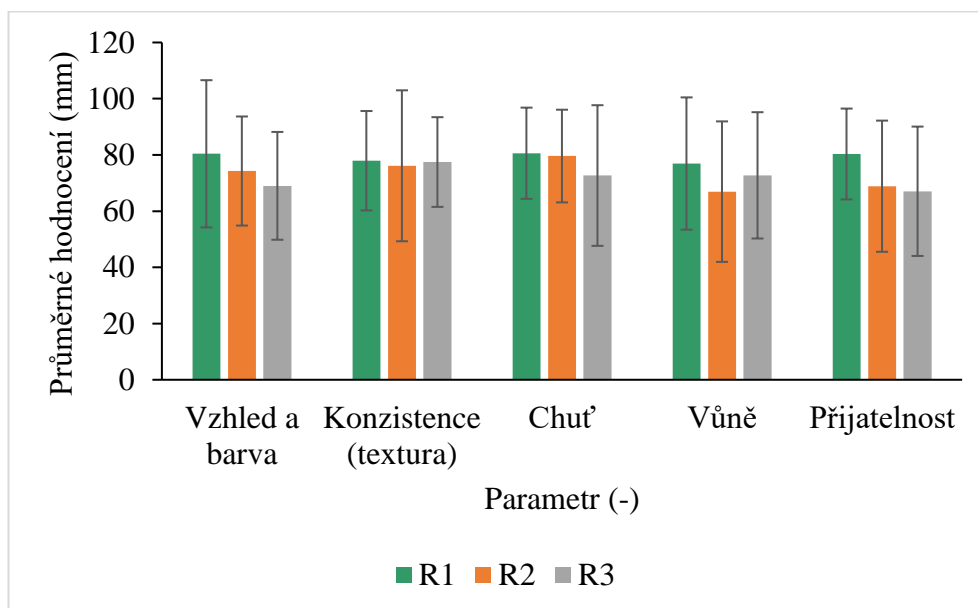
Obrázek 22: Porovnání tvarůžků v rámci skladování pro "vzhled a barva", "konzistence (textura)", "chuť", „vůně“ a „přijatelnost“ po zakoupení, po 2 týdnech, po 4 týdnech

Dle hodnotitelů se ve druhém i čtvrtém týdnu u Olomouckých tvarůžků zvýšila kyselá, hořká, a „jiná“ chuť i intenzita vůně oproti nultému týdnu. Slanost se zvýšila až ve čtvrtém týdnu skladování. Od druhého týdne se více zvýšila hořkost tvarůžků. (Obrázek 23)



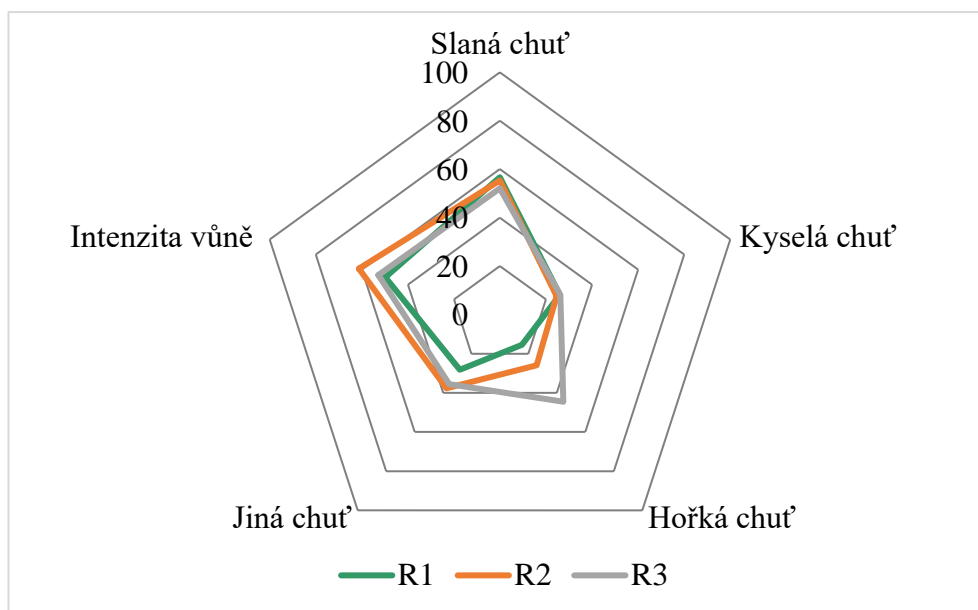
Obrázek 23: Olomoucké tvarůžky – profilový test, změny během skladování

U vzorku Romaduru v rámci skladování klesala podle hodnotitelů celková přijatelnost (Obrázek 24), méně se jim zamlouvala barva i celkový vzhled. Konzistence u Romaduru se podle hodnotitelů příliš neměnila. Po čtvrtém týdnu skladování se zhoršila i chuť a vůně se stala mírně intenzivnější. Jako nejpříjemnější vzorek byl hodnotiteli označen R1 – sýr ihned po zakoupení.



Obrázek 24: Porovnání Romaduru v rámci skladování pro "vzhled a barva", "konzistence (textura)", "chuť", „vůně“ a „přijatelnost“ po zakoupení, po 2 týdnech, po 4 týdnech

V rámci skladování se u Romaduru projevovala hořkost, po čtyřech týdnech hodnotitelé zaznamenali o dost výraznější hořkost oproti druhému týdnu (resp. oproti 0 týdnu). Dále se také zvyšovala intenzita vůně v závislosti na délce skladování. Podle hodnotitelů se slanost mírně snížila po čtyřech týdnech skladování. (Obrázek 25)

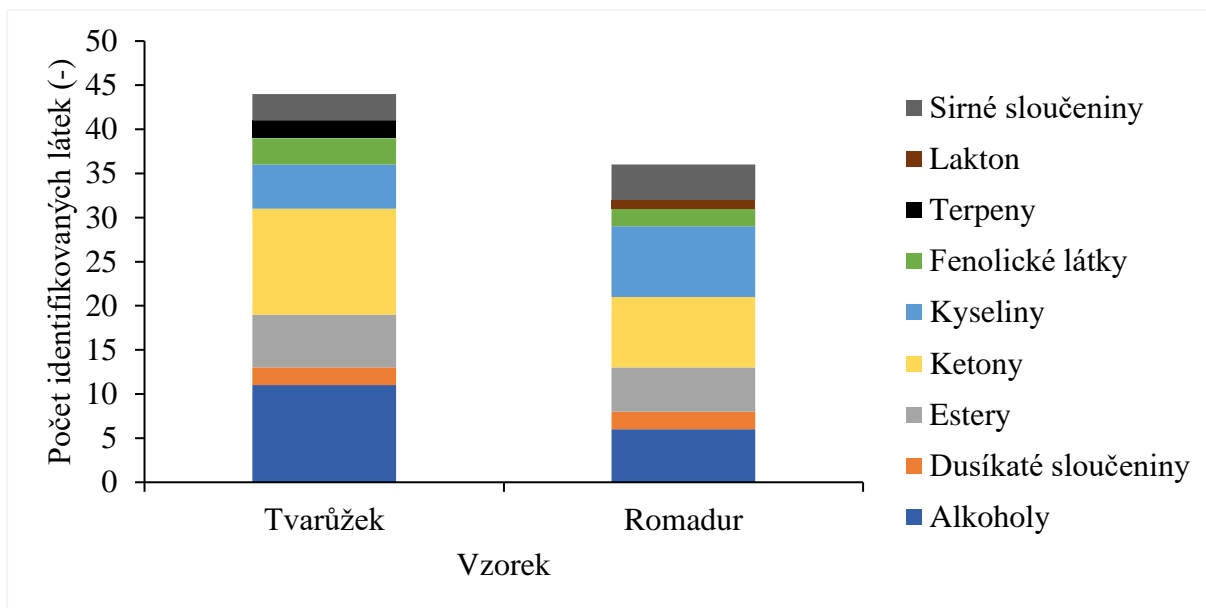


Obrázek 25: Romadur – profilový test, změny během skladování

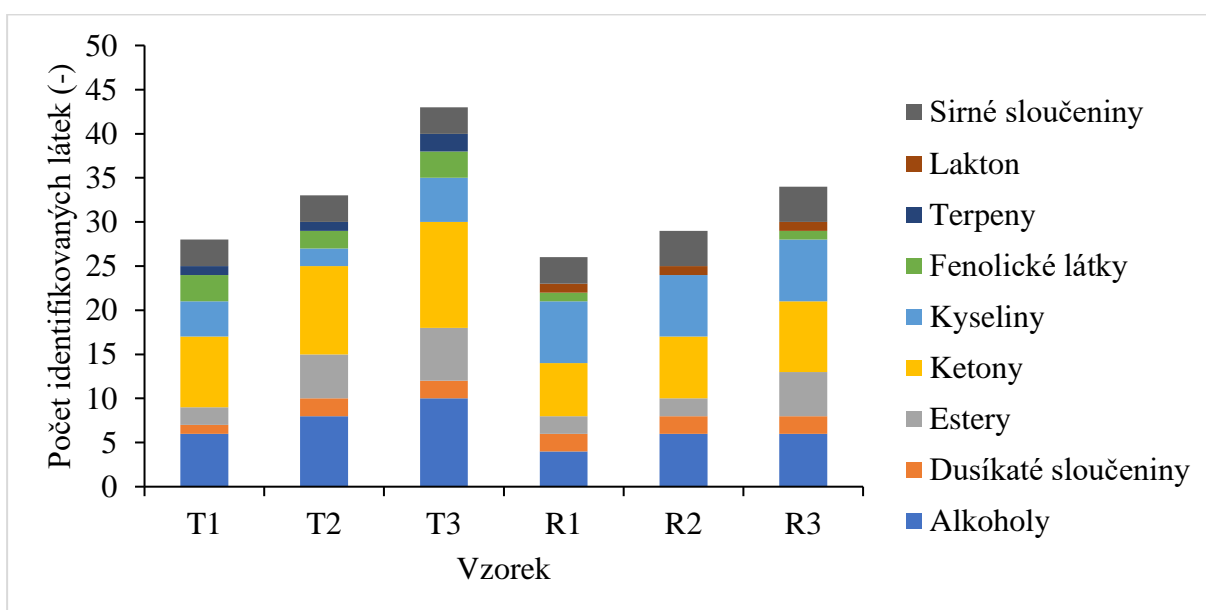
Celkově lze konstatovat, že změny během zrání sýrů mají významný vliv na jejich sensorickou kvalitu a přispívají k vytvoření charakteristických vlastností daných sýrů.

4.2 Stanovení těkavých látek

Pro získání celkového přehledu o těkavých látkách, které jsou produktem metabolických aktivit přítomných bakterií a kvasinek, byla vyhodnocena naměřená data z metody HS-SPME-GC-MS. Pro lepší zorientování byla data znázorněna pomocí sloupcových grafů a tabulek. Na Obrázek 26 je patrné, že Olomoucké tvarůžky obsahují více těkavých látek než Romadur. Předpoklad, že se v průběhu zrání bude zvyšovat celkový počet těkavých látek v rámci skupin, se potvrdil, jak je znázorněno na Obrázek 27. To může být způsobeno již zmíněnou enzymatickou aktivitou mikroorganismů a díky ní mohla vznikat širší škála látek v průběhu skladování (zrání). Všechny těkavé látky detekované v průběhu skladování jsou uspořádány do tabulky, která je umístěna v Příloha 1.



Obrázek 26: Celkový počet identifikovaných látek ve vzorcích Olomouckých tvarůžků a Romaduru podle skupin

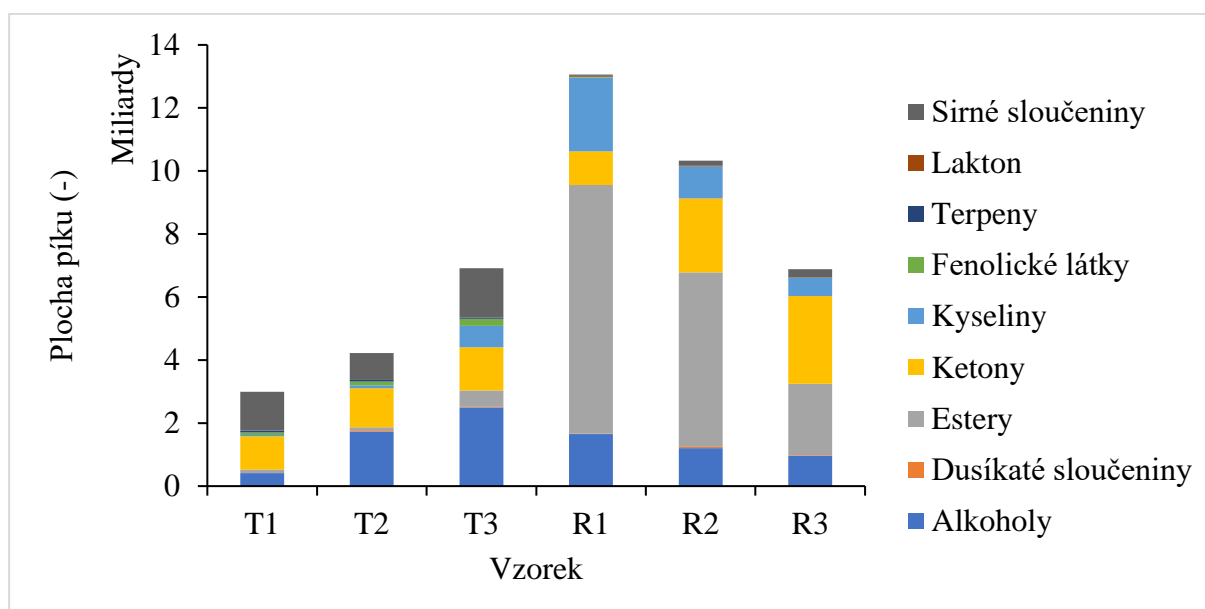


Obrázek 27: Celkový počet identifikovaných látek ve vzorcích sýrů Olomouckého tvarůžku a Romaduru v průběhu skladování

V obou vzorcích bylo celkem identifikováno 57 těkavých látek, 23 těkavých látek bylo totožně identifikováno v obou vzorcích. Těkavé látky identifikované ve vzorcích lze zařadit do 9 skupin, a to do sirných sloučenin, dusíkatých sloučenin, alkoholů, ketonů, kyselin, esterů, fenolických látek, terpenů a laktonů. Z výsledků je patrné, že nejzastoupenějšími skupinami co do počtu identifikovaných látek byly alkoholy a ketony. Následovaly kyseliny a estery. Dusíkaté sloučeniny, terpeny, fenolické látky a laktony se ve vzorcích objevovaly méně často. Přesné počty identifikovaných látek náležících do skupin jsou uvedeny v Tabulka 13.

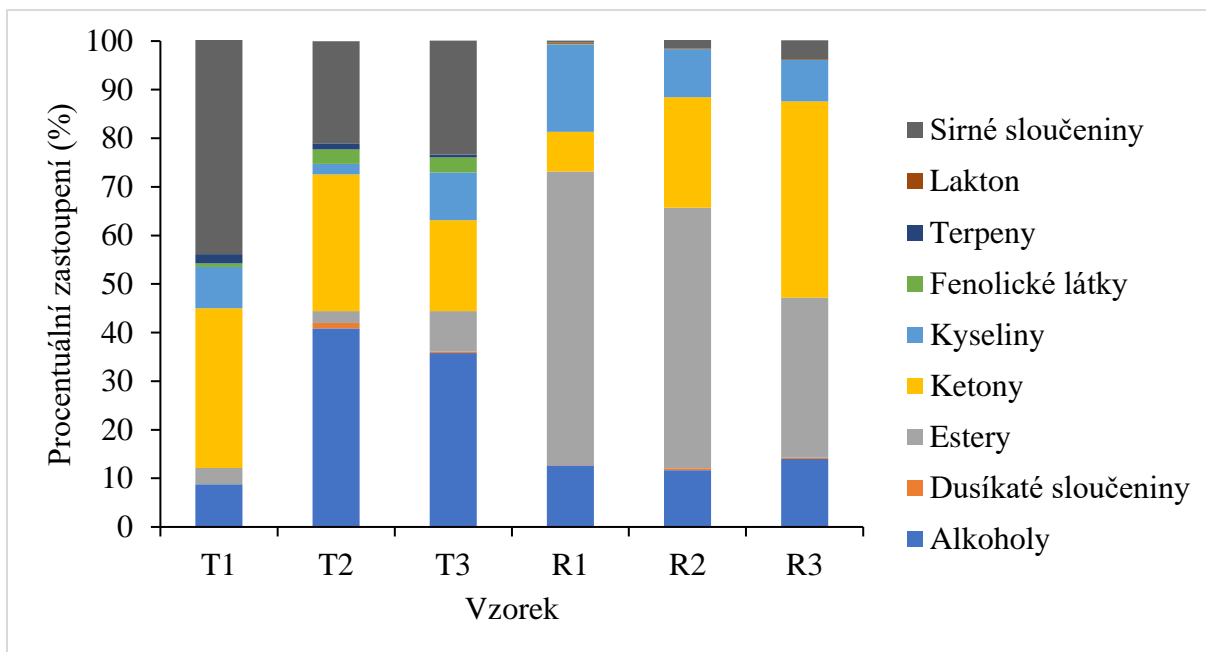
Tabulka 13: Počet identifikovaných těkavých látek dle skupiny pro sýry Romadur a Olomoucký tvarůžek

Skupina	Počet identifikovaných těkavých látek ve tvarůžku (-)	Počet identifikovaných těkavých látek v Romaduru (-)
Alkoholy	11	6
Dusíkaté sloučeniny	2	2
Estery	6	5
Ketony	12	8
Kyseliny	5	8
Fenolické látky	3	2
Terpeny	2	0
Lakton	0	1
Sírné sloučeniny	3	4
Celkem	44	36



Obrázek 28: Obsah jednotlivých skupin v průběhu skladování vyjádřen pomocí plochy píku (-)

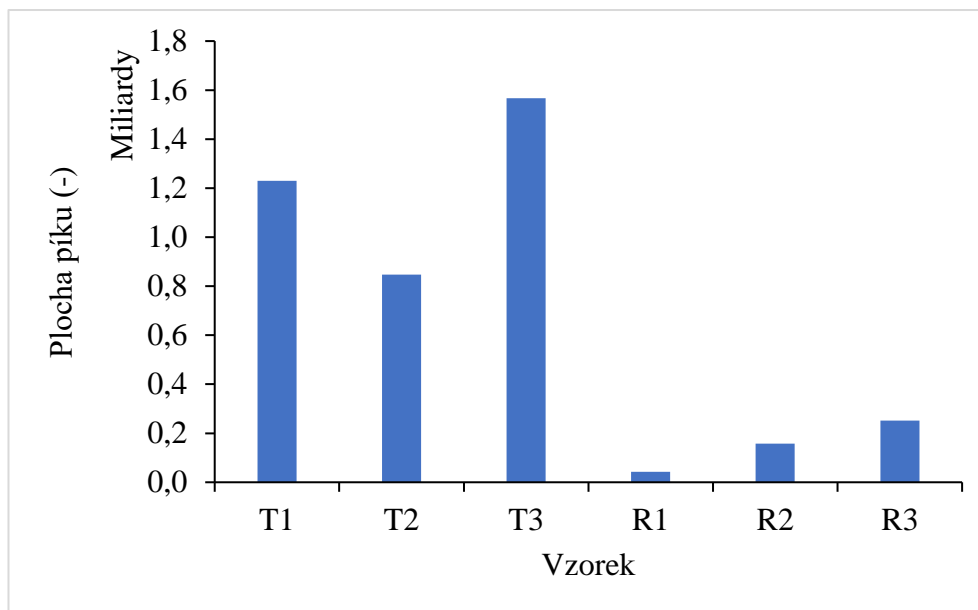
Z grafu (Obrázek 28) je patrné, že se celkové množství těkavých látek v tvarůžku během skladovacího pokusu (čtyři týdny) zvyšovalo, kdežto u vzorku Romaduru tomu bylo naopak a docházelo k poklesu. Množství alkoholů se ve vzorku tvarůžků v průběhu skladování zvyšovalo, stejně tak jako množství kyselin a esterů. U vzorku Romaduru docházelo v průběhu skladování ke zvyšování množství ketonů a kyselin, ale také docházelo ke snižování množství esterů a z menší míry i alkoholů. Procentuální zastoupení skupin látek, během skladování je vyjádřeno v Obrázek 29.



Obrázek 29: Obsah jednotlivých skupin v průběhu skladování vyjádřen pomocí procentuálního zastoupení (%)

Na první pohled je patrné, že se složení obou sýrů (Romadur vs. tvarůžek) liší. V obou grafických znázorněních si lze povšimnout, že vzorek Romaduru obsahuje z velké části estery (vznikající esterifikací krátkých volných mastných kyselin a primárních nebo sekundárních alkoholů; popřípadě alkoholózou). Právě vyšší obsah tuku u sýra Romadur lze považovat za zdroj prekurzorů pro vyšší obsah esterů v rámci všech skupin. Enzym esterázu zodpovědnou za esterifikaci mohou mít streptokoky, mezofilní a termofilní laktobacily. Přítomnost γ -dekalaktonu v Romaduru lze též vysvětlit vyšším obsahem tuku, kdy esterifikací hydroxy mastných kyselin vznikají laktony jakožto další látky odpovědné za aroma sýra. [31]

Množství sirných sloučenin, kam patří dimethyl disulfid, dimethyl trisulfid a dimethyl sulfon a methylthiohexanoát, bylo u vzorku Olomouckých tvarůžků větší než u vzorku Romaduru. Opět je to spjaté se základními složkami sýra, kdy Olomoucký tvarůžek má větší obsah bílkovin než Romadur. Produkce sirných látek souvisí s přítomností bakterie *Brevibacterium linens* a dalších koryneformních bakterií a kvasinek, zejména *Geotrichum candidum*. Děje se tak enzymaticky degradací methioninu, prekurzoru methanthiolu, ze kterého se autooxidací vytváří aromatické látky jako je dimethyldisulfid, dimethyltrisulfid a některé thioestery (jako u Romaduru detekovaný methylthiohexanoát) U tvarůžku po dvou týdnech skladování nastal pokles v množství sirných látek, ovšem po 4 týdnech lze vidět opětový nárůst těchto látek. U vzorku Romaduru v rámci skladování a zrání podle očekávání množství sirných látek vzrostlo. (Obrázek 30)



Obrázek 30: Zobrazení změny v obsahu sirných sloučenin v průběhu skladování vyjádřené pomocí plochy píku (-)

Mezi těkavé látky, které byly detekovány u obou sýrů (Příloha 1) patřily: pentan-2-on, dimethyl disulfid, heptan-2-on, 3-methylbutanol, acetoin, dimethyl trisulfid, nonan-2-on, trimethylpyrazin, kyselina octová, 2-ethylhexanol, undekan-2-ol, ethylester kyseliny kaprinové, benzylmethyl keton, 2-tridekanon, fenylacetát α -methyl-benzeethanol, kyselina kapronová, dimethylsulfon, fenylethyl alkohol, isopropyl myristát, kyselina kaprylová, p-cresol, 2-ethylfenol.

Právě fenylethyl alkohol, který se nacházel v obou druzích sýra spolu s fenylacetátem vznikají enzymatickým odbouráním fenylalaninu a způsobují štiplavou, hořkou a svíravou nejen vůni, ale i chuť a jsou spojovány s pachutí sýra. [32]

V tvarůžku byly nejvíce zastoupeny sirné látky jako dimethyldisulfid a dimethyltrisulfid, dále benzylmethylketon a ethylester kyseliny kaprinové. Ve stopovém množství se zde objevil α -pinen. Přítomna byla také kyselina isovalerová neboli 3-methylbutanová kyselina odpovědná za silný štiplavý odér.

Nejvíce zastoupenou látkou v Romaduru byl 3-methylester kyseliny máselné, a na rozdíl od kyseliny 3-methylbutanové jakožto její ester má ovocnou vůni. V Romaduru byla také z velké části zastoupena kyselina isobutanová a opět fenylethyl alkohol. Zajímavou identifikovanou látkou byl γ -dekalakton, který má ovocnou, kokosovou vůni a hraje roli ve výsledném aroma sýru. [25]

Bakterie *Brevibacterium linens* produkuje kromě sirných látek i námi detekované látky jako 3-methylbutanol, kyselinu 3-methylbutanovou, kyselinu octovou, pentan-2-on. [33] Tyto látky byly identifikovány u obou sýrů, což může souviset s její přítomností na povrchu. Rod *Streptococcus* může produkovat acetoin nebo butan-2-on (ten byl detekován ve větším % zastoupení u Romaduru) [34].

Je patrné, že mikrobiální složení má vliv na produkované těkavé látky

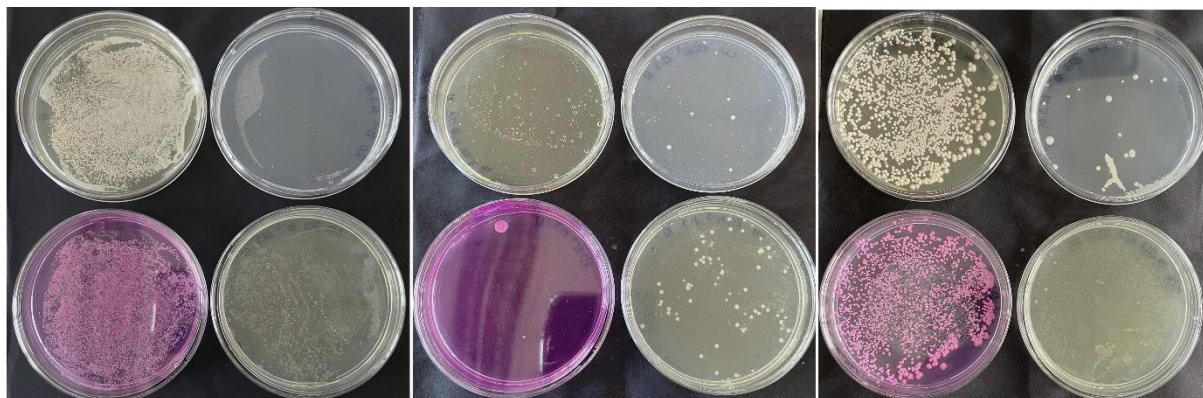
4.3 Mikrobiální profil sýrů

Mikrobiální profil sýrů je jedním ze základních aspektů jejich kvality a bezpečnosti. V průběhu výroby i u finálních výrobků samotných je sledována přítomnost především patogenních mikroorganismů. Často je sledována přítomnost i mikroorganismů, které mají pozitivní efekt na sensorické i technologické vlastnosti výrobku. Za tímto účelem jsou v současnosti kromě klasických kultivačních technik stále častěji využívány molekulárně diagnostické metody, založené zejména na polymerázové řetězové reakci (PCR). Obecně se jedná o metody, které umožňují detekci specifických sekvencí DNA a tím kvalitativní nebo i kvantitativní vyhodnocení mikrobiálního profilu nejen sýrů. Případně je využívána kombinace mikroskopických, kultivačních i zmíněných molekulárně diagnostických technik.

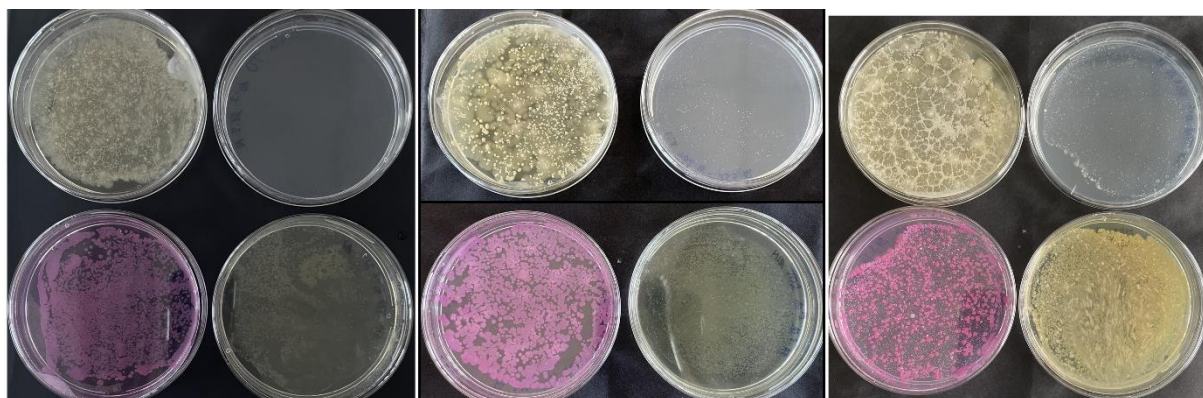
V rámci předkládané práce bylo provedeno klasické kultivační vyšetření a současně byla z testovaných vzorků sýrů izolována DNA, která byla po ověření čistoty a koncentrace použita jako DNA matrice do PCR za použití vybraných specifických primerů.

4.3.1 Kultivační vyšetření

Kultivační vyšetření podle 3.3.3.2 bylo provedeno ze vzorků FT1-3, R2-3, T1-3, tyto výsledky v tabulce uvedeny nejsou. V Příloha 9 jsou uvedeny výsledky kultivačního vyšetření vzorků Olomouckých tvarůžků (TO1-3, TS1-3) a v Příloha 10 jsou uvedeny výsledky vzorků Romaduru (RO1-3, RS1-3). Do tabulek byla zaznamenávána přítomnost mikroorganismů na agarových plotnách (médiá MPA, CZA, SA, DRBC) a pro obě ředění (10^0 a 10^{-2})



Obrázek 31: Ukázka kultivačního vyšetření pro vzorek Romaduru s ředěním 10^{-2} ; zleva RO1-RO2-RO3. Médium vlevo nahoře: SA, vpravo nahoře: CZA, vlevo dole: DRBC, vpravo dole: MPA



Obrázek 32: Ukázka kultivačního vyšetření pro vzorek Olomouckých tvarůžků s ředěním 10^{-2} ; zleva TO1-TO2-TO3. Médium vlevo nahoře: SA, vpravo nahoře: CZA, vlevo dole: DRBC, vpravo dole: MPA

Na základě morfologických a mikrobiologických znaků bylo rozlišeno u Olomouckých tvarůžků 9 morfologicky rozdílných mikroorganismů, u Romaduru jich bylo rozlišeno 7. Pod mikroskopem bylo pozorováno: oválné kvasinky, kulaté kvasinky, kvasinky ve tvaru obdelníku, tyčinky i koky.

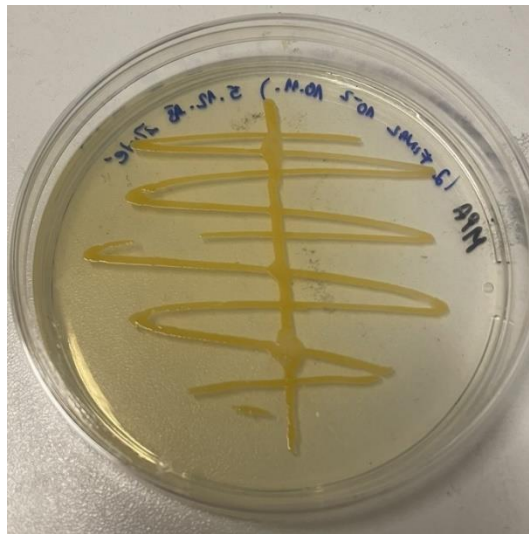
Z důvodu různých morfologických změn mikroorganismů (tvorba hyf, změn vzhledu matný x lesklý, barevné změny) kultivovaných na médiích, byla identifikace poměrně náročná a komplikovaná. Dle literatury může mít rod *Brevibacterium* za různých světelných podmínek (tma x světlo) odlišnou míru produkce barviv, a v rámci růstu mohou měnit svůj tvar (při ranném stádium jsou jako tyčinky, ve stacionární fázi existují jako kulaté útvary - koky). Někdy byl mikroorganismus vizuálně zaznamenán při ředění 10^{-2} , u ředění 10^0 zaznamenán nebyl. Předpokládám, že to bylo způsobené dominancí jednoho mikroorganismu nad druhým a zamezením růstu. Podmínky skladování (dozrávání) hrají důležitou roli v množství a počtu druhů mikroorganismů.

Na první pohled nebylo zřejmé, zda-li jsou rozdíly mezi jednotlivými kultivačními vyšetřeními v rozestupech dvou týdnů. U vzorku Romaduru (Obrázek 31) se u RO s ředěním 10^{-2} nevyskytovaly okrouhlé bílé lesklé vroubkované vypouklé mikroorganismy, po dvou týdnech se objevily 3 kolonie a po čtyřech týdnech se vyskytovalo více kolonií. Aby bylo možné kolonie spočítat a porovnat je mezi sebou, musely by být zavedeny další násobky ředění. Na Obrázek 31 a Obrázek 32 lze vidět nepatrná změna v průběhu zrání, kdy přibýlo více kolonií, popř. byly větší. Aby se toto tvrzení potvrdilo, navrhovala bych provedení více analýz a provedení skladovacího experimentu v rozdílných teplotách.

Dle publikovaných studií dochází v průběhu zrání k převládání bakteriálního mikrobiomu nad kvasinkami, jejichž množství by se mělo od druhého týdne zrání snžovat. [35] Tyto závěry se mi však v rámci předkládané práce nepodařilo potvrdit.

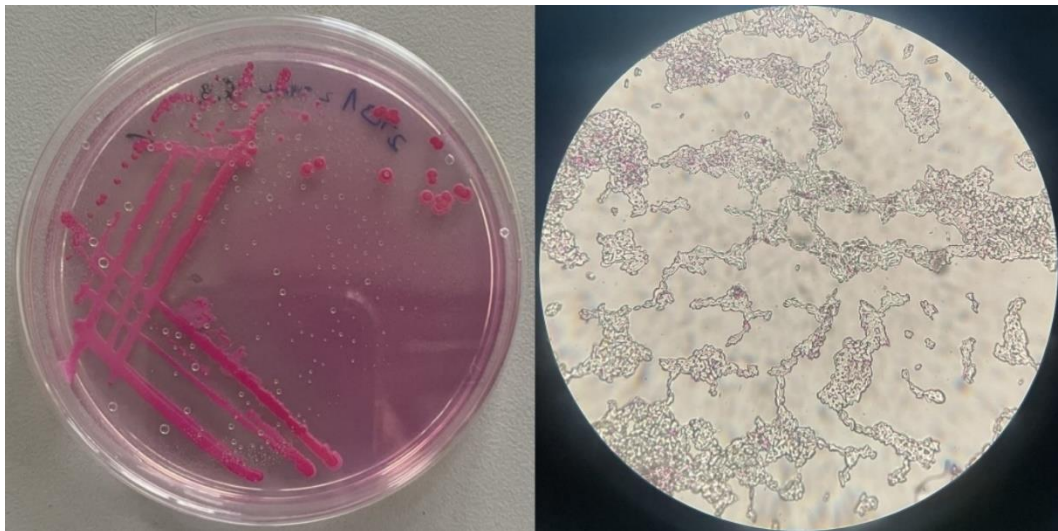
Odebírání středu sýra bylo také hůře proveditelné, zejména ke konečné fázi skladování (po čtyřech týdnech), z důvodu roztékání se mazu na povrchu. I přes sterilizaci nástrojů odebrání čistého středu bez mazu z povrchu nebylo možné.

Pro ukázkou byly uvedeny jen nejvýraznější mikroorganismy. Ze vzorku FT1 byla přeočkována oranžová lesklá kulatá vypouklá. V souladu s údaji uváděných v řadě publikací se domnívám, že se jedná o *Brevibacterium linens*. (Obrázek 33).



Obrázek 33: Oranžová lesklá bakterie přeočkováná z FT1

Dále byla vybrána kvasinka přeočkováná z média DRBC z TO1. Pod mikroskopem se jevila jako oválná kvasinka, svým tvarem i morfologií odpovídala kvasince *Geotrichum candidum*. Na Obrázek 35 je kvasinka, nejspíš opět *Geotrichum candidum*, avšak po delším čase kultivace lze vidět, že kolem vytvořila vlákna. Tato kvasinka se objevovala i na vzorcích Romaduru.



Obrázek 34: Oválná kvasinka přeočkováná z DRBC ze vzorku TO1



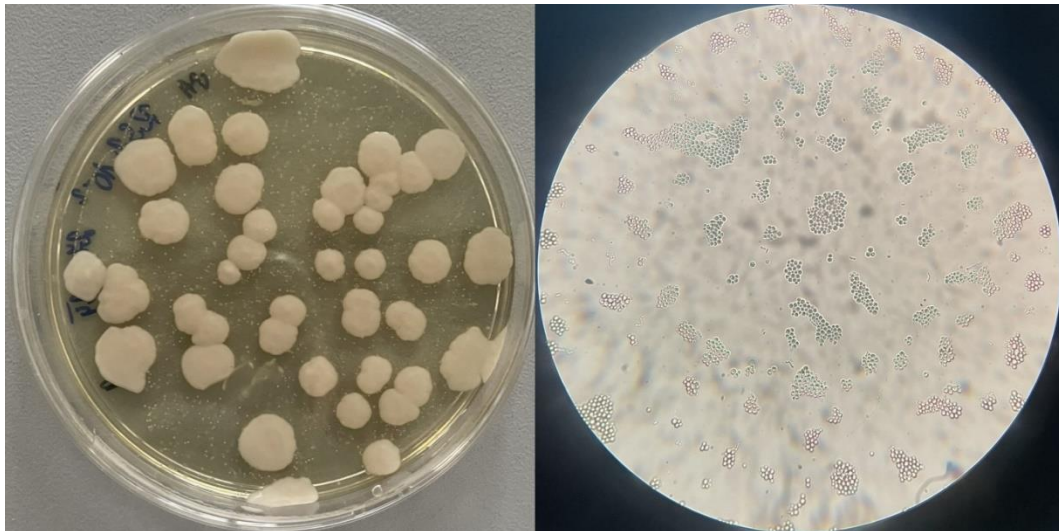
Obrázek 35: *Oválná kvasinka přeočkovaná z T1*

Dále byla přeočkována mléčná lesklá kulatá z média CZA ze vzorku R1 (Obrázek 36), která po kultivaci získala nažloutlou barvu. Pod mikroskopem se jevila jako G⁺ tyčinky. Lze se domnívat, že se jedná o často zastoupený rod bakterií *Arthrobacter* spp. na povrchu sýrů typu Limburger a Romadur, CZA podporuje růst půdních bakterií, kam se řadí i *Arthrobacter* spp.



Obrázek 36: *Přeočkovaná bakterie z média CZA z RS1*

Ze vzorku RO3 byla odebrána zvlněná bílá matná kulatá vypouklá (Obrázek 37). Pod mikroskopem byly vidět shluky kulatých kvasinek. Morfologicky odpovídá *Debaryomyces hansenii*.



Obrázek 37: Kvasinka z média SA z RO3

4.3.2 Izolace DNA, spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty

Celková DNA izolovaná z odebraných vzorků sýrů metodou fenolové extrakce a pomocí magnetických částic byla podrobena spektrofotometrickému stanovení koncentrace a čistoty.

Absorbance byla změřena třikrát pro každý vzorek. Výsledné hodnoty byly uvedeny jako průměr tří naměřených absorbancí. Všechny výstupní hodnoty z přístroje Nanodrop jsou uvedeny v Tabulka 14.

Tabulka 14: Hodnoty naměřené koncentrace a hodnoty absorbancí pro vzorky DNA izolované magnetickými částicemi a fenolem

Vzorek	DNA izolovaná magnetickými částicemi				DNA izolovaná fenolem			
	Koncentrace (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Koncentrace (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
T1a	108,8	2,2	1,7	1,3	1455,0	29,1	16,3	1,8
T1b	99,2	2,0	1,5	1,3	2484,3	49,7	22,1	2,3
FT1a	108,4	2,2	1,6	1,3	1253,8	25,1	14,9	1,7
FT1b	112,2	2,2	1,7	1,3	2148,0	43,0	22,4	1,9
T2a	138,4	2,8	2,1	1,3	1150,3	23,0	14,7	1,6
T2b	127,9	2,6	1,9	1,3	2197,8	44,0	23,2	1,9
FT2a	73,4	1,5	1,1	1,3	1824,0	36,5	20,9	1,7
FT2b	101,5	2,0	1,5	1,3	1827,8	36,6	18,0	2,0
R2a	101,6	2,0	1,6	1,3	1054,8	21,1	14,1	1,5
R2b	101,8	2,0	1,6	1,3	1479,9	29,6	18,0	1,7
FT3a	94,9	1,9	1,5	1,3	1874,4	37,5	21,1	1,8
FT3b	91,3	1,8	1,4	1,3	1096,0	21,9	14,6	1,5
T3a	116,2	2,3	1,8	1,3	965,9	19,3	12,7	1,5
T3b	103,6	2,1	1,6	1,3	1359,0	27,2	17,3	1,6
R3a	94,4	1,9	1,5	1,3	1408,7	28,2	17,8	1,6
R3b	80,7	1,6	1,3	1,3	1267,0	25,3	16,4	1,5
TO1a	78,8	1,6	1,2	1,3	2123,7	42,5	24,5	1,7
TO1b	65,1	1,3	1,0	1,3	2007,2	40,2	23,3	1,7
TS1a	48,5	1,1	1,0	1,1	2110,8	42,2	23,4	1,8

Tabulka 14 - pokračování: Hodnoty naměřené koncentrace a hodnoty absorbancí pro vzorky DNA izolované magnetickými částicemi a fenolem

Vzorek	DNA izolovaná magnetickými částicemi				DNA izolovaná fenolem			
	Koncentrace (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Koncentrace (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
TS1b	59,0	1,2	1,0	1,2	1209,1	24,2	15,7	1,5
RO1a	80,8	1,6	1,4	1,2	1455,2	29,1	18,7	1,6
RO1b	45,7	0,9	0,9	1,1	1821,6	35,5	17,5	2,0
RS1a	89,6	1,8	1,4	1,3	1322,0	26,4	16,9	1,6
RS1b	90,0	1,8	1,4	1,3	2347,6	47,0	21,6	2,2
TO2a	66,8	1,3	1,0	1,3	1204,3	24,1	12,6	1,9
TO2b	80,7	1,3	1,0	1,3	3584,0	71,7	33,3	2,2
TS2a	98,4	2,0	1,7	1,2	2537,4	50,7	21,9	2,3
TS2b	102,9	2,1	1,8	1,1	10080,2	201,6	130,2	1,6
RO2a	77,9	1,6	1,2	1,3	1392,7	27,9	14,5	1,9
RO2b	69,7	1,4	1,1	1,3	2449,4	49,0	21,7	2,3
RS2a	89,3	1,8	1,4	1,3	5188,2	103,8	59,2	1,8
RS2b	87,1	1,7	1,4	1,3	2263,5	45,3	20,8	2,2
TO3a	109,9	2,2	1,7	1,3	915,8	18,3	11,7	1,6
TO3b	95,4	1,9	1,5	1,3	1980,2	39,6	21,5	1,8
TS3a	86,4	1,7	1,3	1,3	1858,0	37,2	20,9	1,8
TS3b	79,4	1,6	1,2	1,3	2165,4	43,3	23,3	1,9
RO3a	46,2	0,9	0,7	1,3	1811,6	36,2	20,0	1,8
RO3b	40,3	0,8	0,7	1,2	2255,7	45,1	23,5	1,9
RS3a	130,3	2,6	2,0	1,3	2280,9	45,6	23,5	1,9
RS3b	128,7	2,6	2,0	1,3	1845,7	36,9	20,3	1,8

vzorek R1 chybí z důvodu ztráty; a–1. duplikát b–2. duplikát

Izolace fenolem měla lepší výsledky z hlediska získané koncentrace vzorků. Koncentrace vyizolované DNA fenolem byla až několikanásobně větší než u izolace magnetickými částicemi. V tomto případě je však nutné brát v úvahu i množství hrubého lyzátu, který byl pro izolaci DNA použit. V případě izolace fenolem to bylo 500 μl u magnetických částic jen 100 μl. Lze si také povšimnout, že hodnota poměru A₂₆₀/A₂₈₀ je u magnetických částic průměrně 1,3, u izolace fenolem je hodnota v rozmezí od 1,6-2,3. Ideální poměr pro čistou DNA by měl být v rozmezí od 1,8 – 2,0. Čistější DNA se tedy povedla získat při izolaci fenolem. Ovšem ani tak se nedá říct, že by všechny vzorky izolované fenolem byly čisté. Odchylku od ideální hodnoty mohla způsobit kontaminace samotným fenolem nebo proteiny (na což ukazuje poměr A₂₆₀/A₂₈₀ nižší než 1,8) a RNA (A₂₆₀/A₂₈₀ nižší než 2,0).

4.3.3 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Byla provedena specifická qPCR pro průkaz domény *Bacteria*, tedy bakteriální DNA a celkových kvasinek ve všech vzorcích uvedených v .

. Amplifikace probíhala za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria* a celkové kvasinky uvedené v části 3.3.3.9 v Tabulka 7. Všechny vzorky DNA získané izolací magnetickými částicemi a izolací fenolem byly naředěny na finální koncentraci celkové DNA 10 ng/μl tak, aby koncentrace všechny vzorků DNA měly jednotnou výslednou koncentraci použitou pro reakci qPCR.

Výsledky qPCR, konkrétně analýzy křivek tání, tedy teploty tání (T_m) jsou uvedeny v .

Tabulka 15: Výsledky qPCR pro prokázání přítomnosti bakterií a kvasinek použitím DNA vyizolované dvěma způsoby – izolací magnetickými částicemi a izolací fenolem

Vzorek	Bakterie		Kvasinky		Vzorek	Bakterie		Kvasinky	
	MČ	Fenol	MČ	Fenol		MČ	Fenol	MČ	Fenol
	T_m (°C)	T_m (°C)	T_m (°C)	T_m (°C)		T_m (°C)	T_m (°C)	T_m (°C)	T_m (°C)
FT1a	-	88,5	-	86,2	TO1a	-	-	86,5	86,5
FT1b	-	-	-	-	TO1b	88,5	-	-	87,0
FT2a	88,3	-	86,5	-	TO2a	88,5	-	86,7	86,5
FT2b	-	88,7	86,7	-	TO2b	-	88,5	87	86,3
FT3a	88,2	89,3	-	-	TO3a	88,2	-	86,5	86,8
FT3b	-	-	-	-	TO3b	88,5	88,5	86,7	86,5
R2a	87,5	-	86,5	-	TS1a	-	88,8	-	86,7
R2b	87,5	-	86,5	86,3	TS1b	88,7	-	86,7	86,3
R3a	87,5	-	86,5	-	TS2a	-	88,5	86,8	86,2
R3b	87,5	-	-	-	TS2b	-	88,5	-	86,8
T1a	-	88,8	86,7	86,5	TS3a	88,5	-	86,7	-
T1b	-	88,5	-	-	TS3b	88,8	88,8	86,7	86,5
T2a	-	-	86,5	86,7	RO1a	87,8	-	86	86,5
T2b	-	-	86,5	86,5	RO1b	87,7	87,8	86	85,8
T3a	-	-	86,5	-	RO2a	-	-	86,5	86,0
T3b	88,5	88,7	86,5	86,5	RO2b	-	87,8	86,5	86,0
					RO3a	87,7	-	86	86,5
					RO3b	87,5	87,8	86	86,2
					RS1a	-	89,7	-	-
					RS1b	-	-	87	-
					RS2a	87,5	-	86,8	-
					RS2b	88,0	-	-	-
					RS3a	-	-	-	-
					RS3b	-	-	87	86,7

vzorek R1 chybí z důvodu ztráty; a–1. duplikát b–2. duplikát; - produkt nebyl detekován

Současně byla provedena qPCR analýza za použití DNA získané přímo z jednotlivých kolonií, které narostly v průběhu výše uvedeného kultivačního vyšetření jednotlivých vzorků.

Byly vybrány vzorky: 2x RO3 na SA, RO1 na DRBC, TS1 na CZA, TO1 na DRBC, TO1 na SA, podrobný popis kolonií je uveden v Tabulka 16

Tabulka 16: Popis kolonií a výsledky qPCR se specifickými primery pro doménu Bacteria a celkové kvasinky s DNA izolovanou z uvedených kolonií vyjádřených hodnotou teploty tání v bodě nejvyššího píku

Vzorek	Médium	Popis	Kvasinky	Bakterie
			T _m (°C)	T _m (°C)
RO3	SA	Bílá lesklá kulatá vypouklá	-	87,7
RO1	DRBC	Okrouhlá bílá matná kulatá vypouklá	-	-
TS1	CZA	Okrouhlá mléčná lesklá kulatá vypouklá	-	87,8
TO1	DRBC	Okrouhlá bílá matná vroubkovaná plochá	87,5	-
TO1	SA	Zvlněná mléčná matná vroubkovaná plochá	86,5	-
RO3	SA	Zvlněná bílá matná kulatá vypouklá	85,8	-

- nezaznamenáno

Tabulka 17: Teploty tání odpovídající pozitivním kontrolám při provedení qPCR specifické pro doménu Bacteria (primer Feub/Reub) a celkové kvasinky (primer NLIF/NLAR)

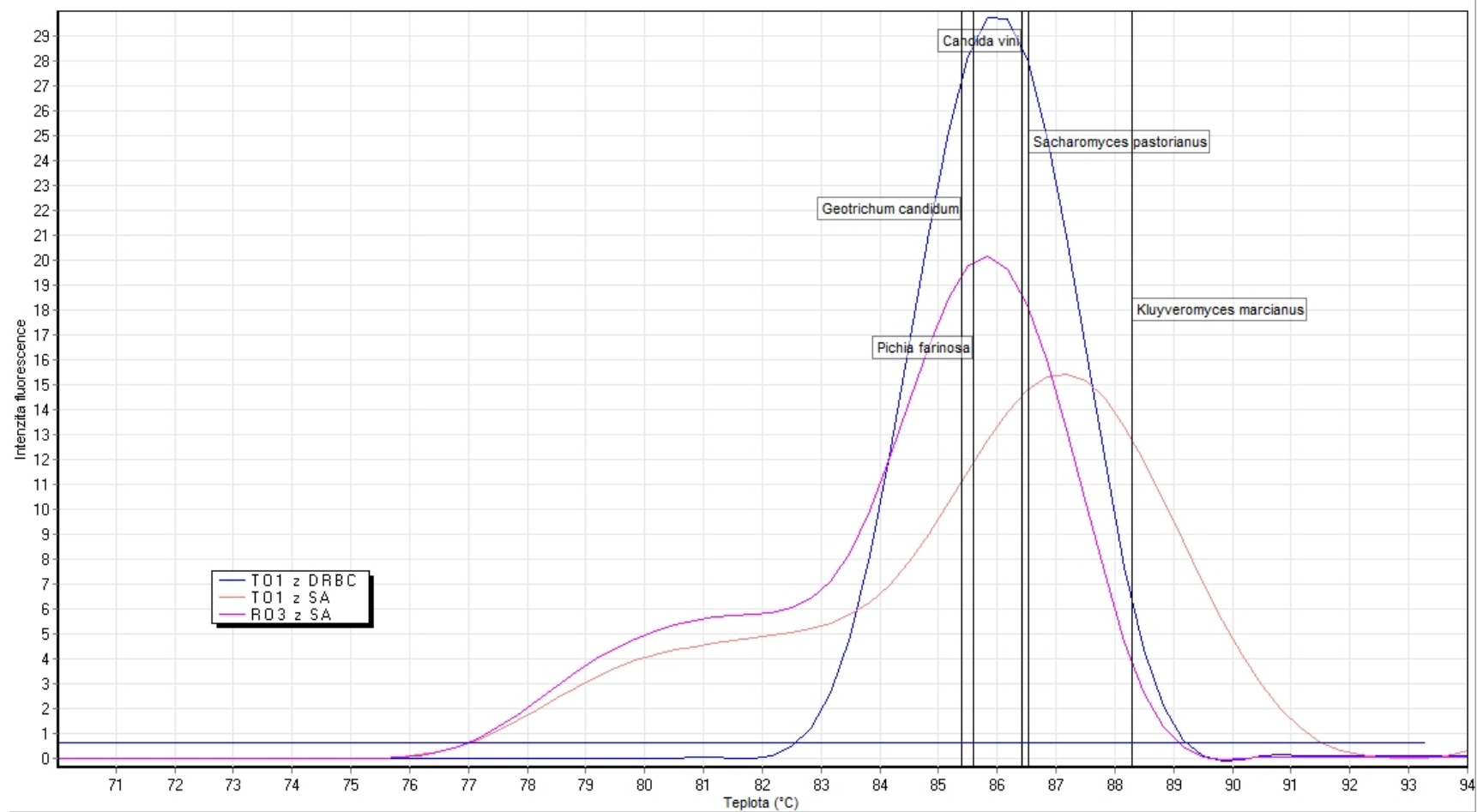
MO	Pozitivní kontrola	T _m (°C)
Bakterie	<i>Lactobacillus helveticus</i> CC	87,8
	<i>Bifidobacterium animalis</i>	87,8
	<i>Brevibacterium linens</i>	89,7
Kvasinky	<i>Candida vini</i>	86,5
	<i>Geotrichum candidum</i>	85,5
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	88,3
	<i>Pichia farinosa</i>	85,5
	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	86,5

Dosažené teploty tání (Tabulka 16) byly porovnány s teplotami tání produktů PCR získaných za shodných podmínek pomocí DNA jednotlivých pozitivních kontrol (Tabulka 17), které tvořily mikroorganismy, jejichž výskyt byl v daném typu výrobku předpokládán.

Zvlněná bílá matná kulatá vypouklá (RO3 z SA) se se svou naměřenou teplotou tání 85,8 °C pohybovala blízko teplot tání pozitivních kontrol *Geotrichum candidum* (85,5 °C) a *Pichia farinosa* (85,5 °C). *Pichia* je podrod *Debaryomyces Hansenii*, proto by se dalo tvrdit, že je to skutečně *Debaryomyces Hansenii*. Zvlněná mléčná matná vroubkovaná plochá (TO1 z SA) se s teplotou tání 86,5 °C shoduje u pozitivních kontrol na *Candida vini* (86,5 °C) nebo *Saccharomyces pastorianus* (85,6 °C) Okrouhlá bílá matná vroubkovaná plochá (TO1 z DRBC) s teplotou tání 87,5 °C se pohybovala mezi pozitivní kontrolou na *Candida vini* (86,5 °C) nebo *Saccharomyces pastorianus* (85,6 °C) a *Kluyveromyces marxianus* (88,3°C). Tato data jsou graficky znázorněna na Obrázek 38.

Bílá lesklá kulatá vypouklá (RO3 z SA) s teplotou tání 87,7 °C a okrouhlá bílá matná kulatá vypouklá s teplotou tání 87,8 °C se shodují s pozitivní kontrolou na *Lactobacillus helveticus* CC (87,8 °C) nebo *Bifidobacterium animalis* (87,8 °C). *Bifidobacterium animalis*

tvoří mléčné až bílé kolonie, proto se lze domnívat, že se jedná o bakterie rodu *Bifidobacterium*.



Obrázek 38: Výstup z qPCR se specifickými primery NL1F/NL4R pro celkové kvasinky ze vzorků TO1 z DRBC, TO1 z SA a RO3 z SA

Pomocí qPCR byla potvrzena přítomnost kvasinek ve vzorcích TO1 z DRBC, TO1 z SA a RO3 z SA. Přítomnost bakterií byla potvrzena ve vzorku RO3 z SA a TS1 z CZA. Melt analýza je znázorněna na obrázku 38. U vzorku RO1 DRBC se bohužel nepodařilo potvrdit, že se jedná o kvasinku, nebyl detekován odpovídající produkt PCR, i když mikroskopická analýza prokázala přítomnost kulatých buněk, jejichž velikost by odpovídala buňkám kvasinek. To mohlo být způsobeno špatným promícháním DNA před provedením reakce. Popis kolonií je uveden v Tabulka 16.

Pro důkladnější identifikace amplifikovaných produktů byla provedena elektroforéza s 1,8% agarosovým gelem. Ta potvrdila výsledky qPCR a nepřítomnost nespecifických produktů. PCR. Na agarosovém gelu byly detekovány produkty qPCR pro doménu *Bacteria* o velikosti 466 bp a pro celkové kvasinky o velikosti 500 bp u všech vzorků, u kterých byla zaznamenána fluorescence z *Tabulka 15*.

Mikrobiologický rozbor (kultivace na ztuženém médiu i mikroskopická analýza) potvrdil, že by všechny vzorky měly obsahovat bakterie i kvasinky. To se ale u všech vzorků nepodařilo prokázat pomocí qPCR. Důvodem může být, že získaná DNA, které byla použita jako DNA matrice do PCR byla naředěna na koncentraci 10 ng/μl, přičemž se jedná o koncentraci celkovou. Zahrnuje tedy jak bakteriální, tak kvasinkovou DNA. Proto se můžeme domnívat, koncentrace cílové (ať už kvasinkové nebo bakteriální) DNA byla pod limitem detekce qPCR. V následujících pracích proto navrhuji upravit vzorky na vyšší koncentraci, a to 100 ng/μl. Současně je nutné poznamenat, že metody izolace DNA magnetickými částicemi a fenolem poskytly rozdílné výsledky v koncentraci i kvalitě získané DNA. Zde se zřejmě projevila komplexnost vzorků, pro které je charakteristický vysoký obsah látek, které mohou ovlivnit zmiňovanou kvalitu DNA. Zejména se jedná o vysoký obsah proteinů a různých solí.

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vyhodnotit změny sensorické kvality, profilu těkavých látek a mikrobiálního profilu dvou vybraných sýrů zrajících pod mazem, Olomouckých tvarůžků a Romaduru, v průběhu skladování po dobu čtyř týdnů.

Senzorická analýza podle očekávání ukázala určité rozdíly v sensorických vlastnostech mezi oběma sýry, které se zvětšovaly v průběhu skladování (dozrávání). Z hlediska celkové přijatelnosti byl na začátku pokusu jako lepší hodnocen Romadur, na konci pokusu to byly tvarůžky. Romadur byl hodnocen jako jemnější, s mírnější vůní, kdežto Olomoucké tvarůžky vykazovaly intenzivnější vůni.

Změny během prozrávání probíhaly u obou sýrů odlišně. U tvarůžků docházelo ke změně barvy, vzhledu, tvaru, sýry byly méně pružné a měkčí, nicméně chuť se zlepšovala a vzorek nejvíce prozrálý byl hodnocen jako celkově nejlepší/nejpřijatelnější, i když se u něj objevila mírná kvasničná chuť. U Romaduru během dozrávání došlo ke zhoršení barvy i vzhledu, ale především se zhoršila chuť a vůně, hodnotitelé zaznamenali hořkou chuť; jeho celková přijatelnost naopak klesala.

Se sensorickými vlastnostmi, především chutí a vůní, souvisí i odlišný profil těkavých látek. Analýza těkavých látek pomocí HS-SPME-GC-MS odhalila přítomnost hned 57 látek, z toho 23 jich bylo společných pro oba sýry. Identifikované látky byly rozděleny do 9 chemických skupin, nejpočetnější byly v tvarůžcích alkoholy a ketony, v Romaduru ketony a kyseliny.

I z hlediska obsahu se složení obou sýrů lišilo; v Romaduru kvantitativně převažovaly estery, v tvarůžcích sirné sloučeniny. Sirné sloučeniny, látky způsobující charakteristické pikantní aroma, se však nacházely v obou sýrech a byly odhaleny čtyři, a to dimethyldisulfid, dimethyltrisulfid, dimethylsulfon a methylthiohexanoát.

Během dozrávání se celkové množství těkavých látek v tvarůžku zvyšovalo, u Romaduru tomu bylo naopak. S tím velmi pravděpodobně souvisí i výše zmíněné hodnocení přijatelnosti sýrů, která se u tvarůžků zvyšovala, u Romaduru naopak.

Oba sýry se lišily v rámci sensorických vlastností i obsahu těkavých látek, proto lze konstatovat vliv mikroflóry na tyto parametry. Pro výrobu sýrů zrajících pod mazem (Olomouckých tvarůžků i Romaduru) se používají rozdílné kombinace kultur *B. linens*, *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Arthrobacter* spp a kvasinek *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces marxianus* aj. Pro detailnější pochopení vlivu mikroflóry na obsah těkavých látek a sensorické kvality bude v následujících pracích řešeno zařazení mikroorganismů do rodů a druhů.

Mikrobiologická analýza potvrdila přítomnost bakterií a kvasinek na okraji i ve středu obou sýrů. Na základě morfologických znaků a pomocí PCR bylo ve tvarůžcích nalezeno 9 morfologicky rozdílných mikroorganismů, u Romaduru jich bylo nalezeno 7. Z důvodu morfologických změn nelze s jistotou určit změnu mikrobiomu v průběhu skladování.

Pomocí qPCR se podařilo prokázat přítomnost bakterií a kvasinek jen v některých vzorcích, protože cílová DNA byla zřejmě pod limitem detekce této metody. Proto bude předmětem následujících prací s cílem průkazu mikroorganismů podílejících se na aroma zkoumaných sýrů, optimalizace metody včetně zisku DNA v lepší kvalitě, případně použití PCR v kombinaci s jinými molekulárně-diagnostickými metodami.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ROGINSKI, Hubert, Patrick F. FOX a John W. FUQUAY. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Amsterdam: Academic Press, 2003. ISBN 0-12-227239-0.
- [2] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-7080-510.
- [3] MCSWEENEY, P. L. H., P. F. FOX, Paul D. COTTER a David W. EVERETT. *Cheese - Chemistry, Physics & Microbiology (4th Edition)*. Fourth edition. London ; San Diego: Elsevier, 2017, 1264 s. ISBN 9780124170124.
- [4] Sýry zrající pod mazem. *Sýry od Madety* [online]. c2022-2024 [cit. 2024-01-10]. Dostupné z: <https://www.syryodmadety.cz/syry/syry-zrajici-pod-mazem>
- [5] Olomoucké tvarůžky. *Olomoucké tvarůžky* [online]. [cit. 2024-01-13]. Dostupné z: <https://www.tvaruzky.cz/>
- [6] RITSCHARD, Jasmine S. a Markus SCHUPPLER. The Microbial Diversity on the Surface of Smear-Ripened Cheeses and Its Impact on Cheese Quality and Safety. *Foods* [online]. 2024, **13**(2) [cit. 2024-05-19]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods13020214
- [7] Spotřeba potravin - 1948 - 2022. *Český statistický úřad* [online]. 2022 [cit. 2024-01-11]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin-1948-2022#>
- [8] A.W., Loštice. Olomoucké tvarůžky - Nová výroba v Lošticích. *Youtube* [online]. 2023, 1.9.2023 [cit. 2024-05-19]. Dostupné z: https://www.youtube.com/watch?v=OWAF5_4WFow
- [9] Mistr sýrař 2 - Romadur. *Youtube* [online]. 2022, 28.1.2022 [cit. 2024-05-19]. Dostupné z: <https://www.youtube.com/watch?v=iAe8QpReCGQ>
- [10] MCSWEENEY, Paul L.H. a John P. MCNAMARA, ed. *Encyclopedia of dairy sciences*. Third edition. Elsevier Academic Press, 2021. ISBN 978-0-12-818767-8.
- [11] COTTER, Paul D. a Tom P. BERESFORD. Microbiome Changes During Ripening. In: *Cheese* [online]. Elsevier, 2017, s. 389-409 [cit. 2024-05-19]. ISBN 9780124170124. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-417012-4.00015-6
- [12] COGAN, T.M. Bacteria, Beneficial: *Brevibacterium linens* , *Brevibacterium aurantiacum* and Other Smear Microorganisms. In: *Reference Module in Food Science* [online]. Elsevier, 2016 [cit. 2024-05-19]. ISBN 9780081005965. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.00632-6

- [13] BOCKELMANN, Wilhelm. Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses. *International dairy journal* [online]. OXFORD: Elsevier, 2002, **12**(2), 123-131 [cit. 2024-05-19]. ISSN 0958-6946. Dostupné z: doi:10.1016/S0958-6946(01)00152-2
- [14] FOX, P. F. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. 3rd ed. London ; Oxford ; San Diego: Elsevier Academic Press, 2004, 429 s. ISBN 9780122636516.
- [15] S. RITSCHARD, Jasmine, Lea AMATO, Yadhu KUMAR, Britta MÜLLER, Leo MEILE a Markus SCHUPPLER. The role of the surface smear microbiome in the development of defective smear on surface-ripened red-smear cheese. *AIMS Microbiology* [online]. 2018, **4**(4), 622-641 [cit. 2024-05-19]. ISSN 2471-1888. Dostupné z: doi:10.3934/microbiol.2018.4.622
- [16] Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny (Text s významem pro EHP). *EUR-Lex* [online]. 2005, 22.12.2005 [cit. 2024-02-04]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32005R2073>
- [17] ČESKÝ NORMALIZAČNÍ INSTITUT. *Pravidla správné hygienické a výrobní praxe - Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace.*
- [18] ZHAO, Shuangqing, Ge ZHAO, Liuyan GU a Christian SOLEM. A novel approach for accelerating smear development on bacterial smear-ripened cheeses reduces ripening time and inhibits the growth of *Listeria* and other unwanted microorganisms on the rind. *LWT* [online]. 2022, **170** [cit. 2024-05-19]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2022.114109
- [19] CIHLÁŘ, Jaromír a Olga BAZALOVÁ. Molekulárně-genetické metody založené na PCR využitelné pro detekci a identifikaci mikroorganismů v mlékárenství. *Mlékařské listy* [online]. 2022, **33**(6), 24-26 [cit. 2024-04-19]. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2022/veda_195_5.pdf
- [20] *Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization*. Editor Ian M. MACKAY. Norfolk: Caister Academic Press, 2007. ISBN 978-1-904455-18-9.
- [21] PRYOR, Robert J., Carl T. WITTEWER, Lo M., Chiu W.K ROSSA, Chan K.C W.K ALLEN a Chan K.C. ALLEN. Real-Time Polymerase Chain Reaction and Melting Curve Analysis. In: *Clinical Applications of PCR* [online]. New Jersey: Humana Press, 2006, 2006-3-1, s. 19-32 [cit. 2024-05-19]. ISBN 1-59745-074-X. Dostupné z: doi:10.1385/1-59745-074-X:19

- [22] PACHLOVÁ, Vendula, František BUŇKA, Martina CHROMEČKOVÁ, Leona BUŇKOVÁ, Petr BARTÁK a Pavel POSPÍŠIL. The development of free amino acids and volatile compounds in cheese ‘ O loumoucké tvarůžky’ (PGI) during ripening. *International Journal of Food Science & Technology* [online]. 2013, **48**(9), 1868-1876 [cit. 2024-05-19]. ISSN 0950-5423. Dostupné z: doi:10.1111/ijfs.12164
- [23] ANDIÇ, Seval, Yusuf TUNÇTÜRK a Gökhan BORAN. Changes in Volatile Compounds of Cheese. In: *Processing and Impact on Active Components in Food* [online]. Elsevier, 2015, s. 231-239 [cit. 2024-05-19]. ISBN 9780124046993. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-404699-3.00028-7
- [24] BERTUZZI, Andrea S., Paul L.H. MCSWEENEY, Mary C. REA a Kieran N. KILCAWLEY. Detection of Volatile Compounds of Cheese and Their Contribution to the Flavor Profile of Surface-Ripened Cheese. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2018, **17**(2), 371-390 [cit. 2024-05-19]. ISSN 1541-4337. Dostupné z: doi:10.1111/1541-4337.12332
- [25] CURIONI, P.M.G. a J.O. BOSSET. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal* [online]. 2002, **12**(12), 959-984 [cit. 2024-05-19]. ISSN 09586946. Dostupné z: doi:10.1016/S0958-6946(02)00124-3
- [26] AVSAR, Y.K., Y. KARAGUL-YUCEER, M.A. DRAKE, T.K. SINGH, Y. YOON a K.R. CADWALLADER. Characterization of Nutty Flavor in Cheddar Cheese. *Journal of dairy science* [online]. NEW YORK: Elsevier, 2004, **87**(7), 1999-2010 [cit. 2024-05-19]. ISSN 0022-0302. Dostupné z: doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)70017-X
- [27] *A.W. Olomoucké tvarůžky malé 100g* [online]. [cit. 2024-01-13]. Dostupné z: <https://nakup.itesco.cz/groceries/cs-CZ/products/2001000138036>
- [28] *Madeta Romadur měkký zrající sýr 100g* [online]. [cit. 2024-01-13]. Dostupné z: <https://nakup.itesco.cz/groceries/cs-CZ/products/2001000138104>
- [29] HAARMAN, Monique a Jan KNOL. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2006, **72**(4), 2359-2365 [cit. 2024-05-19]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006
- [30] MAKINO, Hiroshi, Junji FUJIMOTO a Koichi WATANABE. Development and evaluation of a real-time quantitative PCR assay for detection and enumeration of yeasts of public health interest in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2010, **140**(1), 76-83 [cit. 2024-05-19]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.004

- [31] ANASTASIOU, Rania, Maria KAZOU, Marina GEORGALAKI, Anastasios AKTYPIS, Georgia ZOUMPOPOULOU a Effie TSAKALIDOU. Omics Approaches to Assess Flavor Development in Cheese. *Foods* [online]. Switzerland: MDPI, 2022, **11**(2), 188 [cit. 2024-05-19]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods11020188
- [32] CORSETTI, A., J. ROSSI a M. GOBBETTI. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2001, **69**(1-2), 1-10 [cit. 2024-05-20]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-1605(01)00567-0

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

bp – páry bází

CAR – Carboxen

CIZ – směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1

CZA – Czapkův agar

DRBC - agar s dichloranem, bengálskou červení a chloramfenikolem

DVB – divinylbenzen

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

GC – plynová chromatografie

HS-SPME-GC-MS – headspace mikroextrakce na pevné fázi

MČ – magnetické částice

MO – mikroorganismus

MPA – masopeptonový agar

nd – nebylo detekováno

PCR – polymerázová řetězová reakce

PDMS - polydimethylsiloxan

PEG – polyethylenglykol

qPCR – poloymerázová řetězová reakce v reálném čase

Rt – retenční čas

SA – sladinový agar

SDS – dodecylsulfát sodný

SPME - mikroextrakce tuhou fází

st. – stopové množství

TBE pufr – Tris-borát-EDTA pufr

TVS – tuk v sušině

8 PŘÍLOHY

Příloha 1: Přehled identifikovaných těkavých látek v Olomouckém tvarůžku a Romaduru

Pořadí	Název sloučeniny	Rt (min)	Skupina	Tvarůžek			Romadur		
				Rel. plocha T1 (%)	Rel. plocha T2 (%)	Rel. plocha T3 (%)	Rel. plocha R1 (%)	Rel. plocha R2 (%)	Rel. plocha R3 (%)
1	Butan-2-on	4,2	Keton	nd	nd	nd	5,8	18,7	33,7
2	Pentan-2-on	5,9	Keton	7,8	5,6	5,1	0,7	1,9	2,5
3	3-methylpentan-2-on	6,9	Keton	nd	6,8	2,0	nd	nd	nd
4	Butan-2-ol	7,5	Alkohol	nd	nd	nd	nd	1,2	2,4
5	Dimethyl disulfid	8,7	Sírná sloučenina	19,5	18,6	19,9	0,2	0,9	2,9
6	3-methylbutan-2-ol	11,1	Alkohol	nd	nd	0,1	nd	nd	nd
7	α -Pinen	11,2	Terpen	nd	nd	st.	nd	nd	nd
8	5-methyl-hexanon	11,4	Keton	nd	nd	0,1	nd	nd	nd
9	Heptan-2-on	13,4	Keton	4,9	1,2	1,8	0,5	0,8	2,1
10	D-limonen	13,3	Terpen	1,9	1,2	0,5	nd	nd	nd
11	3-methylbutanol	14,6	Alkohol	2,3	5,4	2,4	1,5	2,6	4,3
12	Ethylester kyseliny kapronové	15,4	Ester	nd	st.	0,2	nd	nd	nd
13	Acetoin	17,7	Keton	0,4	0,5	0,2	0,9	0,5	0,2
14	2,5-dimethylpyrazin	19,3	Dusíkatá sloučenina	nd	nd	nd	st.	st.	0,2
15	Heptan-2-ol	19,3	Alkohol	1,8	1,0	0,3	nd	nd	nd
16	6-methyl-5-hepten-2-on	19,8	Keton	0,4	nd	0,2	nd	nd	nd
17	Pentan-3-ol	20,1	Alkohol	nd	0,7	0,1	nd	nd	nd
18	Dimethyl trisulfid	21,4	Sírná sloučenina	20,1	0,8	1,7	st.	st.	0,5
19	Nonan-2-on	21,9	Keton	8,3	2,1	2,9	0,2	0,3	0,9
20	Hexadekan-2-ol	22,3	Alkohol	nd	0,2	nd	nd	nd	nd
21	Methylthiohexanoát	22,4	Sírná sloučenina	nd	nd	nd	nd	0,1	0,2

Příloha 1 – pokračování: Přehled identifikovaných těkavých látek v Olomouckém tvarůžku a Romaduru

Pořadí	Název sloučeniny	Rt (min)	Skupina	Tvarůžek			Romadur		
				Rel. plocha T1 (%)	Rel. plocha T2 (%)	Rel. plocha T3 (%)	Rel. plocha R1 (%)	Rel. plocha R2 (%)	Rel. plocha R3 (%)
22	Trimethylpyrazin	23,1	Dusíkatá sloučenina	st.	0,7	0,2	st.	0,3	0,1
23	Ethylester kyseliny kaprylové	24,2	Ester	1,8	nd	0,1	nd	nd	nd
24	4-methyl-2-oxopentanová kyselina	24,5	Kyselina	nd	nd	nd	0,4	0,4	0,2
25	3-ethyl-2,5-dimethylpyrazin	24,5	Dusíkatá sloučenina	nd	0,4	0,1	nd	nd	nd
26	Dekan-2-on	24,8	Keton	nd	0,6	0,8	nd	nd	nd
27	Kyselina octová	25,5	Kyselina	nd	0,4	0,1	3,8	0,5	0,5
28	2-ethylhexanol	26,5	Alkohol	1,0	0,9	0,2	0,2	0,8	1,0
29	Nonan-2-ol	27,9	Alkohol	1,0	0,7	0,3	nd	nd	nd
30	Pentadekanol	28,4	Alkohol	nd	nd	nd	0,3	0,3	0,3
31	Kyselina propionová	29,7	Kyselina	nd	nd	nd	0,6	0,4	0,4
32	Kyselina isobutanová	31,4	Kyselina	nd	nd	nd	10,5	7,2	3,6
33	Undekan-2-ol	32,3	Keton	1,2	0,7	0,5	nd	0,1	0,3
34	Ethylester kyseliny kaprinové	35,4	Ester	1,6	1,6	3,9	nd	1,2	1,8
35	Kyselina máselná	36,2	Kyselina	nd	nd	nd	nd	0,2	nd
36	Dodekan-2-on	37,4	Keton	nd	0,3	0,4	nd	nd	nd
37	Diethylester kyseliny butandiové	38,3	Ester	nd	0,3	0,3	nd	nd	nd
38	3-methylester kyseliny máselné	38,4	Ester	nd	nd	nd	60,3	52,4	30,0
39	Kyselina izovalerová	38,8	Kyselina	1,4	1,8	0,8	nd	nd	nd
40	Fenylaceton	40,4	Keton	10,6	10,7	5,5	0,1	0,5	0,6
41	Tridekan-2-on	43,8	Keton	0,4	0,4	0,1	nd	nd	0,1

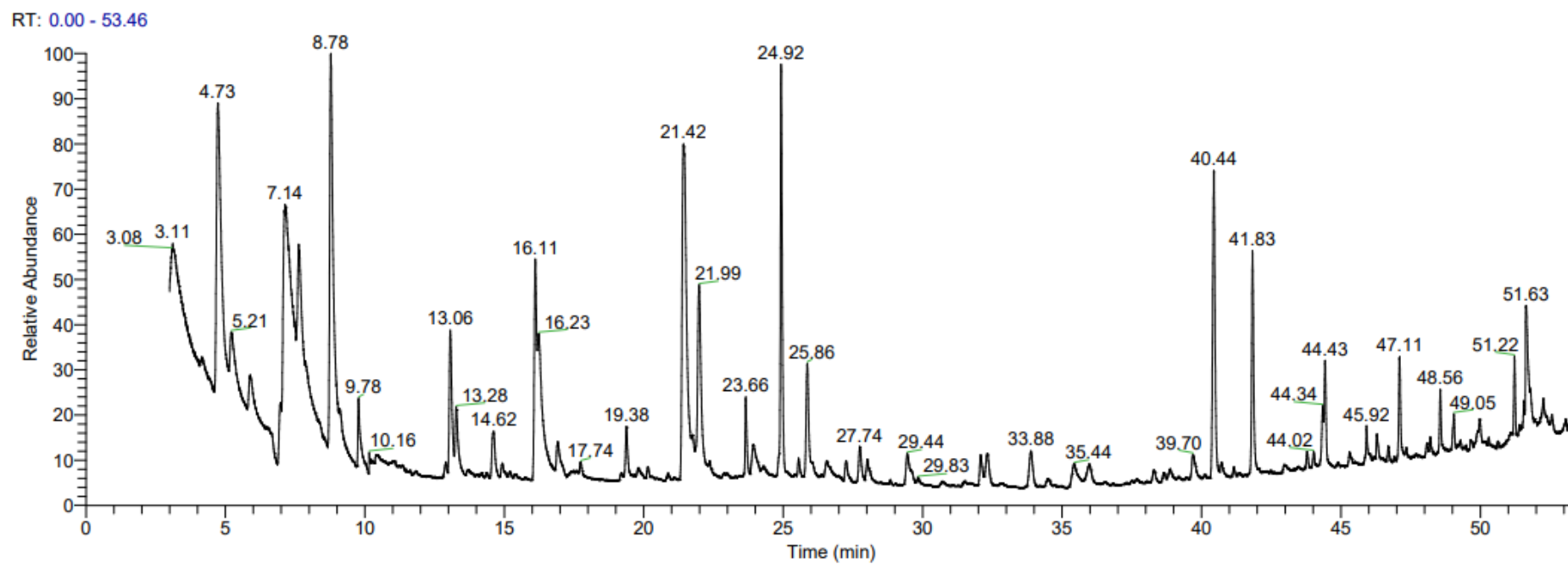
42	Fenylacetát	44,0	Ester	nd	0,2	3,0	nd	nd	0,3
43	Kyselina kaprinová	44,2	Kyselina	4,6	nd	5,5	nd	nd	nd

Příloha 1 – pokračování 2: Přehled identifikovaných těkavých látek v Olomouckém tvarůžku a Romaduru

Pořadí	Název sloučeniny	Rt (min)	Skupina	Tvarůžek			Romadur		
				Rel. plocha T1 (%)	Rel. plocha T2 (%)	Rel. plocha T3 (%)	Rel. plocha R1 (%)	Rel. plocha R2 (%)	Rel. plocha R3 (%)
44	α -methyl-benzeneethanol	44,4	Alkohol	nd	9,0	26,3	nd	0,3	0,1
45	Ethylester kyseliny dodekanové	44,9	Ester	nd	nd	nd	nd	nd	0,2
46	Kyselina kapronová	45,7	Kyselina	0,7	nd	0,5	1,2	0,5	0,5
47	Fenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	46,6	Fenol	0,4	nd	0,2	nd	nd	nd
48	Dimethylsulfon	46,5	Sírná sloučenina	2,7	0,6	0,9	0,1	0,5	0,1
49	Fenylethyl alkohol	47,1	Alkohol	1,6	22,9	5,8	10,7	6,5	5,9
50	Kyselina kaprinová	48,4	Kyselina	nd	nd	nd	0,2	nd	1,5
51	Undekanol	48,6	Alkohol	nd	nd	0,1	nd	nd	nd
52	Dodekanol	49,0	Alkohol	1,2	nd	0,2	nd	nd	nd
53	Isopropyl myristát	49,9	Ester	nd	0,3	0,9	0,1	nd	0,7
54	Kyselina kaprylová	51,2	Kyselina	1,8	nd	3,0	1,2	0,6	2,0
55	p-cresol	51,3	Fenol	0,2	2,7	2,7	0,1	nd	nd
56	γ -Dekalakton	52,5	Laktony	nd	nd	nd	0,2	0,2	0,1
57	2-ethylfenol	53,2	Fenol	0,1	0,3	0,1	nd	nd	st.

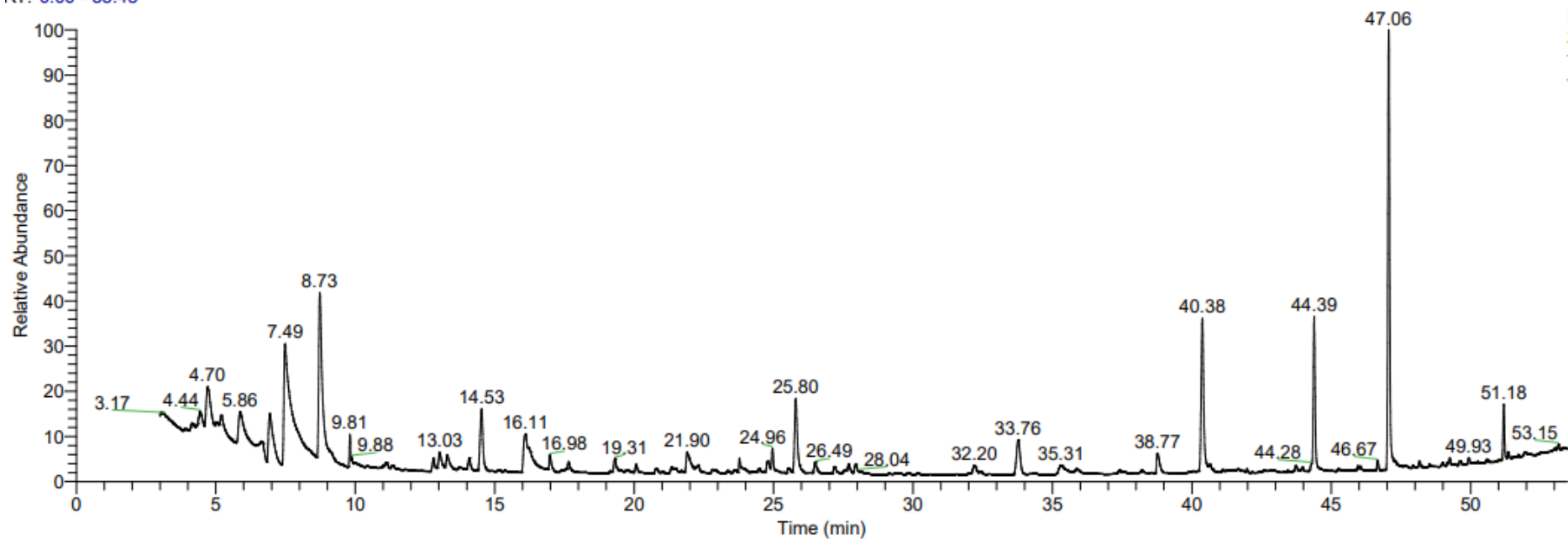
Značení vzorků viz Tabulka 3; Rt – retenční čas, nd – nebylo detekováno, st. – stopové množství

Příloha 2: Ukázka chromatogramu těkavých látek ve vzorku Olomouckého tvarůžku po zakoupení ($t=0$ týdnů). Identifikace látek v tabulce v Příloha 1



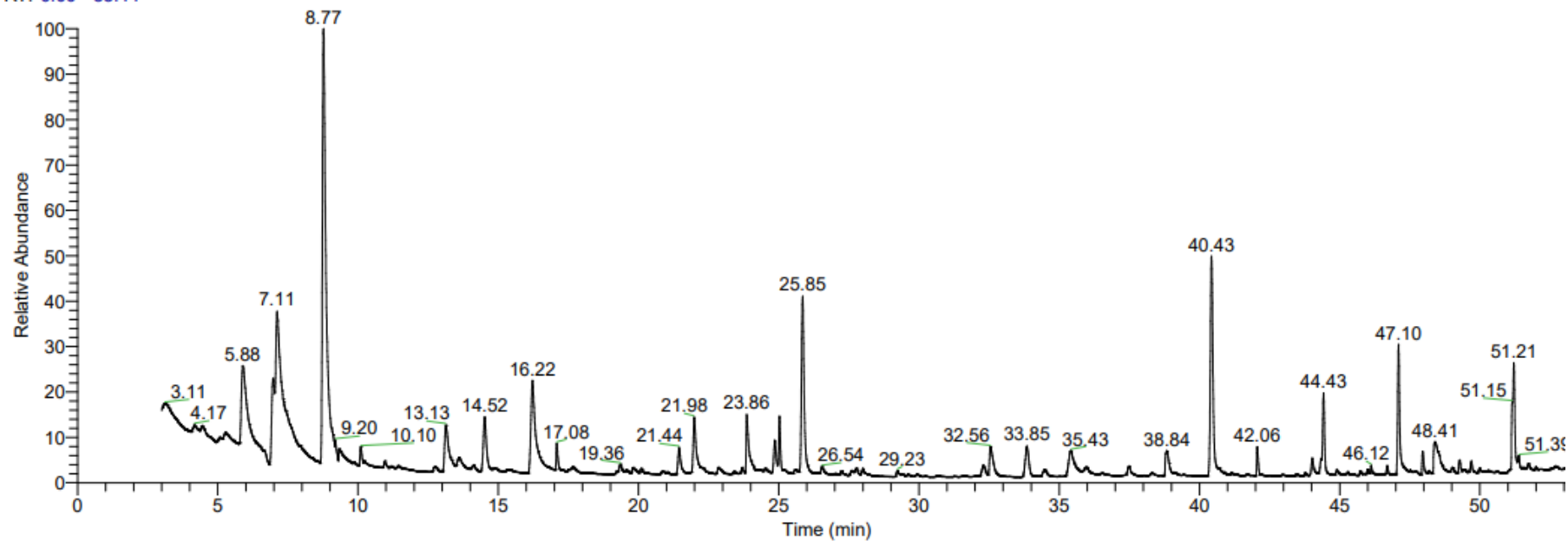
Příloha 3: Ukázka chromatogramu těkavých látek ve vzorku Olomouckého tvarůžku po dvou týdnech od zakoupení (t=2 týdny). Identifikace látek v tabulce v Příloha 1

RT: 0.00 - 53.45

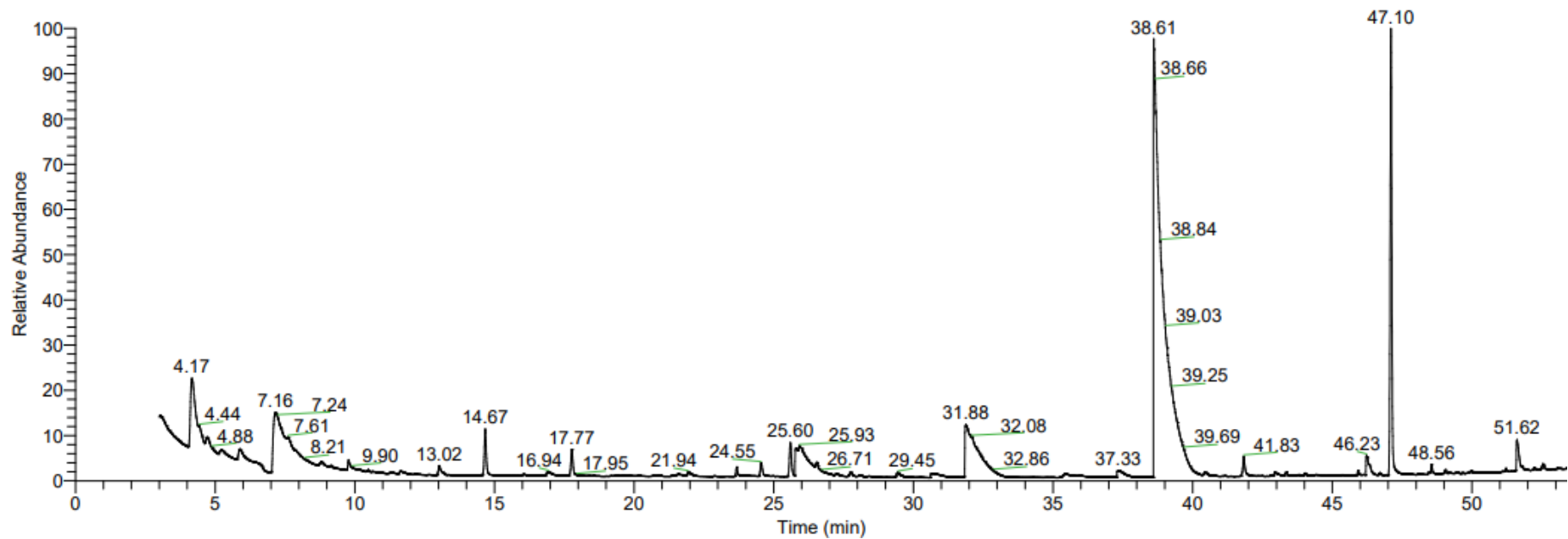


Příloha 4: Ukázka chromatogramu těkavých látek ve vzorku Olomouckého tvarůžku po čtyřech týdnech od zakoupení (t=4 týdny). Identifikace látek v tabulce v Příloha 1

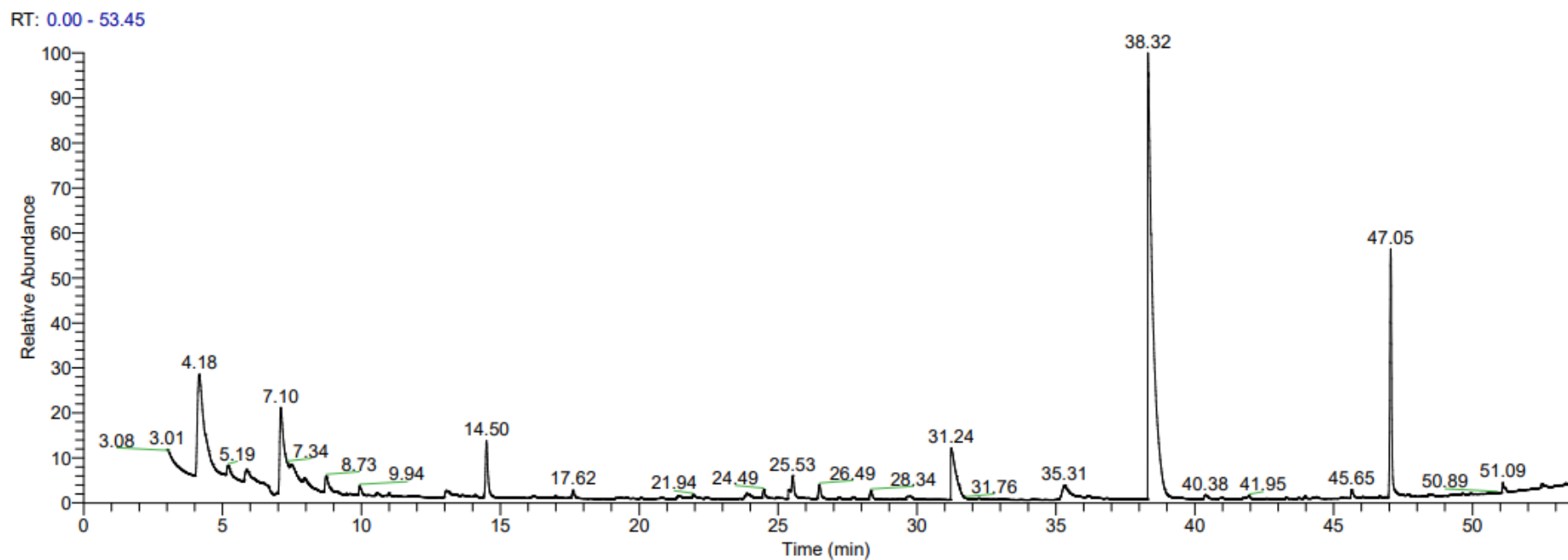
RT: 0.00 - 53.44



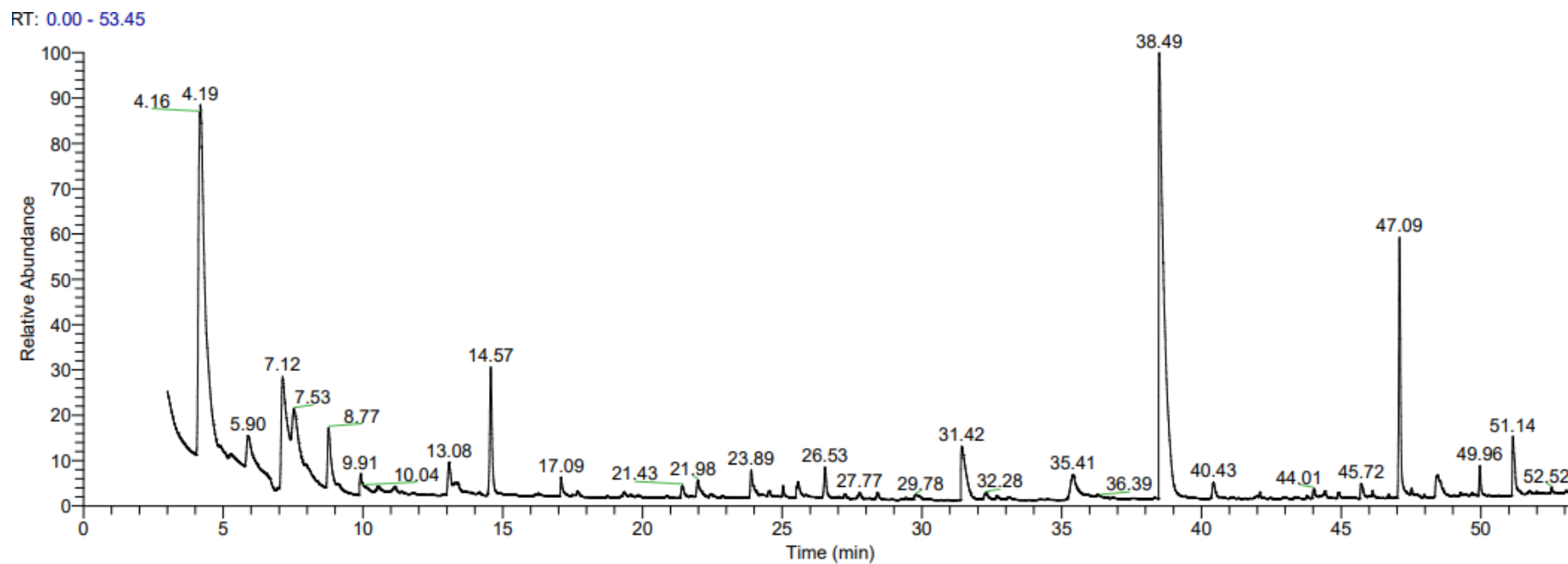
Příloha 5: Ukázka chromatogramu těkavých látek ve vzorku Romaduru po zakoupení (t=0 týdnů). Identifikace látek v tabulce v Příloha 1



Příloha 6: Ukázka chromatogramu těkavých látek ve vzorku Romaduru po dvou týdnech od zakoupení (t=2 týdny). Identifikace látek v tabulce v Příloha 1



Příloha 7: Ukázka chromatogramu těkavých látek ve vzorku Romaduru po čtyřech týdnech od zakoupení (t=4 týdny). Identifikace látek v tabulce v Příloha 1



Dotazník pro sensorické hodnocení sýrů zrajících pod mazem

Vážení hodnotitelé,

Zhodnoťte prosím následující vzorky sýrů.

Hodnotitel: Kuřák – nekuřák

Datum: Muž – žena

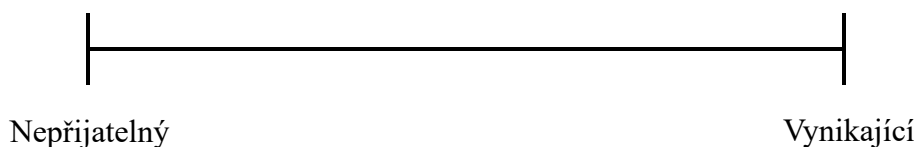
Čas:

Zhodnoťte předložený vzorek v následujících znacích, výsledky (kódy vzorků) vyznačte do uvedených grafických stupnic, případně vlastní připomínky popište slovně.

Část č. 1

Vzhled a barva

Pomocí uvedené grafické stupnice ohodnoťte vzhled sýrů.



Popis krajních bodů:

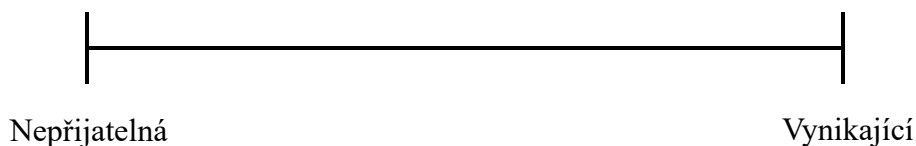
Vynikající – pravidelný tvar, na povrchu charakteristický žluto-oranžový maz, na řezu možné drobné dutinky, patrné tvarohovité jádro

Nepřijatelný – deformace povrchu, vzhled narušen duřením sýra, výskyt plísně, barevné skvrny, výskyt bublinek a jiné vady

Připomínky

Konzistence (textura)

Pomocí uvedené grafické stupnice ohodnoťte konzistenci (texturu) vzorku.



Popis krajních bodů:

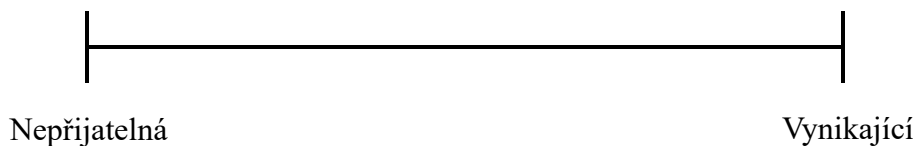
Vynikající – měkká, pružná, hladká, homogenní

Nepřijatelná – příliš měkká, roztékavá, lepivá, nehomogenní

Připomínky

Chuť

Pomocí uvedené grafické stupnice ohodnoťte chuť vzorku.



Popis krajních bodů:

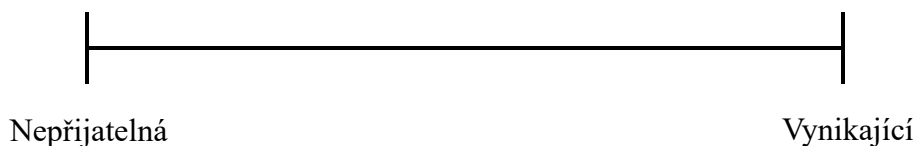
Vynikající – výrazná pikantní chuť, přiměřeně slaná, sýrová

Nepřijatelná – nečistá, žluklá, příliš slaná, hořká, zatuchlá, ostře kyselá, čpavá, kvasnicovitá, mýdlová, případné jiné vady

Připomínky

Vůně

Pomocí uvedené grafické stupnice ohodnoťte vůni vzorku.



Popis krajních bodů:

Vynikající – výrazná pikantní vůně

Nepřijatelná – nečistá, nepříjemná, ostře kyselá, případně jiné vady

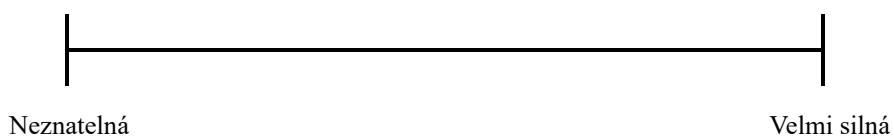
Připomínky

Část č. 2

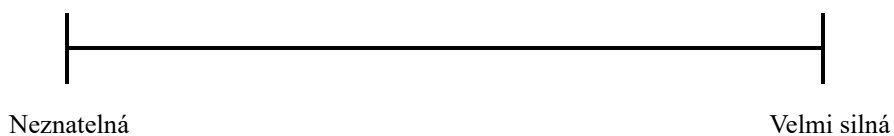
Profilový test

Posuďte uvedené dílčí vlastnosti u každého vzorku.

Slaná chuť



Kyselá chuť



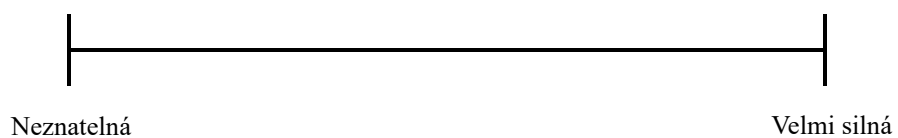
Hořká chuť



„Jiná“ chuť

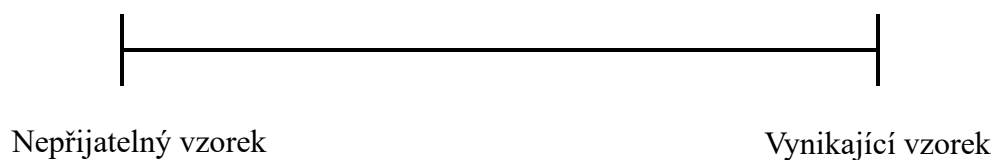


Intenzita vůně



Část č. 3

Ohodnoťte celkovou přijatelnost vzorků



Příloha 9: Výčet mikroorganismů identifikovaných na agarových plotnách v průběhu skladování vzorku Olomouckých tvarůžků

Médium	Ředění	Počet nálezů	Tvar	Barva	Vzhled	Okraje	Profil	TO1	TO2	TO3	TS1	TS2	TS3	MO
MPA	10 ⁰	3	okrouhlý	oranžová	lesklý	kulaté	vypouklý	+	-	-	+	-	+	G+ koky
			okrouhlý	mléčně-žlutá	lesklý	kulaté	vypouklý	+	+	+	+	+	+	Bakterie
			okrouhlý	bílá	lesklý	vroubkované	ploché	-	-	-	-	-	+	Bakterie
	10 ⁻²	4	okrouhlý	oranžová	lesklý	kulaté	vypouklý	+	-	+	+	-	+	G+ koky
			okrouhlý	mléčně-žlutá	lesklý	kulaté	vypouklý	+	-	+	+	+	+	Bakterie
			okrouhlý	mléčná	lesklý	vroubkované	ploché	-	-	-	-	-	+	-
			okrouhlý	bílá	lesklý	vroubkované	ploché	+	-	+	-	-	+	Kvasinka
CZA	10 ⁰	3	okrouhlý	bílá	lesklý	vroubkované	vypouklý	+	+	-	+	+	+	Kulatá kvasinka
			okrouhlý	mléčná	lesklý	kulaté	vypouklý	+	+	+	+	+	+	Koky, tyčinky
			okrouhlý	mléčná	lesklý	vroubkované	vypouklý	-	-	+	-	-	+	
	10 ⁻²	3	okrouhlý	bílá	lesklý	kulaté	vypouklý	film	film	+	+	+	+	Kulatá kvasinka
			okrouhlý	mléčná	lesklý	kulaté	vypouklý	+	+	+	+	+	+	Koky, tyčinky
			okrouhlý	žlutá	lesklý	kulaté	vypouklý	-	-	+	-	-	+	
DRBC	10 ⁰	1	okrouhlý	bílá	matný	vroubkované	ploché	+	+	+	+	+	+	Kvasinka
	10 ⁻²	1	okrouhlý	bílá	matný	vroubkované	ploché	+	+	+	+	+	+	Kvasinka
SA	10 ⁰	3	zvlněný	mléčná	matný	vroubkované	ploché	+	+	+	+	+	+	Kvasinka kulatá
			okrouhlý	oranžová	lesklý	kulaté	vypouklý	+	+	+	+	+	+	G+ koky
			okrouhlý	bílá	matná	kulaté	vypouklý	+	+	+	-	-	-	Bakterie
	10 ⁻²	3	zvlněný	mléčná	matný	vroubkované	ploché	+	+	+	+	+	+	Kvasinka kulatá
			okrouhlý	oranžová	lesklý	kulaté	vypouklý	+	+	+	+	+	+	G+ koky
			okrouhlý	bílá	matná	kulaté	vypouklý	+	+	+	+	+	+	Bakterie

Příloha 10: Výčet mikroorganismů identifikovaných na agarových plotnách v průběhu skladování vzorku Romaduru

Médium	Ředění	Počet nálezů	Tvar	Barva	Vzhled	Okraje	Profil	RO1	RO2	RO3	RS1	RS2	RS3	MO
MPA	10 ⁰	2	okrouhlý	mléčná	lesklý	vroubkované	vypouklý	+	+	+	+	+	+	Kvasinka
			okrouhlý	bílá	lesklý	kulaté	vypouklý	+	+	+	-	+	+	Bakterie
	10 ⁻²	2	okrouhlý	mléčná	lesklý	vroubkované	vypouklý	+	+	+	+	+	+	Kvasinka
			okrouhlý	bílá	lesklý	kulaté	vypouklý	+	+	-	-	+	+	Bakterie
SA	10 ⁰	3	zvlněný	bílá	matný	kulaté	vypouklý	+	+	+	+	+	+	Kvasinka
			okrouhlý	bílá	lesklý	kulaté	vypouklý	-	-	+	-	+	+	Bakterie
			okrouhlý	mléčná	lesklý	kulaté	vypouklý	-	-	-	+	+	+	Bakterie
	10 ⁻²	3	zvlněný	bílá	matný	kulaté	vypouklý	+	+	+	+	+	+	Kvasinka
			okrouhlý	bílá	lesklý	kulaté	vypouklý	-	-	+	-	+	+	Bakterie
			okrouhlý	mléčná	lesklý	kulaté	vypouklý	-	-	+	+	+	+	Bakterie
CZA	10 ⁰	2	okrouhlý	mléčná	lesklý	kulaté	ploché	+	+	+	film	-	-	G+ bakterie
			okrouhlý	bílá	lesklý	vroubkované	vypouklý	-	+	+	-	+	+	kvasinka
	10 ⁻²	2	okrouhlý	mléčná	lesklý	kulaté	ploché	+	+	+	film	-	-	G+ bakterie
			okrouhlý	bílá	lesklý	vroubkované	vypouklý	-	+	+	-	+	+	kvasinka
DRBC	10 ⁰	1	okrouhlý	bílá	matný	kulaté	vypouklý	+	+	+	+	+	+	Kvasinka
	10 ⁻²	1	okrouhlý	bílá	matný	kulaté	vypouklý	+	+	+	+	+	+	Kvasinka