



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

VLIV POUŽITÉHO OLEJE NA SLOŽENÍ A SENZORICKOU KVALITU ANALOGŮ PŘÍRODNÍCH SÝRŮ

INFLUENCE OF USED OIL ON THE COMPOSITION AND SENSORY QUALITY OF CHEESE
ANALOGUES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Dominika Coufalová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1693/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Dominika Coufalová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Vliv použitého oleje na složení a senzorickou kvalitu analogů přírodních sýrů

Zadání diplomové práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:
 - přírodní sýry a jejich analogy – senzorická kvalita, těkavé (aromatické) látky, mastné kyseliny a jejich stanovení
 - vybrané ořechové oleje – senzorická kvalita, obsažené těkavé látky, mastné kyseliny, antioxidanty
2. Optimalizujte postup výroby vybraného typu sýra.
3. Vytvořte modelové vzorky analogů přírodních sýrů s přidavkem ořechových olejů.
4. Pomocí vybraných metod posuďte antioxidační potenciál, profil těkavých látek, volných a vázaných mastných kyselin a celkovou senzorickou kvalitu vyrobených vzorků.
5. Diskutujte rozdíly mezi vzorky.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

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

Bc. Dominika Coufalová
studentka

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá výrobou a charakterizací analogů přírodních sýrů s přidavkem rostlinných olejů, konkrétně mandlového, lískoořechového a oleje z vlašských ořechů.

Výrobky byly charakterizovány z pohledu profilu těkavých látek, obsahu mastných kyselin, antioxidační aktivity a sensorické kvality a následně byly srovnány s výrobkem bez přidaného oleje. Typově je lze zařadit do skupiny měkkých bílých sýrů.

Těkavé látky byly stanoveny pomocí plynové chromatografie s hmotnostním detektorem. Ve standardním výrobku a analogu s přidavkem lískoořechového oleje bylo identifikováno shodně 29 sloučenin, v analogu s přidavkem mandlového oleje 31 sloučenin a v analogu s přidavkem oleje z vlašských ořechů 34 sloučenin. Nejvyšší obsah těkavých látek byl detekován v analogu s lískoořechovým olejem, v analogu s olejem z vlašských ořechů byl identifikován nejvyšší počet terpenů.

Mastné kyseliny byly po extrakci tuku ze vzorku směsí diethyletheru a petroletheru a převodu na methylestery stanoveny pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem. Celkově bylo ve všech vzorcích identifikováno 11 nasycených, 3 mono- a 2 polynenasycené mastné kyseliny. Ve vzorcích analogů byl ve srovnání se standardním sýrem naměřen vyšší obsah mastných kyselin, vzrostl obsah nenasycených mastných kyselin. Nejvyšší obsah polynenasycených mastných kyselin byl stanoven v analogu s olejem z vlašských ořechů. Sýrové analogy vykazovaly vyšší antioxidační aktivitu v porovnání se standardem. Statisticky vyšší hodnota byla stanovena u analogu s lískoořechovým olejem.

Přídavek oleje měl ze sensorického pohledu negativní vliv na konzistenci a celkový flavour. Jako nejpříjemnější byl hodnocen standardní sýr; u analogu s lískoořechovým olejem byla vnímána nejintenzivněji chuť přidaného oleje.

Ze získaných výsledků vyplývá, že přídavek olejů zvyšuje nutriční hodnotu sýrů (vyšší obsah nenasycených mastných kyselin, vyšší antioxidační aktivita), ale snižuje jejich sensorickou kvalitu a celkovou přijatelnost spotřebiteli.

KLÍČOVÁ SLOVA

sýrové analogy, ořechové oleje, antioxidanty, aromatické látky, MK, SPME, GC-FID/MS

ABSTRACT

This master thesis deals with the production and characterization of cheese analogues with vegetable oil, specifically almond, hazelnut and walnut oils.

The products were characterized by volatile compounds, fatty acids, antioxidant activity and sensory quality, and were compared with the standard product. The samples were described as soft white cheese.

Volatile compounds were determined by gas chromatography-mass spectrometry. There were 29 compounds identified both in the standard cheese and the analogue with hazelnut oil, 31 compounds in the analogue with almond oil and 34 compounds in the analogue with walnut oil. The highest content of volatile compounds was found in the analogue with hazelnut oil, and the highest number of terpenes in the analogue with walnut oil.

Fatty acids were converted into methyl esters after the extraction of fat by using mixture of organic solvents and then they were determined by gas chromatography with flame ionization detection. There were identified 11 saturated, 3 monounsaturated and 2 polyunsaturated fatty acids in all samples. The higher content was found in all cheese analogues compared to standard sample, moreover the content of unsaturated fatty acids increased. The highest content of polyunsaturated fatty acids was found in the analogue with walnut oil. The cheese analogues showed the higher antioxidant activity compared to standard cheese. A significantly higher content was found in the analogue with hazelnut oil.

Oil addition decreased the sensory evaluation of consistence and flavour of samples. The standard cheese reached the highest score of overall acceptability among samples; the strongest nut flavour was described in the analogue with hazelnut oil.

The results showed that the addition of oils increases the nutritional value of cheeses (higher content of unsaturated fatty acids, higher antioxidant activity), but reduces their sensory quality and overall consumer acceptability.

KEY WORDS

cheese analogues, nut oils, antioxidants, aroma compounds, FA, SPME, GC-FID/MS

COUFALOVÁ, Dominika. *Vliv použitého oleje na složení a senzoryckou kvalitu analogů přírodních sýrů*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138882>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Vítová.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí této diplomové práce paní doc. Ing. Evě Vítové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, konzultace, ochotu a osobní přístup při vypracování této diplomové práce.

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1	Přírodní sýry.....	10
2.1.1	Technologie výroby měkkých sýrů.....	11
2.1.1.1	Feta.....	12
2.1.1.2	Telemea.....	12
2.1.2	Možnosti zrání a skladování sýrů.....	14
2.2	Analogy přírodních sýrů.....	15
2.2.1	Technologie výroby sýrových analogů.....	16
2.3	Vlastnosti přírodních sýrů a analogů přírodních sýrů.....	18
2.3.1	Senzorická kvalita přírodních sýrů a analogů přírodních sýrů.....	18
2.3.2	Aromaticky aktivní látky v přírodních sýrech.....	18
2.3.3	Mastné kyseliny v přírodních sýrech.....	19
2.4	Složení a vlastnosti vybraných ořechových olejů.....	21
2.4.1	Mandle a mandlový olej.....	21
2.4.1.1	Aromaticky aktivní látky v mandlích.....	21
2.4.1.2	Mastné kyseliny v mandlích.....	22
2.4.2	Lískové ořechy a olej z lískových ořechů.....	22
2.4.2.1	Aromaticky aktivní látky v lískových ořeších.....	23
2.4.2.2	Mastné kyseliny v lískových ořeších.....	23
2.4.3	Vlašské ořechy a olej z vlašských ořechů.....	24
2.4.3.1	Aromaticky aktivní látky ve vlašských ořeších.....	24
2.4.3.2	Mastné kyseliny ve vlašských ořeších.....	24
2.5	Možnosti stanovení aromaticky aktivních látek v sýrech a sýrových analozích.....	25
2.5.1	Přehled aplikací na sýry.....	26
2.6	Možnosti stanovení mastných kyselin v sýrech a sýrových analozích.....	26
2.6.1	Přehled aplikací na sýry.....	27
2.7	Možnosti senzorického hodnocení sýrů a sýrových analogů.....	27
2.8	Možnosti měření antioxidační aktivity.....	29
2.8.1	Oxygen Radical Absorption Capacity (ORAC) test.....	29
2.8.2	Cupric Reducing Antioxidant Power (CUPRAC) test.....	29
2.8.3	ABTS/Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) test.....	29
2.8.4	DPPH (2,2-dilfenyl-1-pikrylhydrazyl) test.....	30
2.8.5	Přehled aplikací na sýry.....	30

3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
3.1	Použité laboratorní vybavení a chemikálie.....	32
3.1.1	Přístroje.....	32
3.1.2	Pracovní pomůcky.....	32
3.1.3	Chemikálie.....	32
3.1.4	Standardní chemikálie.....	33
3.1.5	Plyny.....	33
3.1.6	Suroviny pro výrobu přírodních sýrů a sýrových analogů.....	33
3.2	Analyzované vzorky.....	33
3.2.1	Postup výroby měkkých sýrů a analogů s přidavkem rostlinného oleje.....	34
3.3	Použité metody a experimentální postupy.....	34
3.3.1	Stanovení těkavých látek.....	34
3.3.1.1	Podmínky SPME extrakce.....	34
3.3.1.2	Podmínky GC-MS analýzy.....	35
3.3.1.3	Identifikace a kvantifikace těkavých látek.....	35
3.3.2	Stanovení obsahu vody a sušiny.....	36
3.3.3	Stanovení mastných kyselin.....	36
3.3.3.1	Extrakce lipidů ze vzorku sýra dle ČSN EN ISO 1735.....	37
3.3.3.2	Kyselá esterifikace s bortrifluoridem jako katalyzátorem (TAG).....	38
3.3.3.3	Kyselá esterifikace s bortrifluoridem jako katalyzátorem (VMK).....	38
3.3.3.4	Podmínky GC-FID analýzy.....	39
3.3.3.5	Identifikace a kvantifikace mastných kyselin.....	39
3.3.4	Spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity.....	42
3.3.4.1	Příprava kalibrační křivky.....	42
3.3.4.2	Příprava vodných extraktů sýrů a sýrových analogů.....	43
3.3.5	Senzorická analýza.....	43
3.4	Statistické zpracování výsledků.....	44
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	45
4.1	Optimalizace procesu výroby.....	45
4.2	Těkavé (aromatické) látky ve vzorcích sýrů/analogů.....	51
4.2.1	Srovnání počtu identifikovaných látek ve vzorcích.....	54
4.2.2	Porovnání obsahu těkavých látek ve vzorcích.....	55
4.3	Obsah sušiny, vody v tukuprosté hmotě, tuku a tuku v sušině ve vzorcích sýrů/analogů.....	58
4.4	Mastné kyseliny ve vzorcích sýrů/analogů.....	61
4.4.1	Srovnání obsahu vázaných mastných kyselin ve vzorcích.....	61
4.4.2	Srovnání obsahu volných mastných kyselin ve vzorcích.....	65

4.5	Antioxidační aktivita vzorků sýrů/analogů.....	68
4.6	Senzorické hodnocení vzorků sýrů/analogů	70
4.6.1	Výsledky senzorického hodnocení pomocí stupnice	70
4.6.2	Výsledky profilového testu.....	73
4.6.3	Výsledky pořadového testu celkové přijatelnosti	74
4.6.4	Výsledky párové porovnávací zkoušky	75
5	ZÁVĚR	78
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	80
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	90
8	PŘÍLOHY	91

1 ÚVOD

Sýry a mléčné výrobky obecně jsou konzumovány po celém světě, v různých podobách, úpravách i množstvích, a odborníky na výživu jsou doporučovány jako dobrý zdroj bílkovin a vápníku. Na druhou stranu, mléčný tuk je tvořen především nasycenými mastnými kyselinami a cholesterolem, jejichž zvýšená konzumace je spojována se vznikem celé řady civilizačních onemocnění. Na základě toho bylo provedeno několik studií zabývajících se částečnou, či úplnou náhradou tuku mléčného tukem nutričně hodnotnějším v mléčných výrobcích se zachováním podobných sensorických vlastností, ale s vylepšeným nutričním složením. Ořechové oleje jsou charakterizovány vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin, obsahují antioxidanty a vitaminy rozpustné v tucích, tedy obecně látky, jež mají působit preventivně právě proti vzniku civilizačních chorob. V našich končinách se mandle, lískové a vlašské ořechy řadí k běžně konzumovaným druhům skořápkových plodů, které splňují nutriční benefity popsané u vlastností ořechových olejů.

S ohledem na vzrůstající zájem o zdravé stravování, sledování trendů v oblasti výživy a vyznávání různých stravovacích stylů, lze alternativní výrobky, jakými jsou kupříkladu i sýrové analogy s přídavkem ořechových olejů, považovat za zajímavý produkt, který má potenciál zaujmout řadu spotřebitelů a zpestřit jejich jídelníčky.

Tato práce se zabývala optimalizací procesu výroby sýrových analogů s přídavkem ořechových olejů v laboratorních podmínkách, následnou charakterizací modelových výrobků z pohledu obsahu těkavých látek, mastných kyselin, antioxidačního potenciálu a zhodnocení jejich sensorické kvality. Motivací bylo vyrobit sensoricky atraktivní výrobek s přidanou nutriční hodnotou.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Tato diplomová práce se zaměřuje na výrobu a charakterizaci modelových vzorků přírodních měkkých sýrů s přídavkem rostlinného oleje, tzv. sýrových analogů. V následujících kapitolách jsou charakterizovány sýry, sýrové analogy a vybrané ořechové oleje. Hlavní charakterizující parametry kvality vzorků byly: složení mastných kyselin, aromaticky aktivních látek, antioxidační aktivita a sensorické vlastnosti.

2.1 Přírodní sýry

Pojmem sýr obecně označujeme skupinu fermentovaných mléčných výrobků, které jsou po celém světě vyráběny v širokém množství chutí a tvarů. V roce 1972 bylo popsáno více než 400 druhů sýrů a dalších 400 druhů bylo alespoň pojmenováno [1]. Podle Vyhlášky č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje Ministerstva zemědělství ČR, se sýrem rozumí „*mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, oddělením podílu syrovátky a následným prokysáním nebo zráním*“. Sýr musí být označen těmito informacemi: název druhu, obsah tuku nebo tuku v sušině, obsah sušiny a použité ochucující složky. Skupiny, do kterých se sýry dělí, jsou sýry přírodní, tavené, tavené sýrové výrobky, tavené mléčné výrobky a syrovátkové sýry. Základní rozdíly v procesu výroby jednotlivých produktů jsou takové, že čerstvé sýry neprocházejí výrobní fází zrání, zrající sýry jsou vystaveny procesu zrání, díky čemuž u nich dochází k dalším fyzikálně-chemickým změnám, a tavené sýry jsou tepelně upraveny tavením [2].

Přírodní sýry lze klasifikovat dle několika kritérií a rozdělit je tak do jednotlivých podskupin. Podle obsahu tuku v sušině se výrobky klasifikují jako vysokotučné, plnotučné, polotučné, nízkotučné a odtučněné. V tabulce 1 jsou uvedeny fyzikální požadavky na jednotlivé kategorie podle obsahu tuku v sušině.

Tabulka 1: Klasifikace sýrů podle obsahu tuku v sušině [2]

Sýr	Tuk v sušině [hm. %]
Vysokotučný	nejméně 60,0
Plnotučný	nejméně 45,0 a méně než 60,0
Polotučný	nejméně 25,0 a méně než 45,0
Nízkotučný	nejméně 10,0 a méně než 25,0
Odtučněný	méně než 10

Podle obsahu vody v tukuprosté hmotě přírodního sýra se výrobky klasifikují jako extra tvrdé, tvrdé, polotvrdé, poloměkké a měkké. V tabulce 2 jsou uvedeny fyzikální požadavky na jednotlivé druhy sýrů podle konzistence.

Tabulka 2: Klasifikace přírodních sýrů podle konzistence [2]

Sýr	% vody v tukuprosté hmotě sýra
Extra tvrdý	≤ 51
Tvrdý	49–56
Polotvrdý	54–63
Poloměkký	61–69
Měkký	≥ 67

Podle zrání se výrobky klasifikují jako čerstvé a zrající, přičemž do kategorie zrajících sýrů se řadí i sýry plísňové. V tabulce 3 jsou uvedeny charakteristiky jednotlivých druhů sýrů podle zrání.

Tabulka 3: Klasifikace přírodních sýrů podle zrání [2]

Sýr	Charakteristika
Čerstvý	nezrající
	termizovaný
Zrající	na povrchu
	s mazem na povrchu
	v celé hmotě
z toho Plísňový	s plísní na povrchu
	s plísní uvnitř hmoty sýra
	dvouplísňový

Sýry představují největší a nejrozmanitější skupinu vyráběných mléčných produktů. Hlavní surovinou používanou pro výrobu je mléko kravské, v určitých oblastech také mléko buvolí, kozí, ovčí nebo velbloudí, přičemž původ mléka má vliv na složení a vlastnosti výrobků. El-Fattah a kol. [3] zjistili, že u sýrů vyrobených z ovčího a buvolího mléka se projevují vyšší antioxidační vlastnosti v porovnání se sýry vyrobenými z jiných druhů mléka [3]. Konuspayeva a kol. [4] uvádí, že při použití velbloudího mléka jsou získány vyšší výtěžky v porovnání s použitím mléka kravského [4]. Dále je uváděno, že značný vliv na složení mléka má období laktace [5].

2.1.1 Technologie výroby měkkých sýrů

S ohledem na zaměření této práce na optimalizaci výroby analogů přírodních měkkých sýrů a následnou charakterizaci těchto produktů, bude následující kapitola věnována technologii výroby vybraných měkkých sýrů; především sýrů zrajících v solném nálevu, nazývaných také „bílé sýry“ podle charakteristické bílé barvy sýrového těsta.

Dle způsobu srážení a výroby je možné měkké sýry zrající v solném nálevu rozdělit do tří kategorií:

- Sýry srážené kyselé,
- Sýry srážené syřidlem a s tzv. solením v těstě,

- Sýry srážené syřidlem a se solením do mléka [6].

Na našem českém trhu jsou nejznámější Balkánský sýr, Akawi, Jadel a Istambuli.

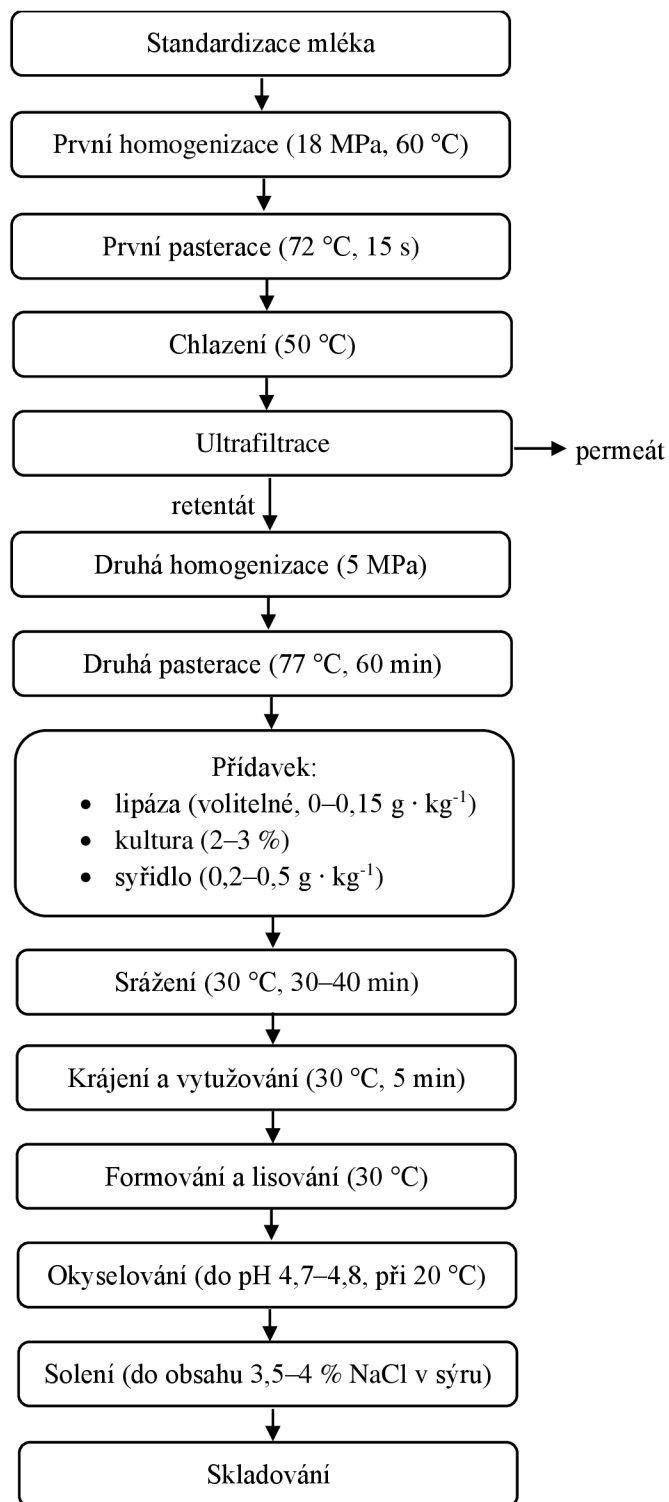
2.1.1.1 Feta

Jedním z nejznámějších sýrů srážených syřidlem a s tzv. solením v těstě je řecký sýr Feta. Výroba tohoto druhu sýra začíná úpravou a standardizací mléka na tučnost okolo 6 %. Mléko je následně pasterováno po dobu 15–20 sekund při 72 °C nebo po dobu 30 minut při 65 °C a ochlazeno na 32–34 °C. Do mléka je přidán 40% roztok CaCl₂ v množství 200 ml · 100 kg⁻¹ mléka. Následuje přidání startovacích kultur, konkrétně komerčních kultur s vyšší schopností acidifikace (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (1:3), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), v množství 0,5–1,0 obj. %. Po inkubaci 20–30 minut následuje proces koagulace neboli srážení, který probíhá při 32–34 °C a je spojen s přidavkem syřidla. Dávkování syřidla je regulováno tak, aby srážení probíhalo 45–50 minut. Po vysrážení sýrové hmoty je hmota pokrájena na kostky o stranách 2–3 cm a pro lepší odtok syrovátky ponechána 10 minut usadit. Poté se takto usazenou sýrovou hmotou plní perforované formy, ve kterých je sýřenina ponechána lisovat vlastní vahou při 14–16 °C po dobu 2–3 hodin, poté je obrácena a nechána dolisovat další 2–3 hodiny. Jakmile je sýr dostatečně pevný, je přemístěn na nasolovací stůl, posypán solí a obrácen každých 12 hodin, dokud nedosáhne obsah soli v sýru 3,0–3,5 %. Sýr se následně nechává zrát v 6–8% roztoku NaCl při 16–18 °C, dokud hodnota pH neklesne na 4,4–4,6, což obvykle trvá 2–3 týdny. Během této doby je občas potřeba otevřít víčko nádoby, aby mohlo dojít k úniku plynů vzniklých fermentací, a kontrolovat, že solný roztok pokrývá celý povrch sýra, aby nedocházelo k osychání povrchu, změnám barvy a možnému nežádoucímu růstu kvasinek a plísní. Po dokončení procesu zrání je sýr uchováván v solném nálevu a skladován při 2–4 °C až 1 rok [6]. Postup uvedený Shakerianem a kol. [7], kteří studovali použití buvolího mléka, jež nechali pro přirozené okyselení při pokojové teplotě 20 °C, se liší od fáze zalisování sýra. Ve své práci nepoužili nasolovací stůl a zalisovaný sýr Feta pokrájeli na kostky, které uložili do 22% solného roztoku při 16 °C po dobu 10 hodin [7].

Výše popsaný tradiční způsob výroby prošel v minulých desetiletích spolu s vývojem technologií několika kroky modernizace a automatizace [8]. Průmyslový popis výroby je znázorněn v diagramu na obrázku 1.

2.1.1.2 Telemea

Telemea je sýr pocházející z Rumunska, odkud se jeho produkce rozšířila do dalších balkánských států, čímž také došlo k lokálním úpravám tradičního výrobního postupu v závislosti na místních klimatických podmínkách a druhu používaného mléka [9]. Technologie výroby je podobná výrobě sýru Feta, avšak liší se v procesech lisování a solení. Zatímco při výrobě Fety se nechává syrovátka oddělit jen volně pomocí gravitační síly, při výrobě sýru Telemea se pro oddělení syrovátky používá lisování tlakem. Co se týče solení a vytvrzení, kousky Fety jsou před uložením do konečného nálevu umístěny do 7–8% roztoku NaCl, tudíž průnik soli do kousků sýra je pomalý. Naproti tomu jsou kousky sýru Telemea naloženy do 18% solného roztoku na 20 hodin nebo do 22–24% roztoku na 16 hodin, čímž dochází k rychlejšímu průniku soli do sýra a patrně i k pozastavení biochemických procesů zrání [10].



Obrázek 1: Technologie výroby sýru Feta [8]

2.1.2 Možnosti zrání a skladování sýrů

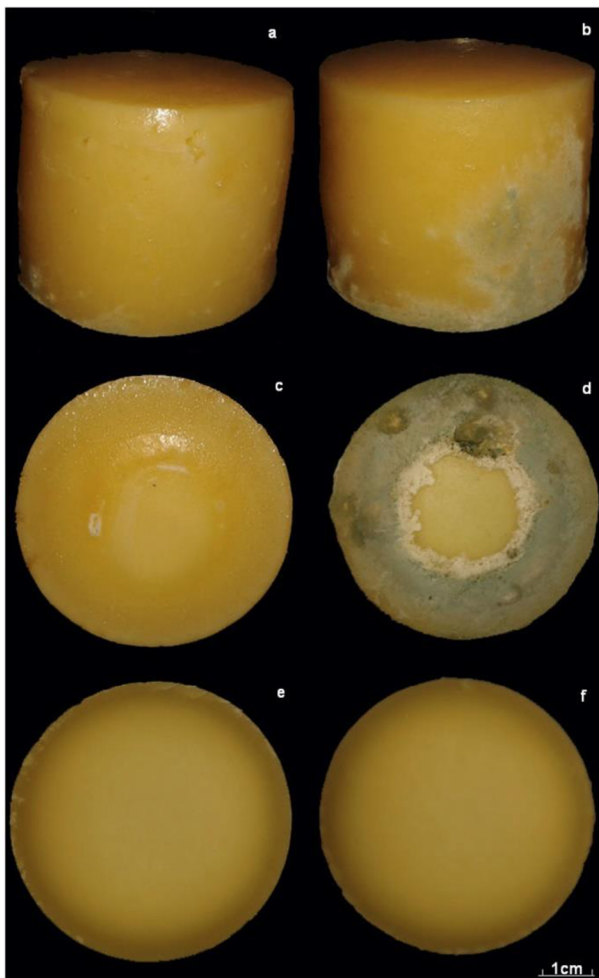
S výjimkou sýrů čerstvých procházejí všechny sýry procesem zrání. Doba potřebná ke zrání sýrů se odvíjí od typu sýra a pohybuje se přibližně od tří týdnů po dva a více roků. Během této doby dochází k tvorbě typického flavouru, textury a vzhledu. Rychlost a rozsah zrání je možné ovlivnit řízením teploty a vzdušné vlhkosti. U mnoha sýrů dochází k rozvoji charakteristické mikroflóry. Růst a složení žádoucích mikroorganismů byly v tradičních postupech výroby řízeny volbou vhodných podmínek, jako jsou pH, teplota, vlhkost, koncentrace kyslíku a soli, to mělo ale za následky náhodný růst nežádoucích mikroorganismů a nekonzistentní kvalitu výrobků. Příkladem nežádoucích mikroorganismů jsou aerobní kvasinky *Debaryomyces hansenii* a *Yarrowia lipolytica*, které jsou tolerantní ke kyselému prostředí a rostou převážně na povrchu sýra [11].

Rozvoji nežádoucích mikroorganismů nebo osychání sýra při zrání lze zabránit použitím obalu nebo ošetřením povrchu. Chatelard-Chauvin a kol. [12] studovali chování patogenní bakterie *Listeria monocytogenes*, která se vyskytuje v syrovém nebo nedokonale ošetřeném mléce, v sýru Cantal v závislosti na druhu použitého obalu. Mléko pro výrobu sýra bylo zaočkováno patogenní bakterií a vyrobený sýr byl uchováván ve smrštitelné fólii, vakuových obalech (obaly z polyamidu nebo polyethylenu) a kraftovém papíru při teplotě 6 °C do doby spotřeby a při 10 °C po datu spotřeby pro simulaci podmínek jako je prodej ve slevě nebo delší skladování zákazníkem. Závěrem studie bylo, že se obsah *L. monocytogenes* zvýšil během prvních 24 hodin výroby a následně se obsah patogenu významně snížil během zrání při 9 °C mezi 45. a 360. dnem, a to u všech typů obalů. Pokles patogenní populace byl výraznější během skladování než během zrání. Na povrchu sýra zabaleného v kraftovém papíru bylo po 45 dnech zjištěno nižší množství *L. monocytogenes* než u vakuově baleného sýra, což mohlo být způsobeno nižší aktivitou vody, ale byl pozorován vyšší obsah jiných gram pozitivních ne-laktobacilních bakterií a kvasinek. Pokles obsahu *L. monocytogenes* během zrání byl zaznamenán také v těstě, rozdíly mezi jednotlivými obaly nebyly ale významné [12].

Atallah a kol. [13] použili pro skladování sýru Domiati obaly s modifikovanou atmosférou. Použili 5 různých složení modifikované atmosféry a u sýrů sledovali dobu skladovatelnosti, chemické, mikrobiologické a senzorické vlastnosti. Kontrolní vzorek byl zabalen vakuově. Výsledky ukazují, že pro inhibici aerobních mezofilních mikroorganismů, psychrofilních bakterií, kvasinek a plísní se jako nejefektivnější jevílo použití 100 % CO₂ nebo 100 % N₂. Nejlepších senzorických výsledků dosáhly sýry skladované v atmosféře 100 % N₂, 100 % CO₂ a 25 % CO₂/75 % N₂. U těchto tří složení modifikované atmosféry byla pozorována také nejdelší doba skladovatelnosti. Kombinace 10 % CO₂/90 % N₂ a 15 % CO₂/85 % N₂ nedosahovaly takových výsledků pro žádné sledované parametry jako výše zmíněné modifikované atmosféry [13].

Další zajímavou možností je aplikace jedlých obalů. Berti a kol. [14] ve své studii použili u sýru Gouda pro ochranu před vnějšími kontaminanty povlak vyrobený z tapiokového škrobu a glycerolu, který obsahoval přírodní konzervanty natamycin, produkovaný bakterií *Streptomyces natalensis*, a nisin, produkovaný kmeny *Lactococcus lactis*. Výsledky byly porovnány se sýry ošetřenými vodným roztokem stejných antimikrobiálních činidel. Sýry zrály při 70% relativní vlhkosti a teplotě 10 °C po dobu 28 dní. Nebylo pozorováno, že by povlaky změnilly fyzikálně-chemické vlastnosti (pH, popel, bílkoviny, chloridy, aktivita vody, index

zrání a barva) ani rozvoj laktobacilů, které působí během zrání. Textura sýra ošetřeného povlakem ze škrobu byla popsána jako více tvrdá, gumovitá a žvýkavá. U tohoto typu výrobku byla také vyhodnocena lepší bariérová ochrana před vnějšími kontaminanty směsné kultury *Saccharomyces cerevisiae* a *Listeria innocua* během zrání v porovnání s výrobkem ošetřeným vodným roztokem. Na obrázku 2 je možné vidět vizuální rozdíly mezi výrobky a rozvoj plísní na konci zrání [14].



Obrázek 2: Sýr ošetřený pouze vodným roztokem (a, c, e) a sýr ošetřený povlakem ze škrobu (b, d, f) na konci zrání z různých pohledů: z boku (a, b), zespodu (c, d), uvnitř (e, f) [14]

Účinnost použití jedlých obalů s přídavkem natamycinu potvrzuje Yangilar [15]. U sýru Kashar ošetřeného povlakem s roztokem kyselého kaseinu s natamycinem byl po 90 dnech zrání zjištěn významně nižší obsah plísní v porovnání se sýrem bez povlaku. Sýr ošetřený pouze natamycinem vykazoval nižší index zrání (rychlost a míra proteolýzy byla nejvyšší), ale v senzoričném hodnocení získal nejhorší hodnocení [15].

2.2 Analogy přírodních sýrů

V současné době Vyhláška č. 397/2016 Sb. MZe definici pro sýrové analogy neobsahuje. Pouze uvádí, že označením „sýrový“ lze označit mléčný výrobek, v němž sýr tvoří nejméně 50 % hmotnostních tohoto výrobku [2]. V zahraniční literatuře se s tímto typem výrobků nejčastěji setkáme pod pojmem „cheese analogue“, „cheese substitute“ nebo „imitation cheese“. Shaw [16]

sýrové analogy definoval již v roce 1984, přesto jejich popularita vzrostla až po roce 2000. Popsal je jako výrobky, které mohou být vyráběny různými postupy, nejčastěji mícháním jednotlivých komponent jako jsou mléko, mléčný tuk, syřidlo, rostlinné oleje, soli a ochucující přísady. Kromě toho mohou být obohaceny o vitaminy, minerály a jiná aditiva. Zájem o takové produkty byl vzbuzen především v USA v oblasti průmyslově zpracovaných potravin jako například výroba pizzy, školní bufety apod. díky lepší cenové dostupnosti surovin nahrazujících mléčné komponenty a jednoduchým výrobním procesům [16].

U spotřebitelů si získaly sýrové analogy na oblibě díky nižšímu obsahu celkového tuku, nasycených mastných kyselin a cholesterolu. Na druhou stranu snížený obsah soli a tuku může ovlivnit fyzikální vlastnosti výrobku jako vzhled, textura, bod tání a flavour. Výhodami většiny sýrových analogů oproti přírodním sýrům jsou delší doba trvanlivosti a stabilita během opakovaných tepelných úprav. Biologická hodnota sójové bílkoviny je vyšší než bílkoviny mléčné, ovšem jejím nahrazením může být u některých osob vyvoláno nadýmání či alergická reakce. Pro snížení obsahu bílkovin je možné kaseinát vápenatý nahradit škrobem s vysokým podílem amylozy. Jak již bylo zmíněno, volba přidaného rostlinného oleje ovlivňuje kromě obsahu cholesterolu a poměru mastných kyselin také fyzikální vlastnosti sýrových analogů. Lobato-Calleros a kol. [17] zjistili, že sójový tuk dodává výrobkům pevnost a přilnavost, naopak snižuje jejich soudržnost a pružnost; při použití sójového oleje s mléčným tukem je efekt opačný [17]. Tavené sýrové analogy s přídavkem arašídového tuku mají pružnou, elastickou konzistenci podobnou sýru mozzarella [18]. Pro prevenci mazovatění bylo navrženo obalování tukových globulí mléčnými proteiny [19]. Volbou surovin nebo výrobního postupu je možné docílit snížení obsahu tuku až na 0,5 % celkového obsahu tuku. Muir a kol. [20] studovali, jak náhrada mléčného tuku škrobem nebo mikročásticemi syrovátkových bílkovin ovlivňuje vnímání flavouru u sýrových analogů. Výrobky byly vyhodnoceny jako krémové, smetanové s máslovým flavourem [20].

2.2.1 Technologie výroby sýrových analogů

S ohledem na zadání práce se bude následující kapitola zaměřovat na možnosti a postupy výroby sýrových analogů s přídavkem rostlinného tuku, což je i v praxi nejčastěji používaná varianta.

Jak již bylo zmíněno, sýrové analogy jsou vyráběny za použití různých druhů rostlinných tuků a imitují různé druhy sýrů. V tabulce 4 je uveden stručný přehled studií zabývajících se výrobou různých druhů sýrů/analogů. Do sýrů byly aplikovány různé druhy olejů nahrazující různou procentuální část mléčného tuku. Ve výrobcích byly poté sledovány různé charakterizující parametry [21].

Tabulka 4: Přehled sýrových analogů s použitím různých druhů rostlinných olejů [21]

Druh sýra	Rostlinný olej	Náhrada mléčného tuku [%]	Stanovované parametry	Reference
Čedar sýr (tvrdý)	Řepkový	100	Reologické vlastnosti, texturní vlastnosti	[22]
Kashar sýr (polotvrdý až tvrdý)	Palmový	0; 50 a 100	Texturní vlastnosti	[23]
Kashar sýr (polotvrdý až tvrdý)	Palmový	0 a 100	Mikrostruktura, reologické vlastnosti, texturní vlastnosti	[24]
Oaxaca sýr (polotvrdý)	Sójový	0; 25; 50 a 75	Reologické vlastnosti, texturní vlastnosti	[25]
Bílý turecký sýr, podobný Fetě (měkký sýr)	Kukuřičný	0; 50; 60 a 100	Texturní vlastnosti	[26]
Bílý turecký sýr, podobný Fetě (měkký sýr)	Interesterifikovaný tuk (palmový, palmojádrový a sójový)	0; 50; 60 a 100	Texturní vlastnosti	[27]

Analog polotvrdého sýra Kashar se vyrábí zejména z odtučněného mléka a rostlinného oleje. Mléko je zahřáto a homogenizováno s olejem při 55–60 °C. Po procesu pasterizace, která se provádí po dobu 20 min při 60 °C, je mléko ochlazeno na 32–38 °C a je k němu přidáno CaCl₂, startovací kultura, srážecí činidlo (syřidlo) a nechá se srážet. Poté je sýřenina pokrájena nožem na kostky 1 × 1 cm a ponechána asi 10 min v klidu usadit. Následně je hmota promíchána, a jakmile dosáhne pH hodnoty 4,8–5,2, tak je sýřenina dohřívána při 73–90 °C v 5–10% roztoku NaCl a 7,5% roztoku citronanu sodného po dobu 15 min. Horkou sýřeninou jsou plněny formy, ve kterých se produkt nechává lisovat přes noc při laboratorní teplotě. Ráno následujícího dne jsou bloky sýrů po osušení vakuově zabaleny do Cryovac nebo PVC (polyvinylchlorid) obalů a skladovány 3 měsíce při 5 °C [23][24]. Leong a kol. [22] použili pro smíšení mléka s olejem a tvorbu jednoduché (O/V) a dvojité emulze (V1/O/V2) metodu ultrasonikace, která k homogenizaci využívá ultrazvuk. U výrobků následně sledovali reologické a texturní vlastnosti. Analog sýra Čedar připravený z dvojité emulze byl v porovnání s kontrolním výrobkem popsán jako tvrdší, s výraznou mikrostrukturou a kapičkami mléka dispergovanými v olejové fázi, méně se roztékal, po 7 měsících zrání u něj došlo k tvorbě většího množství volných mastných kyselin a ve výsledném výrobku bylo stanoveno 26 % tuku. Sýrový analog vyrobený z jednoduché emulze byl vyhodnocen jako měkčí, tukové kapičky vykazovaly větší koalescenci, také se méně roztékal, ale nedošlo u něj k větší tvorbě volných mastných kyselin a výsledný produkt obsahoval 37 % tuku [22].

2.3 Vlastnosti přírodních sýrů a analogů přírodních sýrů

2.3.1 Senzorická kvalita přírodních sýrů a analogů přírodních sýrů

Na sensorickém hodnocení se mohou podílet všechny lidské smysly. S tím souvisí výčet vlastností, které jsou během analýzy hodnoceny, a to: vzhled, vůně a chuť, společně zvané jako flavour; a textura. Norma ČSN ISO 11036 [28] zmiňuje jako příklady charakteristik pro hodnocení textury tvrdost, viskozitu, pružnost, přilnavost, lámavost a soudržnost hmoty. Je možné také hodnotit balení výrobku. Vzorek je hodnocen jako celek, v rámci sensorické analýzy je zpravidla po ochutnání polykán, a proto je vždy hodnotiteli předkládán při běžné konzumní teplotě. Přírodní tvrdé sýry se předkládají ve formě vykrojené výseče, sýry menších rozměrů se předkládají celé v balení [29][30]. Podrobněji o možnostech sensorického hodnocení pojednává kapitola 2.7.

Lamparski a kol. [31] využili deskriptivní metody pro porovnání sensorických vlastností plnotučného polotvrdého komerčního polského sýra s jeho nízkotučnou variantou a zjistili několik rozdílů ve flavouru. Plnotučné sýry byly popsány jako krémovější a sladší, nízkotučná varianta sýra byla naopak vyhodnocena jako více slaná, suchá, zrnitá [31]. Jiná studie [32] uvádí srovnání sýrů Čedar vyráběných průmyslově nebo farmářsky, a vyrobených z pasterizovaného nebo nepasterizovaného mléka. Z výsledků vyplývá, že u sýrů farmářských a vyrobených z nepasterizovaného mléka je flavour více rozmanitý a intenzivní.

Cunha a kol. [33] analyzovali mikrostrukturu, texturu a barvu sýrových analogů, u kterých došlo k nahrazení 25 % a 50 % mléčného tuku rostlinnými oleji, a vyhodnocovali rozdíly s tradičním sýrem. Využili k tomu rastrovací elektronový mikroskop, textuometr a kolorimetr. Při analýze mikrostruktury byly v případě sýrových analogů pozorovány tukové kuličky většího průměru, což indikuje nedostatečnou emulzifikaci při výrobě. Z výsledků pro měření textury vyplývá, že nejvyšší elasticitu a přilnavost vykazoval sýrový analog s 50% náhradou tuku a nejvyšší pevnost byla pozorována u analogu s 25% náhradou tuku. Z kolorimetrického stanovení nebyly zjištěny významné rozdíly mezi vzorky, barevné odchylky pravděpodobně souvisely s použitými rostlinnými oleji nahrazujícími mléčný tuk, protože rozdíly v barvě rostly se zvyšujícím se obsahem rostlinného oleje. V sensorickém hodnocení při srovnání s tradičním sýrem byly ohodnoceny lépe vzorky bez a s 50 % rostlinného tuku než sýrové analogy nahrazující 25 % tuku rostlinnými oleji, což naznačuje možnost úspěšného nahrazování tradičních sýrů sýrovými analogy s obsahem rostlinných olejů [33].

2.3.2 Aromaticky aktivní látky v přírodních sýrech

Manzo a kol. [34] sledovali změny chemického složení tradičního italského polotvrdého sýra Provolone del Monaco během zrání po dobu 9 měsíců. Pro stanovení aromaticky aktivních látek byla použita metoda plynové chromatografie s hmotnostní detekcí ve spojení s mikroextrakcí pevnou fází (HS-SPME-GC-MS). Identifikované sloučeniny byly rozděleny do 6 skupin. Nejhojněji se vyskytující skupinou byly organické kyseliny, zejména kyselina octová, butanová a hexanová. Tyto sloučeniny jsou pro mléčné výrobky typické. Vznikají během proteolýzy, čímž je vysvětlen jejich výrazný nárůst během procesu zrání, a sýru dodávají štiplavé, kyselé a máselné aroma. Alkoholy a ketony představovaly druhou, respektive třetí nejvíce zastoupenou skupinu. Alkoholy vznikají během lipolýzy, což je pravděpodobně důvod, proč byl na začátku zrání jejich obsah nízký a časem se zvyšoval. Detekovanými sloučeninami byly

ethanol, 1-butanol a 2-ethyl-1-hexanol, které přispívají k alkoholovému, ovocnému až štiplavému aroma. Z ketonů byl identifikován acetoin, aromaticky aktivní látka typická pro mléčné výrobky, avšak pouze v prvních dnech zrání. Hexanal a nonanal, řadí se do skupiny aldehydů, byly během zrání přítomny v malém množství a nebyly u nich zaznamenány výrazné kvantitativní změny. Nejmenší zastoupení měly estery se zástupci ethylhexanoát a butylbutanoát. Tyto sloučeniny byly detekovány až při posledním měření. Poslední skupina zahrnující ostatní sloučeniny nepředstavovala významný podíl na celkovém obsahu a nebyly u ní pozorovány ani výrazné kvantitativní změny během 9 měsíců zrání [34].

K obdobnému závěru dospěli Innocente a kol. [35], kteří pomocí metody HS-SPME-GC-MS charakterizovali aromatický profil italského polotvrdého sýra Montasio během zrání. Největší nárůst celkového obsahu aromatických látek zaznamenali mezi 60. a 170. dnem zrání, zejména u sloučenin ze skupiny alkoholů a mastných kyselin. U ketonů a esterů byl pozorován nárůst i po této době, konkrétně do 300. dne u ketonů a u esterů dokonce do 365. dne označeného jako konec zrání. Bylo identifikováno pouze 11 látek, což je pravděpodobně důsledkem použití specifického výrobního procesu, který ovlivňuje rozvoj termofilní kultury a biochemické změny během zrání. Nejvýznamnější detekovanými sloučeninami byly ethanol, mastné kyseliny s krátkým řetězcem C₂ až C₆, diacetyl a ethylhexanoát. Dále byly identifikovány 3-methyl-1-butanol, acetoin, 2,3-butandiol, kyselina octová a dekanová [35].

Gioacchini a kol. [36] identifikovali v italském sýru za využití HS-SPME-GC-MS celkem 75 aromaticky aktivních látek. Tento druh sýra zraje 3 měsíce v dřevěných nádobách vystlaných slámou, které jsou umístěny do jámy vyhloubené v hornině sopečného původu. Tyto podmínky dodávají sýru unikátní flavour, kdy zpočátku sladká chuť přechází do štiplava. Největší obsah byl stanoven u esterů (51,53 %), ketonů (14,80 %) a mastných kyselin (13,67 %) [36].

Zajímavé zjištění publikovali Panseri a kol. [37], kteří použili metodu HS-SPME-GC-MS pro sledování obsahu aromaticky aktivních látek ve čtyřech italských sýrech s označením původu, zabalených v PVC a PE (polyethylen) obalech a skladovaných 20 dní. Největší migrace látky 2-ethylhexanol byla zjištěna u výrobku zabaleného v PVC obalu a skladovaného v temnu. U výrobků zabalených v PE obalech byl zjištěn postupný nárůst ethylbenzenu. Dále byly detekovány sloučeniny styren, xyleny a triacetin, u kterého byl zaznamenán nárůst skladováním na světle. Výrobky zabalené v PE obalech měly obecně jednodušší aromatický profil než výrobky zabalené v obalech z PVC [37].

2.3.3 Mastné kyseliny v přírodních sýrech

Rozdíl v obsahu mastných kyselin (MK) u sýra Kashkaval vyrobeného ze syrového mléka bez přídavku startovací kultury (v syrovém mléce byly přítomny laktobacily a enterokoky) a sýra vyrobeného z pasterovaného mléka s přidáním komerční startovací kultury *Lactococcus lactis* po dobu zrání studovali Pappa a kol. [38]. Po extrakci a izolaci tuku bylo složení mastných kyselin stanoveno plynovou chromatografií s plamenovou ionizací (GC-FID). U sýrů vyrobených ze syrového mléka byla zjištěna vyšší míra lipolýzy a celkový vyšší obsah volných mastných kyselin (VMK) na konci zrání než u sýrů vyrobených z mléka pasterovaného. Nárůst VMK během zrání byl u obou výrobků zaznamenán především u nasycených kyselin butanové (C_{4:0}), myristové (C_{14:0}), palmitové (C_{16:0}), stearové (C_{18:0}) a u mononenasycené kyseliny olejové (C_{18:1}) [38]. Výsledky pro oba druhy výrobků naměřené 1. a 180. den zrání jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Profil volných mastných kyselin v sýru Kashkaval vyrobeného z pasterovaného a syrového mléka 1. a 180. den zrání [38]

VMK	Druh výrobku	$c_{VMK} [\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}]$ 1. den zrání	$c_{VMK} [\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}]$ 180. den zrání
C2:0	P	142,7 ± 21,4	330,7 ± 44,9
	S	269,7 ± 66,0	967,9 ± 13,2
C4:0	P	3,9 ± 0,4	98,4 ± 7,9
	S	5,7 ± 0,5	234,4 ± 18,2
iso-C4	P	1,8 ± 0,4	33,5 ± 10,4
	S	4,7 ± 2,6	61,5 ± 5,5
iso-C5	P	4,4 ± 0,5	20,1 ± 0,4
	S	7,1 ± 1,4	56,0 ± 4,9
C6:0	P	27,7 ± 4,0	30,7 ± 2,5
	S	27,2 ± 1,0	31,5 ± 2,8
C8:0	P	1,9 ± 0,2	4,7 ± 0,3
	S	2,5 ± 0,1	16,7 ± 2,1
C10:0	P	7,3 ± 1,01	31,5 ± 2,7
	S	11,4 ± 1,4	67,6 ± 5,7
C12:0	P	17,5 ± 0,9	30,3 ± 2,6
	S	27,5 ± 1,4	62,3 ± 7,9
C14:0	P	14,9 ± 2,3	89,1 ± 5,6
	S	33,7 ± 3,4	222,9 ± 21,9
C16:0	P	80,8 ± 24,6	201,7 ± 7,0
	S	102,1 ± 9,6	444,7 ± 25,7
C16:1	P	5,4 ± 2,3	12,5 ± 0,5
	S	11,01 ± 1,3	26,4 ± 0,9
C18:0	P	31,2 ± 10,4	74,3 ± 1,3
	S	53,7 ± 5,8	136,1 ± 0,5
C18:1	P	42,4 ± 11,3	147,1 ± 7,8
	S	56,5 ± 8,6	335,4 ± 1,2
C18:2	P	0,5 ± 0,4	8,4 ± 0,6
	S	2,3 ± 0,3	17,4 ± 0,9
Celkem	P	351,9 ± 63,8	887,0 ± 234,6
	S	615, ± 35,8	2 680,5 ± 36,9

P – pasterované mléko, S – syrové mléko

Z tabulky je zřejmý také přírůstek v obsahu kyseliny octové (C2:0). Ta ovšem není produktem lipolýzy, ale vzniká jinými biochemickými cestami, jako je například fermentace kyseliny mléčné [38].

Manzo a kol. [34] stanovovali profil mastných kyselin v sýru Provolone del Monaco během 270 dní zrání. Principem měření byla příprava methylesterů mastných kyselin (MeMK) a jejich stanovení pomocí GC-FID. Celkem bylo identifikováno 22 MK a během zrání nebyly zaznamenány v jejich obsahu výrazné změny. Z celkového obsahu představovaly 49 % MK

se středně dlouhým řetězcem (C10:0 až C16:1), zejména kyselina palmitová (29 %). MK kyseliny s dlouhým řetězcem (C17:0 až C20:3n3) představovaly 44 %, s nejhodněji přítomnou kyselinou olejovou (21 %). Kyseliny s krátkým řetězcem (C4:0 až C8:0) tvořily asi 6 % z celkových MK. Co se týče poměrného zastoupení kyselin podle násobných vazeb, obsah nasycených mastných kyselin byl stanoven na 69 %, mononenasycených na 24 % a polynenasycených mastných kyselin přibližně na 6 %. Během zrání byl pozorován pokles obsahu MK s dlouhým řetězcem a zvýšení obsahu MK s krátkým řetězcem, což může být důsledkem činnosti lipáz přítomných v mléce nebo lipáz ve srážedle (syřidle) z žaludků koz. Lipázy upřednostňují hydrolýzu MK s dlouhým řetězcem, čímž vznikají MK s řetězcem kratším. Lipolýza může probíhat samovolně nebo indukovaně a vznikající VMK s krátkým řetězcem se podílí na tvorbě flavouru. Flavour těchto VMK je popisován jako octový, sýrový, mýdlový či připomínající pot [34].

2.4 Složení a vlastnosti vybraných ořechových olejů

Pro výrobu analogů přírodních sýrů v experimentální části byly vybrány tři druhy ořechových olejů, konkrétně olej mandlový, olej z lískových a vlašských ořechů. Z tohoto důvodu se bude následující kapitola zabývat těmito rostlinnými oleji.

2.4.1 Mandle a mandlový olej

Mandle, plody mandloně obecné (*Prunus dulcis*), jsou jedním z nejznámějších druhů ořechů, které jsou pěstovány zejména v USA, Austrálii a ve Středomoří. Mandlová jádra mají vysokou nutriční hodnotu díky bohatému obsahu zdraví prospěšných látek jako jsou bílkoviny, vláknina, vitaminy (B₂ a B₃), steroly, polyfenoly (kvercetin, kemferol, kyseliny *p*-kumarová, kávová, vanilová), tokoferoly, mastné kyseliny a minerály, jejichž množství je závislé na několika vnějších faktorech, například genotyp, podmínky pro pěstování nebo doba sklizně [39][40]. Csakvari a kol. [40] ve své studii uvádí antioxidační aktivitu mandlového oleje šesti nových kultivarů pěstovaných v Rumunsku, měřenou spektrofotometrickou metodou TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), v rozsahu 1,35–54 mg · l⁻¹ [40].

Nutriční benefity mandlí vychází zejména z vysokého lipidického podílu jader. Pro získání ořechových olejů se nejčastěji používají extrakce rozpouštědlem, superkritická fluidní extrakce za využití oxidu uhličitého a systém hydraulického lisování se šnekovým lisem [39]. Al Juhaimi a kol. [41] porovnávali obsah aktivních složek v mandlových olejích v závislosti na způsobu jejich získání. Za studena lisované oleje vykazovaly vyšší antioxidační aktivitu, vyšší obsah fenolických látek, α -tokoferolů, kyseliny olejové a linolové. Naopak oleje získané Soxhletovou extrakcí byly bohatší na β -karoteny, flavonoidy, karotenoidy a anthokyany [41].

2.4.1.1 Aromaticky aktivní látky v mandlích

Xiao a kol. [42] stanovovali za využití metody HS-SPME-GC-MS aromaticky aktivní látky v syrových a pražených mandlích. Celkově identifikovali 58 látek a až na pár výjimek (např. benzaldehyd, aldehyd s typickým mandlovým aroma) se jejich obsah s pražením zvyšoval. Ve vzorcích bylo identifikováno 19 aldehydů a ketonů, 7 pyrazinů, 22 alkoholů a 10 dalších, nezařazených sloučenin. Nejhojněji zastoupenými látkami v syrových mandlích byly pentanal, hexanal, 2-heptanon, heptanal, nonanal, benzaldehyd, 3-methylbutanol, 1-chloro-2-propanol,

1-hexanol a 1,2-propandiol; v nízkých koncentracích byly detekovány 2 terpeny α -pinen a limonen [42].

Pražením a probíhající Maillardovou reakcí se zvyšuje obsah pyrazinů, furanů a pyrolů, přičemž teplota a doba pražení ovlivňuje finální složení aromatického profilu ořechů. V mandlích pražených při 138 °C po dobu 38 minut byl zjištěn vysoký kvantitativní přírůstek u aromatických látek 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, 2,3-butandion, hexanal, furfural, 2-fenylacetaldehyd, 2,5-dimethylpyrazin, 1-chloro-2-propanol, 1-methylthio-2-propanol a 1,2-propandiol [42]. Agila a kol. [43] uvádí jako hlavní aromaticky aktivní látky u mandlí, které prošly pražením při 177 °C po dobu 5 minut, fenylmethanol, benzaldehyd, 1-okten-2-ol, toluen, dimethylpyrazin, 1-butanol a hexanal [43].

2.4.1.2 Mastné kyseliny v mandlích

Mandlová jádra obsahují přibližně 50–58 % tuku. Ten je tvořen z velké části z mono- (MUFA) a polynenasycených (PUFA) mastných kyselin; do 10 % je doplňují nasycené (SFA) mastné kyseliny. Sakar a kol. [39] identifikovali za využití metody GC-FID v mandlovém oleji 11 mastných kyselin. MUFA byly tvořeny převážně kyselinou olejovou, která představovala kolem 70 % z celkových mastných kyselin, PUFA byly nejvíce zastoupeny kyselinou linolovou (16–22 % z celkových MK) a SFA kyselinou palmitovou (6 % z celkových MK). Dále byly identifikovány kyseliny myristová, palmitoolejová, heptadecylová, heptadecenová, stearová, α -linolenová, arachidonová a eikosenová [39].

Obsah jednotlivých mastných kyselin se liší v závislosti na druhu kultivaru, což dokládají výsledky práce Csakvari a kol. [40]. Ti kvantifikovali nejhojněji zastoupené mastné kyseliny v šesti kultivarech mandlí následovně: kyselina olejová 61–77 %, kyselina linolová 19–28 % a kyselina palmitová 4–11 %, přičemž průměrný obsah MUFA byl 67 %, PUFA 23 % a SFA 10 % [40].

2.4.2 Lískové ořechy a olej z lískových ořechů

Lískové ořechy (*Corylus avellana* L.) patří k celosvětově nejrozšířenějším druhům skořápkových plodů. Obsahují přibližně 55–65 % tuku, který je hodnotným zdrojem mastných kyselin, fytoosterolů či antioxidantních látek jako jsou α -tokoferol či β -sitosterol. Díky nim se pojí s konzumací lískových ořechů několik zdravotních benefitů, například mají antioxidantní účinky, působí preventivně proti ateroskleróze a pozitivně ovlivňují hladinu cholesterolu [44].

Obsah jednotlivých látek je závislý na morfologii a technologické úpravě ořechu. Pelvan a kol. [45] porovnali antioxidantní aktivitu lískových ořechů v syrové a pražené variantě a pražené lískoořechové slupky. K měření byla použita metoda využívající ABTS radikál a výsledky byly vyjádřeny v jednotkách Troloxu. Antioxidantní aktivita vzorků se pohybovala v rozmezí 0,08–27 $\mu\text{g TE} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ vzorku, kdy nejnižší hodnota byla naměřena v pražených lískových ořeších, následovaly syrové lískové ořechy (0,61 $\mu\text{g TE} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) a nejvyšší antioxidantní aktivitu vykazovala pražená lískoořechová slupka [45]. Arranz a kol. [46] využili k porovnání antioxidantní aktivity několika druhů ořechových olejů spektrofotometrickou metodu využívající difenylpikrylhydrazyl (DPPH); vzorky byly dle výsledků stanovené antioxidantní aktivity seřazeny následovně: arašídový olej < mandlový olej < vlašský olej < lískoořechový olej < pistáciový olej [46].

2.4.2.1 Aromaticky aktivní látky v lískových ořeších

Aroma syrových lískových ořechů je popisováno jako ovocné, ořechové, zelené, citrusové, zemité, květinové či připomínající popcorn. Významnými skupinami jsou aldehydy (hexanal, oktanal, 2-methylbutanal; s typickým zeleným, respektive mýdlovým a sladovým aroma), alkoholy (linalool; zodpovědný za květinové aroma) a ketony (2-hepten-4-on, 5-methyl-(Z)-hepten-4-on, 2,3-butandion; dodávající ořechové, respektive ovocné a máselné aroma). Dalšími klíčovými látkami jsou pyraziny, např. 3,6-dimethyl-2-ethylpyrazin nesoucí zemité aroma. Kvalitativní i kvantitativní obsah aromaticky aktivních látek je ovlivněn také vhodným způsobem skladování ořechů. Po 12 měsících skladování lískových ořechů při 18 °C v normální atmosféře je možné pozorovat několikanásobný nárůst v obsahu hexanal, oktanal, 1-okten-3-olu a (*E*)-2-heptenal, látek signalizujících oxidaci lipidů, v porovnání s obsahem těchto látek v ořeších skladovaných při 5 °C v modifikované atmosféře skládající se z 99 % N₂ a 1 % O₂ [47].

Změnami v profilu aromaticky aktivních látek lískových ořechů po tepelné úpravě se zabývá studie Nicolotti a kol. [48]. Lískové ořechy pražili při 140 °C po dobu 40 minut, následně charakterizovali za využití metody HS-SPME-GC-MS. Aromatický profil takto upravených ořechů je popsán sloučeninami 2-methylpropanal, 2,3-pentandion, ethyl acetát, furfural, 2-methylpyrazin či 1-hydroxy-2-propanon, které mají často karamelové aroma [48].

2.4.2.2 Mastné kyseliny v lískových ořeších

Profil triacylglycerolů (TAG), MK a tokoferolů je proměnlivý v závislosti na druhu kultivaru, podmínkách pěstování nebo roku sklizně. Triacylglyceroly představují největší část ve složení rostlinného oleje, konkrétně 95–98 %, nejhojněji se vyskytujícími TAG v lískoořechovém oleji jsou glyceryl trioleát, 1,2-dioleoyl-3-linoleoyl-glycerol a 1-palmitoyl-2,3-dioleoyl-glycerol, které společně tvoří více než 90 % všech TAG [49].

Taş a kol. [50] studovali zastoupení výše zmíněných složek tuku ve 14 kultivarech lískových ořechů. Pro stanovení obsahu mastných kyselin byla provedena transesterifikace tuku a použita instrumentální metoda GC-FID. Největší zastoupení měly mononenasyčené mastné kyseliny, konkrétně kyselina olejová (74–84 %), následně polynenasycené mastné kyseliny, jmenovitě kyselina linolová (6–16 %), a nakonec nasycené mastné kyseliny s kyselinou palmitovou a stearovou, které tvořily 4–7 %, respektive 2–5 % celkového obsahu mastných kyselin. Největší rozdíly ve složení MK mezi jednotlivými kultivary byly zjištěny zejména u kyseliny olejové a linolové. Za využití kapalinové chromatografie bylo zjištěno, že co se složení tokoferolů v lískoořechovém oleji týče, obsah α -tokoferolu je až 7 \times vyšší než β - a γ - tokoferolu. Naopak nebyla zjištěna přítomnost δ -tokoferolu [50].

K podobným závěrům ve složení MK dospěli i Ciemniowska-Żytkiewicz a kol. [51], kteří za využití metody GC-FID provedli stanovení MK u lískových ořechů vypěstovaných v Polsku. U těchto plodů vypadalo procentuální zastoupení MK dle nasycenosti následovně: MUFA 81 %, PUFA 13 %, SFA 6 %. Nejvýznamnějšími kyselinami byly olejová, linolová, palmitová a stearová. Minoritní zastoupení měly kyseliny myristová, palmitoolejová, heptadecylová, heptadecenová, δ - a α -linolenová, arachová, eikosenová, behenová, 13,16-dokosadienová a lignocerová, které souhrnně představovaly méně než 1 % z celkových MK [51].

2.4.3 Vlašské ořechy a olej z vlašských ořechů

Ořešák královský (*Juglans regia* L.) pochází původně ze Středomoří, avšak nyní jsou největšími producenty vlašských ořechů Čína, Spojené státy americké a Turecko. Vlašské ořechy jsou přirozeným zdrojem zdraví prospěšných tuků, bílkovin, vitaminů a minerálů. Díky obsahu omega-3 mastných kyselin, tokoferolů a fenolických látek jsou jim přisuzovány antioxidační a protizánětlivé účinky nebo schopnost snížit riziko vzniku kardiovaskulárních a neurologických onemocnění [52].

Stupeň zralosti ovlivňuje aroma, chuť, složení makroživin a antioxidační aktivitu plodů, tudíž by dozrávání vlašských ořechů mělo trvat alespoň 2, 3 týdny, v závislosti na klimatických podmínkách. Ze studie Wei a kol. [53] vyplývá, že vlašské ořechy sklizené v rané fázi uzrávání mají nejatraktivnější aroma a chuť a nejvyšší antioxidační aktivitu v porovnání s ořechy sklizenými v pozdější fázi. U těch byl naopak zjištěn nejvyšší obsah polynenasycených mastných kyselin a bílkovin [53]. Wang a kol. [52] ve své studii uvádí, že sušené vlašské ořechy mají výrazně vyšší antioxidační aktivitu než ořechy čerstvé. Sušení probíhalo po dobu 5 dní na slunci při teplotě 21–37 °C a ke stanovení antioxidační aktivity byly použity metody s DPPH a ABTS [52]. V porovnání s mandlemi, kešu, arašidy, para, lískovými, makadamovými, pekanovými, pistáciiovými ořechy a arašídovým máslem mají vlašské ořechy nejvyšší antioxidační aktivitu, obsah volných a celkových polyfenolů, a to jak v syrové, tak v pražené formě [54].

2.4.3.1 Aromaticky aktivní látky ve vlašských ořeších

Aromatický profil oleje z vlašských ořechů je tvořen převážně aldehydy a nejhojněji se vyskytujícími sloučeninami jsou hexanal, 2-heptenal, pentanal a 3-methylbutanal. Další významnou skupinou jsou alkoholy, například hexanol a heptanol, které mají bylinné, respektive sladko-bylinné aroma. Ze skupiny kyselin se ve vlašském oleji vyskytují kyseliny hexanová, octová a butanová. Vyšší obsah těchto látek byl zjištěn u bio oleje ve srovnání s olejem vyrobeným z vlašských ořechů pěstovaných konvenčním způsobem zemědělství [55].

Zhou a kol. [56] studovali složení aromatického profilu oleje z vlašských ořechů jako potencionálního ukazatele jeho kvality. K tomu byla použita metoda HS-SPME-GC-MS. Celkově identifikovali 18 aromaticky aktivních látek, ze kterých byly jako nejvýznamnější sloučeniny indikující žluknutí oleje označeny sloučeniny 2-heptenal a 1-okten-3-ol [56]. Závěry studie Mu a kol. [57] doplňují seznam potencionálních ukazatelů oxidace vlašského oleje o látky 2-oktenal, hexanal, kyselinu hexanovou a nonanal [57]. Studie Wei a kol. [53] naopak uvádí 3 aromatické aldehydy, konkrétně sloučeniny 3-methyl-butanal, 2-methyl-2-butenal a 2-fenylethanal, jakožto nejvýznamnější látky vytvářející aroma čerstvých vlašských ořechů. Tyto látky nebyly v pozdní fázi zralosti vlašských ořechů detekovány. Další významnější skupinou, jejichž obsah se se zvyšujícím stupněm zralosti snižuje, jsou estery [53].

2.4.3.2 Mastné kyseliny ve vlašských ořeších

Vlašské ořechy jsou v porovnání s mandlemi a lískovými ořechy bohatší na zdraví prospěšné PUFA. Rabadán a kol. [58] detekovali v oleji z vlašských ořechů za využití metody GC-FID celkem 9 MK, přičemž největší zastoupení měly PUFA (76 %), následně MUFA (15 %) a nakonec SFA (8 %). Hlavními identifikovanými mastnými kyselinami byly kyseliny linolová, linolenová, olejová, palmitová a stearová. V obsahu méně než 1 % se v oleji vyskytovaly

kyseliny palmitoolejová, heptadecylová, arachidonová a eikosenová. Z důvodu vysokého obsahu nenasycených mastných kyselin byla u oleje z vlašských ořechů zjištěna nejvyšší citlivost ke žluknutí během skladování v porovnání s mandlovým a pistáciovým olejem [58].

K podobným závěrům dospěla studie Gao a kol. [59], ve které byly kvantifikovány mastné kyseliny dle násobnosti vazeb následovně: PUFA 66–76 %, MUFA 13–26 % a SFA 4–6 %. Největší zastoupení měly kyseliny linolová (57–67 %), olejová (13–25 %), linolenová (6–8 %), palmitová (4–6 %) a stearová (2 %). K již výše zmíněným MK identifikovaným v oleji z vlašských ořechů [58] byly navíc ve vzorcích identifikovány kyseliny behenová a eruková, obě ve velmi nízkých koncentracích, přičemž kyselina eruková byla vyhodnocena jako specifická pro kultivar tzv. železný ořech (*Juglans sigillata*) [59].

2.5 Možnosti stanovení aromaticky aktivních látek v sýrech a sýrových analozích

Pro stanovení aromaticky aktivních látek byla v této práci použita metoda HS-SPME-GC-MS.

Mikroextrakce pevnou fází se řadí k nejrychleji se vyvíjejícím a rozšiřujícím technikám. K jejím výhodám patří jednoduchost, rychlost, možnost automatizace, vysoká reprodukovatelnost, poměrně dlouhá životnost vlákna či možnost použití různých typů vláken, čímž je možné zvýšit selektivitu vzorkování. Princip spočívá v absorpci aromaticky aktivních látek na SPME vlákno, které je pokryto tenkou vrstvou absorbentu. Vlákno se umístí do vialky se vzorkem a za zvýšené teploty je vystaveno absorpci aromatických látek, dokud nedojde k ustanovení rovnováhy. V kombinaci s headspace technikou dochází k absorpci látek obsažených v plynné fázi nad maticí vzorku. Dalšími základními módy SPME jsou přímá extrakce a membránově-chráněná extrakce. Následně je vlákno s nabsorbovanými analyty přemístěno do injektoru, kde dochází k desorpci látek do mobilní fáze plynového chromatografu. Teplotu a dobu extrakce je potřeba pro vlastní stanovení optimalizovat [60][61].

Plynná chromatografie je instrumentální technika, která se využívá k analýze těkavých sloučenin. Ty jsou rozpuštěny v rozpouštědle a následně převedeny do plynné fáze za účelem distribuce mezi stacionární a mobilní fázi a následné separace. Mobilní fází je inertní plyn, který má funkci nosného plynu, s analytem neinteraguje, ale unáší jej kolonou. Stacionární fází může být pevný nebo kapalný adsorbent. K dávkování analyzovaného vzorku slouží injektor. Jehla injektoru propíchne septum a doručí přesný objem vzorku do odpařovací komory. Je možné použít dávkování s děličem (split), který se využívá při analýze vzorků s vysokým množstvím komponent, nebo dávkování bez děliče (splitless), který je výhodnější pro analýzu zředěných vzorků. V odpařovací komoře je vzorek smíchán s nosným plynem a transportován na kolonu, ve které probíhá samotná separace analytů. Za kolonou je umístěn detekční systém. Jednotlivé typy detektorů se liší v použitelnosti a limitech detekce. Nejčastěji používanými detektory jsou hmotnostní spektrometr, plamenový ionizátor, tepelně vodivostní detektor, detektor s elektronovým záchytem, atomový emisní, chemiluminiscenční a fotoionizační detektor [62].

Hmotnostní spektrometr patří k neúčinnějším detektorům plynové chromatografie. Skládá se ze tří částí: iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Pracuje na principu stanovení poměru m/z , kdy m je hmotnost a z je náboj částice. Do stavu nabitě částice je molekula nejčastěji převedena ionizací elektronovou, chemickou, ionizací polem, elektrosprejem nebo desorpční ionizací laserem za asistence matrice. Takto vzniklé fragmenty následně putují do hmotnostního analyzátoru, kde jsou tříděny podle poměru jejich hmotnosti

a náboje. Nejpoužívanější analyzátory jsou kvadrupól, iontová past, analyzátor doby letu a orbitrap. Kvadrupól je konstruován ze čtyř tyčí, na které je střídavě přiváděno střídavé a stejnosměrné napětí. Vlivem změn hodnot napětí a velikostí amplitud se ionty s určitým poměrem m/z pohybují směrem k detektoru. Detektor zaznamenává ionty, které na něj dopadnou, a tento záznam převádí na elektrický signál. K detekci iontů se využívá elektronový násobič či fotonásobič, které jsou schopny zesílit zaznamenaný elektrický proud a amplifikovat elektrony pomocí soustavy dynod. Konečným výstupem je chromatografický záznam. Výhodou spojení GC-MS je robustnost, jednoduchost, rychlost. Naopak nevýhodou může být diskriminační efekt sloučenin s vysokou molární hmotností nebo tepelná degradace vzorku [62][63].

2.5.1 Přehled aplikací na sýry

Innocente a kol. [35] použili metodu HS-SPME-GC-MS ke stanovení aromaticky aktivních látek v polotvrdém sýru Montasio. 10 g vzorku bylo naváženo do 50ml vialky, která byla uzavřena a umístěna do vodní lázně při 60 °C po dobu 30 minut. Vláknko pokryté vrstvou divinylbenzen/karboxen/polydimethylsiloxanu (DVB/CAR/PDMS) bylo po dobu 20 minut vystaveno headspace prostoru vzorku umístěného ve vodní lázni. Aromaticky aktivní látky byly z vlákna desorbovány při teplotě 250 °C a injektovány ve splitless módu; ventil byl otevřen po dobu 3 minut. Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokem 1 ml · min⁻¹. Separace probíhala na kapilární koloně Econo-Cap Ec-Wax, jako detektor byla použita iontová past a detekované sloučeniny byly identifikovány porovnáním s dostupnou knihovnou spekter [35].

Panseri a kol. [37] sledovali možnou migraci aromaticky aktivních látek z obalových materiálů do italských sýrů s označením původu. Do 20ml vialky bylo vloženo 5 g vzorku sýra a přidán 1 ml interního standardu (kafir ve vodě). Extrakce probíhala na SPME vlákno DVB/CAR/PDMS při teplotě 50 °C po dobu 180 min. Desorpce byla provedena při 280 °C, injekce byla ve splitless módu. Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokem 1 ml · min⁻¹. Pro separaci a analýzu byla použita kapilární kolona Rtx-Wax a detektor kvadrupól Trace DSQ II. Parametry hmotnostního detektoru byly následující: energie ionizačních elektronů 70 eV, rychlost skenování 1 scan · s⁻¹, skenovací rozsah 45–450 m/z . Identifikace fragmentů byla provedena srovnáním s knihovnou spekter NIST [37].

Přehled sloučenin identifikovaných v publikacích [35][37] je uveden v kap. 2.3.2.

2.6 Možnosti stanovení mastných kyselin v sýrech a sýrových analozích

Pro stanovení mastných kyselin byla v této práci použita metoda GC-FID.

Před provedením samotné analýzy složení mastných kyselin ve vzorku je potřeba provést extrakci tuku ze sýra a mastné kyseliny transesterifikovat na methylestery. Extrakce tuku ze sýra je možné provést podle metody Röse-Gottlieba AOAC 996.02. Vzorek sýra se zváží, zhomogenizuje, přidá se k němu kyselina chlorovodíková a rozpustí se ve zkumavce na vodní lázni. Po ochlazení je směs kvantitativně převedena pomocí ethanolu do baňky, je přidán diethylether a směs je zcentrifugována. Poté je odebrána horní fáze, přidána směs diethyletheru a petroletheru pro druhou extrakci a provedena centrifugace. Stejným postupem je provedena i třetí extrakce. Nakonec je baňka, ve které byly spojeny všechny tři odebrané extrakty, umístěna do vakuové odparky pro odpaření rozpouštědla [64].

Derivatizaci (převedení MK na methylestery) je možné provést kyselou i zásaditou hydrolyzou s použitím řady různých činidel. Kyselá katalyzovaná hydrolyza využívá jako katalyzátor bortrifluorid v methanolu, pro bazicky katalyzovanou hydrolyzu se využívá methoxid sodný nebo roztok hydroxidu sodného v methanolu. Ke stanovení volných mastných kyselin pro derivatizaci slouží tetramethylammonium hydroxid [65][66].

Po derivatizaci je provedeno stanovení methylesterů mastných kyselin pomocí GC-FID. Plynová chromatografie je popsána v kap. 2.5. Plamenově ionizační detektor je jedním z nejpoužívanějších detektorů v kombinaci s plynovou chromatografií. Jeho výhodou je univerzální použití na analýzu sloučenin uhlíku a vodíku, vysoká citlivost, jednoduchost; stanovení neovlivňuje rychlost průtoku a detektor neposkytuje odezvu na vzduch, vodu, oxid uhličitý a oxid siřičitý. Po výstupu z kolony v GC je vzorek směřován do FID, konkrétně plamene vzduchu a vodíku, kde dochází k pyrolýze nebo chemické dekompozici a tvorbě iontů a elektronů nesoucích náboj. Vzniklé ionty jsou sbírány na sběrné elektrodě, kde poté dochází ke tvorbě elektrického proudu, který je následně zesilován a měřen [62][67].

2.6.1 Přehled aplikací na sýry

Manzo a kol. [34] použili metodu GC-FID pro stanovení mastných kyselin v tradičním italském polotvrdém sýru Provolone del Monaco. Nástřik vzorku o objemu 1 μl byl proveden teplotně programovaným split injektorem. MeMK byly separovány na kapilární koloně (60 m \times 0,25 mm \times 0,25 mm). Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokem 1,2 ml \cdot min⁻¹. Teplota injektoru a detektoru byla nastavena na 240 °C. Podmínky pro FID byly následující: směs vzduch:vodík v poměru 10:1, teplota 260 °C. Identifikace a kvantifikace byla provedena na základě srovnání s dostupnými standardy Superco 37 Component FAME Mix [34].

Pappa a kol. [38] charakterizovali složení mastných kyselin v sýru Kashkaval. Plynový chromatograf byl vybaven křemennou kapilární kolonou o rozměrech 15 m \times 0,53 mm \times 1 μm . Teplota injektoru byla nastavena na 230 °C. Teplota plamenově ionizačního detektoru byla 225 °C a průtok nosného plynu helia byl 8,8 ml \cdot min⁻¹ při 60 °C. Jednotlivé mastné kyseliny byly identifikovány srovnáním retenčních časů s dostupnými standardy a kvantifikovány na základě interního technologického postupu za využití chromatografického laboratorního softwarového systému CLASS-VP TM [38].

2.7 Možnosti senzorického hodnocení sýrů a sýrových analogů

V České republice jsou obecné pojmy používané v senzorické analýze uvedeny v České technické normě ČSN EN ISO 5492 Senzorická analýza – Slovník. Obecně, cílem senzorické analýzy je získat objektivní informace o vzorcích. K tomu se využívá celá řada metod, které jsou v současné době již standardizovány a součástí norem. Výběr metody je závislý na cíli, kterého chceme v rámci hodnocení dosáhnout. Metody, které cílí na hodnocení produktu, se běžně rozdělují do tří základních skupin: rozlišovací, deskriptivní (popisné) a metody využívající stupnice [68][69].

Rozlišovací metody jsou nejvíce používanými metodami v senzorické analýze. Zkoušky jsou navrhovány tak, aby bylo zjištěno, zda existuje rozdíl mezi dvěma vzorky. Rozdíly ve vzhledu, flavouru nebo textuře vzorků mohou být důsledkem rozdílného skladování, výrobního procesu nebo složení. Nejběžnějšími zkouškami rozlišovacích metod jsou: párová

porovnávací zkouška, zkouška duo-trio, trojúhelníková zkouška, n-Alternative Forced Choice, jednostimulová zkouška a metoda odhadu magnitudy [68][69].

Deskriptivní, neboli popisné metody se využívají ke kvalitativnímu i kvantitativnímu popisu vybrané vlastnosti vzorku. Během zkoušky je možné sledovat jednu nebo i více charakteristik a zkoušku aplikovat na jeden či více vzorků současně. Na vytváření popisu se dle sledovaných vlastností podílejí vjemy zrakové, sluchové, čichové, chuťové i hmatové. Tyto metody tedy slouží k vyjadřování lidského vnímání určitých vlastností výrobku a měření jejich intenzity. Deskriptivní metody se klasifikují do tří skupin: jednoduchá popisná zkouška, stanovení sensorického profilu a metoda volného popisu [68][70]. Fenelon a kol. [71] provedli za využití deskriptivních metod test pro porovnání sensorických vlastností nízkotučného a plnotučného sýra Cedar. Sensorický panel se skládal z 20 proškolených hodnotitelů, kterým byly předkládány 5g kousky vzorků sýrů, a to pod rozptýleným červeným zářením, aby byly minimalizovány rozdíly ve vzhledu vzorků. Zjistili několik rozdílů ve flavouru v souvislosti s tučností sýrů bez ohledu na jejich stáří. Plnotučné sýry byly popsány jako více máslové, krémové, připomínající karamel [71].

Ve velké míře jsou využívány u hodnocení sensorického profilu mlékařských výrobků také metody využívající stupnice a kategorie. Principem metod je zařazení vzorků do stupnice v logickém uspořádání podle úrovně sledované vlastnosti. Nejčastěji používanými stupnicemi jsou stupnice nominální, ve kterých se sledované vlastnosti vyjadřují slovně a umožňují získat pouze kvalitativní výsledky, a ordinální, ve kterých je rozdílné vnímání intenzit sledovaných znaků vyjadřováno pořadím a umožňují tedy získat i kvantitativních výsledků. Mezi tyto metody se řadí také pořadová zkouška [68][72]. Sensorický panel o složení 100 pravidelných konzumentů kozích sýrů měl za úkol zhodnotit přijatelnost dvou vzorků poloměkčích sýrů typu Danbo vyrobených z kozího mléka. Strava jedné skupiny koz, od kterých bylo použito mléko na přípravu sýra, byla obohacena o slunečnicový olej, čímž bylo v mléce dosaženo vyššího obsahu konjugované kyseliny linolové (z 0,8 % na 1,3 %) a kyseliny trans-vakcenové (z 2,4 % na 4,4 %). Hodnotitelům byly v náhodném pořadí předloženy kousky dvou vzorků o rozměrech 4 × 2 × 0,5 cm, přičemž byli požádáni ohodnotit přijatelnost každého vzorku s využitím devítistupňové hédonické stupnice. Dle výsledků nebyly ve vzorcích shledány významné rozdíly, nicméně kontrolní vzorek byl hodnocen o něco lépe – jeho celková přijatelnost dosáhla skóre 6,6 z 9 stupňů, zatímco vzorek vyrobený z mléka od koz krmených stravou obohacenou o slunečnicový olej pouze 6,3 [73].

Poměrně moderním řešením na zjednodušení, časovou i finanční úsporu sensorické analýzy se stává spojení s instrumentálními metodami. Ty jsou navíc schopny zajistit dobrou opakovatelnost zkoušky a umožnit jednoduché zpracování výsledků. Velkou nevýhodou metod instrumentální analýzy je, že měří podněty, tedy fyzikální a chemické vlastnosti produktů, zatímco metodami sensorické analýzy hodnotí posuzovatelé počítky a vjemy. Pro použití instrumentálních metod je tedy důležitá jejich kalibrace na určitou sensorickou jakost po předchozím zhodnocení řady vzorků. Přístroje také nejsou schopny provést hédonické hodnocení vyjadřující příjemnost vjemu [30][68]. Na základě vlastnosti, na kterou cílí sensorická analýza, se volí vhodná instrumentální metoda, např.:

- Vzhled: spektrofotometr, kolorimetr, elektronické oko pro hodnocení barvy a tvaru,
- Vůně: elektronický nos, plynová chromatografie,

- Chuť: elektronický jazyk,
- Textura, konzistence, pocit v ústech, viskozita: viskozimetr, reometr, texturometr [74].

2.8 Možnosti měření antioxidační aktivity

Antioxidanty se vyskytují v rostlinách v nízkých koncentracích a jejich funkcí je neutralizovat volné radikály v buňkách a tkáních, a tím je ochránit před oxidativním stresem. Oxidativní stres může mít za následek rozvoj civilizačních onemocnění jako je diabetes, vysoký krevní tlak či ateroskleróza. Do antioxidantů se řadí např. karotenoidy, flavonoidy, nenasycené mastné kyseliny, vitaminy a enzymy. Jejich aktivita je závislá na několika faktorech, například chemická struktura, teplota, koncentrace; a k jejímu měření se využívají různé analytické metody, které lze rozdělit do tří skupin: spektrometrické, elektrochemické a chromatografické. Metody lze rozdělit také dle mechanismu, na kterém jsou založeny: transfer vodíku a transfer elektronu [75][76].

2.8.1 Oxygen Radical Absorption Capacity (ORAC) test

ORAC test funguje na mechanismu transferu atomu vodíku. Principem je reakce antioxidantu s radikálem peroxyly, který je generován 2,2-azobis(2-amidinopropan) chlorhydrátem nebo 2,2'-azobis-2-amidino-propanem. Peroxylový radikál, který je charakteristický pro lipidickou oxidaci, reaguje s fluoreskujícím vzorkem, čímž dochází k poklesu fluorescence. Jako fluorescenční indikátory lze použít fluorescein nebo β -fykoerytrin, jehož nevýhodami jsou ale nekonzistentnost, široká reakční variabilita a nespecifická vazba proteinů. Vyhodnocení probíhá spektrofotometricky, jako referenční sloučenina se používá Trolox a výsledek je poté vyjadřován jako ekvivalent Troloxu [75][76].

2.8.2 Cupric Reducing Antioxidant Power (CUPRAC) test

Principem CUPRAC testu je redukce měďnatého iontu na iont měďný. Reakce je doprovázena barevnou změnou, přechodem ze světle modré do žlutooranžové, kterou je možné sledovat a vyhodnotit spektrofotometricky při 450 nm. Pro zjednodušení se navíc využívá ligand, čímž dochází ke tvorbě komplexu měď-ligand. Nejčastěji používaným ligandem je neokuproin. Komplex Cu^{2+} -neokuproin reaguje s elektrony antioxidantů, čímž dochází k redukci mědi [75]. Metodu je možné modifikovat, imobilizovat komplex na Nafion membránu vyměňující kation a následně místo absorbance měřit odraz při 530 nm difúzně reflexním spektrometrem [77]. V porovnání s ostatními metodami založenými na transferu elektronu má CUPRAC test několik výhod: rychlá oxidace antioxidantů thiolového typu, vhodný redoxní potenciál, stabilita, univerzálnost, jednoduchost, robustnost, citlivost a lineární odezva [78].

2.8.3 ABTS/Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) test

ABTS (TEAC) test byl vytvořen ke stanovení celkové antioxidační kapacity (TAC). Princip metody je založen na schopnosti antioxidantu neutralizovat stabilní radikálový kation ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina)), využívaný jako modro-zelený chromofor s maximem absorpce při 734 nm. Pokles intenzity zbarvení závisí na době reakce, koncentraci vzorku a samotné antioxidační aktivitě. Původně se pro tvorbu radikál kationu používal metmyoglobin a hydrogen peroxid, později došlo k nahrazení za peroxid a peroxodisíran a nyní se jako oxidační činidlo nejčastěji používá peroxodisíran draselný. ABTS radikál je rozpustný ve vodě a organických rozpouštědlech, což umožňuje stanovit

antioxidační kapacitu hydrofilních i lipofilních sloučenin. Naopak nevýhodou ABTS testu je možné nadhodnocení výsledku, kdy látky mohou reagovat s oxidovadlem a radikál kationem; s ABTS radikálem reaguje i několik fenolických sloučenin. Navíc je stanovení závislé na době reakce, čímž může při nevhodně zvoleném času ukončení dojít k podhodnocení výsledné antioxidační kapacity. Metodu je také možné automatizovat a modifikovat. Pro snazší identifikaci jednotlivých antioxidantů se používá ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Pro vyšší citlivost a účinnost je možná kombinace s amperometrií nebo infračervenou spektroskopií [75][79].

2.8.4 DPPH (2,2-dilfenyl-1-pikrylhydrazyl) test

Princip DPPH testu spočívá stejně jako u ABTS testu v reakci antioxidantu s radikálem a spektrofotometrickém vyhodnocení. Elektrony antioxidantu neutralizují DPPH radikál, přičemž je tato reakce doprovázena barevnou změnou DPPH z tmavě fialové do bledě žluté. Barevný přechod je měřen při vlnové délce 517 nm a výsledek antioxidační aktivity je vyjadřován jako EC₅₀, což je definováno jako koncentrace antioxidantu nezbytná k redukci počáteční koncentrace DPPH o 50 %. DPPH test může být podobně jako ABTS test propojen s amperometrií nebo HPLC. Metoda je často využívána pro měření antioxidační aktivity rostlinných extraktů, jejími výhodami jsou nízká cena, jednoduchost provedení, opakovatelnost, stanovení při pokojové teplotě či možnost automatizace [75][80].

2.8.5 Přehled aplikací na sýry

Na celkovou antioxidační aktivitu sýrů má vliv několik faktorů. Těmi mohou být druh mléka, roční období, druh přidané mikrobiální kultury a doba zrání sýrů. Revilla a kol. [81] studovali po dobu 90 dní vzorky sýrů vyrobených z kravského, ovčího a kozího mléka, a to v letním a zimním období. Všechny sýry byly vyrobeny stejným postupem a ke stanovení antioxidační aktivity byl zvolen TEAC test. Ze sloučenin s antioxidačním potenciálem byla studie zaměřena na sledování obsahu proteinů (a proteolýzy sirných aminokyselin s antioxidačním potenciálem), β -karotenu, vitaminů E (α -tokoferol) a A (retinol). Obsah vitaminů rozpustných v tucích je závislý také na obsahu celkového tuku. Před stanovením bylo rozpuštěno 2,5 mg nastrohaného sýra v 10 ml vody na vodní lázni při 40 °C. Směs byla poté centrifugována při 20 °C po dobu 30 min; supernatant byl slit a doplněn na objem 10 ml. Roztok ABTS byl upraven na absorbanci $0,7 \pm 0,02$ při 734 nm. Do kyvety bylo napipetováno 20 μ l vzorku, přidáno činidlo a po 10 minutách byla spektrofotometricky změřena absorbance při 734 nm. Vedle toho bylo provedeno stanovení se slepým pokusem a všechny vzorky byly proměřeny třikrát. Výsledky byly vyjádřeny v jednotkách Troloxu (μ mol TE \cdot mg sýra⁻¹). Z výsledků vyplývá, že vyšší antioxidační aktivitu vykazují sýry vyrobené z mléka nadojeného v letním období. Dále se antioxidační aktivita zvyšovala s delší dobou zrání sýrů. Naopak nebyly pozorovány významné rozdíly mezi druhy mléka použitými k výrobě [81].

Yousefi a kol. [82] sledovali vliv použitého druhu mikrobiální kultury na antioxidační aktivitu sýra Feta. Byl sledován obsah peptidů, u kterých byl již dříve popsán antioxidační potenciál, a průběh proteolýzy, která má na jejich obsah a následně i celkovou antioxidační aktivitu negativní dopad, přičemž nejvyšší antioxidační aktivita souvisela s obsahem proteinových hydrolyzátů s molekulovou hmotností > 10 kDa. Vzorky sýrů byly vyrobeny z ultrafiltrovaného mléka stejným postupem, ale s přidavkem jiné mikrobiální kultury.

Vodné extrakty byly připraveny zahřátím 12 g sýra a 36 ml destilované vody na vodní lázni při 40 °C. Následně byly zcentrifugovány po dobu 30 minut a zfiltrány přes filtrační papír Whatman č. 42. Antioxidační aktivita byla stanovena pomocí DPPH testu následujícím postupem: 3 ml 60 μ M DPPH v ethanolu byly smíchány s 250 μ l vodného extraktu (nebo deionizované vody jako slepý pokus), poté byl 1 ml tohoto roztoku zcentrifugován po dobu 2 minut a následně byla spektrofotometricky změřena absorbance při 517 nm. Výsledky byly vyjádřeny jako schopnost zhášení DPPH radikálu v %. Nejvyšší antioxidační aktivita 31,45 % byla stanovena u vzorku s přídavkem *Lactobacillus brevis* KX572376 po 14 dnech zrání, zatímco u kontrolního vzorku bez přídavku mikrobiální kultury byla její hodnota jen 12,65 %. To naznačuje zvýšenou schopnost kmene *Lactobacillus brevis* KX572376 peptidové hydrolyzy. Mimo to byly použity kmeny *L. brevis* KX572378, *L. brevis* KX572382, *L. brevis* KX572386, *L. casei* KX572389 a *L. plantarum* KX572390 a sýry byly sledovány po zrači dobu 56 dní [82].

Khalifa a kol. [83] se zabývali studiem náhrady mléčného tuku arašídovým olejem při výrobě měkkého bílého sýra Domiati. Pro výrobu použili odtučněné mléko, které bylo smícháno s 4 hm. % arašídového oleje. Do dvou vzorků byly navíc přidány stabilizátory v koncentraci 1 hm. %: mono- a diglyceridy mastných kyselin a sušená syrovátka v poměru 1:1; mono- a diglyceridy mastných kyselin, guarová guma, karboxymethylcelulóza a xanthanová guma v poměru 1:1:1:1. Vedle toho byl připraven vzorek bez použití arašídového oleje. Dále bylo postupováno dle technologického postupu výroby sýra Domiati. Před stanovením antioxidační aktivity za využití DPPH testu byly připraveny vodné extrakty sýrů rozpuštěním 10 g vzorku v 2,5 ml destilované vodě, s přídavkem HCl ($c = 1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na okyselení, ve vodní lázni při 45 °C po dobu 10 minut. Následně byla směs zcentrifugována a byl slit supernatant. Do květy s vodným extraktem byl přidán roztok DPPH a následně byl spektrofotometricky sledován pokles absorbance při 515 nm po dobu 16 minut. Výsledky byly vyjádřeny jako schopnost zhášení DPPH radikálu v %. U výrobků s přídavkem stabilizátoru se antioxidační aktivita během skladovací doby 90 dní zvýšila až na 78 %, zatímco u výrobku bez přídavku oleje došlo k jejímu poklesu z počátečních 31 % naměřených 3. den skladování na 28 %. Nejlepších výsledků dosahoval vzorek s přídavkem prvního typu stabilizátoru mono- a diglyceridů mastných kyselin a sušené syrovátky v poměru 1:1. Obecně byla zjištěna nejvyšší antioxidační aktivita u výrobků 60. den skladování, konkrétně 78 % u analogu se stabilizátorem mono- a diglyceridy mastných kyselin a sušená syrovátka (3. den skladování 45 %), 76 % analog bez přídavku stabilizátoru (3. den skladování 43 %) a 73 % analog s přídavkem čtyřsložkového stabilizátoru (3. den skladování 42 %). Z výsledků navíc vyplývá, že přídavek stabilizátoru snižuje ztrátu oleje ze sýra, a tedy že použití arašídového oleje a stabilizátoru při výrobě analogů sýrů s přídavkem oleje má pozitivní vliv na antioxidační aktivitu výrobku [83].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité laboratorní vybavení a chemikálie

3.1.1 Přístroje

- Plynový chromatograf Trace™ 1310 se split/splitless injektorem, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Hmotnostní detektor ISQ™ LT Single Quadrupole, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Knihovna spekter NIST/EPA/NIH, Verze 2.0, Gaithersburg, Maryland, USA
- Plynový chromatograf Trace™ GC 2000, ThermoQuest Italia S. p. a., Itálie s plamenově ionizačním detektorem a split/splitless injektorem
- Spektrofotometr Specord 50 Plus, Analytik Jena, Německo
- Počítač PC, Intel Pentium Procesor
- Lednice ERB40233X, Electrolux
- Vinotéka GZ-59 Guzzanti
- Externí vakuová balička VS6610 FROG
- Předvážky EK-600i, A&D Instruments LTD., Japonsko
- Analytické digitální váhy GR-202, HELAGO, Itálie
- Skříňová sušárna ULM 400, Memmert GmbH & Co. KG, Německo
- Exsikátor
- Centrifuga EBA 21, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Německo
- Vodní lázeň TW12, Julabo, Německo
- Vakuová rotační odparka HB 4 Basic, IKA WERKE, Německo
- Topné hnízdo LTHS 100, Brněnská Drutěva, v. d., Česká republika
- Vařič dvouplotýnkový SCP 2255SS, Sencor, Japonsko

3.1.2 Pracovní pomůcky

- SPME vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30 μm , Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA
- Vialky o objemu 2, 4 a 10 ml se šroubovacím uzávěrem
- Běžně dostupné laboratorní sklo a materiál
- Filtrační papír kvalitativní KA 1 pr. 110 mm, Papírna Perštein spol. s r. o.
- Nádobí a kuchyňské pomůcky pro výrobu vzorků a senzoricou analýzu
- Vakuovací sáčky CRYOVAC zrcí (150 \times 250 mm; tloušťka 52 μm)
- Mikropipety Biohit 10–1 000 μl

3.1.3 Chemikálie

- Bortrifluorid (10% roztok v methanolu), p. a., Sigma-Aldrich, Německo
- Ethanol 96%. p. a., PENTA, Česká republika
- Diethylether p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Isooktan 99,7% p. a., Sigma-Aldrich, Německo
- Hexan p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Hydroxid sodný p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Chlorid sodný, p. a., PENTA, Česká republika
- Kyselina chlorovodíková 35% p. a., PENTA, Česká republika
- Methanol p. a., Lach-Ner, Česká republika

- Petrolether p.a., Lach-Ner, Česká republika
- Síran sodný bezvodý p. a., PENTA, Česká republika

3.1.4 Standardní chemikálie

- Trolox 97%, ((±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), C₁₄H₁₈O₄, Sigma-Aldrich, RUS
- ABTS 98% (2,2'-azinobis(3-ethylbenzotiazolin-6-sulfonová kyselina)), Sigma-Aldrich, CAN
- Směsný standard methylesterů mastných kyselin, Supelco™ 37 Component FAME Mix, Sigma-Aldrich, Německo

3.1.5 Plyny

- Helium, čistota 4.8., v tlakové lahvi s redukčním ventilem, SIAD, Česká republika
- Dusík, čistota 5.0 v tlakové bombě s redukčním ventilem a kovovou membránou, SIAD, Česká republika
- Vodík, čistota 5.5 v tlakové bombě s redukčním ventilem, SIAD, Česká republika
- Vzduch, čistota 5.0 v tlakové bombě s redukčním ventilem pro kyslík, SIAD, Česká republika

3.1.6 Suroviny pro výrobu přírodních sýrů a sýrových analogů

- Čerstvé mléko polotučné 1,5%
- Smetanová kultura sušená, MILCOM a.s., Česká republika
- Syřidlo Laktochym, MILCOM a.s., Česká republika
- Chlorid vápenatý, MILCOM a.s., Česká republika
- Kuchyňská sůl
- Olej mandlový za studena lisovaný, Natural Jihlava, Česká republika
- Olej z lískových ořechů za studena lisovaný, Natural Jihlava, Česká republika
- Olej z vlašských ořechů za studena lisovaný, Natural Jihlava, Česká republika

3.2 Analyzované vzorky

V experimentální části práce byly analyzovány modelové vzorky sýrů a sýrových analogů vyrobené v laboratorních podmínkách na FCH VUT v Brně. Celkově byly vyrobeny čtyři typy vzorků: standardní měkký sýr (bez přídavku rostlinného oleje) a tři druhy analogů s přídavkem mandlového, lískoořechového a vlašského oleje. Oleje byly zakoupeny v běžné tržní síti a skladovány v lednici v originálních obalech, tj. skleněných lahvích z tmavého skla. Označení vzorků je uvedeno v tabulce 6. Výroba vycházela ze standardního technologického postupu pro výrobu měkkých sýrů, v rámci výrobního procesu bylo optimalizováno několik vybraných parametrů (viz kap. 4.1). Konečný optimalizovaný postup výroby je uveden v kap. 3.2.1.

Tabulka 6: Označení vzorků sýrů/analogů

Označení vzorku	Typ vzorku
S	standardní měkký sýr
M	analog s přídavkem mandlového oleje
L	analog s přídavkem lískoořechového oleje
V	analog s přídavkem oleje z vlašských ořechů

3.2.1 Postup výroby měkkých sýrů a analogů s přídavkem rostlinného oleje

Polotučné mléko bylo zahřáto v hrnci na teplotu 32 °C, byl přidán zákys v koncentraci 2 ml · l⁻¹ mléka (zákys byl předem připravený ze sušené smetanové kultury a polotučného mléka) a chlorid vápenatý v koncentraci 1 ml · l⁻¹ mléka. Směs byla promíchána a ponechána 45 minut prokysat. Poté bylo přidáno chymozinové syřidlo v koncentraci 1 ml · l⁻¹ mléka, zředěné 1:10 vodou, směs byla dobře promíchána a ponechána 30 minut srážet, dokud neměla hmota lomivou konzistenci. Následně byla hmota pokrájena nožem, přehřáta na 35 °C a 15 minut vytužována lehkým promícháváním. Po vytužení bylo zrno ponecháno usadit po dobu 10 minut, poté byl obsah hrnce scezen přes síto pro odtok syrovátky. Po tomto kroku byl v případě výroby sýrových analogů přimíchán rostlinný olej v množství 15 ml · l⁻¹ mléka.

Forma vyložená plátnem byla naplněna scezenou syřeninou, zajištěna lisovacím mechanismem a obsah formy byl ponechán lisovat při laboratorní teplotě 22 °C po dobu 3 hodin. Pro rovnoměrné zalisování a odtok syrovátky byl obsah formy v průběhu lisování po 1,5 hodině obrácen. Vylisovaný sýr byl následně naložen na 20 minut do solné lázně (200 g · l⁻¹ vody). Nasolený sýr byl osušen a uložen na 24 hodin do zracího boxu s nastavenou teplotou 13 °C. Následující den byl sýr rozdělen na 4 díly, zabalen a zavakuován ve zracích sáčcích. Zavakuovaný sýr byl vložen do horké vody o teplotě 85 °C na 15 sekund, obal byl osušen a výrobek byl uložen zpět do zracího boxu; zrání probíhalo při teplotě 13 °C po dobu 2 týdnů.

3.3 Použité metody a experimentální postupy

3.3.1 Stanovení těkavých látek

Pro stanovení těkavých látek byla zvolena metoda plynové chromatografie s hmotnostní detekcí ve spojení s mikroextrakcí pevnou fází (HS-SPME-GC-MS).

Na předvážkách byly do 10ml vialky naváženy 2 g vzorku sýra/sýrového analogu. Vialka byla uzavřena šroubovacím magnetickým víčkem se septem, aby byl znemožněn únik těkavých látek. Poté byla vialka se vzorkem umístěna do GC-MS a podrobena analýze.

3.3.1.1 Podmínky SPME extrakce

- Doba inkubace (temperování): 10 min
- Doba extrakce: 20 min
- Teplota agitátoru (teplota extrakce a inkubace): 40 °C
- Agitátor zapnutý: 5 s
- Agitátor vypnutý: 60 s
- Množství vzorku: 3 g
- Hloubka ponoření vlákna do vialky: 20 mm

3.3.1.2 Podmínky GC-MS analýzy

- Kapilární kolona: ZB–Wax; parametry kolony: 30 m × 0,25 mm × 0,5 μl
- Teplota injektoru (teplota desorpce): 240 °C
- Doba desorpce: 20 min
- Dávkování: splitless, ventil uzavřen 10 min
- Hloubka ponoření vlákna do injektoru: 40 mm
- Nosný plyn: helium
- Průtok nosného plynu: 1 ml · min⁻¹
- Teplotní program: 40 °C s výdrží 2 min
Vzestupný gradient 3 °C · min⁻¹ do 110 °C s výdrží 10 min
Vzestupný gradient 3 °C · min⁻¹ do 200 °C s výdrží 0 min
Celková doba analýzy: 65 min
- Hmotnostní detektor v módu EI
- Energie ionizačních elektronů: 70 eV
- Teplota iontového zdroje: 200 °C
- Skenovací rozsah *m/z*: 30–370 amu
- Rychlost skenování: 0,2 s

3.3.1.3 Identifikace a kvantifikace těkavých látek

K vyhodnocení stanovení těkavých látek byl použit program Xcalibur 2.2 a knihovny spekter. Identifikace byla provedena na základě srovnání hmotnostních spekter s dostupnou knihovnou spekter a porovnání vypočítaných retenčních indexů s publikovanými hodnotami; obsah identifikovaných sloučenin je vyjádřen semikvantitativně pomocí ploch příslušných píků na chromatogramu. Pro výpočet retenčních (Kovatsových) indexů byl použit upravený vzorec (1), který zadefinovali Van den Dool a Kratz [84].

Výpočet retenčního indexu podle vzorce (1):

$$RI_x = 100 \cdot n + 100 \cdot \left(\frac{T_{R(x)} - T_{R(n)}}{T_{R(n+1)} - T_{R(n)}} \right), \quad (1)$$

kde RI_x – retenční index analytu,

n – počet atomů uhlíku v nejbližším nižším n-alkanu,

$T_{R(x)}$ – retenční čas analytu,

$T_{R(n)}$ – retenční čas nejbližšího nižšího n-alkanu,

$T_{R(n+1)}$ – retenční čas nejbližšího vyššího n-alkanu.

3.3.2 Stanovení obsahu vody a sušiny

Přístroje a pomůcky:

Analytické váhy, exsikátor, sušárna, hliníkové misky se skleněnými tyčinkami, kleště, mořský písek propláchnutý a vyžíhaný.

Postup:

Miska s 15–30 g písku a skleněnou tyčinkou byla vysušena v sušárně po dobu 1 hodiny. Po vychladnutí byla miska s pískem zvážena s přesností na čtyři desetinná místa. Do misky bylo naváženo 3–5 g vzorku sýra/sýrového analogu s přesností na čtyři desetinná místa a obsah byl promíchán tyčinkou. Miska byla sušena po dobu 3 hodin a její obsah byl v časových intervalech promícháván. Následně byla miska přemístěna do exsikátoru a po jejím vyhlazení byla opět zvážena. V sušení a vážení se pokračovalo v půlhodinových intervalech, dokud nebylo dosaženo konstantní hmotnosti [85].

Výpočet obsahu vody podle vzorce (2):

$$w_v = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 100}{m_1 - m_0} [\%], \quad (2)$$

kde w_v – obsah vody [%],

m_0 – hmotnost misky s pískem a tyčinkou [g],

m_1 – hmotnost misky s pískem, tyčinkou a navážkou před sušením [g],

m_2 – hmotnost misky s pískem, tyčinkou a navážkou po sušení [g].

Výpočet obsahu sušiny podle vzorce (3):

$$w_{suš} = 100 - w_v [\%], \quad (3)$$

kde $w_{suš}$ – obsah sušiny [%],

w_v – obsah vody [%].

Výpočet obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra (VVTPH) podle vzorce (4):

$$\text{VVTPH} = \frac{100 - w_{suš}}{100 - w_{tuk}} \cdot 100 [\%], \quad (4)$$

kde $w_{suš}$ – obsah sušiny [%],

w_{tuk} – obsah tuku [%].

3.3.3 Stanovení mastných kyselin

Pro stanovení mastných kyselin byla provedena extrakce lipidů ze vzorků sýra/sýrových analogů, které byly následně podrobeny kyselé esterifikaci s bortrifluoridem jako katalyzátorem. Esterifikace byla provedena zvlášť pro stanovení všech (metoda značená jako TAG) a volných (VMK) mastných kyselin.

3.3.3.1 Extrakce lipidů ze vzorku sýra dle ČSN EN ISO 1735

Extrakce lipidů ze vzorku sýra a sýrového analogu byla provedena podle normy ČSN EN ISO 1735 směsí diethyletheru a petroletheru.

Princip:

Po rozpuštění netukových látek výrobku je uvolněný tuk vytřepán kvantitativně směsí diethyletheru a petroletheru a po jejich odpaření je zvážen.

Přístroje a pomůcky:

Struhadlo, nůž, zkumavka, dělicí nálevka, odměrný válec 10 ml, destilační baňka s kulatým dnem 50 ml, vodní lázeň, pipeta 5 ml, analytické váhy, vakuová odparka.

Chemikálie:

Kyselina chlorovodíková 35% p.a., ethanol 96% obj. p.a., diethylether p.a., petrolether p.a.

Postup:

Sýr/sýrový analog byl nastrouhán na jemném struhadle, do zkumavky byl navážen 1 g vzorku s přesností na čtyři desetinná místa, bylo přidáno 5 ml kyseliny chlorovodíkové a směs byla nechána zahřívát ve vodní lázni při 80 °C až do úplného rozpuštění sýra (změna barvy roztoku na tmavě fialovou, cca 10 minut), následně byla směs ochlazená pod tekoucí vodou.

Po ochlazení byla směs pomocí 5 ml ethanolu kvantitativně převedena do dělicí nálevky. Ke směsi bylo postupně přidáno 9 ml diethyletheru a 9 ml petroletheru, po každém přidavku byla směs mírně promíchána a protřepána po dobu 1 minuty. Poté byla směs nechána odstát při laboratorní teplotě cca 22 °C po dobu minimálně 30 minut, dokud nebyla horní fáze čirá a zřetelně oddělená od vodné fáze – první extrakce. Po této době byla horní fáze opatrně odebrána pipetou do vysušené a předem zvážené 50ml destilační baňky s kulatým dnem. Následně byla provedena druhá a třetí extrakce obdobným postupem, ale s polovičním množstvím rozpouštědel (4,5 ml diethyletheru a 4,5 ml petroletheru). Všechny tři extrakty byly spojeny a rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové rotační odparce při teplotě okolo 40 °C [86].

Takto získaný tuk bylo možné podrobit esterifikaci.

Množství tuku bylo zjištěno gravimetricky – shromážděný tuk v destilační baňce byl sušen 1 hodinu v sušárně při teplotě 102 °C a poté byla zjištěna hmotnost vyextrahovaného tuku zvážením na analytických vahách s přesností na 0,000 1 g a odečtením hmotnosti čisté destilační baňky.

Výpočet procentuálního obsahu tuku podle vzorce (5):

$$w_{tuk} = \frac{m_{tuk} \cdot 100}{m_{syr}} [\%], \quad (5)$$

kde w_{tuk} – obsah tuku [%],

m_{tuk} – hmotnost vyextrahovaného tuku ze vzorku [g],

m_{syr} – navážka vzorku sýra [g].

Výpočet procentuálního obsahu tuku v sušině podle vzorce (6):

$$w_{tvs} = \frac{w_{tuk} \cdot 100}{w_{suš}} [\%], \quad (6)$$

kde w_{tvs} – obsah tuku v sušině [%],

w_{tuk} – obsah tuku [%],

$w_{suš}$ – obsah sušiny [g].

3.3.3.2 Kyselá esterifikace s bortrifluoridem jako katalyzátorem (TAG)

Princip:

V prvním kroku bazické katalýzy jsou glyceroly transmetylovány pomocí methanolického roztoku hydroxidu sodného na methylestery, přítomné VMK jsou převedeny na soli. V druhém kroku kyselá katalýza jsou soli MK převedeny na methylestery reakcí s komplexem bortrifluorid-methanol.

Přístroje a pomůcky:

Destilační baňka s kulatým dnem, zpětný chladič, topné hnízdo, pipeta 5 ml, odměrný válec 50 ml, vialka (2 a 4 ml).

Chemikálie:

Methanolický roztok hydroxidu sodného ($c = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), bortrifluorid methanolický roztok 10%, isooktan p.a., chlorid sodný p.a. (nasycený vodný roztok), síran sodný bezvodý p.a.

Postup:

Do 50ml destilační baňky s kulatým dnem byl kvantitativně převeden vyextrahovaný tuk. Byly přidány 4 ml methanolického roztoku hydroxidu sodného ($c = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a varný kamínek. K baňce byl připojen zpětný chladič, baňka byla vložena do topného hnízda a obsah baňky byl vařen pod zpětným chladičem, dokud nedošlo k vymizení kapiček tuku. Každých cca 30 sekund po dobu 5 až 10 minut byla baňka jemnými krouživými pohyby promíchána, aby se na stěnách baňky nevytvořil pevný kroužek hydroxidu sodného. Poté bylo do vroucí směsi přes zpětný chladič přidáno 5 ml methanolického roztoku bortrifluoridu a bylo pokračováno ve varu dalších 20 až 25 minut. Poté byly do vroucí směsi přes horní konec chladiče přidány 3 ml isooktanu, destilační baňka byla vyjmuta z topného hnízda a var se zastavil. Ihned, bez jakéhokoli chlazení, bylo do směsi přidáno 20 ml nasyceného vodného roztoku chloridu sodného, baňka byla uzavřena a protřepána 15 sekund. Poté bylo přidáno větší množství nasyceného vodného roztoku chloridu sodného, tak aby hladina kapaliny dosáhla hrdla baňky a šlo rozeznat rozhraní dvou fází. Baňka byla pro oddělení fází nechána 5 minut odstát. Z horní isooktanové vrstvy byly odebrány 2 ml do 4ml vialky. Bylo přidáno malé množství bezvodého síranu sodného, aby se odstranily stopy vlhkosti. Z takto připraveného roztoku byl odebrán 1 ml do vialky k analýze GC-FID [85].

Příprava methanolického roztoku NaOH ($c = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$):

Navážka 2 g NaOH byla za mírného ohřívání ve vodní lázni rozpuštěna ve 100 ml methanolu. Připravený roztok byl uchováván v lednici maximálně po dobu 3 měsíců.

3.3.3.3 Kyselá esterifikace s bortrifluoridem jako katalyzátorem (VMK)

Princip:

Volné MK jsou esterifikovány zahříváním v přebytku bezvodého methanolu v přítomnosti BF_3 jako katalyzátoru.

Přístroje a pomůcky:

Destilační baňka s kulatým dnem, zpětný chladič, topné hnízdo, pipeta 5 ml, odměrný válec 50 ml, vialka (2 a 4 ml).

Chemikálie:

Bortrifluorid methanolický roztok 10%, isooktan p.a., chlorid sodný p.a. (nasycený vodný roztok), síran sodný bezvodý p.a.

Postup:

Do 50ml destilační baňky s kulatým dnem byl kvantitativně převeden vyextrahovaný tuk. K baňce byl připojen zpětný chladič, přidán varný kamínek, 5 ml methanolického roztoku bortrifluoridu a směs byla přivedena k varu. Po 3 minutách byly do vroucí směsi přes horní konec chladiče přidány 3 ml isooktanu, destilační baňka byla vyjmuta z topného hnízda a byl zastaven var. Ihned, bez jakéhokoli chlazení, bylo do směsi přidáno 20 ml nasyceného vodného roztoku chloridu sodného, baňka byla uzavřena a protřepána 15 sekund. Poté bylo přidáno větší množství nasyceného vodného roztoku chloridu sodného, tak aby hladina kapaliny dosáhla hrdla baňky a šlo rozeznat rozhraní dvou fází. Baňka byla pro oddělení fází nechána 5 minut odstát. Z horní isooktanové vrstvy byly odebrány 2 ml do 4ml vialky. Bylo přidáno malé množství bezvodého síranu sodného, aby se odstranily stopy vlhkosti. Z takto připraveného roztoku byl odebrán 1 ml do vialky k analýze na plynovém chromatografu [85].

3.3.3.4 Podmínky GC-FID analýzy

- Kapilární kolona: DB-WAX s vysoce polární stacionární fází (PEG); parametry kolony: 30 m × 0,32 mm × 0,5 μm
- Teplota injektoru: 250 °C
- Dávkování: splitless, ventil uzavřen 1 minutu, split flow 10 ml · min⁻¹
- Dávkovaný objem vzorku: 1 μl
- Nosný plyn: dusík
- Průtok nosného plynu: 1 ml · min⁻¹
- Teplotní program: 50 °C s výdrží 1 min
Vzestupný gradient 25 °C · min⁻¹ do 200 °C s výdrží 0 min
Vzestupný gradient 3 °C · min⁻¹ do 230 °C se zadržením 30 min
Celková doba analýzy: 47 min
- Detektor: plamenově ionizační
- Teplota detektoru: 250 °C
- Průtok vzduchu: 350 ml · min⁻¹
- Průtok vodíku: 35 ml · min⁻¹
- Make-up dusíku: 30 ml · min⁻¹

3.3.3.5 Identifikace a kvantifikace mastných kyselin

Mastné kyseliny byly identifikovány na základě srovnání vyhodnocených retenčních časů těkavých methylesterů MK v extraktech vzorků se standardy uvedenými v tabulce 7. Kvantifikace byla vypočítána pomocí následujících vztahů (7)–(10). Zastoupení MK je vyjádřeno po přepočtu v mg · g⁻¹ sýra.

Výpočet koncentrace MeMK v extraktu ve vialce podle vzorce (7):

$$c_{MeMK} = \frac{c_s \cdot P_{MeMK}}{P_s} \left[\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \right], \quad (7)$$

kde c_{MeMK} – koncentrace MeMK v extraktu [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$],
 c_s – koncentrace standardu [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$],
 P_{MeMK} – plocha píku MeMK v extraktu [$\text{mV} \cdot \text{s}$],
 P_s – plocha píku standardu [$\text{mV} \cdot \text{s}$].

Výpočet koncentrace MK přepočtem z koncentrace MeMK podle vzorce (8):

$$c_{MK} = \frac{c_{MeMK} \cdot Mr_{MK}}{Mr_{MeMK}} \left[\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \right], \quad (8)$$

kde c_{MK} – koncentrace MK v extraktu [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$],
 c_{MeMK} – koncentrace MeMK v extraktu [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$],
 Mr_{MK} – molární hmotnost MK [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$],
 Mr_{MeMK} – molární koncentrace MeMK [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$].

Výpočet množství v původním objemu v baňce podle vzorce (9):

$$m_{MK} = c_{MK} \cdot V \left[\text{mg} \right], \quad (9)$$

kde m_{MK} – celková hmotnost MK v baňce [mg],
 c_{MK} – koncentrace MK v extraktu [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$],
 V – objem isooktanu [ml].

Výpočet koncentrace MK v sýru podle vzorce (10):

$$c_{sýr} = \frac{m_{MK}}{m_{sýr}} \left[\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \right], \quad (10)$$

kde $c_{sýr}$ – koncentrace MK ve vzorku sýra [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$],
 m_{MK} – celková hmotnost MK v baňce [mg],
 $m_{sýr}$ – navážka vzorku sýra [g].

Tabulka 7: Standardy MeMK použité pro identifikaci a kvantifikaci MK ve vzorcích

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

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

3.3.4 Spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita sýrů/sýrových analogů byla stanovena pomocí TEAC testu.

Příprava ABTS^{•+}:

Nejprve bylo připraveno 10 ml roztoku ABTS o koncentraci $7 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. ABTS bylo rozpuštěno v destilované vodě, kdy reakcí s $2,45 \text{ ml mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ došlo ke vzniku radikálového kationu $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Takto připravený roztok byl ponechán po dobu 12 hodin ve tmě a dále byl uchováván v uzavřené baňce obalené alobalem v lednici. Před samotným měřením byl roztok $\text{ABTS}^{\bullet+}$ zředěn 60% ethanolem na absorbanci $0,7 \pm 0,02$ při vlnové délce $\lambda = 734 \text{ nm}$ (měřeno spektrofotometricky proti ethanolu); dále bylo pracováno s takto upraveným roztokem.

Postup:

V kyvetě byl smíchán 1 ml zředěného roztoku $\text{ABTS}^{\bullet+}$ s $10 \mu\text{l}$ destilované vody, obsah byl promíchán a ihned byla změřena absorbance v čase $t = 0 \text{ min}$ (A_0) při $\lambda = 734 \text{ nm}$.

Pro stanovení antioxidační kapacity vzorku byl do kyvety napipetován 1 ml zředěného $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a $10 \mu\text{l}$ vzorku, obsah byl promíchán a kyveta byla na dobu 10 minut vložena do spektrofotometru. Po 10 minutách byla změřena absorbance v čase $t = 10 \text{ min}$ (A_{10}) při $\lambda = 734 \text{ nm}$. Výsledná absorbance byla vypočítána podle vzorce (11) a výsledná antioxidační aktivita vzorku byla po odečtení z kalibrační křivky vyjádřena pomocí parametru TEAC, tj. ekvivalentní množství Troloxu (c_{Trolox} ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra)). Následně bylo vypočítáno % zhášení radikálu podle vzorce (12).

Výpočet výsledné absorbance podle vzorce (11):

$$A = A_0 - A_{10} \quad [-], \quad (11)$$

kde A – výsledná absorbance [-],

A_0 – absorbance v čase $t = 0 \text{ min}$ [-],

A_{10} – absorbance v čase $t = 10 \text{ min}$ [-].

Výpočet procenta zhášení radikálu podle vzorce (12):

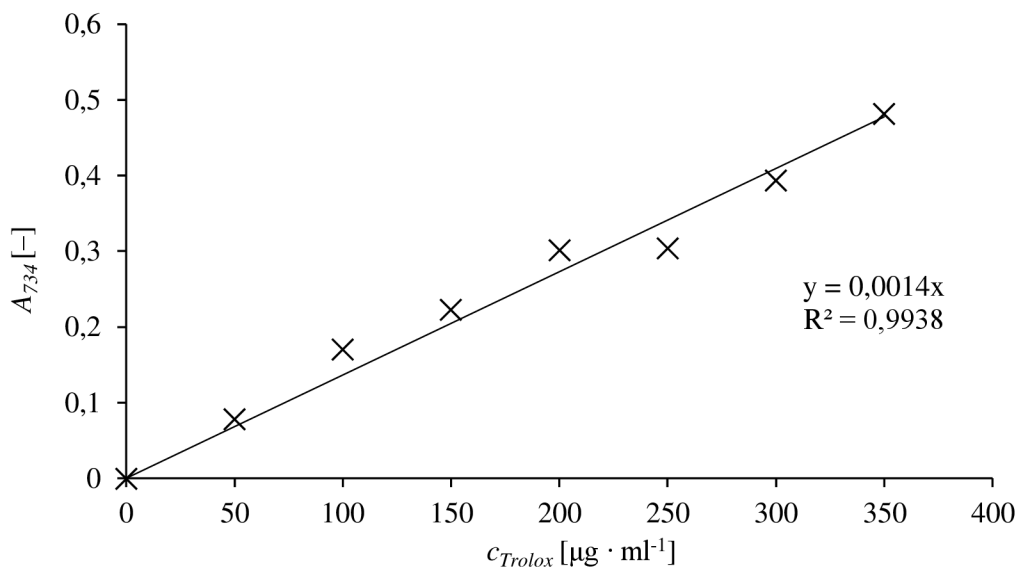
$$\text{zhášení radikálu} = 100 \cdot \frac{A_0 - A_{10}}{A_0} \quad [\%], \quad (12)$$

kde A_0 – absorbance v čase $t = 0 \text{ min}$ [-],

A_{10} – absorbance v čase $t = 10 \text{ min}$ [-].

3.3.4.1 Příprava kalibrační křivky

Byla připravena kalibrační řada Troloxu (standard Troloxu v 60% ethanolu) v rozmezí $50\text{--}400 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a změřena kalibrační závislost absorbance na koncentraci (viz graf 1). 1 ml zředěného roztoku $\text{ABTS}^{\bullet+}$ byl v kyvetě smíchán s $10 \mu\text{l}$ roztoku Troloxu a byla změřena absorbance. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalentní množství Troloxu TEAC vztažené na hmotnost sýra/sýrového analogu ($\mu\text{g}_{\text{Trolox}} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra).



Graf 1: Kalibrační křivka Troloxu

3.3.4.2 Příprava vodných extraktů sýrů a sýrových analogů

Pro stanovení antioxidační aktivity byly použity extrakty sýrů/analogů. K jejich přípravě byl použit upravený postup uvedený v práci Khalifa a kol. [83], kteří extrakty použili při studiu antioxidační aktivity analogů měkkých bílých sýrů s přidavkem arašídového oleje.

Postup:

Byly naváženy 3 g sýra/sýrového analogu. Vzorek byl tloučkem rozmělněn v třecí misce s 6 ml destilované vody a 300 μl H_2SO_4 ($c = 1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na úpravu pH 4,5. Poté byla směs zcentrifugována při otáčkách 5 000 $\text{ot} \cdot \text{min}^{-1}$ po dobu 15 minut. Odstředěný supernatant byl následně přefiltrován přes filtrační papír KA 1. Vzorky vodných extraktů byly před použitím skladovány v lednici v uzavřených vialkách z tmavého skla.

3.3.5 Senzorická analýza

Senzorická analýza byla provedena se všemi čtyřmi vyrobenými vzorky, které byly následně podrobeny ostatním analýzám. Komise hodnotitelů se skládala z 10 osob (7 žen, 3 muži) z řad studentů navazujícího magisterského a doktorského studia Fakulty chemické VUT v Brně.

Senzorická analýza se skládala z hodnocení pomocí stupnic, pořadového testu a párové porovnávací zkoušky. V senzorickém hodnocení byly pomocí pětistupňové stupnice (vynikající \rightarrow nepřijatelný) sledovány u výrobků vzhled a barva, konzistence a celkový flavour. V profilovém testu byla pětistupňovou stupnicí (nepozorovatelně \rightarrow výrazně) hodnocena intenzita vybraných deskriptorů, tj. ořechová, případně jiná chuť. Hodnotitelé se měli také pokusit identifikovat druh přidaného ořechového oleje. V pořadovém testu byly vzorky seřazeny podle celkové přijatelnosti. Párová porovnávací zkouška byla zaměřena na výběr přijatelnějšího vzorku vždy mezi výrobkem s/bez přidavku ořechového oleje.

Sýry byly rozkrojeny na výseče, umístěny na talířek a označeny čtyřmístným kódem. Takto připravené vzorky byly předloženy hodnotitelům společně s vodou, jakožto chuťovým neutralizátorem, a dotazníkem pro záznam senzorického hodnocení. Formulář je uveden v příloze 1.

3.4 Statistické zpracování výsledků

Získaná data byla zpracována pomocí programu Microsoft Excel Office 365 a softwaru Statistica.13.3, veškeré statistické zpracování bylo provedeno na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Těkavé (aromaticky aktivní) látky byly identifikovány pomocí programu Xcalibur 2.2 porovnáním hmotnostních spekter s dostupnými knihovny spekter a porovnáním vypočítaných retenčních indexů s publikovanými hodnotami. Obsah identifikovaných sloučenin byl vyjádřen semikvantitativně pomocí ploch příslušných píků na chromatogramu. Každý vzorek byl analyzován dvakrát ($n = 2$). Průměrný retenční čas (T_R) byl vypočítán jako aritmetický průměr z jednotlivých měření. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách a znázorněny pomocí sloupcových grafů.

Pro výpočet obsahu sušiny, vody v tukuprosté hmotě sýra, tuku a tuku v sušině byl každý vzorek analyzován vždy třikrát ($n = 3$). Výsledky jsou uvedeny v tabulce ve tvaru $\% \pm$ směrodatná odchylka a znázorněny graficky pomocí boxových grafů. Statistické rozdíly mezi vzorky byly zjišťovány za využití Kruskal-Wallisova testu.

Stanovení mastných kyselin bylo provedeno zvlášť pro stanovení TAG a VMK. Každé stanovení bylo pro každý vzorek provedeno dvakrát ($n = 2$). Výsledky jsou uvedeny v tabulkách ve tvaru aritmetický průměr $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra \pm směrodatná odchylka a pro lepší přehlednost znázorněny také graficky, chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku měření. Ke zjištění rozdílu obsahu SFA:MUFA:PUFA byl použit Kruskal-Wallisův test.

Ke zhodnocení antioxidační aktivity byl každý extrakt příslušného vzorku měřen třikrát ($n = 3$). Antioxidační aktivita byla vyjádřena ve tvaru aritmetický průměr $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra \pm směrodatná odchylka, výsledky jsou uvedeny v tabulce a znázorněny pomocí sloupcového grafu. Dále bylo provedeno statistické porovnání pomocí testu ANOVA a pomocí Tukeyho HSD testu zjištění rozdílů mezi jednotlivými vzorky.

Výsledky sensorické analýzy byly vyjádřeny jako medián a vzorky byly statisticky srovnány pomocí neparametrického Kruskal-Wallisova testu. Výsledky jednotlivých testů byly opět uvedeny v tabulkách a znázorněny graficky.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce je pilotní součástí studie, která se bude zabývat výrobou a charakterizací měkkých zrajících sýrů a jejich analogů s přidavkem ořechových olejů, a jejímž cílem bude získat sensoricky atraktivní produkt se zvýšenou nutriční hodnotou.

Cílem této práce bylo optimalizovat proces výroby měkkých bílých sýrů v laboratorních podmínkách a při výrobě analogů aplikovat do výrobků vybrané druhy ořechových olejů (výrobní proces je uveden v kap. 3.2.1). Dále byl pomocí vybraných metod posouzen profil těkavých látek, mastných kyselin, antioxidační potenciál a celková sensorická kvalita připravených vzorků (použité metody a postupy jsou uvedeny v kap. 3.3). Hlavním záměrem bylo zjistit, zda a jakým způsobem bude mít přídavek rostlinných olejů vliv na výše uvedené parametry.

4.1 Optimalizace procesu výroby

Výroba vzorků vycházela ze standardního technologického postupu pro výrobu měkkých sýrů, v rámci výrobního procesu bylo optimalizováno několik vybraných parametrů. Veškeré výrobky v rámci optimalizace byly sensoricky hodnoceny skupinou zvláště vyškolených hodnotitelů v rámci pracovní skupiny, na základě jejich hodnocení byl postupně navržen konečný postup výroby sýrů/analogů.

Prvním parametrem bylo množství přidaného syřidla. Síla syřidla je definována jako počet dílů mléka, které dokáže srazit 1 díl syřidla při teplotě 35 °C za dobu 40 minut [87]. Jeho hodnota uváděná na obale však většinou neodpovídá jeho aktuální síle, což bylo potvrzeno během zkušební výroby, kdy proces syření trval příliš dlouho, k vločkování mléka došlo zhruba po dvou hodinách od přidání dávky syřidla, přičemž by měl proces syření během výroby měkkých sýrů probíhat při teplotě 28–33 °C po dobu 40–60 minut [87]. Z tohoto důvodu byl proveden test síly syřidla a následně i upraveno použité množství. Živočišné syřidlo chymozin je v tekuté formě méně stabilní než ve formě práškové; bylo zjištěno, že cca po půlročním skladování chymozinového syřidla o deklarované síle 1:5 000 může dojít k poklesu jeho síly o 41 %, což má za následek téměř dvojnásobně dlouhou dobu koagulace. Kromě doby skladování a působení ultrafialového záření má na degradaci syřidla vliv také vystavení alkalickému pH například v případě vodných roztoků [88]. Navíc je síla syřidla silně závislá na chemických vlastnostech mléka a je tedy potřeba jej standardizovat na konkrétní, zpracovávané mléko [89].

Test síly syřidla spočívá v přidání 1 ml syřidla do 100 ml mléka zahřátého na teplotu syření (konkrétně 32 °C, dle postupu uvedeného v kap. 3.2.1) a stopování času, ve kterém je možné pozorovat tzv. vločkování mléka (obrázek 3). Z času je následně dle vzorce (13) vypočítána síla syřidla, pomocí Soxhletova vzorce (14) je pak vypočítáno potřebné množství pro konkrétní recepturu a následně připočtena korekce. U mléka kravského se uvádí počítat s navýšením o 50–100 %. Tímto způsobem bylo zvoleno množství přidaného syřidla na 1 ml · l⁻¹ mléka [87].

Výpočet síly syřidla:

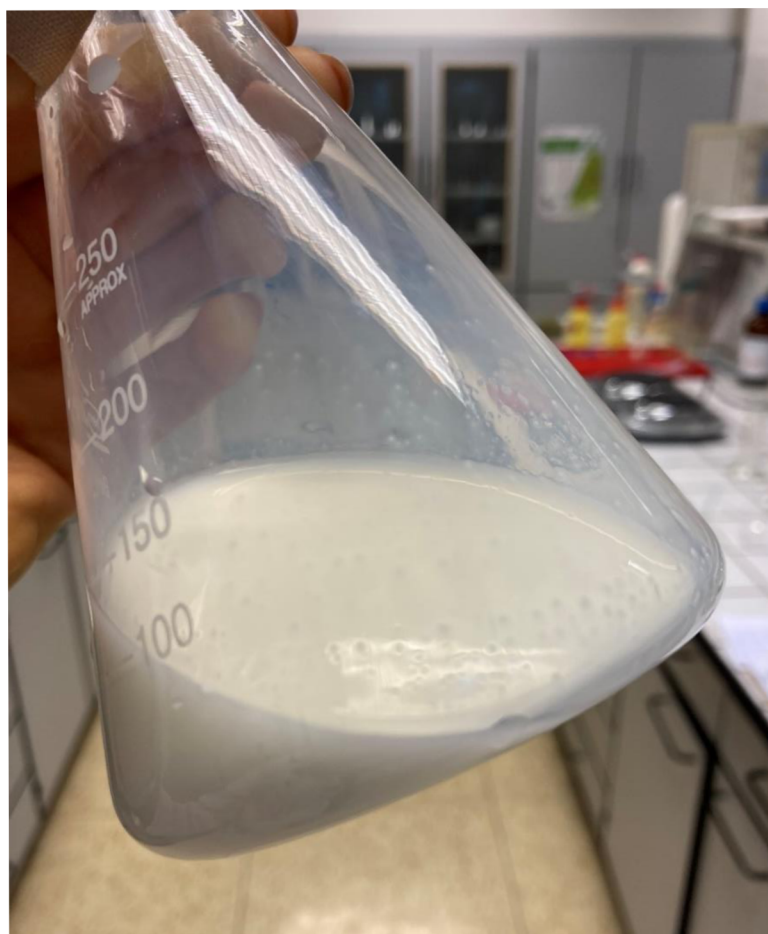
$$S = \frac{2\,400 \cdot V}{t_{vl} \cdot V_s} \quad [-], \quad (13)$$

kde S – síla syřidla [–],
2 400 – ideální doba srážení [s],
 V – objem sráženého mléka [ml],
 t_{vl} – doba vzniku prvních vloček mléka [s],
 V_s – objem syřidla [ml].

Výpočet dávky syřidla dle Soxhletova vzorce:

$$V_{syř} = \frac{V_m \cdot 35 \cdot 40}{S \cdot T \cdot t} \cdot 1\,000 \text{ [ml]}, \quad (14)$$

kde $V_{syř}$ – objem potřebné dávky syřidla [ml],
 V_m – objem sráženého mléka [l],
35 – ideální teplota srážení ve stupních Celsia,
40 – ideální doba srážení v minutách,
 S – síla syřidla [–],
 T – teplota [°C],
 t – požadovaná doba srážení [min] [87].



Obrázek 3: Test síly syřidla – vločkování mléka

Dalším parametrem byl způsob zrání. Sýry z prvních výrob byly nechány zrát volně bez obalu v chladu při teplotě 13 °C. Sýry byly pravidelně potírány roztokem kuchyňské soli (200 g · l⁻¹ vody), ale z důvodu nízké vzdušné vlhkosti začaly sýry brzy osychat a po třech týdnech se na nich objevila i plíseň (obrázek 4). Sýry z dalších výrob byly baleny a zavakuovány ve zracích sáčcích, které by měly zamezit osychání, přístupu kyslíku a nežádoucích mikroorganismů, ale zároveň umožnit propouštění CO₂. V tomto případě sýry sice nevysychaly, ale zrání probíhalo velmi pomalu, s čímž souvisí i optimalizace třetího parametru.

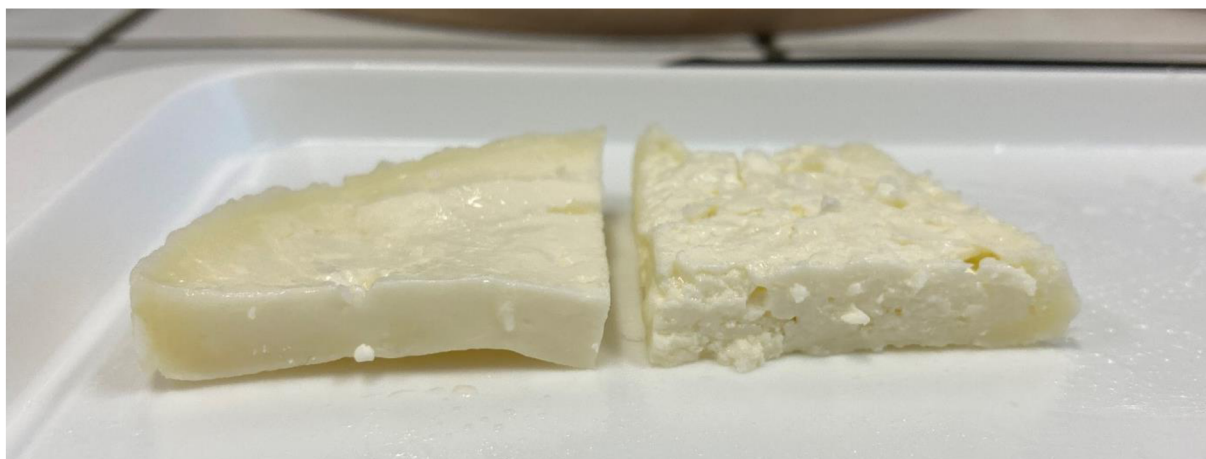
Třetím sledovaným parametrem byla potřebná doba zrání sýrů, která byla nakonec stanovena na dva týdny. Po této době neprojevovaly vzorky známky zkažení ani výrazné snížení sensorické kvality. Nebyly hluboce prozrálé, podle bílé barvy sýrového těsta a ostatních vlastností je lze řadit do kategorie „bílých sýrů“ [6].

Jako poslední, čtvrtý parametr bylo posuzováno množství přidaného rostlinného oleje (v případě analogů), tak aby byl výrobek sensoricky atraktivní a zároveň nebyla z ekonomických důvodů spotřeba oleje příliš vysoká. Vyšší množství přidaného oleje mělo navíc negativní dopad na dobu lisování a mělo za následek méně konzistentní těsto (obrázek 5). Na základě těchto kritérií bylo použito množství oleje v koncentraci 15 ml · l⁻¹ mléka.

Na obrázku 6–10 je zobrazena část vybraných kroků výrobního procesu.



Obrázek 4: Sýr po procesu zrání bez obalu v chladu



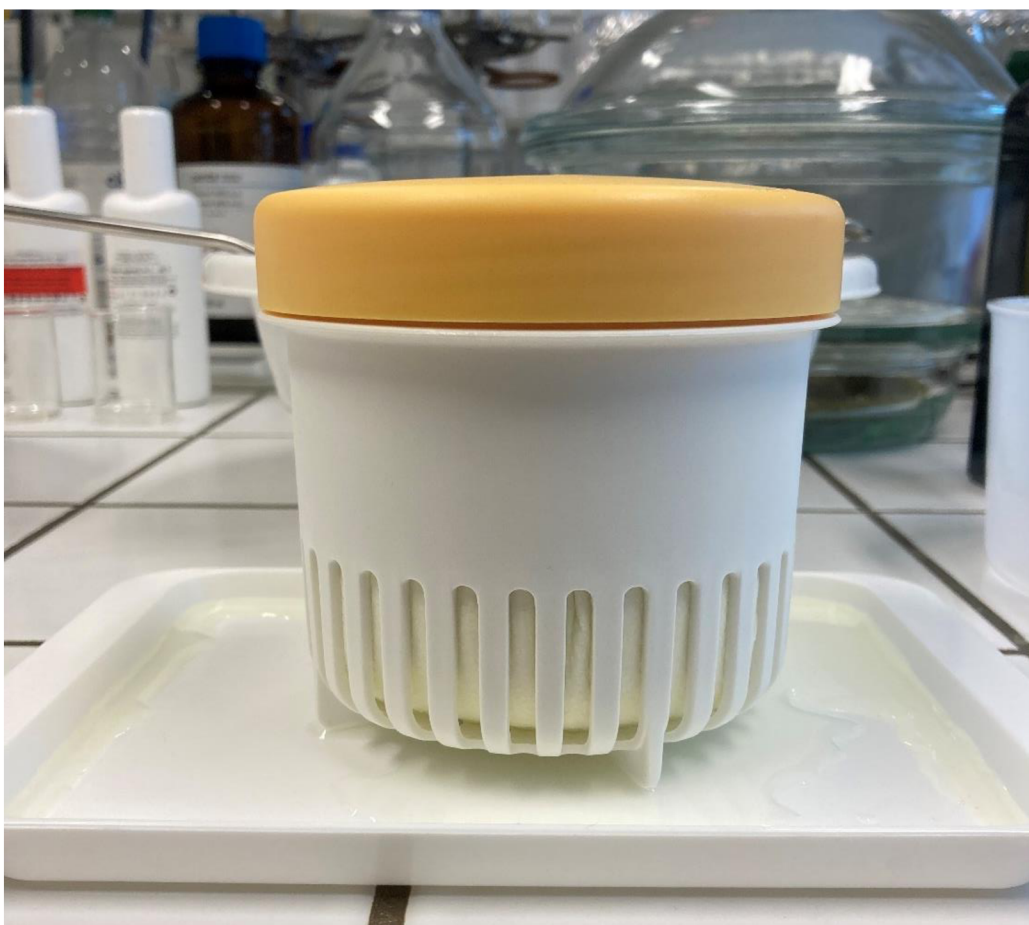
Obrázek 5: Sýr s vyšším množstvím přidaného oleje a méně konzistentním těstem (vpravo) ve srovnání se standardem (vlevo)



Obrázek 6: Sýřenina o lomivé konzistenci před krájením



Obrázek 7: Vytužené sýrové zrno



Obrázek 8: Lisování syřeniny



Obrázek 9: Vylisovaný sýr po nasolení (standard)



Obrázek 10: Vakuování sýra

4.2 Těkavé (aromatické) látky ve vzorcích sýrů/analogů

Těkavé látky byly stanoveny pomocí metody HS-SPME-GC-MS a identifikovány na základě srovnání hmotnostních spekter s dostupnými knihovnamí a porovnání vypočítaných retenčních indexů s publikovanými hodnotami. Přehled identifikovaných sloučenin je uveden v tabulce 8. Sloučeniny byly zařazeny do chemických skupin a jejich přítomnost ve vzorku byla označena symbolem „✓“. Retenční čas je uveden jako průměr ze všech měření.

Celkově bylo ve všech vzorcích identifikováno 38 sloučenin, z toho 11 alkoholů, 6 ketonů, 6 kyselin, 4 aldehydy, 4 estery, 4 terpeny a 3 ostatní, nezařazené sloučeniny.

Ukázky chromatogramů vzorků jsou součástí přílohy 2–5.

Tabulka 8a: Přehled těkavých látek identifikovaných ve vzorcích sýrů/analogů

Název sloučeniny	Skupina	T_R [min]	RI vypočítaný	Tabelovaný interval 90% RI	S	M	L	V	Ref.
pentan-3-on	keton	4,27	978	935–1 003	✓	✓	✓	✓	[90]
butan-2,3-dion	keton	5,63	996	954–1 000	✓	✓	✓	✓	[35][42][90]
α -thujen	terpen	6,78	1 027	1 012–1 039		✓	✓	✓	[90]
ethyl ester kyseliny butanové	ester	7,29	1 043	1 019–1 057	✓	✓	✓	✓	[90]
hexan-1-al	aldehyd	8,70	1 087	1 056–1 106		✓	✓	✓	[42][47][55][90]
2-methylpropan-1-ol	alkohol	9,43	1 110	1 057–1 113	✓	✓	✓	✓	[42][47][90]
3-methylbutyl ester kyseliny octové	ester	10,25	1 129	1 102–1 140	✓	✓	✓	✓	[90]
pent-1-en-3-ol	alkohol	10,47	1 134	1 130–1 179	✓	✓	✓	✓	[47][55][90]
heptan-2-on	keton	12,64	1 189	1 160–1 205	✓	✓	✓	✓	[42][47][55][90]
limonen	terpen	12,91	1 196	1 178–1 219		✓		✓	[42][90]
3-methylbutan-1-ol	alkohol	13,83	1 218	1 179–1 236	✓	✓	✓	✓	[35][47][90]
ethyl ester kyseliny hexanové	ester	14,77	1 240	1 216–1 258	✓	✓	✓	✓	[35][90]
pentan-1-ol	alkohol	15,60	1 259	1 217–1 271	✓	✓	✓	✓	[42][47][55][90]
oktan-3-on	keton	16,34	1 277	1 230–1 280	✓			✓	[90]
3-hydroxybutan-2-on	keton	17,23	1 298	1 250–1 314	✓	✓	✓	✓	[35][42][47][53][90]
heptan-2-ol	alkohol	18,55	1 329	1 284–1 335	✓	✓	✓	✓	[47][90]
3-methylbut-2-en-1-ol	alkohol	18,70	1 332	1 280–1 338	✓	✓	✓		[42][90]
hexan-1-ol	alkohol	20,00	1 362	1 316–1 377	✓	✓	✓	✓	[42][47][53][90]
dimethyltrisulfid	ostatní	20,62	1 377	1 347–1 406	✓	✓	✓		[90]
okt-2-en-al	aldehyd	22,99	1 433	1 407–1 463	✓	✓	✓	✓	[42][47][55][90]
ethyl ester kyseliny oktanové	ester	23,39	1 443	1 416–1 458	✓	✓		✓	[90]
okt-1-en-3-ol	alkohol	24,14	1 461	1 411–1 465				✓	[57][90]

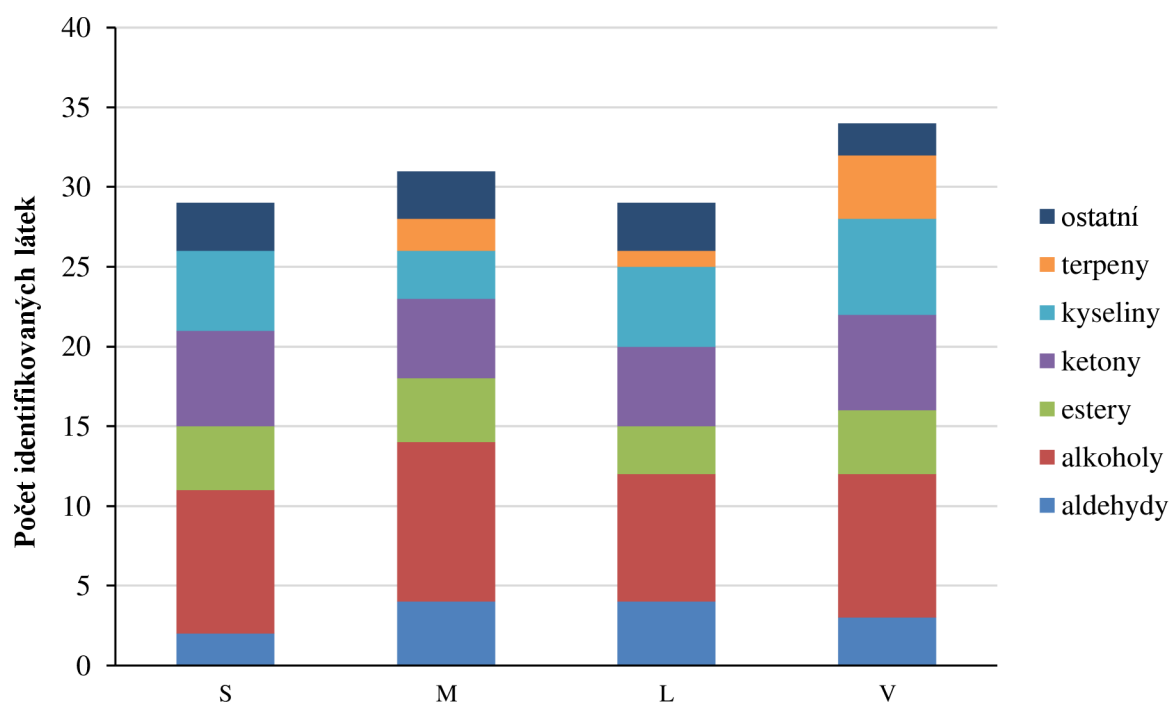
Tabulka 8b: Přehled těkavých látek identifikovaných ve vzorcích sýrů/analogů – pokračování

Název sloučeniny	Skupina	T_R [min]	RI vypočítaný	Tabelovaný interval 90% RI	S	M	L	V	Ref.
kyselina octová	kyselina	24,83	1 477	1 408–1 479	✓	✓	✓	✓	[35][47][53][90]
2-ethylhexan-1-ol	alkohol	25,74	1 499	1 452–1 513	✓	✓			[42][90]
benzaldehyd	aldehyd	28,26	1 547	1 481–1 555	✓	✓	✓	✓	[42][47][90]
undekan-2-on	keton	30,43	1 588	1 579–1 617	✓	✓	✓	✓	[43][90]
kyselina butanová	kyselina	34,81	1 650	1 593–1 655	✓	✓	✓	✓	[35][47][55][90]
3-methylbutanová kyselina	kyselina	37,93	1 691	1 636–1 697	✓	✓	✓	✓	[90]
karvon	terpen	40,73	1 728	1 699–1 751				✓	[90]
kyselina hexanová	kyselina	47,72	1 868	1 807–1 873	✓		✓	✓	[35][47][55][90]
geranylaceton	terpen	47,95	1 873	1 820–1 873				✓	[90]
benzylalkohol	alkohol	48,66	1 888	1821–1 905		✓		✓	[42][90]
fenylacetonitril	ostatní	49,73	1 913	1 871–1 957	✓	✓	✓	✓	[90]
2-fenylethylalkohol	alkohol	50,05	1 921	1 859–1 944	✓	✓	✓	✓	[42][47][90]
cinnamaldehyd	aldehyd	55,24	2 044	2 015–2 044		✓	✓		[90]
kyselina oktanová	kyselina	56,37	2 069	2 011–2 089	✓		✓	✓	[35][47][57][90]
kyselina nonanová	kyselina	58,31	2 111	2 110–2 196				✓	[57][90]
δ -dekalakton	ostatní	60,97	2 165	2 137–2 221	✓	✓	✓	✓	[90]

T_R – retenční čas; RI – retenční index; S – měkký sýr bez přídavku oleje (standard); M – analog s přídavkem mandlového oleje; L – analog s přídavkem lískoořechového oleje; V – analog s přídavkem oleje z vlašských ořechů

4.2.1 Srovnání počtu identifikovaných látek ve vzorcích

Porovnání celkového počtu identifikovaných sloučenin ve vzorcích rozdělených podle chemických skupin je uvedeno na grafu 2, podrobnější přehled je v tabulce 9.



Graf 2: Celkový počet těkavých látek ve vzorcích podle chemických skupin; značení vzorků viz tabulka 6

Tabulka 9: Celkový počet těkavých látek ve vzorcích podle chemických skupin

Chemická skupina	S	M	L	V
aldehydy	2	4	4	3
alkoholy	9	10	8	9
estery	4	4	3	4
ketony	6	5	5	6
kyseliny	5	3	5	6
terpeny	0	2	1	4
ostatní	3	3	3	2
Celkem	29	31	29	34

Značení vzorků viz tabulka 6

Celkem bylo identifikováno 38 sloučenin, z nichž 22 se nacházelo ve všech vzorcích. Ve vzorku standardu bylo identifikováno 29 sloučenin, stejný počet látek byl identifikován i ve vzorku analogu s přidavkem lískořechového oleje, ve vzorku analogu s přidavkem mandlového oleje bylo identifikováno 31 látek a největší počet, 34 těkavých látek, byl identifikován ve vzorku analogu s přidavkem vlašského oleje. Konkrétně bylo ve vzorku standardu identifikováno 9 alkoholů, 6 ketonů, 5 kyselin, 4 estery, 3 ostatní, nezařazené

sloučeniny a 2 aldehydy. Ve vzorku analogu s přídavkem mandlového oleje bylo identifikováno 10 alkoholů, 5 ketonů, 4 aldehydy, 4 estery, 3 kyseliny, 3 ostatní, nezařazené sloučeniny a 2 terpeny. Ve vzorku analogu s přídavkem lískoořechového oleje bylo identifikováno 8 alkoholů, 5 ketonů, 5 kyselin, 4 aldehydy, 3 estery, 3 ostatní, nezařazené sloučeniny a 1 terpen. Ve vzorku analogu s přídavkem vlašského oleje bylo identifikováno 9 alkoholů, 6 ketonů, 6 kyselin, 4 estery, 4 terpeny, 3 aldehydy a 2 ostatní, nezařazené sloučeniny. Porovnáním výsledků lze říci, že nejvíce zastoupenými skupinami byly ve všech vzorcích alkoholy, ketony a kyseliny.

Obecně lze říci, že co se týče počtu identifikovaných látek rozdělených do jednotlivých chemických skupin, tak se od sebe vzorky výrazně nelišily (viz graf 2). Významnější rozdíl byl stanoven v obsahu terpenů, které na rozdíl od analogů nebyly dle očekávání ve vzorku standardu detekovány.

Mezi látky identifikované ve všech čtyřech vzorcích sýrů/analogů patřily: pentan-3-on, butan-2,3-dion, ethyl ester kyseliny butanové, 2-methylpropan-1-ol, 3-methylbutyl ester kyseliny octové, pent-1-en-3-ol, heptan-2-on, 3-methylbutan-1-ol, ethyl ester kyseliny hexanové, pentan-1-ol, 3-hydroxybutan-2-on, heptan-1-ol, hexan-1-ol, okt-2-en-1-ol, kyselina octová, benzaldehyd, undekan-2-on, kyselina butanová, 3-methylbutanová kyselina, fenylacetonitril, 2-fenylethylalkohol a δ -dekalakton.

Kyseliny octová a hexanová vznikají proteolýzou během zrání a jsou typické pro mléčné výrobky. Díky nim mají výrobky štiplavé, kyselé aroma. Keton 3-hydroxybutan-2-on a aldehyd hexan-1-al jsou taktéž charakteristické pro mléčné výrobky. Tyto sloučeniny byly identifikovány ve vzorcích sýrů/analogů, stejně jako ve zrajícím italském polotvrdém sýru [34]. Detekovaný dimethyltrisulfid vzniká degradací sirných aminokyselin během zrání, je tedy typický pro zrající sýry jako je např. Čedar a jeho vůně je popisována jako aroma vařeného zelí [32]. Bylo zjištěno, že se během zrání obsah dimethyltrisulfidu zvyšoval více v sýrech připravených z mléka teplotně ošetřeného (66 °C po dobu 30 s) v porovnání se sýry připravenými z mléka ošetřeného šetrnou pasterizací (72 °C po dobu 15 s) [91]. Obecně se laktony nevyskytují v sýrech ve vysokých koncentracích, na spoluvytváření celkového aroma výrobků se podílejí mírně, konkrétně aroma identifikovaného δ -dekalaktonu je popisováno jako kokosové, smetanové či máslové a přítomnost tohoto δ -laktonu byla identifikována v sýru Čedar a v Parmazánu [92].

Ve vzorku analogu s přídavkem mandlového oleje byly dle očekávání detekovány látky benzaldehyd a limonen, které jsou typické pro jejich mandlové aroma [42].

Ve vzorku analogu s přídavkem oleje z vlašských ořechů se nacházely 4 sloučeniny, které nebyly detekovány v žádném jiném vzorku, konkrétně okt-1-en-3-ol, kyselina nonanová a terpeny karvon a geranylaceton. Dle Zhou a kol. [56] indikuje detekovaný okt-1-en-ol ve vlašském oleji jeho žluknutí. Tomuto faktu nasvědčuje i studie Mu a kol. [57] uvádějící seznam potencionálních ukazatelů oxidace oleje; ten obsahuje i sloučeniny okt-2-en-al, hexanal a kyselinu hexanovou detekované ve vzorku analogu s přídavkem ořechového oleje.

4.2.2 Porovnání obsahu těkavých látek ve vzorcích

Obsah identifikovaných těkavých látek je vyjádřen semikvantitativně pomocí ploch příslušných píků na chromatogramu. V grafu 3 a grafu 4 je uvedeno srovnání obsahu identifikovaných sloučenin ve vzorcích, opět rozdělené podle chemických skupin. Výsledky jsou vyjádřeny

jednak srovnáním ploch píků (graf 3) a jednak jako „relativní obsah“, tj. % z celkové plochy všech identifikovaných píků na chromatogramu (graf 4).

Přestože je celkový počet identifikovaných těkavých látek ve vzorcích přibližně stejně vysoký (graf 2), z grafu 3 vyplývá, že obsah těkavých látek byl ve všech vzorcích analogů vyšší v porovnání se vzorkem bez přídavku ořechového oleje, přičemž obsah těkavých látek ve vzorcích všech 3 druhů analogů je přibližně stejně vysoký. Lze předpokládat, že aplikací ořechového oleje do vzorků analogů se obsah těkavých látek v porovnání se vzorkem standardu významně zvýší, avšak rozdíly nebyly příliš výrazné. Relativně nízký rozdíl v kvantitativním obsahu těkavých látek mezi vzorkem standardu a vzorky analogů mohl být způsobený několika faktory, jako nízký přídavek ořechového oleje, ztráty oleje při odtoku syrovátky při lisování a zrání či způsobem aplikace oleje do sýřeniny.

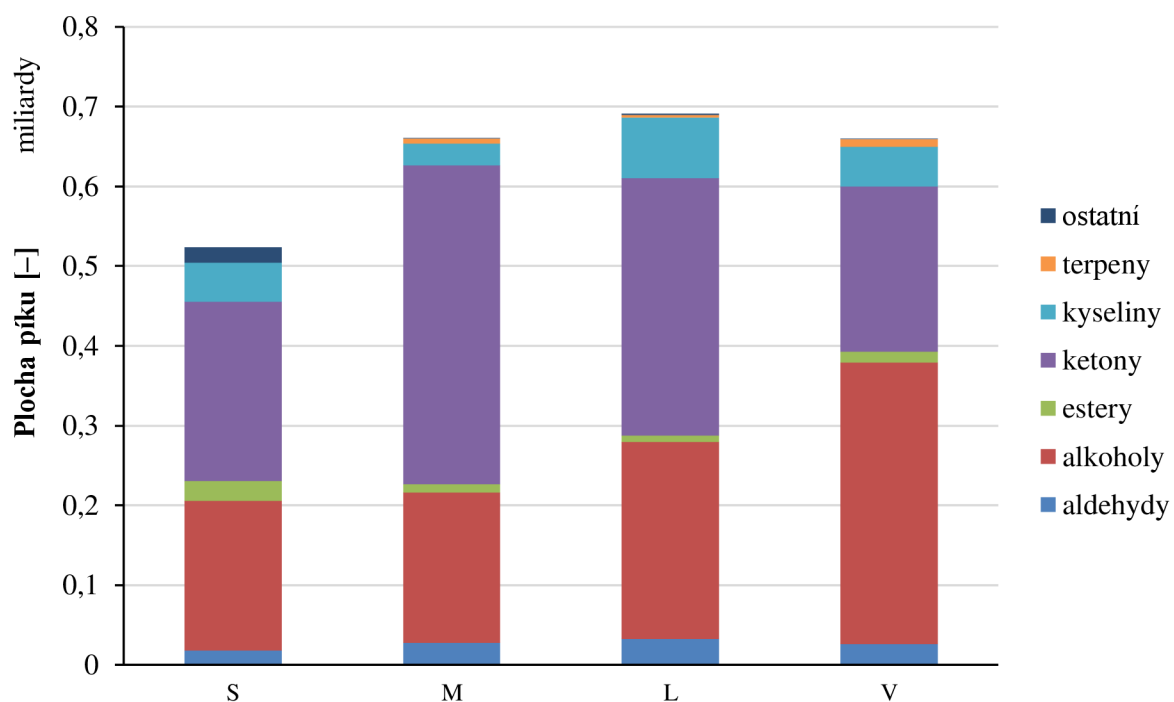
Nejvíce zastoupenými skupinami ve všech vzorcích byly alkoholy, ketony a kyseliny. Jak již bylo zmíněno, tyto skupiny jsou typické pro polotvrde zrající sýry a jejich významný podíl ve vzorcích sýrů/analogů byl očekáván [34][35]. Ve vzorku standardu představovaly z celkového množství ketony cca 43 %, alkoholy cca 36 % a kyseliny cca 9 %. Největší zastoupení měly butan-2,3-dion, 3-methylbutan-1-ol, kyselina octová, pentan-3-on a dimethyltrisulfid.

Ve vzorku analogu s přídavkem mandlového oleje představovaly z celkového množství ketony cca 61 %, alkoholy cca 29 % a kyseliny cca 4 %. Největší zastoupení měly butan-2,3-dion, 2-fenylethylalkohol, 3-methylbutan-1-ol, kyselina octová a benzaldehyd.

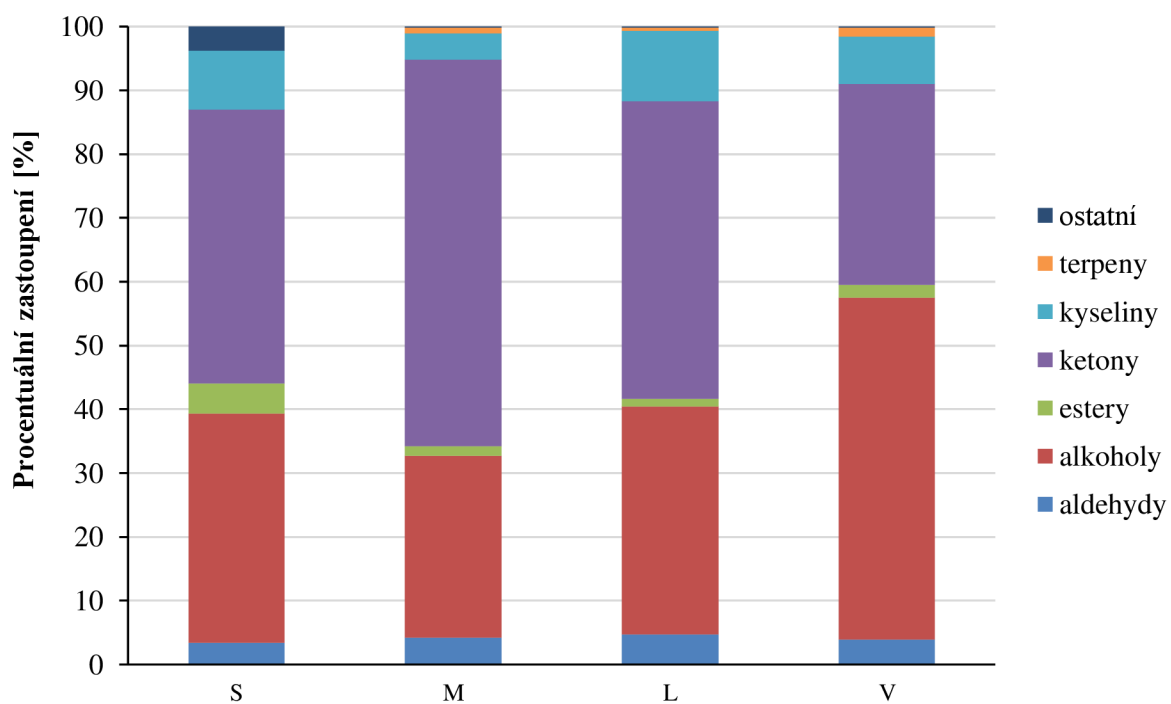
Ve vzorku analogu s přídavkem lískoořechového oleje představovaly z celkového množství ketony cca 47 %, alkoholy cca 38 % a kyseliny cca 11 %. Největší zastoupení měly 3-methylbutan-1-ol, butan-2,3-dion, pentan-3-on, 3-methylbutanová kyselina a benzaldehyd.

Ve vzorku analogu s přídavkem oleje z vlašských ořechů měly z celkového množství největší zastoupení alkoholy cca 55 %, dále ketony cca 31 % a kyseliny cca 7 %. Největší zastoupení měly 3-methylbutan-1-ol, butan-2,3-dion, hexan-1-ol, 3-methylbutanová kyselina a 2-fenylethylalkohol.

Největší obsah terpenů byl zaznamenán u vzorku analogu s přídavkem oleje z vlašských ořechů, nejnižší obsah terpenů mezi analogy byl zjištěn u vzorku s přídavkem lískoořechového oleje, nutno ale zmínit, že obsah terpenů nepředstavoval u žádného vzorku významný podíl z celkového množství těkavých látek. Ve všech vzorcích měly dále minoritní zastoupení aldehydy, estery a ostatní, nezařazené sloučeniny.



Graf 3: Obsah těkavých látek ve vzorcích podle chemických skupin; značení vzorků viz tabulka 6



Graf 4: Obsah těkavých látek ve vzorcích podle chemických skupin (v %); značení vzorků viz tabulka 6

4.3 Obsah sušiny, vody v tukuprosté hmotě, tuku a tuku v sušině ve vzorcích sýrů/analogů

Obsah sušiny ve vzorcích byl stanoven pomocí metody sušení a vypočítán pomocí vzorce (3). Obsah vody v tukuprosté hmotě sýra byl vypočítán podle vzorce (4). Obsah tuku ve vzorcích byl stanoven extrakcí směsí diethyletheru a petroletheru dle ČSN EN ISO 1735 a vypočítán podle vzorce (5). Nakonec byl vypočítán obsah tuku v sušině podle vzorce (6). Výsledky jsou vyjádřeny v % a uvedeny v tabulce 10, grafické znázornění viz graf 5–7.

Tabulka 10: Obsah sušiny, vody v tukuprosté hmotě, tuku a tuku v sušině ve vzorcích

Vzorek	$w_{suš}$ [%]	VVTPH [%]	w_{tuk} [%]	w_{tvs} [%]
S	37,8 ± 0,1	72,6 ± 0,2	14,3 ± 0,1	37,7 ± 0,2
M	42,8 ± 0,8	70,0 ± 0,1	17,8 ± 1,1	41,7 ± 1,9
L	40,6 ± 0,6	73,8 ± 1,2	19,5 ± 2,1	48,0 ± 4,5
V	43,2 ± 0,1	71,4 ± 1,5	20,4 ± 1,8	47,3 ± 4,1

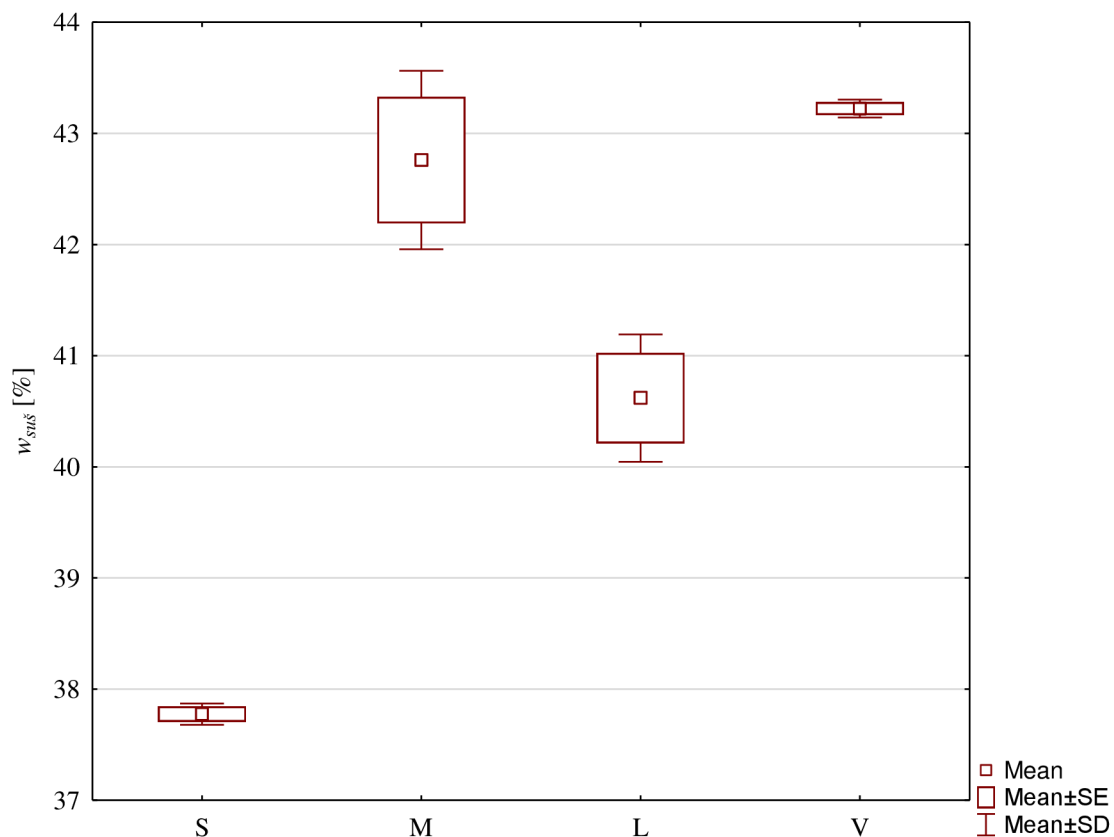
Značení vzorků viz tabulka 6

Přestože vzorky sýrů/analogů byly vyrobeny stejným postupem (vyjma aplikace oleje do sýrových analogů), dá se očekávat, že výsledky z měření sušiny, vody v tukuprosté hmotě, tuku a tuku v sušině se nebudou výrazně lišit. Obsah sušiny ve vzorcích se pohyboval mezi 37,8 a 43,2 %, přičemž nejnižší obsah byl naměřen u vzorku standardního sýru a nejvyšší obsah ve vzorku analogu s přídavkem oleje z vlašských ořechů. Vzorky se v obsahu sušiny dle neparametrického Kruskal-Wallisova testu statisticky významně nelišily (při zvolené hladině významnosti $\alpha = 0,05$, $p = 0,116$, $p > \alpha$). Neparametrický test byl zvolen z důvodu nehomogenity rozptylů hodnot. Grafické znázornění viz graf 5. Dle Vyhlášky č. 397/2016 Sb. [2] lze vyrobené vzorky na základě obsahu VVTPH zařadit do kategorie měkkých sýrů ($VVTPH \geq 67$ %) [2].

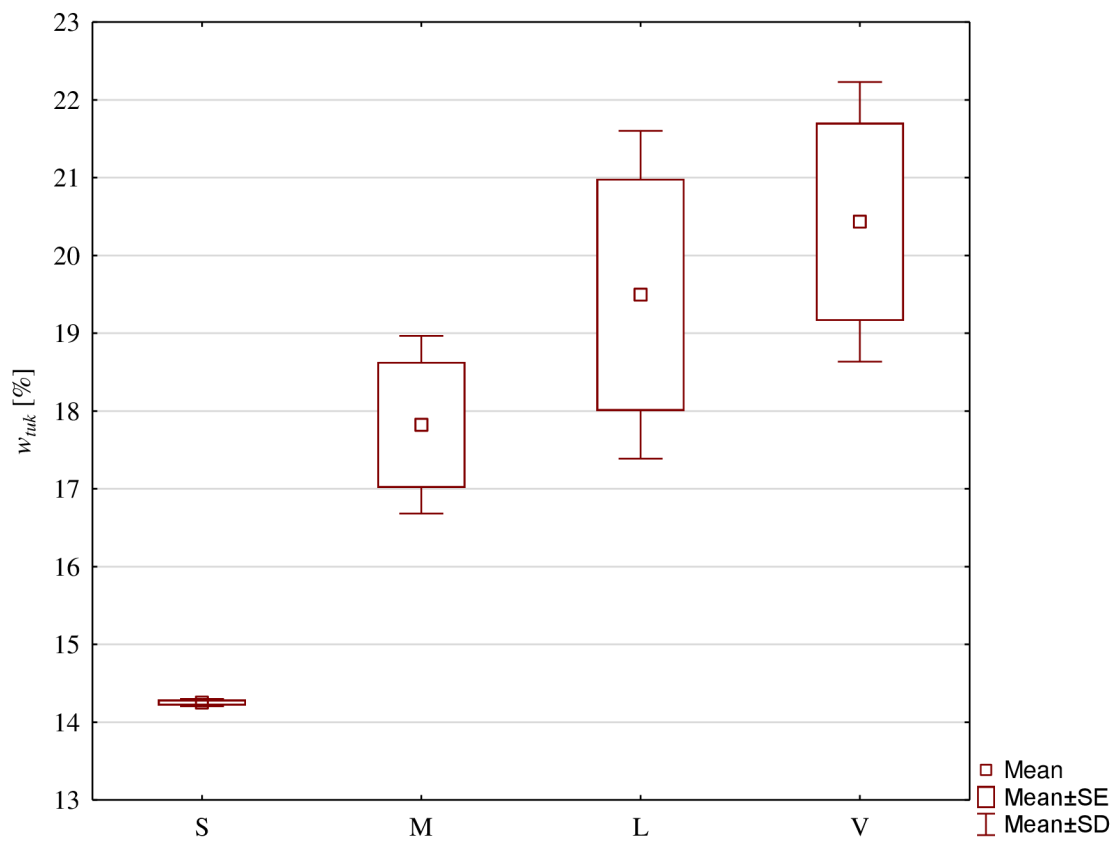
Obsah tuku ve vzorcích se pohyboval mezi 14,3 a 20,4 %, přičemž nejnižší obsah byl naměřen u vzorku standardního sýru a nejvyšší obsah ve vzorku analogu s přídavkem oleje z vlašských ořechů. U všech vzorků analogů byl obsah tuku vyšší než u vzorku standardního sýru. Toto zjištění bylo s ohledem na výrobní postup a aplikaci ořechových olejů do vzorků analogů očekávané, přesto se vzorky v obsahu tuku dle Kruskal-Wallisova testu statisticky významně nelišily ($p = 0,1386$, $p > \alpha$). Grafické znázornění viz graf 6. Abo-Elwafa a kol. [93] provedli porovnání měkkých bílých sýrů dostupných na trhu od různých typů prodejců, přičemž obsah tuku v sýrech se pohyboval mezi 14,8–51,5 %. Nejnižší obsah tuku byl naměřen u sýrů získaných přímo z mlékáren, naopak nejvyšší hodnoty byly naměřeny u sýrů zakoupených u stánkových prodejců [93]. Analogy sýrů Oaxaca připravených v rámci studie Totosaus a kol. [25] byly vyrobeny za použití sójového oleje a různých druhů karagenanů pro stabilizaci emulze. U analogu vyrobeného z mléka standardizovaného na 2,19 % tuku a sójového oleje přidaného v množství $2,23 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ byl naměřen obsah tuku v rozmezí 20,25–22,75 %, v závislosti na druhu použitého typu karagenanu. U výrobků připravených z 1,09% mléka a sójového oleje přidaného v množství $3,35 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ byl naměřen obsah tuku v rozmezí 19,16–20,80 %, v závislosti na druhu použitého typu karagenanu. Statisticky významně

($p < 0,05$) nižší obsah tuku u výrobků nahrazujících větší část mléčného tuku rostlinným olejem naznačuje na horší inkorporaci oleje do emulze [25]. Arslan a kol. [27] připravili dva druhy analogů bílého tureckého sýra, zrajícího po dobu 90 dní, z odtučněného mléka (1,5 %), 35% smetany a interesterifikovaného oleje (směs palmového, palmojadrového a sójového oleje), kterého použili při výrobě v množství 1,0 a 1,5 %. U výrobků poté naměřili obsah tuku přibližně 37–39 % u výrobku prvního typu, respektive cca 41–45 % u výrobku druhého typu [27]. S ohledem na použití smetany nelze tyto hodnoty s naměřenými výsledky přímo porovnávat.

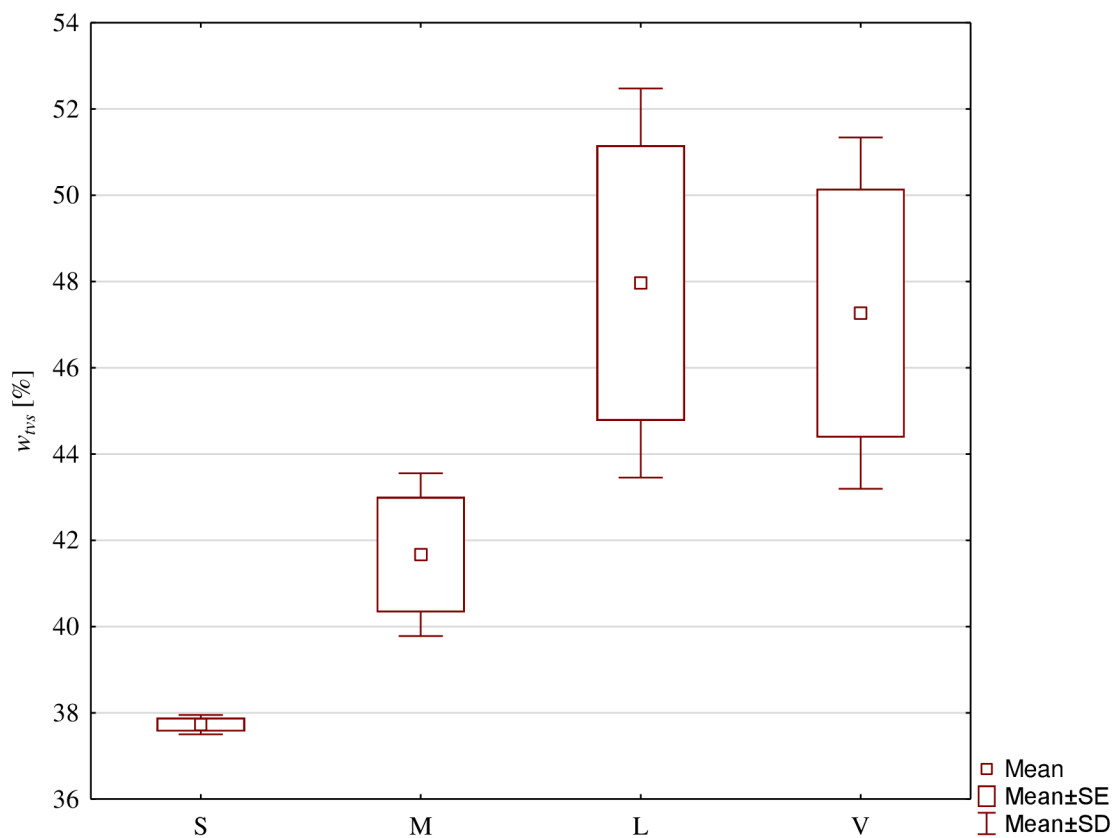
Obsah tuku v sušině se ve vzorcích pohyboval mezi 37,7 a 48,0 %, přičemž nejnižší obsah byl naměřen u vzorku standardního sýru a nejvyšší obsah ve vzorku analogu s přidavkem lískoořechového oleje. U všech vzorků analogů byl obsah tuku v sušině vyšší než u vzorku standardního sýru, což bylo stejně jako při měření obsahu tuku očekávané, přesto se vzorky v obsahu tuku v sušině dle Kruskal-Wallisova testu významně statisticky nelišily ($p = 0,1038$, $p > \alpha$). Grafické znázornění viz graf 7. Přestože bylo množství oleje přidaného do všech vzorků analogů stejné, podle Vyhlášky č. 397/2016 Sb. [2] lze vzorky standardního sýru a analogu s přidavkem mandlového oleje zařadit do skupiny polotučných sýrů (obsah tuku v sušině nejméně 25,0 % a méně než 45,0 %) a vzorky analogů s přidavkem lískoořechového oleje a oleje z vlašských ořechů do skupiny plnotučných sýrů (nejméně 45,0 % a méně než 60,0 %) [2]. To mohlo být způsobeno odlišně úspěšným zapracováním oleje do vzorků analogů.



Graf 5: Obsah sušiny ve vzorcích; značení vzorků viz tabulka 6



Graf 6: Obsah tuku ve vzorcích; značení vzorků viz tabulka 6



Graf 7: Obsah tuku v sušině ve vzorcích; značení vzorků viz tabulka 6

4.4 Mastné kyseliny ve vzorcích sýrů/analogů

Lipidy byly ze vzorků izolovány extrakcí směsí diethyletheru a petroletheru dle ČSN EN ISO 1735, následně byla provedena esterifikace MK za použití bortrifluoridu jako katalyzátoru a volné a vázané MK byly podrobeny analýze za použití GC-FID. MK byly identifikovány na základě srovnání retenčních časů MeMK s příslušnými standardy. Kvantifikace byla provedena srovnáním ploch píků se standardy o známé koncentraci. V tabulce 11 a tabulce 12 je uveden kompletní přehled identifikovaných vázaných a volných MK a jejich obsah (v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra), srovnání celkového obsahu MK dle jejich nasycenosti je uvedeno v grafu 8 a grafu 12. Celkově bylo ve všech vzorcích identifikováno 16 mastných kyselin. Ukázky chromatogramů jsou v příloze 6–7.

4.4.1 Srovnání obsahu vázaných mastných kyselin ve vzorcích

Ve všech vzorcích bylo identifikováno 16 MK, z toho 11 SFA (kyselina kapronová, kaprylová, kaprinová, laurová, tridekanová, myristová, pentadekanová, palmitová, heptadekanová, stearová a arachová), 3 MUFA (kyselina myristolejová, palmitolejová a olejová) a 2 PUFA (kyselina linolová a α -linolenová). Kompletní přehled obsahu identifikovaných vázaných MK je uveden v tabulce 11.

Na grafu 8 je znázorněno porovnání obsahu identifikovaných vázaných MK rozdělených podle jejich nasycenosti. Z grafu vyplývá, že nejnižší obsah vázaných MK byl naměřen ve vzorku standardu a nejvíce ve vzorku analogu s přidavkem oleje z vlašských ořechů. Nejnižší obsah SFA byl identifikován ve vzorku analogu s přidavkem mandlového oleje ($163,85 \pm 44,69 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra) a nejvíce ve vzorku analogu s přidavkem lískoořechového oleje ($173,94 \pm 18,33 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra), přičemž se vzorky v obsahu SFA dle Kruskal-Wallisova testu významně statisticky nelišily ($\alpha = 0,05$; $p = 0,9189$; $p > \alpha$). Neparametrický Kruskal-Wallisův test byl použit z důvodu nehomogenity rozptylů.

Nejnižší koncentrace MUFA byla zjištěna u vzorku bez přidavku oleje ($49,33 \pm 8,23 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra), naopak nejvíce MUFA obsahoval vzorek analogu s přidavkem mandlového oleje ($99,68 \pm 27,69 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra). Dle Kruskal-Wallisova testu se vzorky v obsahu MUFA významně statisticky nelišily ($\alpha = 0,05$; $p = 0,1038$; $p > \alpha$).

Nejméně PUFA obsahoval vzorek bez přidavku ořechového oleje ($5,55 \pm 1,15 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra) a nejvíce vzorek analogu s přidavkem oleje z vlašských ořechů ($55,77 \pm 9,62 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra). Přestože je dle grafu 8 v obsahu PUFA mezi vzorky viditelný rozdíl, dle Kruskal-Wallisova testu tento rozdíl statisticky významný není ($\alpha = 0,05$; $p = 0,0833$; $p > \alpha$). Neparametrický Kruskal-Wallisův test byl stejně jako u předchozích dvou veličin zvolen z důvodu nehomogenity rozptylů, jak je možné vidět na grafu 9.

Poměrné zastoupení SFA:MUFA:PUFA (graf 8) bylo ve vzorku standardu stanoveno dle očekávání, tedy že největší zastoupení měly SFA (cca 75 %), následovaly MUFA (cca 22 %) a nejmenší část byla tvořena PUFA (cca 3 %). K obdobnému závěru dospěla i studie Manzo a kol. [34], kteří charakterizovali jimi studovaný přírodní zrající sýr následovně: obsah SFA cca 69 %, MUFA cca 24 % a PUFA cca 6 % [34]. Rozdílné složení v profilu MK a vyšší obsah MUFA a PUFA ve vzorcích analogů v porovnání se vzorkem standardu je tedy možné přisoudit přidavku rostlinného oleje do analogů. Mandlový a lískoořechový olej jsou z velké části tvořeny MUFA a následně PUFA, konkrétně olej mandlový obsahuje 67 % MUFA a 23 % PUFA a olej lískoořechový 81 % MUFA a 13 % PUFA [40][51]. Pro porovnání olej

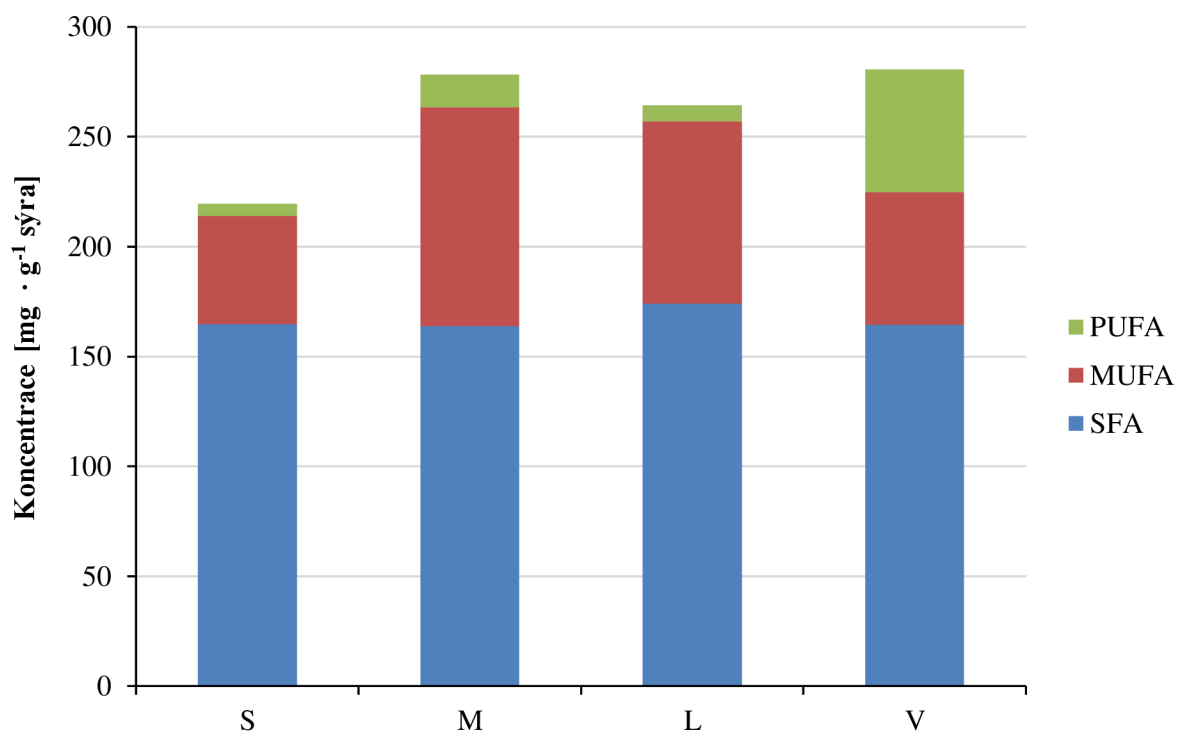
z vlašských ořechů obsahuje vyšší množství PUFA (76 %) a méně MUFA (15 %) [58]. Tímto faktem je i možné vysvětlit obdobné poměrné zastoupení MK dle nasycenosti u vzorků analogů s přidavkem mandlového a lískoořechového oleje a vyšší naměřený obsah PUFA v analogu s přidavkem oleje z vlašských ořechů.

Na grafu 10 a grafu 11 je možné vidět srovnání obsahu jednotlivých MK ve vzorcích, MK jsou rozděleny podle koncentrace. Ve vzorku standardu byly nejvíce zastoupenými MK kyseliny palmitová, olejová, stearová, myristová a laurová. Ve vzorku analogu s přidavkem mandlového oleje byly nejvíce zastoupeny kyseliny olejová, palmitová, stearová, myristová a linolová. Analog s přidavkem lískoořechového oleje obsahoval nejvíce kyseliny palmitové, olejové, stearové, myristové a laurové. V analogu s přidavkem oleje z vlašských ořechů byl stanoven nejvyšší obsah kyseliny palmitové, olejové, linolové, stearové a myristové. Ve všech vzorcích analogů byl v porovnání se standardem zjištěn vyšší obsah nenasycených MK olejové a linolové, analog s přidavkem oleje z vlašských ořechů obsahoval v porovnání se všemi vzorky výrazně nejvíce kyseliny α -linolenové. Vyšší obsah zmíněných MK ve vzorcích analogů souvisí s profilem MK ořechových olejů, které byly do analogů aplikovány, a jež jsou z velké části tvořeny kyselinou olejovou, linolovou, respektive navíc kyselinou linolenovou v oleji z vlašských ořechů [40][50][58].

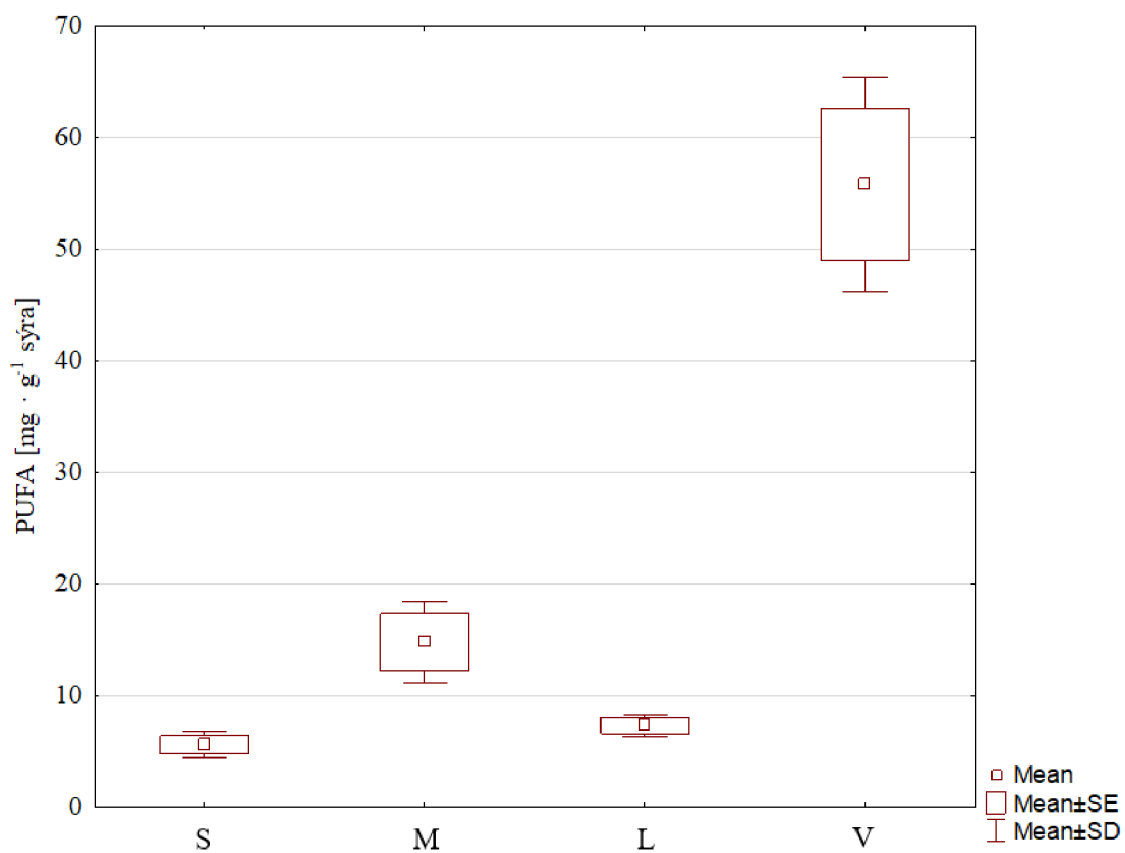
Tabulka 11: Obsah vázaných MK ve vzorcích ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra)

Zkrácený zápis MK	S	M	L	V
C6:0	3,18 ± 0,14	2,99 ± 0,61	3,41 ± 0,04	2,67 ± 0,21
C8:0	2,31 ± 0,08	2,20 ± 0,49	2,48 ± 0,01	1,92 ± 0,20
C10:0	5,57 ± 0,06	5,20 ± 1,24	5,81 ± 0,06	4,55 ± 0,58
C12:0	7,26 ± 0,56	6,45 ± 1,58	7,25 ± 0,32	5,70 ± 0,74
C13:0	0,26 ± 0,01	0,27 ± 0,12	0,30 ± 0,04	0,29 ± 0,05
C14:0	25,81 ± 1,84	23,77 ± 6,40	26,30 ± 2,22	21,15 ± 2,60
C14:1 ^{Δ9}	2,06 ± 0,16	1,82 ± 0,48	2,17 ± 0,20	1,60 ± 0,13
C15:0	3,09 ± 0,31	2,84 ± 0,91	3,14 ± 0,39	2,52 ± 0,30
C16:0	88,06 ± 10,52	88,79 ± 24,62	92,99 ± 10,72	82,06 ± 13,21
C16:1 ^{Δ9}	5,25 ± 0,59	5,14 ± 1,49	4,52 ± 0,55	4,24 ± 1,24
C17:0	1,61 ± 0,25	1,56 ± 0,44	1,70 ± 0,21	1,47 ± 0,21
C18:0	27,31 ± 4,93	29,40 ± 8,20	30,05 ± 4,32	29,35 ± 5,51
C18:1 ^{Δ9}	42,01 ± 7,47	92,72 ± 25,72	76,30 ± 10,47	54,55 ± 5,30
C18:2 ^{Δ9,12}	3,88 ± 0,80	13,40 ± 3,64	5,68 ± 0,76	40,11 ± 6,82
C18:3 ^{Δ9,12,15}	1,67 ± 0,35	1,35 ± 0,01	1,59 ± 0,26	15,67 ± 2,80
C20:0	0,19 ± 0,12	0,39 ± 0,08	0,53 ± 0,01	12,76 ± 2,88

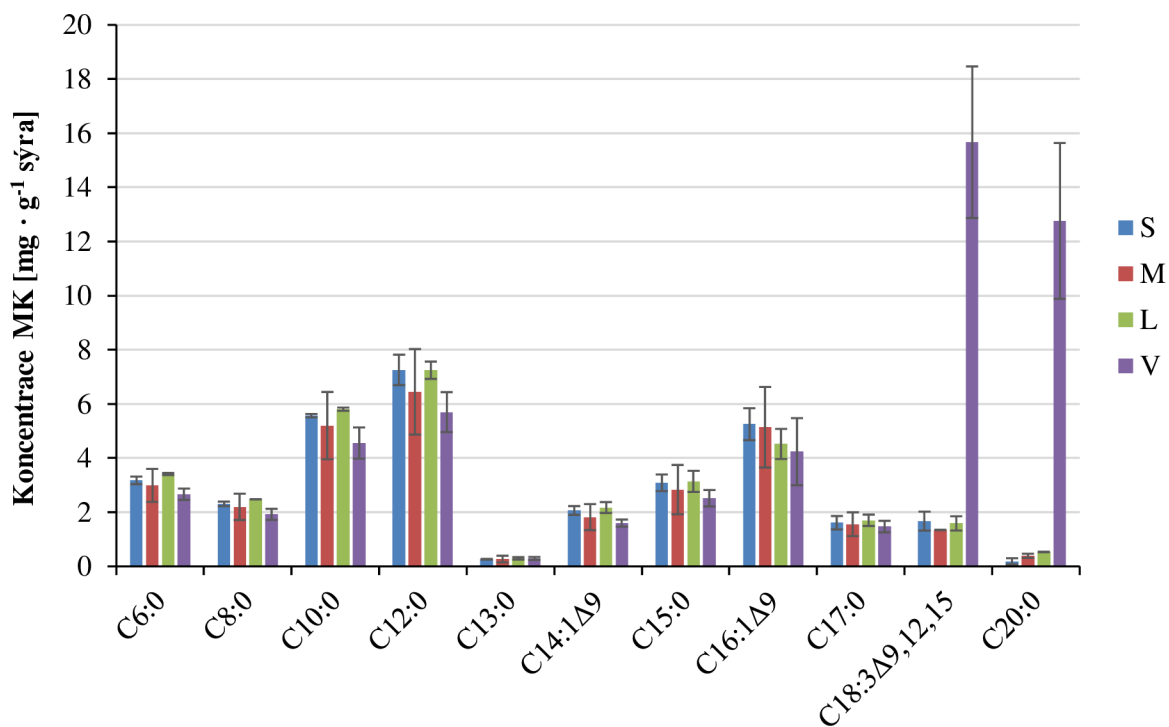
Značení vzorků viz tabulka 6



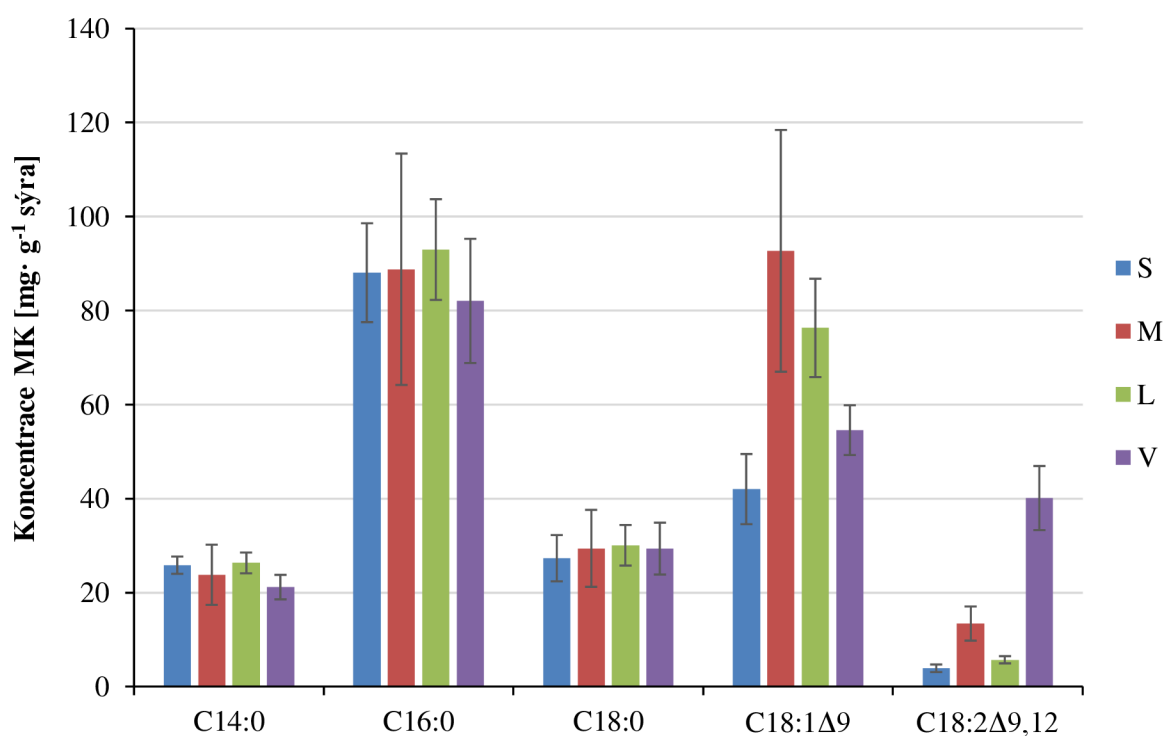
Graf 8: Srovnání obsahu SFA:MUFA:PUFA ve vzorcích (vázané MK); značení vzorků viz tabulka 6



Graf 9: Srovnání obsahu PUFA ve vzorcích (mg · g⁻¹ sýra); značení vzorků viz tabulka 6



Graf 10: Srovnání obsahu jednotlivých minoritně zastoupených MK ve vzorcích (vázané MK); značení vzorků viz tabulka 6



Graf 11: Srovnání obsahu jednotlivých majoritně zastoupených MK ve vzorcích (vázané MK); značení vzorků viz tabulka 6

4.4.2 Srovnání obsahu volných mastných kyselin ve vzorcích

Ve všech vzorcích bylo identifikováno 16 VMK, shodných jako při stanovení obsahu MK vázaných, tedy 11 SFA, 3 MUFA a 2 PUFA. Kompletní přehled obsahu identifikovaných volných MK je uveden v tabulce 12.

Na grafu 12 je znázorněno porovnání obsahu identifikovaných VMK rozdělených podle jejich nasycenosti. Z grafu vyplývá, že nejnižší obsah VMK byl naměřen ve vzorku standardu a nejvíce ve vzorku analogu s přidavkem oleje z vlašských ořechů, stejně jako u stanovení obsahu vázaných mastných kyselin. Nejnižší obsah SFA byl identifikován ve vzorku standardu ($7,02 \pm 1,05 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra) a nejvíce ve vzorku analogu s přidavkem oleje z vlašských ořechů ($17,29 \pm 0,96 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra), přičemž se vzorky v obsahu SFA dle Kruskal-Wallisova testu významně statisticky nelišily ($\alpha = 0,05$; $p = 0,1038$; $p > \alpha$). Neparametrický Kruskal-Wallisův test byl opět použit z důvodu nehomogenity rozptylů.

Nejnižší koncentrace MUFA byla zjištěna u vzorku standardu ($1,61 \pm 0,35 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra), naopak nejvíce MUFA obsahoval vzorek analogu s přidavkem oleje z vlašských ořechů ($5,71 \pm 0,48 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra). Dle Kruskal-Wallisova testu se vzorky v obsahu MUFA významně statisticky nelišily ($\alpha = 0,05$; $p = 0,0833$; $p > \alpha$).

Nejméně PUFA obsahoval vzorek bez přidavku ořechového oleje ($0,20 \pm 0,03 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra) a nejvíce vzorek analogu s přidavkem oleje z vlašských ořechů ($5,95 \pm 0,69 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra). Přestože je dle grafu 12 v obsahu PUFA mezi vzorky viditelný rozdíl a jejich výrazně vyšší množství ve vzorku analogu s přidavkem oleje z vlašských ořechů, dle Kruskal-Wallisova testu tento rozdíl není statisticky významný ($\alpha = 0,05$; $p = 0,1116$; $p > \alpha$). Neparametrický Kruskal-Wallisův test byl opět použit z důvodu nehomogenity rozptylů.

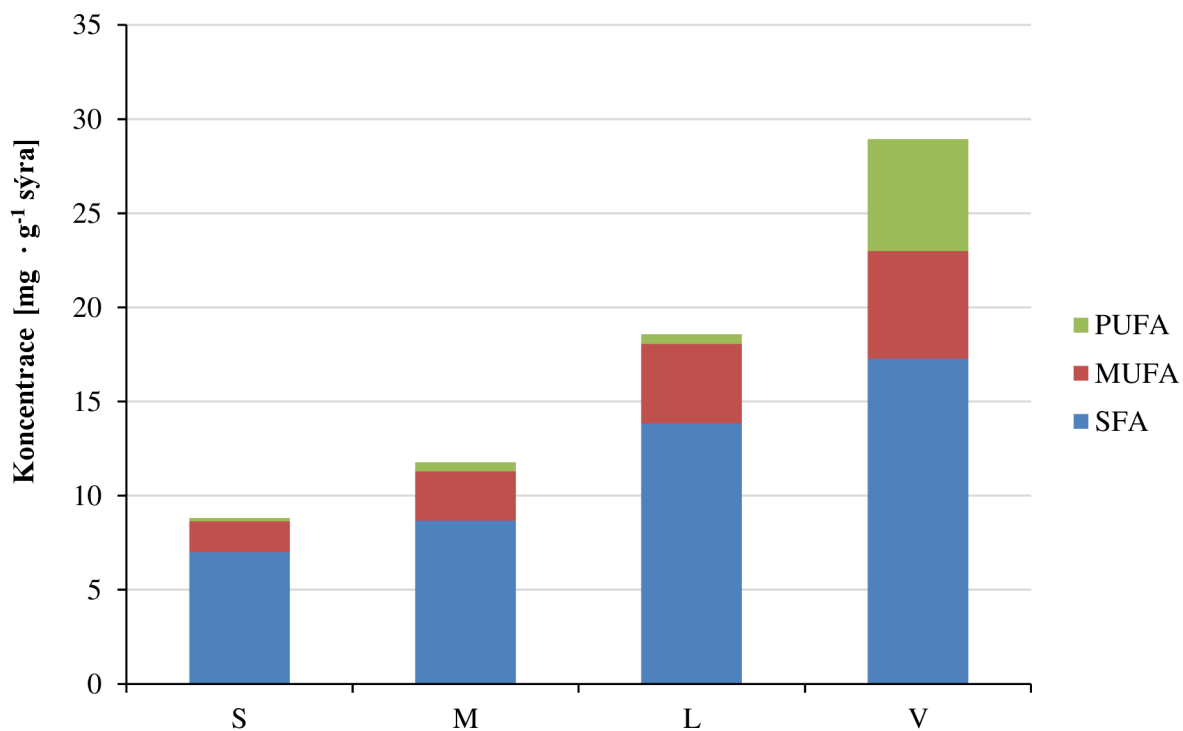
Na grafu 13 a grafu 14 Graf 11 je zobrazeno srovnání obsahu jednotlivých VMK ve vzorcích, MK jsou rozděleny podle koncentrace. Ve vzorku standardu, analogu s přidavkem mandlového a lískoořechového oleje, byly nejvíce zastoupenými MK kyseliny palmitová, olejová, myristová, stearová a laurová. Zastoupení výše zmíněných MK bylo ve vzorku standardu očekávané, v práci Pappa a kol. [38] byly v sýru Kashkaval nejvíce zastoupenými VMK kyseliny palmitová, olejová, myristová, stearová, kaprinová, kapronová a laurová [38]. Jelikož VMK vznikají během lipolýzy, byl s ohledem na kratší dobu zrání (2 týdny) jejich celkový nižší obsah očekávaný. VMK vznikající během lipolýzy, zvláště ty s kratším uhlíkatým řetězcem, jsou popisovány octovým, mýdlovým flavourem a podílejí se tak na tvorbě celkového flavouru výrobku [34]. Dalším faktorem, díky kterému byl očekávaný nižší obsah VMK, byl výběr mléka (čerstvé, pasterované polotučné). K nižší tvorbě VMK dochází u sýrů vyrobených z pasterovaného mléka v porovnání se sýry vyrobenými z mléka čerstvého či u sýrů vyrobených z odtučněného mléka v porovnání se sýry vyrobenými z mléka plnotučného [38][94]. V analogu s přidavkem oleje z vlašských ořechů byl stanoven nejvyšší obsah kyseliny palmitové, olejové, linolové, stearové a myristové. Vyšší obsah volných nenasycených kyselin linolové a α -linolenové ve vzorku analogu s přidavkem oleje z vlašských ořechů v porovnání s ostatními vzorky byl vzhledem k vysokému obsahu PUFA ve vlašském oleji a charakteru výrobku a jeho výrobnímu procesu, kterým je přírodní sýr s dobou zrání 2 týdny, očekávaný. VMK, produkty hydrolýzy TAG, vznikají v rostlinných olejích primárně během jejich výroby a skladování, což vysvětluje naměřený vyšší obsah VMK ve všech vzorcích analogů

ve srovnání se sýrem bez přídavku oleje. Vyšší obsah VMK, v tomto případě u oleje z vlašských ořechů, může též indikovat zhoršení kvality oleje [95].

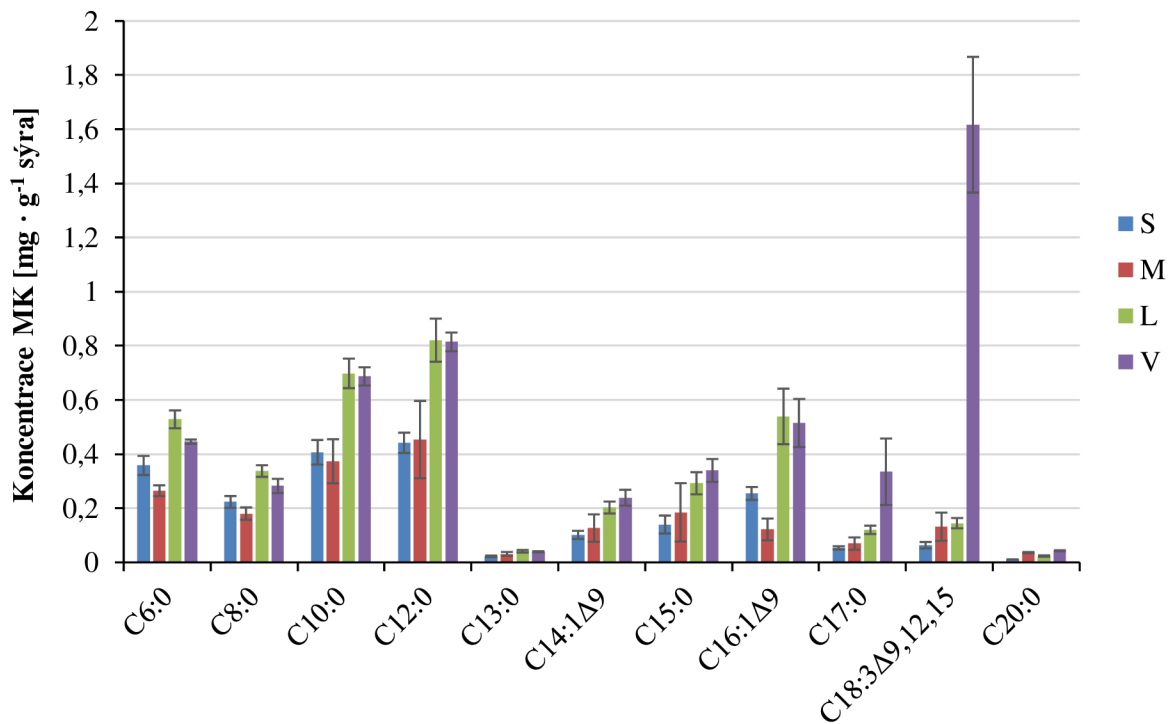
Tabulka 12: Obsah VMK ve vzorcích [$\cdot 10^{-2}$) mg : g⁻¹ sýra]

Zkrácený zápis MK	S	M	L	V
C6:0	35,82 ± 3,51	26,48 ± 2,00	52,84 ± 3,30	44,57 ± 0,81
C8:0	22,35 ± 2,17	18,04 ± 2,28	33,75 ± 2,14	28,25 ± 2,64
C10:0	40,66 ± 4,53	37,38 ± 8,13	69,82 ± 5,45	68,72 ± 3,38
C12:0	44,17 ± 3,75	45,38 ± 14,27	82,08 ± 7,97	81,45 ± 3,45
C13:0	2,24 ± 0,30	3,16 ± 0,70	4,12 ± 0,46	3,95 ± 0,20
C14:0	121,31 ± 19,30	144,62 ± 57,02	248,17 ± 27,25	263,14 ± 12,48
C14:1 ^{Δ9}	10,16 ± 1,49	12,68 ± 5,06	20,27 ± 2,19	23,90 ± 2,91
C15:0	14,00 ± 3,31	18,51 ± 10,78	29,23 ± 4,09	33,98 ± 4,21
C16:0	337,28 ± 55,73	444,88 ± 178,57	675,58 ± 79,15	866,28 ± 38,43
C16:1 ^{Δ9}	25,48 ± 2,38	12,19 ± 4,02	53,93 ± 10,26	51,48 ± 8,89
C17:0	5,38 ± 0,62	6,96 ± 2,27	12,03 ± 1,56	33,50 ± 12,27
C18:0	77,94 ± 11,70	118,25 ± 46,50	176,37 ± 24,64	300,61 ± 65,10
C18:1 ^{Δ9}	125,15 ± 31,08	237,80 ± 94,73	346,96 ± 47,74	495,87 ± 42,40
C18:2 ^{Δ9,12}	13,45 ± 1,59	32,76 ± 13,96	33,47 ± 4,24	433,10 ± 43,74
C18:3 ^{Δ9,12,15}	6,37 ± 1,19	13,20 ± 5,21	14,50 ± 1,89	161,69 ± 25,07
C20:0	1,10 ± 0,02	3,64 ± 0,22	2,34 ± 0,27	4,33 ± 0,19

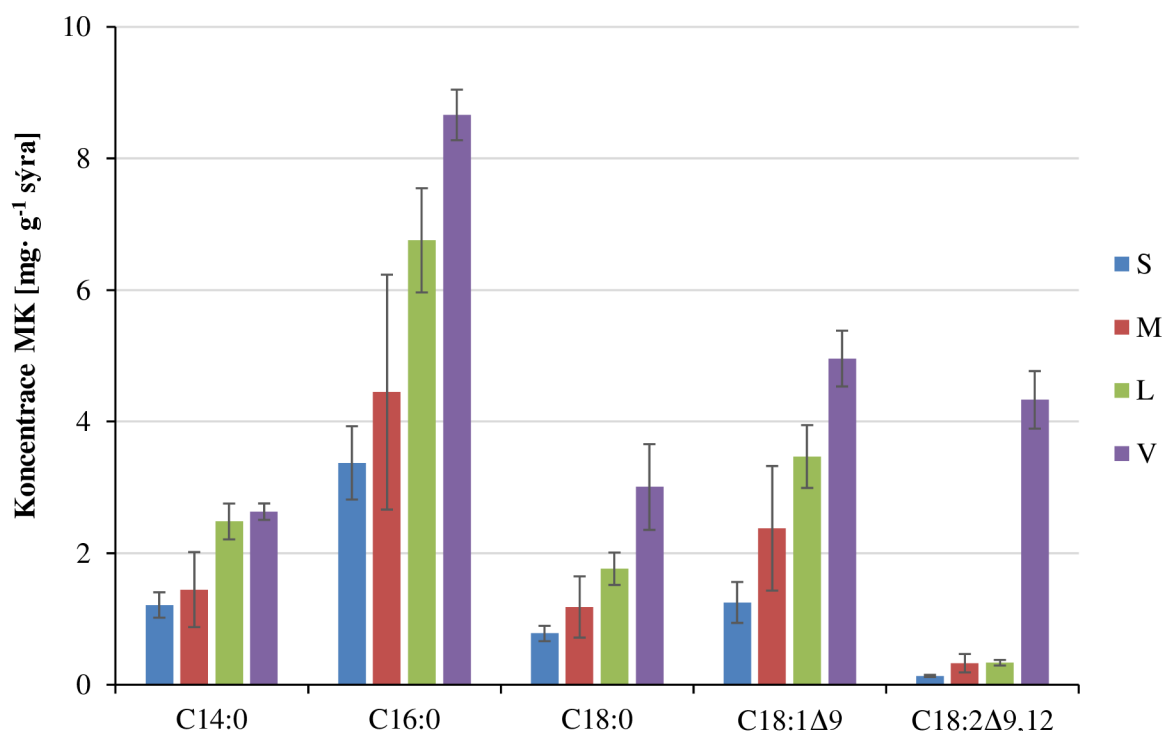
Značení vzorků viz tabulka 6



Graf 12: Srovnání obsahu SFA:MUFA:PUFA ve vzorcích (VMK); značení vzorků viz tabulka 6



Graf 13: Srovnání obsahu jednotlivých minoritně zastoupených MK ve vzorcích (VMK); značení vzorků viz tabulka 6



Graf 14: Srovnání obsahu jednotlivých majoritně zastoupených MK ve vzorcích (VMK); značení vzorků viz tabulka 6

4.5 Antioxidační aktivita vzorků sýrů/analogů

Antioxidační aktivita vzorků sýrů/analogů byla stanovena pomocí metody TEAC, která je založena na schopnosti antioxidantu neutralizovat a zhaset stabilní radikálový kation ABTS^{•+}. Ke stanovení byly připraveny vodné roztoky vzorků a měření bylo provedeno dle postupu uvedeného v kap. 3.3.4. Výsledná antioxidační aktivita byla odečtena z kalibrační křivky a schopnost zhasení radikálu byla vypočítána podle vzorce (12). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 13, grafické znázornění viz graf 15.

Tabulka 13: Antioxidační aktivita vzorků sýrů/analogů. Hodnoty značené jiným písmenem (a, b) se podle Tukeyho HSD testu významně statisticky liší ($p < 0,05$).

Vzorek	c_{Trolax} [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra]	zhášení radikálu [%]
S	$85,1 \pm 12,6^a$	$4,9 \pm 0,5$
M	$100,5 \pm 3,6^{ab}$	$5,8 \pm 0,4$
L	$107,4 \pm 7,2^b$	$6,2 \pm 0,6$
V	$101,4 \pm 3,5^{ab}$	$5,8 \pm 0,2$

Značení vzorků viz tabulka 6

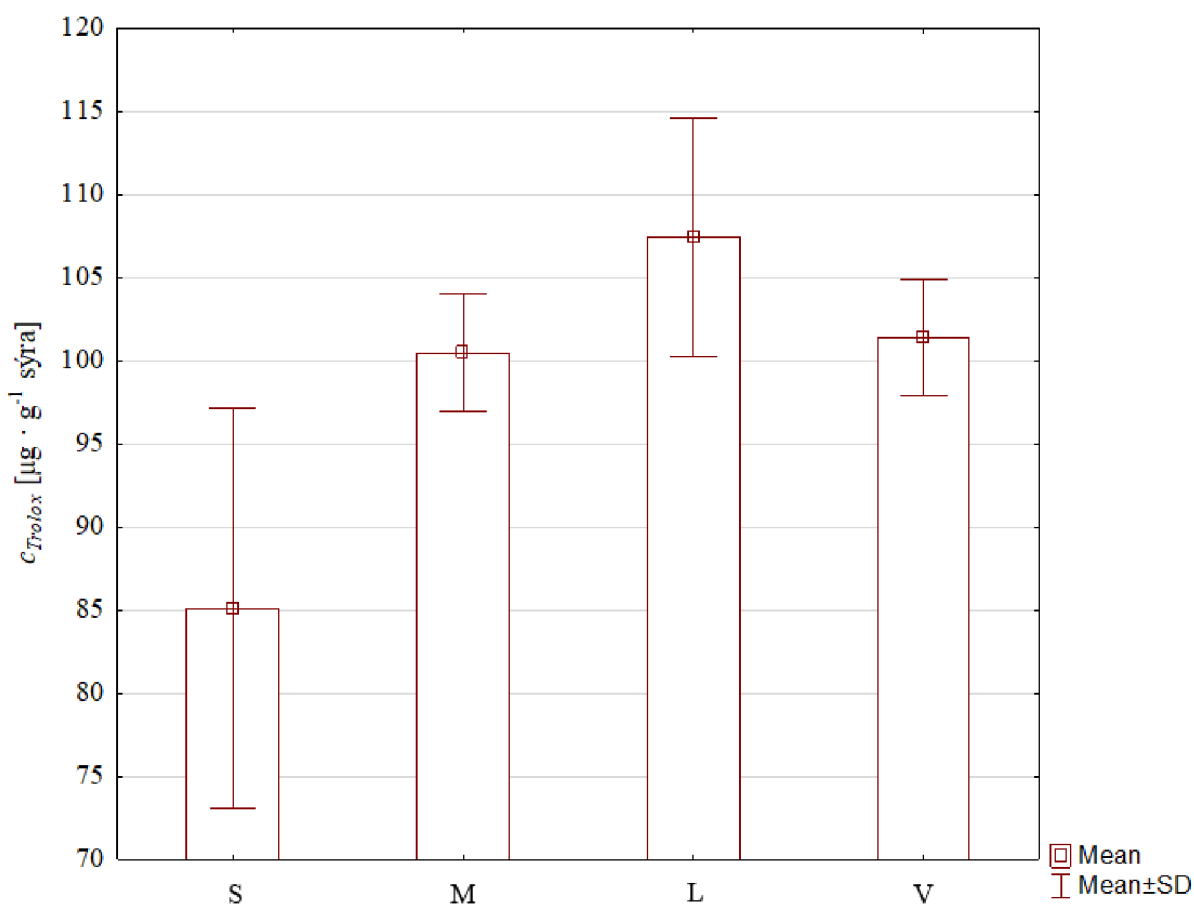
Nejnižší antioxidační aktivita byla stanovena u vzorku standardu ($85,1 \pm 12,6 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra) a nejvyšší u analogu s přidavkem lískoořechového oleje ($107,4 \pm 7,2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sýra). U všech vzorků analogů byla naměřena vyšší antioxidační aktivita než u standardu, čímž byl potvrzen předpoklad schopnosti přidaných ořechových olejů vykazovat antioxidační aktivitu. Dle Tukeyho HSD testu byl mezi vzorky statistický rozdíl (analýza rozptylu ANOVA

$p = 0,0321$, $\alpha = 0,05$, $p < \alpha$), přičemž vzorky byly rozděleny do dvou skupin, kdy se v rámci skupiny vzorky mezi sebou významně statisticky neliší. První skupina byla složena ze vzorku standardu, analogu s přidavkem mandlového oleje a analogu z oleje z vlašských ořechů a druhá skupina byla složena ze všech tří druhů analogů. Standard a analog s přidavkem lískoořechového oleje se tedy z hlediska antioxidační aktivity na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ statisticky lišily. Pořadí analogů dle druhu přidaného ořechového oleje a schopnosti vykazovat antioxidační aktivitu bylo stanoveno stejně jako v práci Arranz a kol. [46], tedy sestupně lískoořechový, vlašský a mandlový olej [46].

Z hlediska antioxidační aktivity lze výběr ořechových olejů použitých pro výrobu analogů v rámci této práce považovat za vhodně zvolený, jelikož ne všechny rostlinné oleje vykazují stejný přínos, co se týče výše diskutované veličiny. Sýrový analog s přidavkem palmového oleje vykazoval v práci Abdel-Ghany a kol. [96] nižší antioxidační aktivitu než výrobek, ve kterém byl mléčný tuk nahrazen máslovým olejem. V práci byl zároveň popsán vliv tučnosti výrobku, kdy u obou typů výrobků byla s klesající tučností pozorována sestupná schopnost zhášet DPPH radikál, tedy že nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovaly analogy plnotučné, následně polotučné a nejnižší analogy nízkotučné [96].

Schopnost rostlinných olejů zhášet radikál popsali Khalifa a kol. [83], kteří sledovali antioxidační aktivitu měkkých bílých sýrů s 4% přidavkem arašídového oleje. Ke stanovení byl použit DPPH test. Všechny vzorky analogů, ať už obsahovaly navíc přidaný stabilizátor, či nikoliv, vykazovaly vyšší antioxidační aktivitu ve srovnání s kontrolním vzorkem, do kterého byl místo arašídového oleje aplikován máslový olej [83]. Pro zajištění antioxidačního potenciálu bývá do sýrových analogů s náhradou tuku aplikován i jiný rostlinný materiál. Ivanova a kol. [97][98] do analogu sýra s enkapsulovaným olivovým olejem (4 % hm.) aplikovali navíc i extrakt z kopru (0,003 % obj.) [97] a do analogu sýra s řepkovým olejem (4 % hm.) extrakt z bazalky (0,003 % obj.) [98], které mají prokazatelné antioxidační účinky.

Na antioxidační aktivitu mohl mít vliv i způsob zrání. Barac a kol. [99] ve své práci srovnali antioxidační potenciál polotučných bílých sýrů, kdy jeden výrobek byl po dobu zrání 60 dní uchován v solném nálevu a druhý výrobek byl vakuově zabalen. Na stanovení byla použita metoda využívající ABTS. U obou výrobků byl zaznamenán nárůst antioxidační aktivity mezi 3. a 40. dnem zrání, přičemž nárůst od sýra vakuově zabaleného pokračoval u prvního typu výrobku nárůst i do 60. dne zrání a i celkový nárůst byl vyšší. U sýra zrajícího v solném nálevu byla pozorována vyšší míra proteolýzy, zejména degradace α -kaseinů, kterou dochází ke vzniku bioaktivních peptidů, čímž byl vysvětlen vyšší antioxidační potenciál bílého sýra zrajícího v solném nálevu ve srovnání s vakuově zabaleným výrobkem [99]. Volba způsobu zrání sýrů/analogů analyzovaných v této práci byla diskutována v kap. 4.1.



Graf 15: Srovnání antioxidační aktivity vzorků; značení vzorků viz tabulka 6

4.6 Senzorické hodnocení vzorků sýrů/analogů

V rámci sensorické analýzy byly vyrobené vzorky sýrů/analogů zhodnoceny desetičlenným panelem hodnotitelů, který byl tvořen 7 ženami a 3 muži. Cílem sensorické analýzy bylo zhodnotit vizuální a chuťové vlastnosti výrobků a zjistit, zda a jakým způsobem ovlivňuje aplikace ořechového oleje do výrobků jejich sensorickou atraktivitu. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno dle odpovědí zaznamenaných v dotazníku, který byl hodnotitelům předložen společně se vzorky. Dotazník pro sensorické hodnocení je uveden v příloze 1.

Před ochutnávkou vzorků byli hodnotitelé tázáni, jaký je jejich vztah k výrobkům označovaným jako sýrové analogy. Pět hodnotitelů uvedlo, že výrobky vyhledávají a konzumují; 2 hodnotitelé výrobky aktivně nevyhledávají, ale s konzumací nemají problém; a 3 hodnotitelé uvedli, že výrobky neznají. Pouze 1 hodnotitel sensorického panelu uvedl, že je kuřák.

4.6.1 Výsledky sensorického hodnocení pomocí stupnice

Mezi sledované znaky, které byly hodnoceny pomocí pětistupňové stupnice, patřily vzhled a barva, konzistence a celkový flavour, přičemž stupeň 1 byl definován jako vynikající a stupeň 5 jako nepřijatelný. Ze zaznamenaných dat byl vypočítán medián, výsledky jsou uvedeny v tabulce 14 a graficky znázorněny na grafu 16–18. Pro statistické porovnání byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test z důvodu nenormální distribuce dat.

Tabulka 14: Srovnání sledovaných sensorických znaků u vzorků

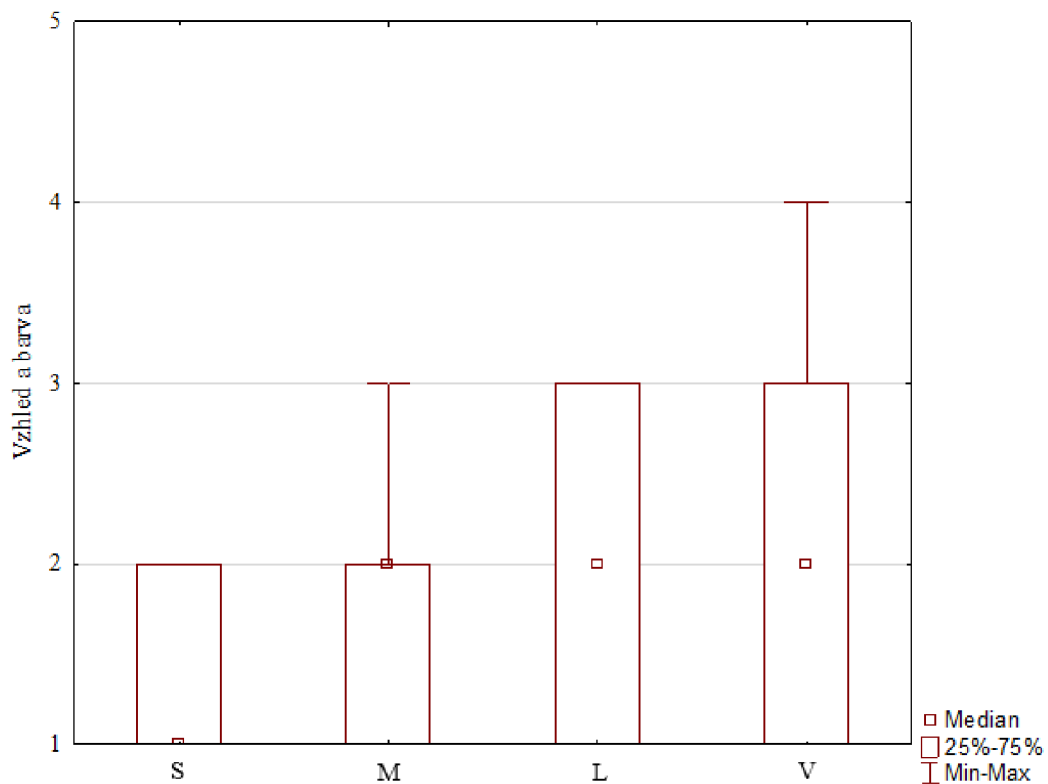
Vzorek	Vzhled a barva	Konzistence	Celkový flavour
S	1	2	2
M	2	2	2,5
L	2	3	3
V	2	3	4

1 – vynikající → 5 – nepřijatelný; značení vzorků viz tabulka 6

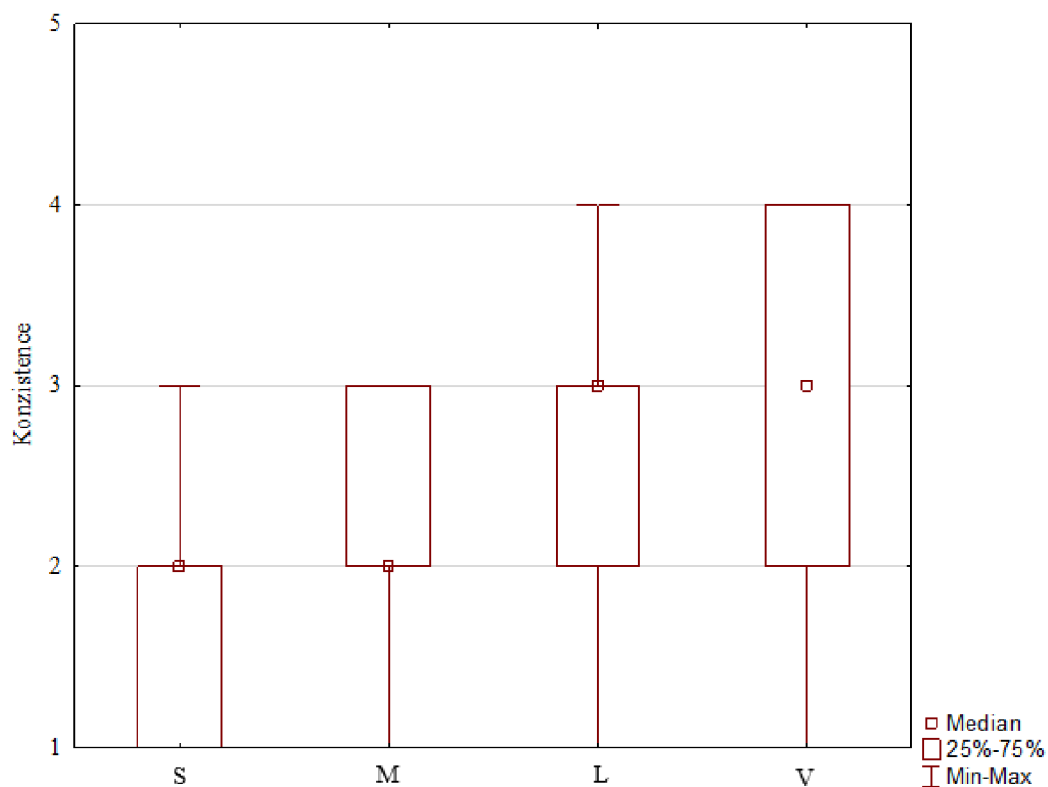
Z výsledků vyplývá, že přidavek ořechového oleje měl negativní vliv na vnímání vzhledu a barvy, jelikož všechny druhy analogů byly hodnoceny hůře než standard. Vzorek standardu byl hodnocen stupněm 1 jako vynikající. Všechny vzorky analogů byly hodnoceny o 1 stupeň hůře než sýr bez přídavku oleje. Barva všech vzorků se hodnotitelům zdála dobrá. Statisticky se dle Kruskal-Wallisova testu výrobky co se týče vzhledu a barvy ovšem významně statisticky nelišily ($\alpha = 0,05$; $p = 0,2478$; $p > \alpha$). Grafické znázornění viz graf 16.

Konzistence byla nejlépe ohodnocena u standardu a analogu s přídavkem mandlového oleje. Zbylé dva druhy analogů, s přídavkem lískoořechového a vlašského oleje, byly hodnoceny o 1 stupeň hůře. Část hodnotitelů popisovala konzistenci standardu jako tužší, sušší, oschlejší. Vzorky analogů byly komentovány jako jemnější a drobivější, s výraznými oddělovacími se hrudkami. Nedostatky v celistvosti a pevnosti těsta sýrových analogů spojené s přídavkem rostlinného oleje byly rovněž popsány v několika publikacích [22][24][33]. Dle Kruskal-Wallisova testu se v konzistenci výrobky významně statisticky nelišily ($\alpha = 0,05$; $p = 0,0690$; $p > \alpha$). Grafické znázornění viz graf 17.

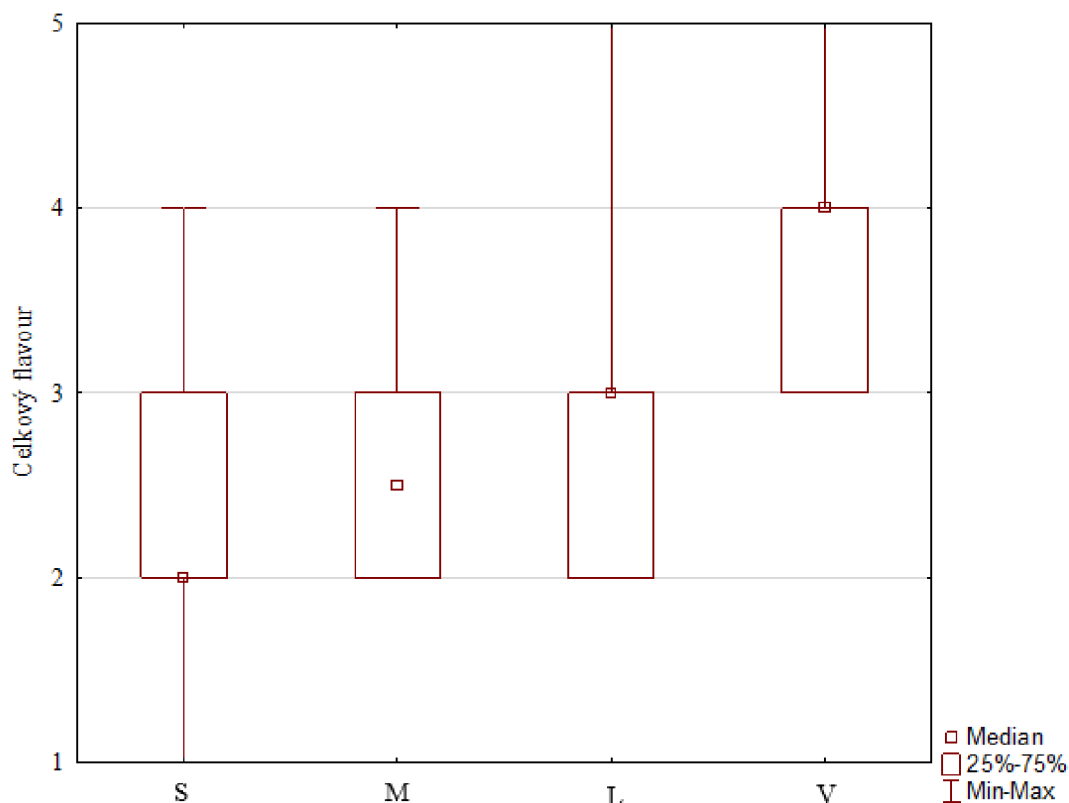
Přídavek ořechového oleje do vzorků měl také negativní vliv na celkový flavour. Nejlépe byl hodnocen vzorek standardu, následovaly analog s přídavkem mandlového, lískoořechového a vlašského oleje. Vzorku standardu byla vytykána kyselá chuť, což pravděpodobně souviselo s aromatickým profilem výrobku, konkrétně identifikovanými kyselinami octovou, hexanovou a butanovou, jejichž aroma je popisováno jako kyselé, štiplavé [34]. Naopak analogy s přídavkem lískoořechového a vlašského oleje se zdály hodnotitelům nahořklé. U analogu s přídavkem mandlového oleje nebyla vnímána silně kyselá ani hořká chuť, což naznačuje na jemnou, méně výraznou chuť mandlového oleje, čímž tento výrobek dosáhl nejlepšího výsledného hodnocení celkového flavouru ze všech tří druhů analogů. Dle Kruskal-Wallisova testu byl mezi vzorky významný statistický rozdíl ($\alpha = 0,05$; $p = 0,0068$; $p < \alpha$), přičemž se od sebe významně lišil vzorek standardu a analogu s přídavkem oleje z vlašských ořechů ($p = 0,0106$). Grafické znázornění viz graf 18.



Graf 16: Srovnání příjemnosti vzhledu a barvy vzorků; 1 – vynikající → 5 – nepřijatelný; značení vzorků viz tabulka 6



Graf 17: Srovnání příjemnosti konzistence vzorků; 1 – vynikající → 5 – nepřijatelný; značení vzorků viz tabulka 6



Graf 18: Srovnání příjemnosti celkového flavouru vzorků; 1 – vynikající → 5 – nepřijatelný; značení vzorků viz tabulka 6

4.6.2 Výsledky profilového testu

V rámci profilového testu bylo sledováno, do jaké míry hodnotitelé vnímají intenzitu vybraných deskriptorů chuti, a to ořechové, případně jiné. Stupeň 1 byl definován jako nepozorovatelně a stupeň 5 jako výrazně. Ze zaznamenaných dat byl vypočítán medián a výsledky jsou uvedeny v tabulce 15. Z důvodu nenormální distribuce dat byl pro statistické porovnání použit neparametrický Kruskal-Wallisův test. Hodnotitelé měli také za úkol pokusit se identifikovat druh přidaného ořechového oleje do jednotlivých výrobků.

Tabulka 15: Srovnání sledovaných deskriptorů v profilovém testu

Vzorek	Intenzita ořechové chuti	Intenzita jiné chuti
S	1,5	2,5
M	2	2
L	3,5	1
V	3	2

1 – nepozorovatelná → 5 – výrazná; značení vzorků viz tabulka 6

Podle očekávání byla u všech vzorků analogů vnímána vyšší intenzita ořechové chuti ve srovnání se standardem, přičemž nejvyšší intenzita ořechové chuti byla zaznamenána u analogu s přídavkem lískoořechového oleje, následoval analog s přídavkem oleje z vlašských ořechů a nejnižší intenzita ořechové chuti byla mezi analogy vnímána u výrobku s přidaným

mandlovým olejem. To pravděpodobně souvisí s výsledky senzoričkého hodnocení pomocí stupnice (kap. 4.6.1), kdy analogy s přidavkem lískoořechového a vlašského oleje byly popisovány jako nahořklé, což mohlo asociovat přítomnost ořechového oleje ve výrobcích. U analogu s přidavkem mandlového oleje tento komentář zaznamenaný nebyl, což i s ohledem na hodnocení v tabulce 15 naznačuje na méně výraznou ořechovou chuť tohoto druhu oleje. Dle Kruskal-Wallisova testu byl mezi vzorky ve vnímání intenzity ořechové chuti statistický rozdíl ($\alpha = 0,05$; $p = 0,0126$; $p < \alpha$), přičemž se od sebe významně lišily vzorek standardu a analogu s přidavkem lískoořechového oleje ($p = 0,0160$). Vysoké vnímání intenzity ořechové chuti u analogu s přidavkem oleje z vlašských ořechů mohlo být spojeno s aromatickým profilem výrobku, kdy ve výrobku bylo identifikováno nejpestřejší složení těkavých terpenů, které se podílejí na dotváření flavouru typického pro vlašský olej.

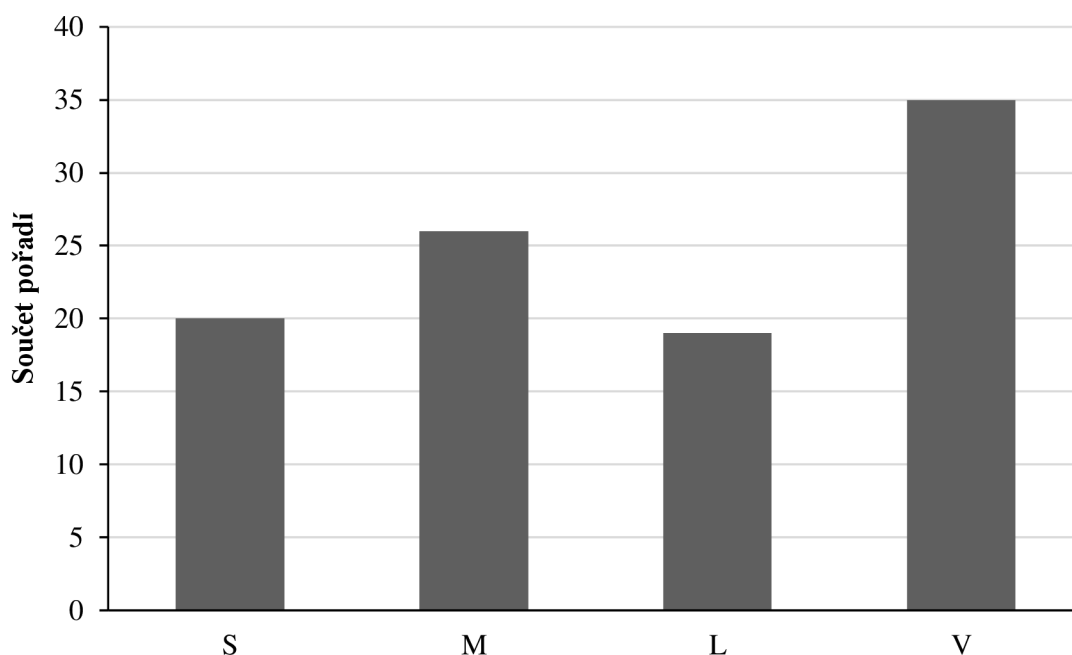
V hodnocení intenzity jiné chuti dopadl nejhůře vzorek standardu, kterému byla vytýkána příliš kyselá chuť, což potvrzuje výsledky senzoričkého hodnocení v kap. 4.6.1. Nejmenší vnímání jiné chuti bylo zaznamenáno u analogu s přidavkem lískoořechového oleje, což pravděpodobně souvisí s vnímáním nejvyšší intenzity ořechové chuti, která mohla případnou kyselost zamaskovat. Vzorky se jinak dle Kruskal-Wallisova testu významně statisticky nelišily ($\alpha = 0,05$; $p = 0,3068$; $p > \alpha$).

Co se týče hodnocení negativní chuti, známky zkažení cítili u vzorku standardu, analogu s přidavkem mandlového a lískoořechového oleje shodně 2 hodnotitelé. Nejhůře dopadl analog s přidavkem oleje z vlašských ořechů, u kterého uvedlo celkem 8 hodnotitelů vnímání negativní chuti či známek zkažení výrobku. Jelikož výroba i skladování výrobků byly provedeny u všech výrobků stejným postupem, lze si toto hodnocení vysvětlit charakteristickou nahořklou chutí vlašského oleje, která byla okomentována i v rámci předchozího testu.

Úspěšně se podařilo identifikovat přidaný olej u analogu s mandlovým olejem 1 hodnotiteli, u analogu s vlašským olejem 3 hodnotitelům a u analogu s lískoořechovým olejem 5 hodnotitelům. To opět naznačuje na jemnou, méně výraznou chuť mandlového oleje.

4.6.3 Výsledky pořadového testu celkové přijatelnosti

V rámci pořadového testu hodnotitelé výrobky seřadili dle celkové přijatelnosti. Výsledky jsou pro každý vzorek vyjádřeny jako součet pořadí jednotlivých hodnocení, nejnižší hodnota tedy znamená nejlepší hodnocení. Výsledky jsou znázorněny graficky na grafu 19.



Graf 19: Výsledky pořadového testu celkové přijatelnosti; značení vzorků viz tabulka 6

Z grafu 19 je patrné, že z pohledu celkové přijatelnosti byl nejlépe hodnocen vzorek analogu s přidavkem lískoořechového oleje (součet pořadí 19), následoval vzorek standardu (součet pořadí 20). Hodnotitelé u výše zmíněného analogu ocenili především znatelnou chuť po ořeších, jemnou texturu výrobku a s tím spojenou vlastnost rozpadání se v ústech. 4 hodnotitelé označili tento vzorek jako nejlepší, ale 1 hodnotitel jej označil jako nejhorší. Sýr bez přidavku oleje označilo 5 hodnotitelů jako nejlepší vzorek a 1 hodnotitel jej označil jako nejhorší. Kladné hodnocení tohoto výrobku hodnotitelé dle očekávání zdůvodnili celistvou, nedrobivou texturou a smetanovou chutí bez známek hořkosti. S ohledem na výsledky předchozích testů sensorického hodnocení, kdy analogu s přidavkem mandlového oleje nebyla vytykána kyselá ani hořká chuť, zaujal tento výrobek překvapivě třetí místo v celkové přijatelnosti (součet pořadí 26). Žádný hodnotitel neoznačil tento výrobek jako nejlepší a dokonce 1 hodnotitel jej označil jako nejhorší. Nejhůře hodnocen byl analog s přidavkem oleje z vlašských ořechů (součet pořadí 35), přičemž jej 7 hodnotitelů zařadilo na poslední místo z pohledu celkové přijatelnosti a žádný z hodnotitelů jej neoznačil jako nejlepší výrobek. To potvrzuje výsledky hodnocení celkového flavouru v rámci prvního testu, kdy byl výrobek také ohodnocen nejhorším skóre.

4.6.4 Výsledky párové porovnávací zkoušky

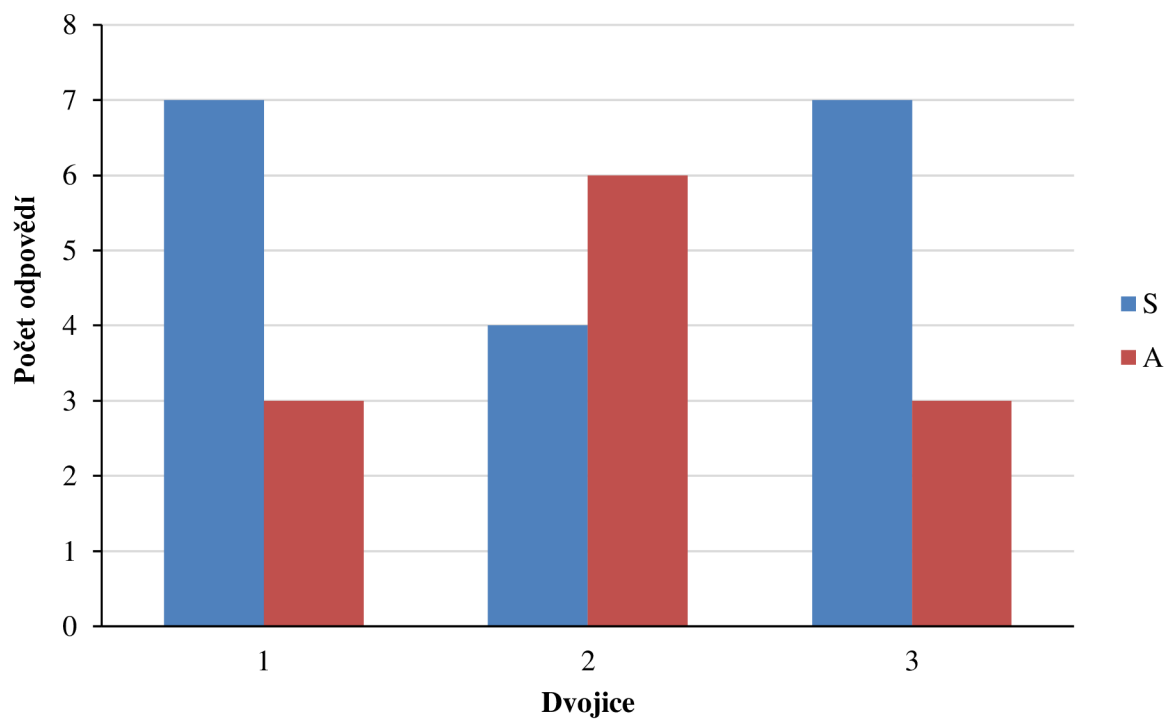
V rámci párové porovnávací zkoušky byly hodnotitelům předloženy tři dvojice výrobků, kdy v každé dvojici byl jedním vzorkem standard, který byl v každé dvojici doplněn jiným druhem analogu (A); tedy dvojice 1 standard vs. analog s přidavkem mandlového oleje, dvojice 2 standard vs. analog s přidavkem lískoořechového oleje a dvojice 3 standard vs. analog s přidavkem oleje z vlašských ořechů. Hodnotitelé měli následně u každé dvojice určit vzorek, který preferují. Cílem bylo zjistit, zda hodnotitelé vnímají vzorky analogů pozitivně, chutněji a ve srovnání se standardem by tento druh výrobku upřednostnili. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 16 a graficky znázorněny na grafu 20.

Tabulka 16: Výsledky párové porovnávací zkoušky srovnávající vzorek standardu se vzorkem analogu

Dvojice	Vzorek	Počet preferenčních hlasů
1	S	7
	M	3
2	S	4
	L	6
3	S	7
	V	3

Značení vzorků viz tabulka 6

Dle Normy ČSN EN ISO 5495 [100] je při celkovém počtu 10 hodnotitelů potřebných 9 preferenčních hlasů, aby mohl být výsledek při zvolené hladině pravděpodobnosti $P = 95 \%$ považován za statisticky významný [100], čehož nebylo dosaženo u žádného ze vzorků, jak je možné vidět v tabulce 16. Z výsledků i grafického znázornění je zřejmé, že hodnotitelům chutnal více vzorek bez přídavku oleje než analog s přídavkem mandlového oleje i analog s přídavkem oleje z vlašských ořechů. U obou dvojic označilo sýr bez přídavku oleje jako chutnější 7 z 10 hodnotitelů. Přestože hodnotitelé uvedli, že u preferovaného vzorku (standard) necítí chuť přidaného ořechového oleje, z důvodu více tradiční chuti a absence vnímání chuti hořké (dvojice 3, srovnání standardu vs. analogu s přídavkem oleje z vlašských ořechů) upřednostňují právě sýr bez přídavku oleje. Pouze v případě analogu s přídavkem lískoořechového oleje byl vyhodnocen jako chutnější vzorek analogu. Ve srovnání s výrobkem bez přídavku oleje jej preferovalo 6 z 10 hodnotitelů. Zdůvodněním, jako u předchozích testů sensorického hodnocení, bylo příjemné aroma a oříšková chuť bez známek kyselosti a hladká konzistence podobající se klasickým sýrům.



Graf 20: Výsledky párové porovnávací zkoušky srovnávající vzorek standardu (S) se vzorkem analogu (A); značení dvojic viz tabulka 16

5 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala optimalizací výroby analogů přírodních sýrů s přidavkem vybraných rostlinných olejů, konkrétně mandlového, lískoořechového a oleje z vlašských ořechů, a studiem vlivu použitých ořechových olejů na modelové výrobky. Vzorky sýrů a sýrových analogů byly charakterizovány z hlediska obsahu těkavých (aromatických) látek, mastných kyselin, tuku v sušině, dále z hlediska antioxidační aktivity a sensorické kvality.

Celkem bylo ve všech vzorcích identifikováno 38 sloučenin, z toho 11 alkoholů, 6 ketonů, 6 kyselin, 4 aldehydy, 4 estery, 4 terpeny a 3 ostatní, nezařazené sloučeniny. V celkovém počtu identifikovaných sloučenin se od sebe vzorky příliš nelišily, v analogu s přidavkem mandlového oleje byl dokonce identifikován stejný počet látek jako ve vzorku standardu; nejvyšší počet těkavých látek byl detekován v analogu s přidavkem oleje z vlašských ořechů. Na rozdíl od standardního výrobku byly dle očekávání v analozích detekovány sloučeniny ze skupiny terpenů, charakteristické pro ořechové oleje. Rozdíly byly shledány v obsahu těkavých látek. Ve vzorcích analogů byl obsah těkavých látek srovnatelný, avšak lišilo se procentuální zastoupení jednotlivých skupin. Ve všech vzorcích analogů byl naměřen vyšší obsah těkavých látek než ve vzorku standardu.

Dle předpokladu byl ve všech vzorcích analogů stanoven vyšší obsah tuku v sušině i obsah mastných kyselin než ve vzorku standardu. Celkově bylo identifikováno 16 mastných kyselin, z toho 11 nasycených, 3 mono- a 2 polynenasycené, a to ve vázané i volné formě. Všechny vzorky analogů byly ve srovnání se standardem bohatší na nenasycené mastné kyseliny. Výrazně nejvyšší obsah polynenasycených mastných kyselin byl zjištěn ve vzorku analogu s přidavkem oleje z vlašských ořechů. Ořechové oleje jsou cenným zdrojem mono- i polynenasycených mastných kyselin a potvrzené zvýšení obsahu těchto látek ve výrobcích může takto přinést zajímavé zdravotní benefity spojené s konzumací obdobného typu výrobků, tedy sýrů obohacených o nutričně bohaté ořechové oleje. Na základě stanovení obsahu tuku v sušině lze podle Vyhlášky č. 397/2016 Sb. vzorek standardního sýru zařadit do skupiny polotučných sýrů. Přestože byly vzorky analogů vyrobeny dle stejného postupu, analog s přidavkem mandlového oleje lze rovněž zařadit do kategorie polotučných sýrů, zatímco analogy s přidavkem lískoořechového a vlašského oleje spadaly do kategorie sýrů plnotučných. To si lze vysvětlit méně úspěšnou distribucí mandlového oleje do produktu a následně spojeným vzorkováním výrobku pro stanovení. Dle stanovení vody v tukuprosté hmotě sýra byly všechny výrobky zařazeny do kategorie měkkých sýrů.

Vyrobené sýrové analogy byly ve srovnání se standardem charakterizovány též vyšším antioxidačním potenciálem, přičemž rozdíl mezi standardním výrobkem a analogem s přidavkem lískoořechového oleje byl statisticky významný ($p < \alpha$), tudíž se z pohledu antioxidační aktivity jeví olej z lískových ořechů jako dobrou volbou při náhradě mléčného tuku sýrových výrobků. Naopak ale u sýrových analogů došlo k poklesu sensorické kvality. Celkový flavour analogu s přidavkem oleje z vlašských ořechů ve srovnání se standardem byl statisticky horší ($p < \alpha$), přičemž byl tento výrobek hodnocen také jako nejméně sensoricky atraktivní v rámci celkové přijatelnosti spotřebiteli.

Výsledky ukazují, že sýrové analogy s přidavkem ořechových olejů mají potenciál stát se zdrojem nutričně cenných látek jako jsou nenasycené mastné kyseliny a antioxidanty.

Další kroky pilotního projektu, který má za cíl vyrobit sýrový analog s přídavkem rostlinného oleje, a kterého je tato práce součástí, by měly pokračovat v optimalizaci výrobních kroků, aby mimo zvýšení nutričních benefitů výrobků došlo také ke zvýšení jejich sensorické atraktivity. S ohledem na charakter výrobku je možné doporučit aplikaci různých druhů stabilizátorů pro zajištění lepší distribuce oleje do analogu a zajištění lepších texturních vlastností výrobku či optimalizovat způsob inkorporace oleje do analogu v jiném výrobním kroku. Dalším návrhem je jiný způsob zrání výrobků s využitím sýrařského vosku s možností aplikace povlaku z přírodních konzervantů pro zvýšení ochrany proti napadení nežádoucími mikroorganismy a následným prodloužením trvanlivosti výrobků.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] WALTER, H. E. a R. C. HARGROVE. *Cheeses of the World*. 1. New York: Dover Publications, 1972.
- [2] Vyhláška č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. In: *Sbírka zákonů*. 2016, částka 162. ISSN 1211-1244.
- [3] EL-FATTAH, Alaa Abd, Mohamed AZZAM, Hany ELKASHEF, et al. Antioxidant Properties of Milk: Effect of Milk Species, Milk Fractions and Heat Treatments. *International Journal of Dairy Science*. 2019, **15**(1), 1-9. ISSN 18119743. Dostupné z: doi:10.3923/ijds.2020.1.9.
- [4] KONUSPAYEVA, Gaukhar, Benedicte CAMIER, Nasser ALEILAWI, et al. Manufacture of dry- and brine-salted soft camel cheeses for the camel dairy industry. *International Journal of Dairy Technology*. 2017, **70**(1), 92-101. ISSN 1364727X. Dostupné z: doi:10.1111/1471-0307.12319.
- [5] ROSTANE ME, Fawzi, Amel MERIBAI, Meriem HIND BEN-M, et al. Lactation Stage Effect on Nutritional Quality of Algiers Area Cows' Milk: Effect of Milk Species, Milk Fractions and Heat Treatments. *International Journal of Dairy Science*. 2017, **12**(3), 236-242. ISSN 18119743. Dostupné z: doi:10.3923/ijds.2017.236.242.
- [6] ABD EL-SALAM, M.H. a E. ALICHANIDIS. Cheese varieties ripened in brine. *Major Cheese Groups* [online]. Elsevier, 2004, 227-249 [cit. 2021-11-28]. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. ISBN 9780122636530. Dostupné z: doi:10.1016/S1874-558X(04)80046-0.
- [7] SHAKERIAN, Mansour, Hossein KIANI a Mohammad-Reza EHSANI. Effect of buffalo milk on the yield and composition of buffalo feta cheese at various processing parameters. *Food Bioscience* [online]. 2016, **15**, 110-117 [cit. 2021-12-05]. ISSN 22124292. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbio.2016.06.002.
- [8] ÖZER, Barbaros H. CHEESE | Microflora of White-brined Cheeses. *Encyclopedia of Food Microbiology* [online]. Elsevier, 1999, 397-403 [cit. 2021-11-28]. ISBN 9780122270703. Dostupné z: doi:10.1006/rwfm.1999.0315.
- [9] MALLATOU, Heleni, Eleni PAPPA a Theophilos MASSOURAS. Changes in free fatty acids during ripening of Teleme cheese made with ewes', goats', cows' or a mixture of ewes' and goats' milk. *International Dairy Journal* [online]. 2003, 13(2-3), 211-219 [cit. 2021-11-28]. ISSN 09586946. Dostupné z: doi:10.1016/S0958-6946(02)00153-X
- [10] FOX, Patrick F, Paul L H MCSWEENEY, Timothy M COGAN a Timothy P GUINEE. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Volume 2, Major Cheese Groups*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. ISBN 0-1226-3653-8.
- [11] FOX, Patrick F, Paul L H MCSWEENEY, Timothy M COGAN a Timothy P GUINEE. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Volume 1, General aspects*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. ISBN 0-1226-3652-X.
- [12] CHATELARD-CHAUVIN, C., F. PELISSIER, S. HULIN a M.C. MONTEL. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw milk Cantal type cheeses during cheese making, ripening and storage in different packaging conditions. *Food Control* [online]. 2015, **54**,

- 53-65 [cit. 2022-02-02]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2015.01.007.
- [13] ATALLAH, A.A., Amany M. EL-DEEB, Entsar N. MOHAMED a M.C. MONTEL. Shelf-life of Domiati cheese under modified atmosphere packaging. *Journal of Dairy Science* [online]. 2021, **104**(8), 8568-8581 [cit. 2022-02-02]. ISSN 00220302. Dostupné z: doi:10.3168/jds.2020-19956.
- [14] BERTI, Sofia, Carolina P. OLLÉ RESA, Florencia BASANTA, Lía N. GERSCHENSON a Rosa J. JAGUS. Edible coatings on Gouda cheese as a barrier against external contamination during ripening. *Food Bioscience* [online]. 2019, **31**(8), 8568-8581 [cit. 2022-02-02]. ISSN 22124292. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbio.2019.100447.
- [15] YANGILAR, Filiz, Pınar OĞUZHAN YILDIZ, Florencia BASANTA, Lía N. GERSCHENSON a Rosa J. JAGUS. Casein/natamycin edible films efficiency for controlling mould growth and on microbiological, chemical and sensory properties during the ripening of Kashar cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2016, **96**(7), 2328-2336 [cit. 2022-02-02]. ISSN 00225142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.7348.
- [16] SHAW, MICHAEL. Subject: Novel cheeses and cheese-making processes. *International Journal of Dairy Technology*. 1984, **37**(1), 27-31. ISSN 1364-727X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-0307.1984.tb02278.x.
- [17] LOBATO-CALLEROS, C., E.J. VERNON-CARTER, I. GUERRERO-LEGARRETA, J. SORIANO-SANTOS a H. ESCALONA-BEUNDIA. Use of Fat Blends in Cheese Analogs: Influence on Sensory and Instrumental Textural Characteristics. *Journal of Texture Studies*. 1997, **28**(6), 619-632. ISSN 0022-4901. Dostupné z: doi:10.1111/j.1745-4603.1997.tb00142.x.
- [18] CHEN, Shio-ling, P. WAN, E. LUCAS a K. RHEE. Utilization of peanut protein and oil in cheese analogs. *Food Technology*. 1979, (33), 88-93.
- [19] HANSEN, R. Cheese with vegetable oil. *Nordeuropaeisk Mejeri-Tidsskrift*. 1986, (52), 261.
- [20] MUIR, D.D., A.Y. TAMIME, M.E. SHENANA a A.H. DAWOOD. Processed Cheese Analogues Incorporating Fat-Substitutes 1. Composition, Microbiological Quality and Flavour Changes During Storage at 5 °C. *LWT - Food Science and Technology*. 1999, **32**(1), 41-49. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1006/fstl.1998.0509
- [21] GIHA, Valeria, María José ORDOÑEZ a Ruby Alejandra VILLAMIL. How does milk fat replacement influence cheese analogue microstructure, rheology, and texture profile? *Journal of Food Science* [online]. 2021, **86**(7), 2802-2815 [cit. 2021-12-05]. ISSN 0022-1147. Dostupné z: doi:10.1111/1750-3841.15799.
- [22] LEONG, Thomas S.H., Lydia ONG, Charitha J. GAMLATH, Sally L. GRAS, Muthupandian ASHOKKUMAR a Gregory J.O. MARTIN. Formation of cheddar cheese analogues using canola oil and ultrasonication – A comparison between single and double emulsion systems. *International Dairy Journal* [online]. 2020, **105**(7), 2802-2815 [cit. 2021-12-05]. ISSN 09586946. Dostupné z: doi:10.1016/j.idairyj.2020.104683.
- [23] KAVAK, Dilek Demirbucker, Hacer KARABIYIK, Charitha J. GAMLATH, Sally L. GRAS, Muthupandian ASHOKKUMAR a Gregory J.O. MARTIN. Quality evaluation of

- kashar cheese: influence of palm oil and ripening period. *Food Science and Technology* [online]. 2020, **40**(2), 354-360 [cit. 2021-12-05]. ISSN 1678-457X. Dostupné z: doi:10.1590/fst.39618.
- [24] DINKÇI, N., H. KESENKAŞ, A. K. SEÇKIN, Ö. KINIK, S. GÖNÇ a Gregory J.O. MARTIN. Influence of a vegetable fat blend on the texture, microstructure and sensory properties of kashar cheese: influence of palm oil and ripening period. *Grasas y Aceites* [online]. 2011, **62**(3), 275-283 [cit. 2021-12-05]. ISSN 1988-4214. Dostupné z: doi:10.3989/gya.091810.
- [25] TOTOSAUS, Alfonso, Eladio ROJAS-NERY, M. Jesus FRANCO-FERNÁNDEZ, Ö. KINIK, S. GÖNÇ a Gregory J.O. MARTIN. Soya bean oil/soya protein isolate and carrageenan emulsions as fat replacer in fat-reduced Oaxaca-type cheese: influence of palm oil and ripening period. *International Journal of Dairy Technology* [online]. 2017, **70**(4), 499-505 [cit. 2021-12-05]. ISSN 1364727X. Dostupné z: doi:10.1111/1471-0307.12397.
- [26] ARSLAN, Seher, Ali TOPCU, Ilbilge SALDAMLI, Gülden KOKSAL, S. GÖNÇ a Gregory J.O. MARTIN. Use of corn oil in the production of Turkish white cheese: influence of palm oil and ripening period. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2014, **51**(10), 2382-2392 [cit. 2021-12-05]. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-012-0752-6.
- [27] ARSLAN, Seher, Ali TOPCU, Ilbilge SALDAMLI, Gulden KOKSAL, S. GÖNÇ a Gregory J.O. MARTIN. Utilization of interesterified fat in the production of Turkish white cheese: influence of palm oil and ripening period. *Food Science and Biotechnology* [online]. 2010, **19**(1), 89-98 [cit. 2021-12-05]. ISSN 1226-7708. Dostupné z: doi:10.1007/s10068-010-0013-2.
- [28] ČSN ISO 11036. *Senzorická analýza - Metodologie - Profil textury*. Second edition. Česká agentura pro standardizaci, 2020.
- [29] KINCLOVÁ, V., A. JAROŠOVÁ a B. TREMLOVÁ. *Senzorická analýza potravin* [online]. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2004 [cit. 2021-4-26]. Dostupné z: <https://www.vetweb.cz/senzoricka-analyza-potravin/>.
- [30] KOUŘIMSKÁ, Lenka. *Principy Senzorické Analýzy: Zavádění nových metod rozborů a technologických postupů u prvovýrobců a zpracovatelů mléka*. Praha, 2008. Dostupné také z: http://www.uniconsulting.cz/download/ucebnitext/Zavadeni_novych_metod.pdf.
- [31] LAMPARSKI, Grzegorz, Gabriel TOBOTA, Agnieszka TROSZYŃSKA a Józef FORMAL. Sensory Quality of Commercial Full Fat And Reduced Fat Cheeses. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* [online]. 2006, **56**(1), 119–123 [cit. 2022-03-04]. ISSN 1230-0322. Dostupné z: doi:10.1016/j.smallrumres.2021.106379.
- [32] DRAKE, Mary A., Conor M. DELAHUNTY, Conor DELAHUNTY, Jane MURRAY a Fidelma CROWE. Sensory Character of Cheese and Its Evaluation. *Cheese* [online]. Elsevier, 2017, 2017, **13**(1), 517-545 [cit. 2021-5-3]. ISBN 9780124170124. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-417012-4.00020-X.
- [33] CUNHA, Clarissa R., Ana Isabel DIAS, Walkiria H. VIOTTO, Jane MURRAY a Fidelma CROWE. Microstructure, texture, colour and sensory evaluation of a spreadable

- processed cheese analogue made with vegetable fat. *Food Research International* [online]. Elsevier, 2010, 2017, **43**(3), 723-729 [cit. 2021-5-3]. ISBN 9780124170124. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2009.11.009.
- [34] MANZO, Nadia, Antonello SANTINI, Fabiana PIZZOLONGO, et al. Influence of Ripening on Chemical Characteristics of a Traditional Italian Cheese: Provolone del Monaco. *Sustainability* [online]. 2019, **11**(9) [cit. 2022-02-05]. ISSN 2071-1050. Dostupné z: doi:10.3390/su11092520.
- [35] INNOCENTE, N., M. MUNARI a M. BIASUTTI. Characterization by solid-phase microextraction-gas chromatography of the volatile profile of protected designation of origin Montasio cheese during ripening. *Journal of Dairy Science* [online]. 2013, **96**(1), 26-32 [cit. 2022-02-06]. ISSN 00220302. Dostupné z: doi:10.3168/jds.2012-5689.
- [36] GIOACCHINI, Anna Maria, Mauro DE SANTI, Michele GUESCINI, Giorgio BRANDI a Vilberto STOCCHI. Characterization of the volatile organic compounds of Italian 'Fossa' cheese by solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2010, **24**(23), 3405-3412 [cit. 2022-03-12]. ISSN 09514198. Dostupné z: doi:10.1002/rcm.4782.
- [37] PANSERI, Sara, Luca CHIESA, Alfonso ZECCONI, Gabriella SONCINI a Ivano DE NONI. Determination of Volatile Organic Compounds (VOCs) from Wrapping Films and Wrapped PDO Italian Cheeses by Using HS-SPME and GC/MS. *Molecules* [online]. 2014, **19**(7), 8707-8724 [cit. 2022-02-06]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules19078707.
- [38] PAPPA, Eleni C., Efthymia KONDYLI, John SAMELIS, Gabriella SONCINI a Ivano DE NONI. Microbiological and biochemical characteristics of Kashkaval cheese produced using pasteurised or raw milk. *International Dairy Journal* [online]. 2019, **89**(7), 60-67 [cit. 2022-02-06]. ISSN 09586946. Dostupné z: doi:10.1016/j.idairyj.2018.08.011.
- [39] SAKAR, El Hassan, Mohamed EL YAMANI, Abdelali BOUSSAKOURAN, Ayoub AINANE, Tarik AINANE, Saïd GHARBY a Yahia RHARRABTI. Variability of oil content and its physicochemical traits from the main almond [*Prunus dulcis* Mill. DA Webb] cultivars grown under contrasting environments in north-eastern Morocco. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* [online]. 2021, **32** [cit. 2022-02-23]. ISSN 18788181. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcab.2021.101952.
- [40] CSAKVARI, ADRIANA CECILIA. Fatty Acids Profile and Antioxidant Activity of Almond Oils Obtained from Six Romanian Varieties. *FARMACIA* [online]. 2019, **67**(5), 882-887 [cit. 2022-02-23]. ISSN 00148237. Dostupné z: doi:10.31925/farmacia.2019.5.19.
- [41] AL JUHAIMI, Fahad, Mehmet Musa ÖZCAN, Kashif GHAFUOR, Elfadil E. BABIKER a Shahzad HUSSAIN. Comparison of cold-pressing and soxhlet extraction systems for bioactive compounds, antioxidant properties, polyphenols, fatty acids and tocopherols in eight nut oils. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2018, **55**(8), 3163-3173 [cit. 2022-02-23]. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-018-3244-5.
- [42] XIAO, Lu, Jihyun LEE, Gong ZHANG, Susan E. EBELER, Niramani WICKRAMASINGHE, James SEIBER a Alyson E. MITCHELL. HS-SPME GC/MS

- characterization of volatiles in raw and dry-roasted almonds (*Prunus dulcis*). *Food Chemistry* [online]. 2014, **151**, 31-39 [cit. 2022-02-24]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.052.
- [43] AGILA, Amal, Sheryl BARRINGER, Gong ZHANG, Susan E. EBELER, Niramani WICKRAMASINGHE, James SEIBER a Alyson E. MITCHELL. Effect of Roasting Conditions on Color and Volatile Profile Including HMF Level in Sweet Almonds (*Prunus dulcis*). *Journal of Food Science* [online]. 2012, **77**(4), C461-C468 [cit. 2022-02-24]. ISSN 00221147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02629.x.
- [44] SUN, Jiayang, Xiaonuo FENG, Chunmao LYU, Shuang ZHOU a Zixuan LIU. Effects of different processing methods on the lipid composition of hazelnut oil: A lipidomics analysis. *Food Science and Human Wellness* [online]. 2022, **11**(2), 427-435 [cit. 2022-02-25]. ISSN 22134530. Dostupné z: doi:10.1016/j.fshw.2021.11.024.
- [45] PELVAN, Ebru, Elmas Öktem OLGUN, Ayşe KARADAĞ, Cesarettin ALASALVAR a Zixuan LIU. Phenolic profiles and antioxidant activity of Turkish Tombul hazelnut samples (natural, roasted, and roasted hazelnut skin): A lipidomics analysis. *Food Chemistry* [online]. 2018, **244**(2), 102-108 [cit. 2022-02-25]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2017.10.011.
- [46] ARRANZ, Sara, Rosa CERT, Jara PÉREZ-JIMÉNEZ, Arturo CERT a Fulgencio SAURA-CALIXTO. Comparison between free radical scavenging capacity and oxidative stability of nut oils: A lipidomics analysis. *Food Chemistry* [online]. 2008, **110**(4), 985-990 [cit. 2022-02-25]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2008.03.021.
- [47] ROSSO, Marta Cialiè, Erica LIBERTO, Nicola SPIGOLON, Mauro FONTANA, Marco SOMENZI, Carlo BICCHI a Chiara CORDERO. Evolution of potent odorants within the volatile metabolome of high-quality hazelnuts (*Corylus avellana* L.): evaluation by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2018, **410**(15), 3491-3506 [cit. 2022-02-25]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-017-0832-6.
- [48] NICOLOTTI, Luca, Chiara CORDERO, Carlo BICCHI, Patrizia RUBIOLO, Barbara SGORBINI a Erica LIBERTO. Volatile profiling of high quality hazelnuts (*Corylus avellana* L.): Chemical indices of roasting. *Food Chemistry* [online]. 2013, **138**(2-3), 1723-1733 [cit. 2022-02-25]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.086.
- [49] ALASALVAR, Cesarettin, Joana S. AMARAL, Gülçin SATIR a Fereidoon SHAHIDI. Profiling triacylglycerols, fatty acids and tocopherols in hazelnut varieties grown in Turkey. *Food Chemistry* [online]. 2009, **113**(4), 115-121 [cit. 2022-02-26]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.019.
- [50] TAŞ, Neslihan Göncüoğlu a Vural GÖKMEN. Profiling triacylglycerols, fatty acids and tocopherols in hazelnut varieties grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2015, **44**, 115-121 [cit. 2022-02-26]. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2015.08.010.
- [51] CIEMNIEWSKA-ŻYTKIEWICZ, Hanna, Vito VERARDO, Federica PASINI, Joanna BRYŚ, Piotr KOCZOŃ a Maria Fiorenza CABONI. Determination of lipid and phenolic

- fraction in two hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars grown in Poland. *Food Chemistry* [online]. 2015, **168**(4), 615-622 [cit. 2022-02-26]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2014.07.107.
- [52] WANG, Ping, Linlin ZHONG, Hongbing YANG, Feng ZHU, Xujie HOU, Cuiyun WU, Rui ZHANG a Yunjiang CHENG. Comparative analysis of antioxidant activities between dried and fresh walnut kernels by metabolomic approaches. *LWT* [online]. 2022, **155**(4), 615-622 [cit. 2022-02-26]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2021.112875.
- [53] WEI, Fang, Youyuan LI, Donghui SUN, et al. Odor, tastes, nutritional compounds and antioxidant activity of fresh-eating walnut during ripening. *Scientia Horticulturae* [online]. 2022, **293**(4), 615-622 [cit. 2022-02-26]. ISSN 03044238. Dostupné z: doi:10.1016/j.scienta.2021.110744.
- [54] VINSON, Joe A., Yuxing CAI, Hongbing YANG, et al. Nuts, especially walnuts, have both antioxidant quantity and efficacy and exhibit significant potential health benefits. *Food Funct* [online]. 2012, **3**(2), 134-140 [cit. 2022-02-26]. ISSN 2042-6496. Dostupné z: doi:10.1039/C2FO10152A.
- [55] KALOGIOURI, Natasa P., Natalia MANOUSHI, Erwin ROSENBERG, et al. Exploring the volatile metabolome of conventional and organic walnut oils by solid-phase microextraction and analysis by GC-MS combined with chemometrics. *Food Chemistry* [online]. 2021, **363**(2), 134-140 [cit. 2022-02-26]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2021.130331.
- [56] ZHOU, Ye, Wei FAN, Fuxiang CHU, et al. Identification of Volatile Oxidation Compounds as Potential Markers of Walnut Oil Quality. *Journal of Food Science* [online]. 2018, **83**(11), 2745-2752 [cit. 2022-02-26]. ISSN 00221147. Dostupné z: doi:10.1111/1750-3841.14342.
- [57] MU, Honglei, Haiyan GAO, Hangjun CHEN, et al. Study on the Volatile Oxidation Compounds and Quantitative Prediction of Oxidation Parameters in Walnut (*Carya cathayensis* Sarg.) Oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2019, **121**(6), 2745-2752 [cit. 2022-02-26]. ISSN 1438-7697. Dostupné z: doi:10.1002/ejlt.201800521.
- [58] RABADÁN, Adrián, Manuel ÁLVAREZ-ORTÍ, José Emilio PARDO, et al. Storage stability and composition changes of three cold-pressed nut oils under refrigeration and room temperature conditions. *Food Chemistry* [online]. 2018, **259**(6), 31-35 [cit. 2022-02-26]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2018.03.098.
- [59] GAO, Pan, Ruijie LIU, Qingzhe JIN, et al. Comparative study of chemical compositions and antioxidant capacities of oils obtained from two species of walnut: *Juglans regia* and *Juglans sigillata*. *Food Chemistry* [online]. 2019, **279**(6), 279-287 [cit. 2022-02-26]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2018.12.016.
- [60] HO, Tien D., Anthony J. CANESTRARO a Jared L. ANDERSON. Ionic liquids in solid-phase microextraction: A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2011, **695**(1-2), 18-43 [cit. 2022-02-28]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2011.03.034.
- [61] VAS, György a Károly VÉKEY. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*

- [online]. 2004, **39**(3), 233-254 [cit. 2022-02-28]. ISSN 1076-5174. Dostupné z: doi:10.1002/jms.606.
- [62] Gas Chromatography. *Chemistry LibreTexts* [online]. 16 August, 2020 [cit. 2022-02-28]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography).
- [63] FRIEDECKÝ, David a Karel LEMR. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2012, **20**(41), 152-157 [cit. 2022-03-02]. ISSN 1210-7921. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>.
- [64] AOAC OFFICIAL METHOD 996.06. *Fat (Total, Saturated, and Unsaturated) in Foods*. 17th edition. Gaithersburg, MD: AOAC International, 2002.
- [65] AMORES, Gustavo a Mailo VIRTO. Total and Free Fatty Acids Analysis in Milk and Dairy Fat. *Separations* [online]. 2019, **6**(1) [cit. 2022-03-03]. ISSN 2297-8739. Dostupné z: doi:10.3390/separations6010014.
- [66] KILCAWLEY, Kieran N. a David T. MANNION. Free Fatty Acids Quantification in Dairy Products. *Fatty Acids* [online]. InTech, 2017, 2017-06-2 [cit. 2022-03-03]. ISBN 978-953-51-3301-8. ISSN 2297-8739. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.69596.
- [67] SHELLIE, R.A. a David T. MANNION. Gas Chromatography. *Encyclopedia of Forensic Sciences* [online]. Elsevier, 2013, 2013, 579-585 [cit. 2022-03-03]. ISBN 9780123821669. ISSN 2297-8739. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-382165-2.00245-2.
- [68] JEŽEK, František a Alena SALÁKOVÁ. *Senzorická analýza potravin*. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012.
- [69] WATTS, Barry D., G. L. YLIMAKI, L. E. JEFFERY a L. G. ELIAS. *Basic Sensory Methods for Food Evaluation*. 1. Canada: International Development Research Centre, 1989. ISBN 0-88936-563-6.
- [70] MURRAY, J.M., C.M DELAHUNTY a I.A BAXTER. Descriptive sensory analysis: past, present and future. *Food Research International* [online]. 2001, **34**(6), 461-471 [cit. 2022-03-04]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/S0963-9969(01)00070-9.
- [71] FENELON, Mark A., Timothy P. GUINEE, Conor DELAHUNTY, Jane MURRAY a Fidelma CROWE. Composition and Sensory Attributes of Retail Cheddar Cheese with Different Fat Contents. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2000, **13**(1), 13-26 [cit. 2022-04-03]. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1006/jfca.1999.0844.
- [72] ČSN ISO 6658. *Senzorická analýza – Metodologie – Všeobecné pokyny*. 1. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2009.
- [73] DAUBER, Cecilia, Tatiana CARRERAS, Alejandro BRITOS, et al. Elaboration of goat cheese with increased content of conjugated linoleic acid and transvaccenic acid: Fat, sensory and textural profile. *Small Ruminant Research* [online]. 2021, **199** [cit. 2022-03-04]. ISSN 09214488. Dostupné z: doi:10.1016/j.smallrumres.2021.106379.
- [74] MÜLLER VON BLUMENCRON, Marie, Elisabeth HAMACHER, Hans WIECH a Thomas WORTELMANN. Instrumental sensory analysis in the food industry: Part 1: Electronic noses. *Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft – German Agricultural*

- Society* [online]. Frankfurt am Main: DLG e. V. Competence Center Food, 2015 [cit. 2021-5-1]. Dostupné z: https://www.dlg.org/fileadmin/downloads/lebensmittel/themen/publikationen/expertenwissen/lebensmittelsensorik/e_2015_2_Expertenwissen_Electronic_Noses.pdf.
- [75] MUNTEANU, Irina Georgiana a Constantin APETREI. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(7) [cit. 2022-03-05]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22073380.
- [76] SHAHIDI, Fereidoon a Ying ZHONG. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods* [online]. 2015, **18**, 757-781 [cit. 2022-03-05]. ISSN 17564646. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2015.01.047.
- [77] BENER, Mustafa, Mustafa ÖZYÜREK, Kubilay GÜÇLÜ a Reşat APAK. Novel Optical Fiber Reflectometric CUPRAC Sensor for Total Antioxidant Capacity Measurement of Food Extracts and Biological Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2013, **61**(35), 8381-8388 [cit. 2022-03-05]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf402327x.
- [78] ÖZYÜREK, Mustafa, Kubilay GÜÇLÜ a Reşat APAK. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2011, **30**(4), 652-664 [cit. 2022-03-05]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2010.11.016.
- [79] TIAN, Xin a K. M. SCHAICH. Effects of Molecular Structure on Kinetics and Dynamics of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay with ABTS •. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2013, **61**(23), 5511-5519 [cit. 2022-03-06]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf4010725.
- [80] FOTI, Mario C. a K. M. SCHAICH. Use and Abuse of the DPPH • Radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2015, **63**(40), 8765-8776 [cit. 2022-03-06]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.5b03839.
- [81] REVILLA, I., M.I. GONZÁLEZ-MARTÍN, A.M. VIVAR-QUINTANA, M.A. BLANCO-LÓPEZ, I.A. LOBOS-ORTEGA a J.M. HERNÁNDEZ-HIERRO. Antioxidant capacity of different cheeses: Affecting factors and prediction by near infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science* [online]. 2016, **99**(7), 5074-5082 [cit. 2022-03-13]. ISSN 00220302. Dostupné z: doi:10.3168/jds.2015-10564.
- [82] YOUSEFI, Leila, Mohammad Reza Edalatian DOVOM, Mohammad Bagher Habibi NAJAFI a Amir Mohammad MORTAZAVIAN. Antioxidant activity of ultrafiltered-Feta cheese made with adjunct culture during ripening. *Journal of Food Measurement and Characterization* [online]. 2021, **15**(5), 4336-4342 [cit. 2022-03-13]. ISSN 2193-4126. Dostupné z: doi:10.1007/s11694-021-01019-0.
- [83] KHALIFA, Salah A., Ahmad A. OMAR a Azza H. MOHAMED. The Effect of Substituting Milk Fat by Peanut Oil on the Quality of White Soft Cheese. *International Journal of Dairy Science* [online]. 2016, **12**(1), 28-40 [cit. 2022-03-13]. ISSN 18119743. Dostupné z: doi:10.3923/ijds.2017.28.40.
- [84] VAN DEN DOOL, H. a P. DEC. KRATZ. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal*

- of Chromatography A* [online]. 1963, **11**, 463-471 [cit. 2022-04-06]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(01)80947-X.
- [85] HRSTKA, Miroslav a Lenka SOMROVÁ. Praktikum z analytické chemie potravin: Vysoké učení technické v Brně Fakulta chemická. Brno, 2019.
- [86] ČSN EN ISO 1735 (571007). *Sýry a tavené sýrové výrobky - Stanovení obsahu tuku - Gravimetrická metoda (Referenční metoda)*. 02/2005. Praha: Český normalizační institut, 2005.
- [87] HADAŠOVÁ, Klára. *Domáci mlékař, aneb, Jak přijít vlastním přičiněním k mléčným produktům*. Průhonice: Analfabet, 2014. ISBN 978-80-905790-0-2.
- [88] KOZELKOVÁ, Monika, Miroslav JŮZL, Táňa LUŽOVÁ, Květoslava ŠUSTOVÁ Aneta BUBENÍČKOVÁ. *Changes of quality of rennets during storing*. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. 2013, **60**(6), 189-196. ISSN 12118516. Dostupné z: doi:10.11118/actaun201260060189.
- [89] KINDSTEDT, Paul. *American Farmstead Cheese: The Complete Guide to Making and Selling Artisan Cheeses*. Vermont: Chelsea Green Publishing, 2005. ISBN 1-93498-77-6.
- [90] BABUSHOK, V. I., P. J. LINSTROM a I. G. ZENKEVICH. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* [online]. 2011, **40**(4), 463-471 [cit. 2022-04-06]. ISSN 0047-2689. Dostupné z: doi:10.1063/1.3653552.
- [91] BURBANK, Helen a Michael C. QIAN. Development of volatile sulfur compounds in heat-shocked and pasteurized milk cheese. *International Dairy Journal* [online]. 2008, **18**(8), 811-818 [cit. 2022-04-07]. ISSN 09586946. Dostupné z: doi:10.1016/j.idairyj.2007.12.006.
- [92] CHEN, Chen, Zheng LIU, Haiyan YU, Zhiyuan XU a Huaixiang TIAN. Flavoromic determination of lactones in cheddar cheese by GC–MS–olfactometry, aroma extract dilution analysis, aroma recombination and omission analysis. *Food Chemistry* [online]. 2022, **368** [cit. 2022-04-07]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2021.130736.
- [93] ABO-ELWAFI, Ghada, Mervat I. FODA a Soher E. ALY. Comparative Studies on Fat of White Soft Cheese Collected from Cairo Markets. *Middle East Journal of Applied Sciences* [online]. Egypt, 2015, **5**(2), 328-334 [cit. 2022-04-10]. ISSN 2077-4613.
- [94] NOUIRA, Wassim, Young W PARK, Zehra GULER a Thomas TERRILL. Comparison of free fatty acid composition between low-fat and full-fat goat milk cheeses stored for 3 months under refrigeration. *Open Journal of Animal Sciences* [online]. 2011, **01**(02), 17-24 [cit. 2022-04-14]. ISSN 2161-7597. Dostupné z: doi:10.4236/ojas.2011.12003.
- [95] DI PIETRO, Maria Enrica, Alberto MANNU a Andrea MELE. NMR Determination of Free Fatty Acids in Vegetable Oils. *Processes* [online]. 2020, **8**(4) [cit. 2022-04-15]. ISSN 2227-9717. Dostupné z: doi:10.3390/pr8040410.
- [96] ABDEL-GHANY, I. H. I., Sally S. SAKR, Mahassen M.M. SLEEM a Hamdy A. SHAABAN. The Effect of Milk Fat Replacement by Some Edible Oils on Chemical Composition, Antioxidant Activity and Oxidative Stability of Spreadable Processed Cheese Analogues. *International Research Journal of Food and Nutrition* [online]. 2020,

- 2(1), 6-14 [cit. 2022-04-16]. ISSN 2663-7189. Dostupné z: <https://scirange.com/abstract/irjfn.2020.6.14>.
- [97] IVANOVA, M., T. BALABANOVA, G. KOSTOV, G. UZUNOVA, Danijel MILINČIĆ, Bojana ŠPIROVIĆ TRIFUNOVIĆ a Milenko SMILJANIĆ. Comparative study on different incorporation of olive oil and dill extract in fresh cheese. *Food Research* [online]. 2020, 4(6), 2233-2240 [cit. 2022-04-16]. ISSN 25502166. Dostupné z: doi:10.26656/fr.2017.4(6).341.
- [98] IVANOVA, Mihaela, Olga TENEVA, Mariya DUSHKOVA, Radka VLASEVA a Albena STOYANOVA. Effect of canola oil and natural antioxidant of basil on chemical and sensory properties of fresh cheese. *Ukrainian Food Journal* [online]. 2020, 9(2), 373-382 [cit. 2022-04-16]. ISSN 2304974X. Dostupné z: doi:10.24263/2304-974X-2020-9-2-9.
- [99] BARAĆ, Miroljub, Zlatan SARIĆ, Tanja VUČIĆ, Ivana SREDOVIĆ IGNJATOVIĆ, Danijel MILINČIĆ, Bojana ŠPIROVIĆ TRIFUNOVIĆ a Milenko SMILJANIĆ. Effect of Ripening in Brine and Vacuum on Protein, Fatty Acid and Mineral Profiles, and Antioxidant Potential of Reduced-Fat White Cheese. *Food Technology and Biotechnology* [online]. 2021, 59(1), 44-55 [cit. 2022-04-16]. ISSN 13342606. Dostupné z: doi:10.17113/ftb.59.01.21.6891.
- [100] ČSN EN ISO 5495 (560032). *Senzorická analýza - Metodologie - Párová porovnávací zkouška*. Změna A1. Praha: Ústav pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2016.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

FID	Plamenově ionizační detektor
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HS	Headspace prostor
MeMK	Methylester mastné kyseliny
MK	Mastná kyselina
MS	Hmotnostní detektor
MUFA	Mononenasyčená mastná kyselina
PUFA	Polynenasycená mastná kyselina
PVC	Polyvinylchlorid
SFA	Nasyčená mastná kyselina
SPME	Mikroextrakce pevnou fází
TAG	Triacylglycerol
VMK	Volná mastná kyselina
VVTPH	Voda v tukuprosté hmotě sýra

8 PŘÍLOHY

- Příloha 1 Dotazník pro senzorickou analýzu
- Příloha 2 Chromatogram těkavých látek ve vzorku standardního sýra
- Příloha 3 Chromatogram těkavých látek ve vzorku analogu s přídavkem mandlového oleje
- Příloha 4 Chromatogram těkavých látek ve vzorku analogu s přídavkem lískoořechového oleje
- Příloha 5 Chromatogram těkavých látek ve vzorku analogu s přídavkem oleje z vlašských ořechů
- Příloha 6 Chromatogram vázaných mastných kyselin ve vzorku standardního sýra (100 × zředěno)
- Příloha 7 Chromatogram volných mastných kyselin ve vzorku standardního sýra

DOTAZNÍK PRO SENZORICKÉ HODNOCENÍ SÝROVÝCH ANALOGŮ

Vážení hodnotitelé,
zhodnoťte prosím předložené vzorky sýrových analogů s přídavkem ořechového oleje.
Děkuji Vám za spolupráci.

Hodnotitel: _____

kuřák / nekuřák

Datum: _____

muž / žena

Čas: _____

Jaký je Váš vztah k výrobkům označovaným jako sýrové analogy?

- a) Výrobky vyhledávám a konzumuji.
- b) Výrobky aktivně nevyhledávám, ale s konzumací nemám problém.
- c) Výrobky nevyhledávám a vyhýbám se jim.
- d) Výrobky neznám.

1. Senzorické hodnocení pomocí stupnice

Zhodnoťte u vzorků sledovaný znak pomocí stupnice 1–5.

(1 – vynikající, 5 – nepřijatelný)

Kód vzorku	Vzhled a barva	Konzistence	Celkový flavour

Vzhled a barva:

1 – vynikající = vzhled bez známek deformace, hladký, suchý; barva smetanová, bez cizích odstínů

Konzistence:

1 – vynikající = měkká, pevná, nedrobivá, homogenní, jemná, bez vzduchových dutin

Celkový flavour (= chuť a aroma, tj. celkový dojem v ústech při konzumaci):

1 – vynikající = chuť příjemně mléčná, bez cizích příměsí, bez známek kyselosti či hořkosti; aroma příjemné, jemně vyžralé

U jednotlivých vzorků popište důvod případného horšího hodnocení:

2. Profilový test

Posuďte, do jaké míry cítíte vybrané deskriptory chuti pomocí stupnice 1–5.
(1 – nepozorovatelně, 5 – výrazně)

Kód vzorku	Ořechová	Jiná	Popište <u>příp. jiné deskriptory</u> , které ve vzorcích vnímáte, a pokuste se pro každý vzorek <u>identifikovat druh přidaného ořechového oleje</u> .	Cítíte nějakou negativní chuť nebo nějaké známky zkažení výrobků?

3. Pořadový test celkové přijatelnosti

Seřaďte vzorky podle celkové přijatelnosti.
(1 – nejlepší, 4 – nejhorší)

Pořadí vzorku	1.	2.	3.	4.
Kód vzorku				

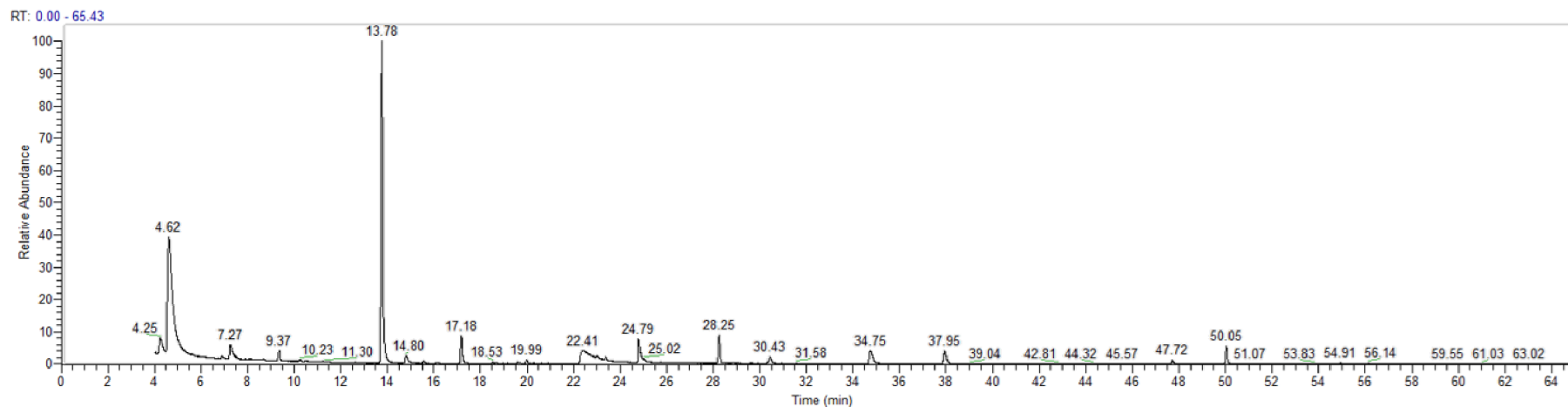
Popište důvod:

4. Párová porovnávací zkouška

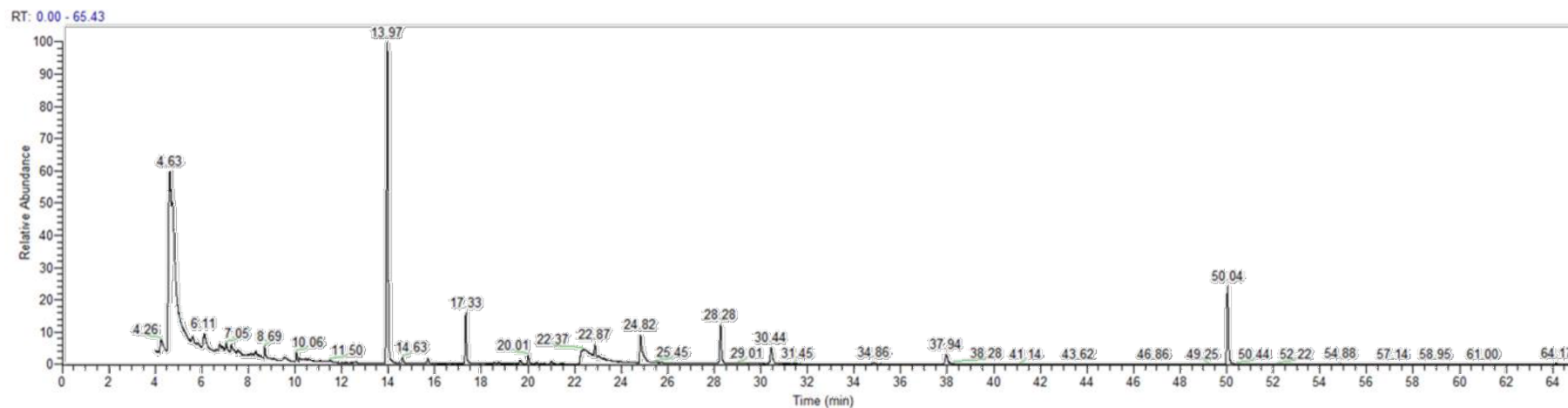
Ochutnejte tři dvojice vzorků a z každé dvojice vyberte výrobek, který Vám chutná více.

Kód vzorku 1	Kód vzorku 2	Popište důvod

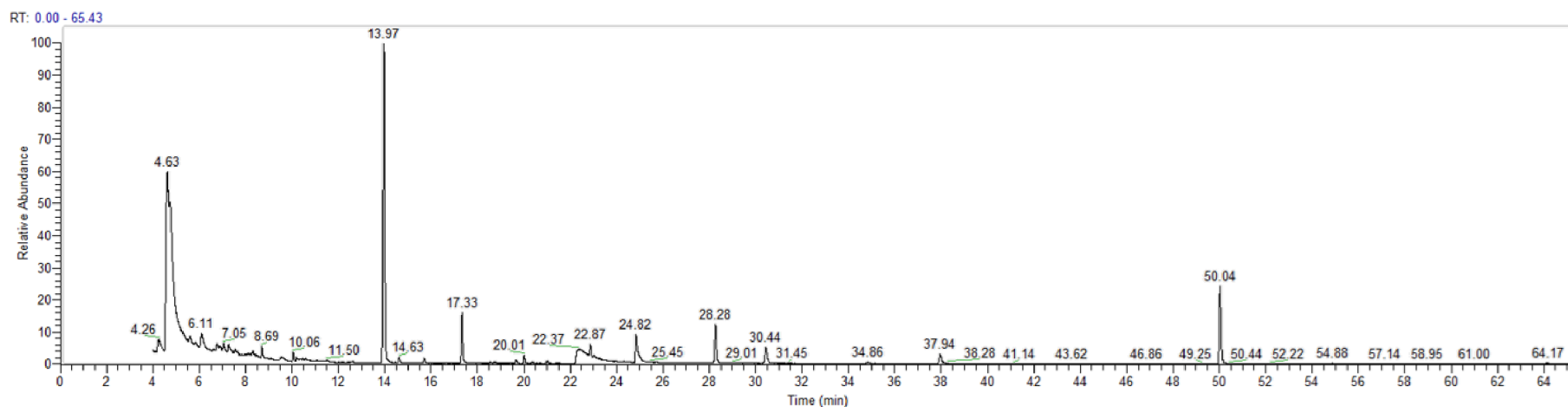
Příloha 2: Ukázka chromatogramu identifikovaných těkavých látek ve vzorku standardního sýra; identifikace sloučenin viz tabulka 8



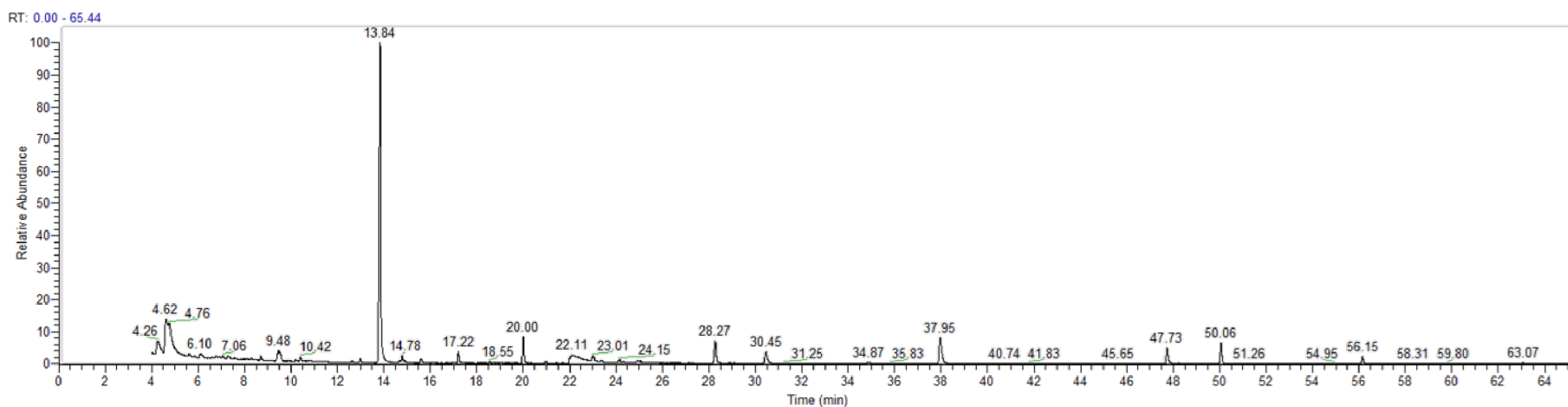
Příloha 3: Ukázka chromatogramu identifikovaných těkavých látek ve vzorku analogu s přidavkem mandlového oleje; identifikace sloučenin viz tabulka 8



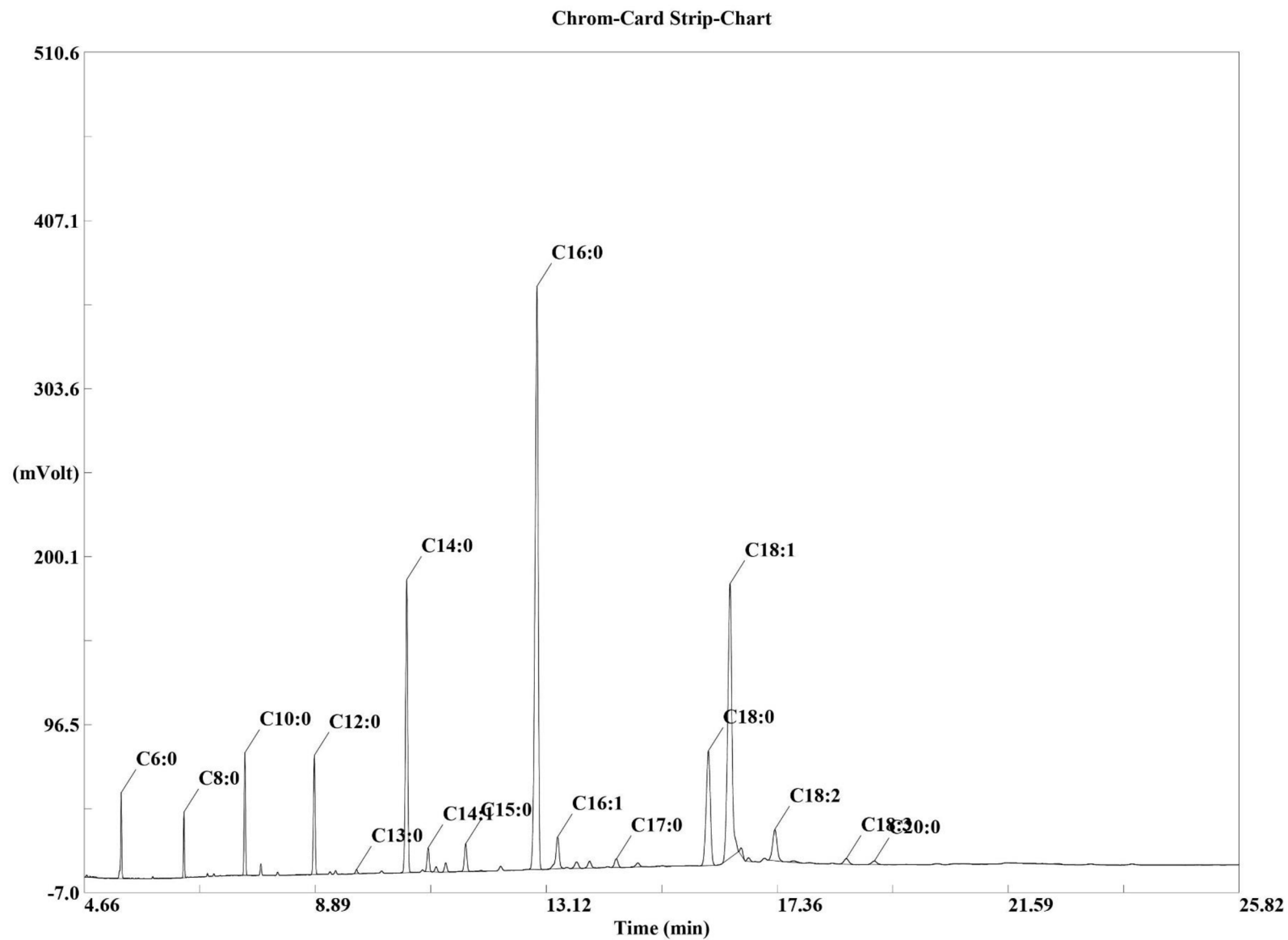
Příloha 4: Ukázka chromatogramu identifikovaných těkavých látek ve vzorku analogu s přidavkem liskoořechového oleje; identifikace sloučenin viz tabulka 8



Příloha 5: Ukázka chromatogramu identifikovaných těkavých látek ve vzorku analogu s přidavkem oleje z vlašských ořechů; identifikace sloučenin viz tabulka 8



Příloha 6: Ukázka chromatogramu identifikovaných vázaných mastných kyselin ve vzorku standardního sýra (100 × zředěno); identifikace viz tabulka 11



Příloha 7: Ukázka chromatogramu identifikovaných volných mastných kyselin ve vzorku standardního sýra; identifikace viz tabulka 12

