



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**ZMĚNY AROMATICKY AKTIVNÍCH LÁTEK BĚHEM
VÝROBY MODELOVÉHO SÝRA**

CHANGES OF AROMA ACTIVE COMPOUNDS DURING PRODUCTION OF MODEL CHEESE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Dominika Školová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1067/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Dominika Školová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Eva Vítová, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Změny aromaticky aktivních látek během výroby modelového sýra

Zadání diplomové práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:
 - sýry s vysokodohřívanou sýřeninou – charakteristika, složení, vlastnosti
 - aromaticky aktivní látky v sýrech s vysokodohřívanou sýřeninou
 - možnosti stanovení aromaticky aktivních látek v sýrech - princip, provedení, přehled aplikací
2. Pomocí metody SPME-GC-MS identifikujte aromaticky aktivní látky ve vzorcích sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou
3. Diskutujte změny aromaticky aktivních látek v průběhu výroby

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

Bc. Dominika Školová
student(ka)

Ing. Eva Vítová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo identifikovat aromaticky aktivní látky v modelových sýrech typu Moravský bochník, diskutovat jejich změny v průběhu zrání a posoudit vliv aplikace různých poměrů mikrobiálních kultur na počet těkavých látek. Pro identifikaci těkavých látek byla vybrána metoda SPME-GC-MS. Celkově bylo identifikováno 148 těkavých látek, z nichž 82 lze považovat za prokazatelně aromaticky aktivní.

Pro výrobu modelových sýrů byly použity tři mikrobiální kultury, resp. jejich různé kombinace s převažující mezofilní nebo termofilní kulturou. Nepodařilo se prokázat vliv převahy mezofilní/termofilní kultury na počet aromatických sloučenin v sýrech; z hlediska sensorické kvality se více osvědčily kombinace s převažující mezofilní kulturou.

V průběhu zrání sýrů docházelo ke snižování počtu identifikovaných sloučenin u všech sledovaných kombinací kultur. Za optimální dobu zrání sýrů lze považovat dobu 3 měsíce.

ABSTRACT

The aim of the work was identification of aroma active compounds in „Moravský bochník“ cheese type, than discuss their changes during ripening and consider influence of application different rates of microbial cultures on number of volatile compounds. SPME-GC-MS was used for identification of volatile compounds. In total, 148 of volatile compounds were identified and 82 of them are considered as aroma active compounds.

Three microbial cultures (their combination with predominant thermophilic or mesophilic culture) were used for making samples. The influence of predominant thermophilic/mesophilic culture on number of volatile compounds was not proved. From the point of view of sensory quality, combinations with predominant mesophilic culture proved to be more successful.

During ripening, the number of identified compounds was reduced in all the combinations of cultures studied. The optimal time for ripening seems to be three months.

KLÍČOVÁ SLOVA

sýry, aromaticky aktivní látky, SPME, GC-MS

KEY WORDS

cheese, aroma active compounds, SPME, GC-MS

ŠKOLOVÁ, D. *Změny aromaticky aktivních látek během výroby modelového sýra*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 81 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Poděkování:

Ráda bych poděkovala paní Ing. Evě Vítové, PhD. za ochotu, laskavost, odborné i cenné rady, které mi usnadnily vypracování této práce a také Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně za poskytnuté vzorky.

Obsah

1 ÚVOD	7
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	8
2.1 SÝRY S VYSOKODOHŘÍVANOU SÝŘENINOU.....	8
2.1.1 SÝRY EMENTÁLSKÉHO TYPU.....	9
2.1.2 SÝRY TYPU MORAVSKÝ BOCHNÍK.....	14
2.2 AROMATICKÉ LÁTKY SÝRŮ S VYSOKODOHŘÍVANOU SÝŘENINOU	15
2.2.1 METABOLISMUS LAKTÓZY, LAKTÁTU A CITRÁTU	16
2.2.2 LIPOLÝZA, METABOLISMUS MASTNÝCH KYSELIN	18
2.2.3 PROTEOLÝZA	19
2.2.4 KATABOLISMUS AMINOKYSELIN	20
2.2.5 TĚKAVÉ (AROMATICKY AKTIVNÍ) LÁTKY EMENTÁLU	23
2.3 POUŽITÉ METODY A EXPERIMENTÁLNÍ TECHNIKY.....	28
2.3.1 IZOLACE AROMATICKY AKTIVNÍCH LÁTEK ZE SÝRŮ	28
2.3.2 ANALYTICKÉ METODY STANOVENÍ AROMATICKÝCH LÁTEK V SÝRECH	31
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
3.1 ANALYZOVANÉ VZORKY.....	33
3.1.1 POUŽITÉ MLÉKAŘSKÉ STARTOVACÍ KULTURY.....	33
3.1.2 TECHNOLOGIE VÝROBY MODELOVÝCH SÝRŮ.....	34
3.2 LABORATORNÍ VYBAVENÍ.....	35
3.2.1 PŘÍSTROJE	35
3.2.2 PLYNY	35
3.2.3 PRACOVNÍ POMŮCKY	35
3.3 POUŽITÁ METODA SPME-GC- MS.....	35
3.3.1 PODMÍNKY SPME EXTRAKCE.....	35
3.3.2 PODMÍNKY GC-MS ANALÝZY	35
3.4 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ.....	36
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	37
4.1 IDENTIFIKACE TĚKAVÝCH LÁTEK VE VZORCÍCH SÝRŮ.....	37
4.2 SROVNÁNÍ IDENTIFIKOVANÝCH SLOUČENIN VE VZORCÍCH MODELOVÝCH SÝRŮ	39
4.2.1 TĚKAVÉ SLOUČENINY IDENTIFIKOVANÉ VE VZORCÍCH V1 – V4.....	39
4.2.2 TĚKAVÉ SLOUČENINY IDENTIFIKOVANÉ VE VZORCÍCH V5 – V7.....	40
4.2.3 TĚKAVÉ SLOUČENINY IDENTIFIKOVANÉ VE VZORCÍCH V9 – V10.....	41
4.2.4 TĚKAVÉ SLOUČENINY IDENTIFIKOVANÉ VE VZORCÍCH V1 – V3 (KONEČNÁ FÁZE ZRÁNÍ)....	42
4.2.5 ZMĚNY IDENTIFIKOVANÝCH TĚKAVÝCH SLOUČENIN V PRŮBĚHU ZRÁNÍ SÝRŮ	43

5 ZÁVĚR.....	48
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	49
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	54
8 PŘÍLOHY	55

1 ÚVOD

Sýry patří mezi potraviny, které dnes nalezneme téměř v každé domácnosti. Jednou z výhod zpracování mléka na sýry je prodloužení trvanlivosti a zakonzcentrování nutričně hodnotných látek. Jedná se o mléčné výrobky obsahující tuky, bílkoviny, vitaminy, minerální látky. Nalezneme zde také ušlechtilé plísňe, kvasinky, bakterie atd. Na pultech v našich obchodech se můžeme setkat i s tzv. sýrovými analogy. U těchto výrobků bývá mléčný tuk nahrazen rostlinnými oleji, což výrazně ovlivňuje jak chuť, tak výživovou hodnotu a cenu.

Základem vysoké nutriční hodnoty sýrů je především obsah přítomných tuků a bílkovin. Tuk dodává sýrům chuť, texturu a jedná se také o energeticky nejbohatší složku. Obsahuje vitaminy rozpustné v tucích, jako jsou A, D, E. Obsažený vápník je důležitý pro správný vývoj kostí, volné esenciální aminokyseliny slouží k regeneraci tkání a jejich tvorbu.

Tato práce se zabývá sýry typu Moravský bochník, které se řadí mezi sýry s vysokodohřívanou syřeninou. To znamená, že se sýrové zrno v syrovátce dohřívá na teplotu 48-54°C. Při této teplotě je eliminována většina nežádoucích mikroorganismů. Dochází také k potlačení příliš intenzivní proteolýzy a k inaktivaci syřidla.

Jedním z hlavních kritérií pro přijetí výrobku spotřebitelem je flavour, jehož součástí je i aroma, na kterém se podílí řada aromaticky aktivních látek. Jedná se o těkavé sloučeniny, jako jsou alkoholy, ketony, aldehydy, estery, mastné kyseliny a laktony. U sýrů tyto sloučeniny vznikají na základě metabolických přeměn laktózy, lipidů a proteinů během jejich zrání a skladování.

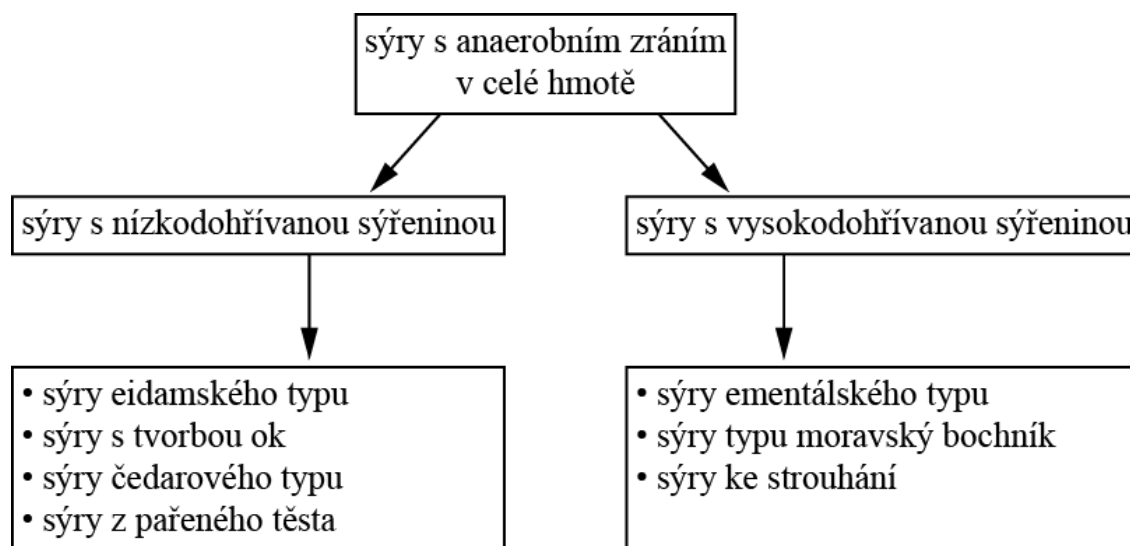
Cílem této práce bylo zpracovat literární rešerši na dané téma a identifikovat aromaticky aktivní látky v modelových vzorcích sýrů typu Moravský bochník a následně diskutovat jejich změny v průběhu výroby.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Sýry s vysokodohřívanou sýřeninou

V této kapitole budou charakterizovány sýry s vysokodohřívanou sýřeninou, jejich vlastnosti, změny ve složení díky působení mikroorganismů a stručně bude zmíněna technologie jejich výroby. Vzhledem k tomu, že o sýrech typu Moravský bochník je dostupných poměrně velmi málo informací, hlavní pozornost bude věnována sýrům ementálského typu, poněvadž se jedná o sýry příbuzné, s podobnými vlastnostmi i technologií výroby.

Sýry s anaerobním zráním v celé hmotě můžeme rozdělit na sýry s nízkodohřívanou a s vysokodohřívanou sýřeninou (viz Obr. 1). Sýry s nízkodohřívanou sýřeninou zahrnují sýry eidamského typu, sýry s tvorbou ok, sýry čedarového typu a sýry z pařeného těsta. Pro tyto sýry je charakteristické dohřívání sýrového zrna horkou vodou na teploty do 40 °C. Pokud mají sýry nižší obsah tuku, pak vyžadují nižší teploty a kratší dobu zpracování. Sýry s vysokodohřívanou sýřeninou patří mezi tvrdé, případně extra tvrdé sýry. Pro jejich výrobu je třeba zajistit mléko nejvyšší kvality s co nejšetrnějším tepelným ošetřením. Může se použít i termizované, popřípadě syrové mléko. Společným znakem těchto sýrů jsou vysoké dohřívací teploty, které se pohybují v rozmezí 48-56 °C. Řadíme sem sýry ementálského typu, sýry typu moravský bochník a sýry ke strouhání. Pro sýry ke strouhání je důležité maximální oddělení syrovátky při jednotlivých výrobních operacích. Vyrábějí se většinou s nižším obsahem tuku v sušině (30 %). Jsou typické svou dlouhou dobou zrání (jeden rok, v extrémních případech i tři roky). Mezi nejznámější sýry ke strouhání patří italský Parmazán a Grana Padano, švýcarský Sbrinz a u nás vyráběný „parmazán“ Gran Moravia. [1].



Obr. 1: Rozdělení sýrů

2.1.1 Sýry ementálského typu

Ementál byl poprvé vyroben v údolí řeky Emme ve Švýcarsku tradičním postupem ze syrového mléka okyseleného pomocí termofilních bakterií mléčného kvašení. Dnes jsou však sýry ementálského typu (známé též jako sýry švýcarského typu) vyráběny v mnoha zemích a v různých variantách. Patří sem například sýry Jarlsberg, Maasdamer, Leerdamer a mnoho dalších. Řadíme je mezi tvrdé a polotvrdé sýry. Tyto sýry jsou však vyráběny odlišným způsobem oproti tradiční švýcarské výrobě. Liší se ve způsobu ošetření mléka, v použitých startovacích kulturách, v míře mechanizace celého procesu, v hmotnosti, tvaru, délce zráního času a trvanlivosti. Mezi charakteristické znaky švýcarského Ementálu patří:

- válcovitý tvar
- pevná suchá kůra
- váha 60-130 kg
- v celém bochníku sýra se nachází 1000-2000 ok o průměru 1-4 cm způsobených propionovým kvašením
- flavour (chut' a vůně) - jemný, lehce nasládlý, více aromatický s rostoucím stářím sýra
- slonovinová až lehce žlutá barva, lehce elastická textura

Sýry ementálského typu jsou charakteristické svými oky, která mají průměr přibližně kolem 2 cm. Avšak některé sýry, jako Gruyère, je mohou mít, ale nejsou nezbytné. Oka vznikají díky metabolické aktivitě propionových bakterií, které metabolizují laktát produkovaný laktobacily na kyselinu propionovou, octovou, oxid uhličitý a vodu. Spontánní propionová fermentace vede k nepravidelné formaci ok, kdy počet a velikost ok velmi kolísají. Při této fermentaci jsou běžné i praskliny a trhliny sýra. Příkladem spontánní propionové fermentace jsou sýry Comté a Beaufort. Je to způsobeno velkou rozmanitostí přírodní propionové mikroflóry. Při aplikaci vybraných kultur propionového kvašení však dochází k pravidelné formaci sýrových ok jako výsledek fermentace, která je pod kontrolou. Ke správnému vývoji ok musí být nezbytně splněny tyto tři podmínky:

- Zrání sýrů při teplotě 20-24 °C umožňující rychlý růst propionových bakterií a změkčení sýra, jež umožňuje správný vývoj ok.
- Relativně nízký obsah soli kvůli citlivosti propionových bakterií.
- Fyzikální vlastnosti syřeniny - musí být dostatečně elastická a flexibilní, aby mohla udržet plyn a vytvořit žádoucí oka.

Ke vzniku charakteristického jemného oříškového flavouru přispívají volné mastné kyseliny s krátkým řetězcem uvolněné lipolýzou mléčného tuku a tvorba kyseliny octové a propionové při propionovém kvašení. Pro vznik charakteristického flavouru je tedy nezbytné:

- dohřívání při vysoké teplotě
- propionové kvašení
- lipolýza
- proteolýza.

Sýřenina se dohřívá při teplotě přibližně 54 °C, kdy dochází k denaturaci většiny syřidla. Po odstranění syrovátky následuje formování a okyselení. Tento postup vede k vysokému obsahu vápníku, který spolu s nízkou aktivitou syřidla (nízký stupeň proteolýzy) dává sýru elastickou texturu. Sýry ementálského typu zrají nejméně 4 měsíce, z čehož přibližně 3-6 týdnů zrají při teplotě 22 °C kvůli tvorbě ok [2].

2.1.1.1 Bakterie mléčného kvašení

Při výrobě tvrdých sýrů ementálského typu se jako startovací kultury používají termofilní mléčné bakterie a to hlavně za použití směsných kultur laktobacilů (*Lactobacillus helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*) a streptokoků (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*). Zaručují nejméně 90% homofermentativní přeměnu laktózy na laktát. Streptokoky produkují pouze L-kyselinu mléčnou, zatímco *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* přeměňuje laktózu pouze na D-laktát. Oba izomery jsou produkovány *Lb. helveticus* [2].

Lb. helveticus nefermentuje pentózy ani glukonát. Laktózu hydrolyzuje pomocí enzymu β -galaktosidázy, který je indukován v přítomnosti laktózy a v nepřítomnosti fosfo- β -galaktosidázy. Toto indikuje přenos laktózy do buňky pomocí permeázy (membránový transportní protein), kde se hydrolyzuje na glukózu a galaktózu. Glukóza a galaktóza jsou metabolizovány pomocí glykolýzy za vzniku hlavně kyseliny mléčné. *Lb. helveticus* disponuje obecně větší proteolytickou aktivitou, než jiné studované laktobacily. Aktivita a vyváženost proteináz a peptidáz se mezi kmeny liší, jedná se však o důležitou vlastnost při zrání sýrů. Proteinázy z různých kmenů mají různou specifitu, např. některé hydrolyzují α -s₁ a β -kaseiny bez preferencí, jiné hydrolyzují pouze β -kaseiny a některé další dají přednost α -s₁-kaseinům. Většina obecných a specifických aminopeptidáz a endopeptidáz byla identifikována v různých kmenech *Lb. helveticus*. Všechny jsou pravděpodobně umístěny intracelulárně. Kmeny tohoto mikroorganismu vykazují další biologické aktivity, které mohou přispívat k flavouru v sýrech, ale nebyly dosud studovány tak podrobně, jako jejich proteolytická aktivita. Např. esterázová aktivita je vyšší než lipázová aktivita a inkubace *Lb. helveticus* s aminokyselinami produkuje řadu sloučenin přispívajících k flavouru sýrů [3].

Laktobacily rostou nejlépe při teplotě 38-45 °C a jejich optimální pH rozpětí se pohybuje mezi 5-5,5. Laktóza je plně hydrolyzovaná během 4-6 hodin po přidavku startovací kultury, mléčné kvašení je dokončeno po 24 hodinách. Galaktóza z rozložené laktózy není využita streptokoky, ale je metabolizována laktobacily. Celkově je jeden mol laktózy fermentován na 2 moly laktátu a 1 mol galaktózy, zatímco u mezofilních mléčných bakterií je laktóza přeměněna na laktózu-6-fosfát a ta je kompletně metabolizována na 4 moly laktátu. Kyselina mléčná nejenže inhibuje růst nežádoucích mikroorganismů, ale zároveň ovlivňuje synerezi sýřeniny, tudíž i texturu a proteolýzu v sýrech. V některých oblastech se přidávají do večerního mléka mezofilní kultury laktokoků (*Lactococcus lactis*) [4,5].

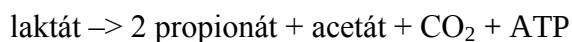
Pro streptokoky je optimální teplota růstu 38-42 °C a jejich pH optimum se pohybuje mezi 6-6,5. Streptokoky jsou stimulovány produkty rozkladu kaseinů díky aktivitě proteináz laktobacilů a přispívají tvorbou kyseliny mravenčí a oxidu uhličitého, který naopak stimuluje laktobacily. Streptokoky jsou důležitou součástí startovací termofilní kultury a jsou zodpovědné za rychlou produkci kyselin. Neschopnost *Sc. thermophilus* metabolizovat

galaktózu vede k její exkreci z buňky a hromadění v sýrech, kde ji využívají laktobacily. Pokud by startovací kultura nebyla schopna odbourávat galaktózu, výsledkem by mohl být atypický sýr. V proteolýze hrají streptokoky minoritní roli [4, 5].

Heterofermentativní laktobacily jsou grampozitivní, mikroaerofilní tyčinky. Přeměňují hexózy pomocí glykolýzy na kyselinu mléčnou a v malém množství také na kyselinu octovou, mravenčí a ethanol. Pentózy jsou katabolizovány na kyselinu mléčnou a octovou pomocí fosfoketolázy. Do této skupiny mikroorganismů patří *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus*, které se přirozeně vyskytují v syrovém mléce. Během zrání sýrů rostou díky využívání citrátu, který se nachází v čerstvých nezralých sýrech. Oba druhy jsou schopny růst při teplotě 15 °C. *Lactobacillus rhamnosus* je jediný druh fakultativně heterofermentativního laktobacila, který je schopen růst při teplotě 45 °C. Při přidavku kultur *Lb. casei* nebo *Lb. rhamnosus* je snáze kontrolováno propionové kvašení a zároveň je minimalizováno riziko pozdní fermentace. Přesný mechanismus zatím není znám; předpokládá se kompetice mezi různými mikroorganismy o přístupný substrát. Kultury fakultativně heterofermentativních laktobacilů jsou široce využívány výrobci švýcarských Ementálů a jsou přidávány do mléka spolu se startovacími kulturami [5].

2.1.1.2 Bakterie propionového kvašení

Propionová fermentace je nezbytná pro všechny sýry ementálského typu. Díky ní mají tyto sýry svá charakteristická oka a oříškovou příchut'. Fermentace je iniciována přidavkem propionových bakterií, obsahujících většinou druh *Propionibacterium freudenreichii*. Jedná se o grampozitivní, krátké tyčinky. Jejich optimální pH pro růst se pohybuje v rozmezí 6-7, optimální teplota pro růst je 30 °C, ale růst se pomalu projevuje již při 14 °C. Propionové bakterie jsou anaerobní až aerotolerantní. Pro výrobu sýra ementálského typu stačí velmi malé množství inokula propionové kultury (pouze několik set kolonií pro nádrž obsahující 1000 l mléka). Propionová fermentace začíná kolem 30. dne od počátku výroby v tzv. kvasném sklepe při teplotě 20-24 °C po dobu přibližně 7 týdnů a poté probíhá pomalejší rychlostí při teplotě 10-13 °C. Laktát produkovaný mléčnou startovací kulturou je rozložen na propionát, acetát a oxid uhličitý podle následující rovnice:



Pokud je přítomen aspartát, pak je fermentace kombinována s deaminací aspartátu na sukcinát podle následující rovnice:



V přítomnosti aspartátu je tedy přeměněno více laktátu na acetát a oxid uhličitý, než na propionát. Kmeny schopné deaminace aspartátu fermentují větší množství laktátu,

tudíž jsou v sýrech přítomny ve větším množství než kmeny, které aspartát nevyužívají. Větší množství propionových bakterií tvoří větší množství acetátu, sukcinátu a oxidu uhličitého, a tedy více intenzivní flavour a větší oka. Schopnost kmenů využívat aspartát je velmi důležitý faktor při výběru nových kultur. Na druhou stranu vysoká aktivita aspartázy snižuje množství oxidu uhličitého a vzniká riziko pozdní fermentace. Nicméně přiměřená aktivita aspartázy může mít pozitivní efekt na kvalitu tvorby ok a intenzitu flavouru [5]. Velkých ok je možno dosáhnout při použití *Lb. helveticus* spolu s kulturami propionových bakterií se silnou aspartázovou aktivitou, zatímco malých ok se dosáhne při použití fakultativně heterofermentativních laktobacilů (kmeny *Lactobacillus casei*) spolu s propionovými kulturami se slabou aspartázovou aktivitou [6].

Ve výzkumech se prokázalo, že termofilní bakterie mléčného kvašení (hlavně *Lb. delbruecki* a *Lb. helveticus*) mohou stimulovat růst propionových bakterií. Ve studii byl růst propionových bakterií přímo závislý na koncentraci volných aminokyselin v sýru bez ohledu na kmeny laktobacilů obsažené v kulturách. Růst těchto kultur byl závislý na proteolytické aktivitě bakterií mléčného kvašení. Stimulující vliv *Sc. thermophilus* byl malý, pravděpodobně z důvodu nízké produkce množství aminokyselin v mléce nebo sýru. Laktobacily, které prodělaly buněčnou lyzi, krátce po výrobě sýru produkovaly velké množství aminokyselin. U fakultativně heterofermentativních bakterií se ukázalo, že snížily riziko sekundární fermentace v Ementálu. Propionové bakterie jsou schopny růst již při teplotě 14 °C, a proto mají větší tendenci způsobit sekundární fermentaci v porovnání s bakteriemi, které nejsou schopny při této teplotě růst [7].

Další metabolickou dráhou, kterou propionové bakterie využívají, je fixace oxidu uhličitého za vzniku sukcinátu, což vede ke snížení množství oxidu uhličitého v sýru. Tato cesta však není využívána často a není ještě plně prozkoumána. Proteolytická aktivita propionových bakterií nemá velký význam, jejich lipolytická aktivita však může mít vliv na vývoj flavouru během zrání sýrů [5].

2.1.1.3 Technologie výroby sýrů ementálského typu

Mléko pro výrobu sýrů ementálského typu by mělo obsahovat co nejméně bakterií, aby měla startovací kultura optimální účinky. Pokud je použito syrové mléko, jsou na něj kladeny velice přísné požadavky z hlediska mikrobiálního. Mikrobiální a hygienický status syrového mléka záleží na způsobu získávání, teplotě a době skladování. Je třeba se vyhnout sekundární kontaminaci před, během i po výrobě. Švýcarský Ementál se vyrábí ze syrového mléka získaného od krav, které nejsou krmeny siláží [2, 5].

Veškeré pořadí technologických operací je uzpůsobeno k vytvoření optimálních podmínek pro propionové kvašení. Základním krokem je přidavek vody (12-18%) do mléka nebo sýřeniny, což vede k poměrně vysokému pH po mléčném kvašení (5,2-5,3). Vyšší pH urychluje propionové kvašení. Tento krok vede k měkké a elastické textuře a také k vysokému obsahu vápníku v sýrech. Aby nedocházelo k nežádoucím fermentacím v sýrech, je třeba se vyhnout zbytkovému cukru (galaktóza) po mléčném kvašení [2, 5].

Jak již bylo zmíněno, většina sýrů švýcarského typu potřebuje vysokou dohřívací teplotu. Sýřenina je po rozkrájení zahřata na teplotu 52-54 °C. Během lisování teplota zůstává na 50 °C a udržuje se tak mnoho hodin. Při této teplotě sýřenina vysychá a většina nežádoucích mikroorganismů je eliminována. Teplota není důležitá pouze pro hygienickou kvalitu sýrů, ale je důležitá také pro potlačení příliš intenzivní proteolýzy, což by vedlo ke krátkým peptidovým řetězcům a vzniku drobné textury sýrů a zvýšení rizika praskání sýrů během zrání. Vysoká teplota rovněž zabezpečí kompletní inaktivaci chymosinu (syřidla). Teplota nad 54 °C už silně poškozuje bakterie propionového kvašení [2, 5].

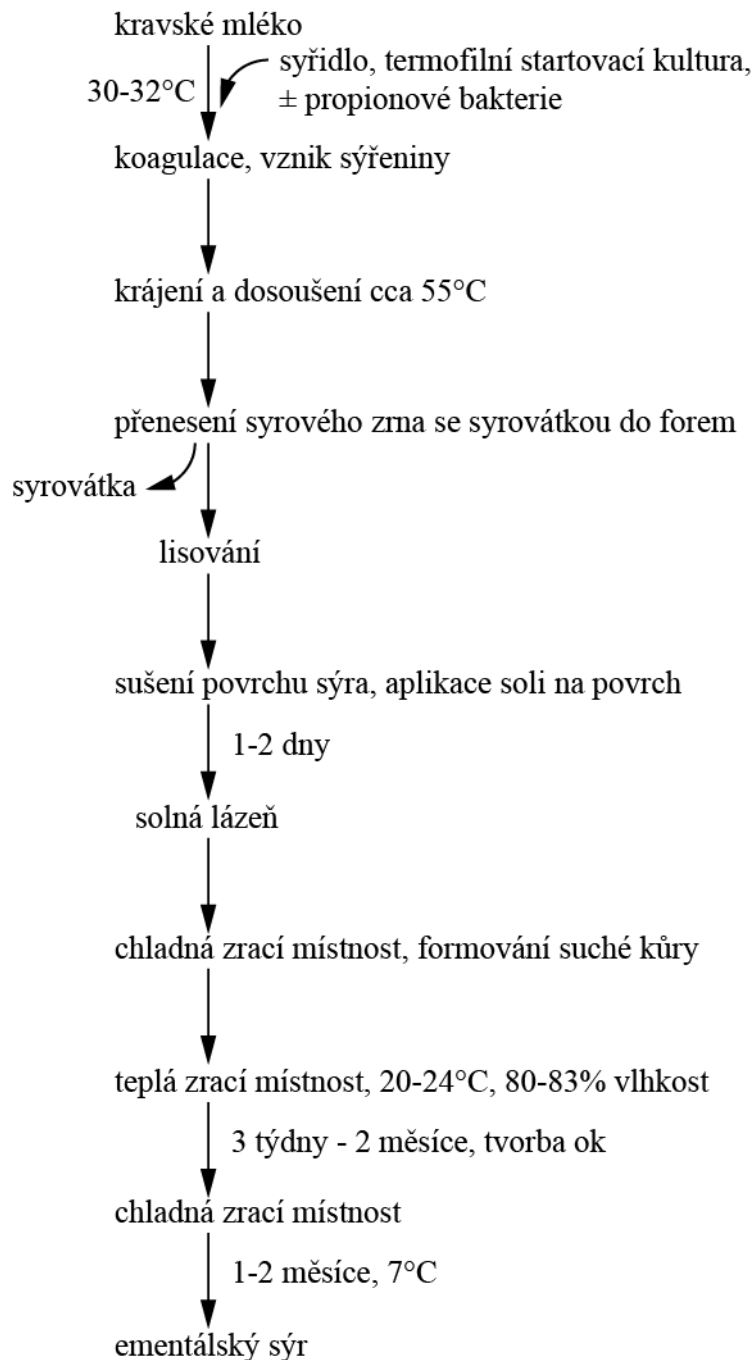
Sýry ementálského typu jsou často vyráběny v měděných nádržích a jsou lisovány do válcovitého tvaru. Určité množství mědi přechází z povrchu měděných nádrží do sýra. Obsah mědi by neměl být příliš vysoký, protože inhibuje tvorbu kyseliny mléčné a propionové. Na druhou stranu měď tvoří komplexy se sirnými sloučeninami vzniklými z katabolismu aminokyselin, což má pozitivní vliv na flavour a aroma sýrů. Obsah mědi by se měl pohybovat v rozmezí od 120 do 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ [2, 5].

Vzhledem k citlivosti propionových bakterií na sůl je solná lázeň méně koncentrovaná než u jiných sýrů. Průměrný obsah soli ve švýcarských ementálech je 3-5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Tento obsah soli vede ke tvrdému a suchému povrchu sýra, který způsobuje zmenšení ztrát oxidu uhličitého během propionového kvašení, což podporuje tvorbu ok [2, 5].

K iniciaci propionového kvašení musí být udržována teplota zrání 20-24 °C po danou dobu. Podle odkapávání sýrů pozná zkušený výrobce (sýrař) správný čas pro přesun sýrů do teplejších prostor. Jakmile se dokončí tvorba sýrových ok, propionové kvašení se zpomalí přesunutím sýrů do prostoru s nižší teplotou, tzv. zráních sklepů (10-13 °C). U švýcarských sýrů trvá tvorba ok přibližně 40-60 dnů. Relativní vlhkost ve zrací místnosti je poměrně nízká (70-80 %), což opět vede ke tvrdému a suchému povrchu sýra a zamezení ztrát oxidu uhličitého. Nízká vlhkost také urychluje tzv. pocení sýrů (sekrece tuku) a redukuje tím růst plísní na povrchu a tudíž i čas nutný k jejich manuálnímu čištění. Rozmanitost doby zrání je široká [2, 5].

V poslední době se ve Švýcarsku přikládá větší význam zrání sýrů v jeskyních při vyšší vlhkosti. Díky působení specifických plísní zčerná povrch sýra, proteolýza je intenzivnější, přesto ale proteolytické enzymy plísní nepronikají dovnitř sýrů. Nepřímá, ale silná proteolýza urychluje vzrůst pH díky deacidifikaci povrchu sýra, navíc rozpustné látky produkované plísní pronikají dovnitř sýra [2, 5]. Obecné schéma výroby si lze prohlédnout níže na Obr. 2

.



Obr. 2: Postup výroby Ementálu [2]

2.1.2 Sýry typu moravský bochník

Sýry typu Moravský bochník se ve srovnání s ementálem dohřívají na poněkud nižší teplotu a doba zpracování je kratší. Hlavní rozdíl spočívá ve zrání, kdy sýry typu Moravský bochník zrají pouze ve chladném sklepě, tudíž jsou bez ok [8].

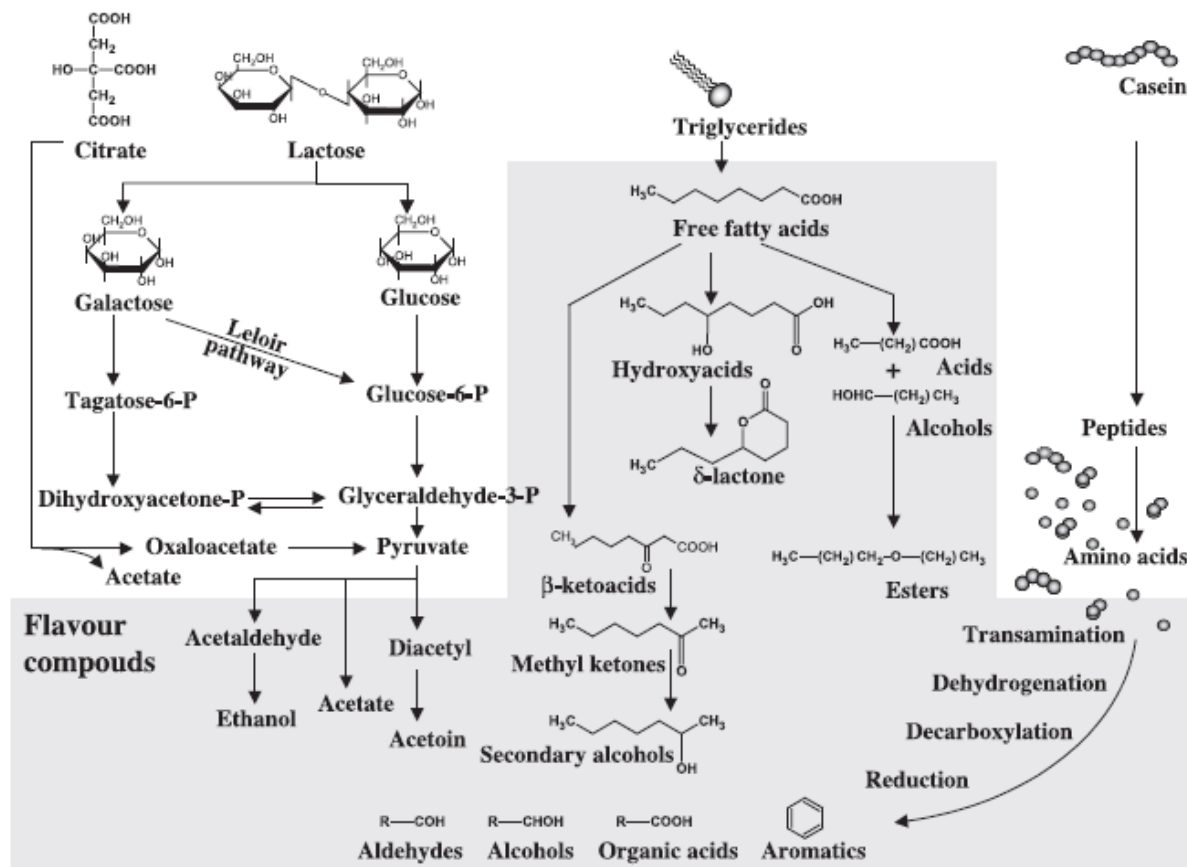
Moravský bochník se začal u nás vyrábět před první světovou válkou, kdy se nedařila výroba ementálského sýra ve tvaru velkého bochníku. V dnešní době se vyrábí ve tvaru hranolu známého jako tzv. moravský blok [9].

Sýřenina se dohřívá při nižší teplotě než ementál (48-52 °C). Dosušené sýrové zrno se vypouští do lisovacích van a lisuje se 60-120 minut. Po vylisování se sýry mechanicky vyjímají z perforovaných forem, mohou se dále krájet na menší bloky o velikosti 30-40 cm. Následuje dvoudenní 20% solná lázeň při teplotě 12-14 °C. Následně se sýry balí za vakua do zracích obalů a vkládají se do zracích palet nebo beden. Doba zrání je 6-8 týdnů při teplotě 12-14 °C a relativní vlhkosti max. 80 %. Moravský bochník má na řezu celistvou a pevnou konzistenci na omak pružnou až vláčnou [9].

Vzhledem k tomu, že se jedná o českou specialitu, Moravské bochníky dosud prakticky nebyly zkoumány; jediná dostupná publikace se věnuje změnám obsahu aminokyselin v tavených sýrech vyrobených z Moravského bochníku v závislosti na použitém sterilačním záhřevu [10].

2.2 Aromatické látky sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou

Aromaticky aktivní látky jsou látky s nízkou molekulovou hmotností, které vznikají během zrání sýrů díky mikrobiologickým a biochemickým pochodům. Tyto látky přispívají k tzv. flavouru (chuti a vůni) sýrů. Biochemické změny během zrání mohou být rozděleny do dvou skupin a to na primární a sekundární děje. Primární děje zahrnují metabolismus zbytkové laktózy, metabolismus citrátu, lipolýzu a proteolýzu. Sekundární děje navazují na primární děje a patří do nich metabolismus mastných kyselin a aminokyselin. Sekundární děje jsou velmi důležité z hlediska tvorby těkavých aromaticky aktivních látek. Při katabolismu aminokyselin se tvoří většina aromaticky aktivních látek, ale zároveň vznikají i látky, které mohou způsobovat off-flavour. Schéma vzniku aromaticky aktivních látek v průběhu zrání sýrů lze vidět na Obr. 3. Sloučeniny označené šedě jsou považovány za aromaticky aktivní [11-13].



Obr. 3: Schéma tvorby aromaticky aktivních látek (šedý rámeček) [13]

Z analytického hlediska se dělí sloučeniny způsobující flavour do dvou hlavních skupin:

- Těkavé
- Netěkavé

Mezi těkavé neboli aromaticky aktivní látky řadíme organické kyseliny s krátkým řetězcem, primární a sekundární alkoholy, methylketony, aldehydy, estery, laktony, alkany, aromatické uhlovodíky, a různé sloučeniny obsahující síru nebo dusík [2].

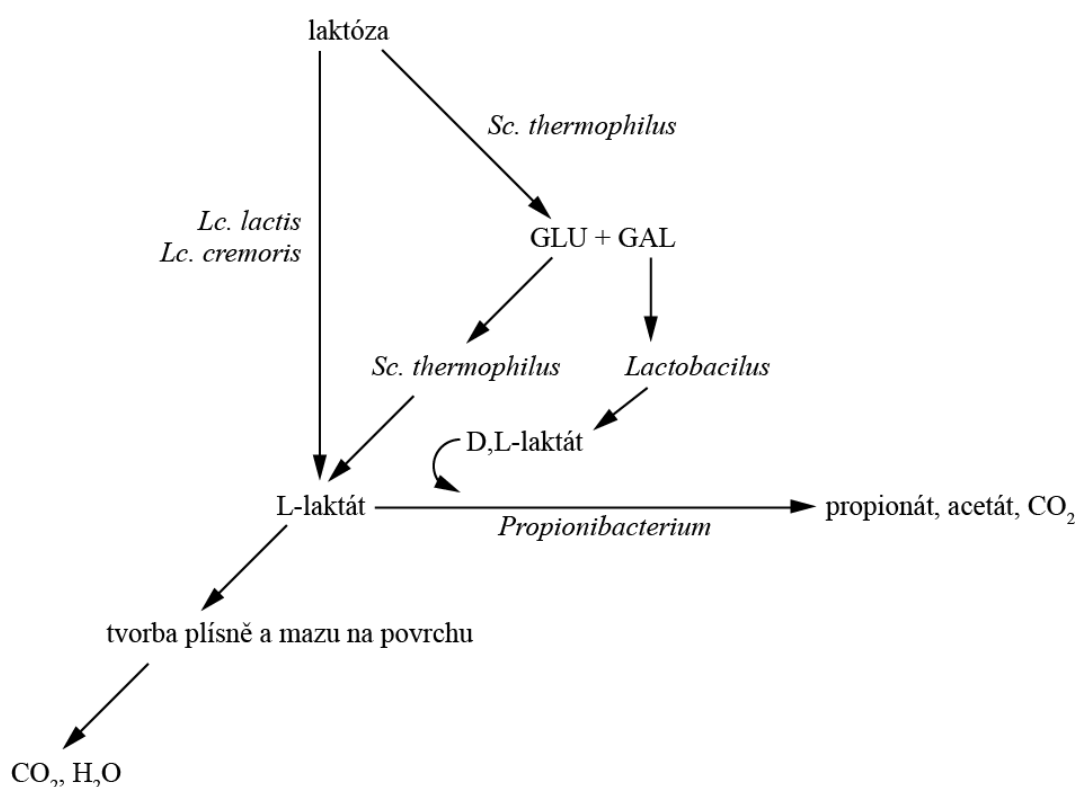
Do skupiny netěkavých látek řadíme peptidy, aminokyseliny, aminy, organické kyseliny, aminy, soli a minerály. Peptidy a volné aminokyseliny přispívají k pozadí flavouru. Volná glutamová kyselina je zodpovědná hlavně za chuť umami. Sůl (NaCl) a další minerály ovlivňují jak slanost, tak nepřímo i celkovou intenzitu aroma sýrů [2].

2.2.1 Metabolismus laktózy, laktátu a citrátu

V závislosti na použité startovací kultuře je laktóza zpracována pomocí glykolýzy (většina bakterií) a nebo fosfoketolázovou dráhou (*Leuconostoc* spp.). Hlavním produktem metabolismu laktózy je L- nebo L+ laktát, popřípadě racemická směs obou. Některé kmeny produkují i další produkty, například rod *Leuconostoc* produkuje ethanol. Některé startovací bakterie (*Streptococcus thermophilus*) nejsou schopny metabolizovat galaktózu (vzniká

po hydrolýze laktózy) a musí růst s galakto-positivními mikroorganismy (laktobacily), aby nedocházelo k akumulaci galaktózy v sýrenině (viz Obr. 4). Produkce D-laktátu během zrání sýrů je pravděpodobně vyšší u sýrů vyráběných ze syrového mléka, což prozatím bylo zkoumáno jen v rámci několika studií. Racemizace laktátu nemá na flavour velký vliv. Rozpustnost Ca-D-laktátu je menší než u Ca-L-laktátu. Ca-D-laktát může krystalizovat za tvorby bílých krystalků [14].

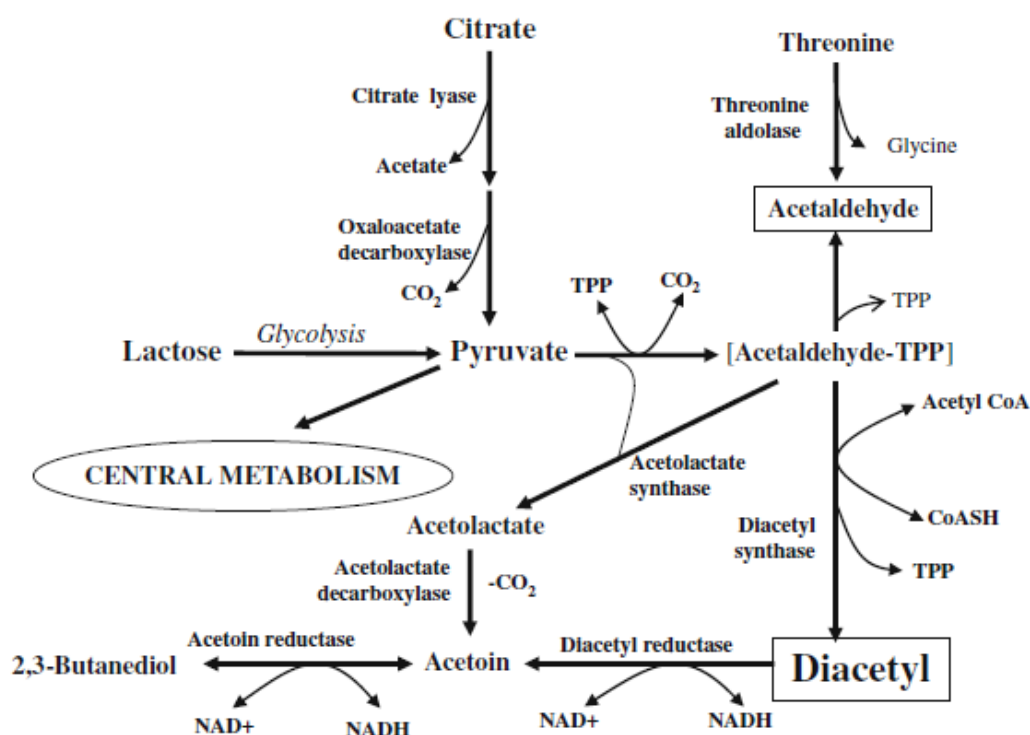
Propionové bakterie v sýrech švýcarského typu začínají růst, jakmile jsou sýry přeneseny do kvasného sklepa. Zde metabolizují L-laktát na propionát, acetát a oxid uhličitý. Jak již bylo zmíněno, oxid uhličitý je důležitý pro tvorbu ok, zatímco acetát a propionát jsou součástí flavouru [14].



Obr. 4: Schéma metabolismu laktózy v sýrech švýcarského typu [5]

Mléko obsahuje přibližně $1750 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ citrátu, kdy většina je ztracena v syrovátce při výrobě sýrů. Citrát je z 94 % obsažen v rozpustné fázi mléka, přesto má jeho nízká koncentrace v sýrenině velký význam pro tvorbu aromaticky aktivních látek. Citrát je metabolizován některými mezofilními startovacími kulturami (laktokoky a *Leuconostoc* spp.), popřípadě některými mezofilními bakteriemi mléčného kvašení, které se nachází v syrovém mléce. Citrát není metabolizován *Sc. thermophilus* nebo jinými termofilními laktobacily. Mezi hlavní aromaticky aktivní látky této dráhy patří acetát, diacetyl, acetoin a 2,3-butandiol. Tyto látky jsou důležité hlavně pro sýry holandského typu, nežádoucí jsou u Čedaru a Cottage sýrů. Diacetyl je důležitý také pro mnoho dalších druhů sýrů, vzhledem k tomu

že může být dále přeměněn na 2,3-butandiol a 2-butanon [13,14]. Schéma tohoto metabolismu je uvedeno na Obr. 5.



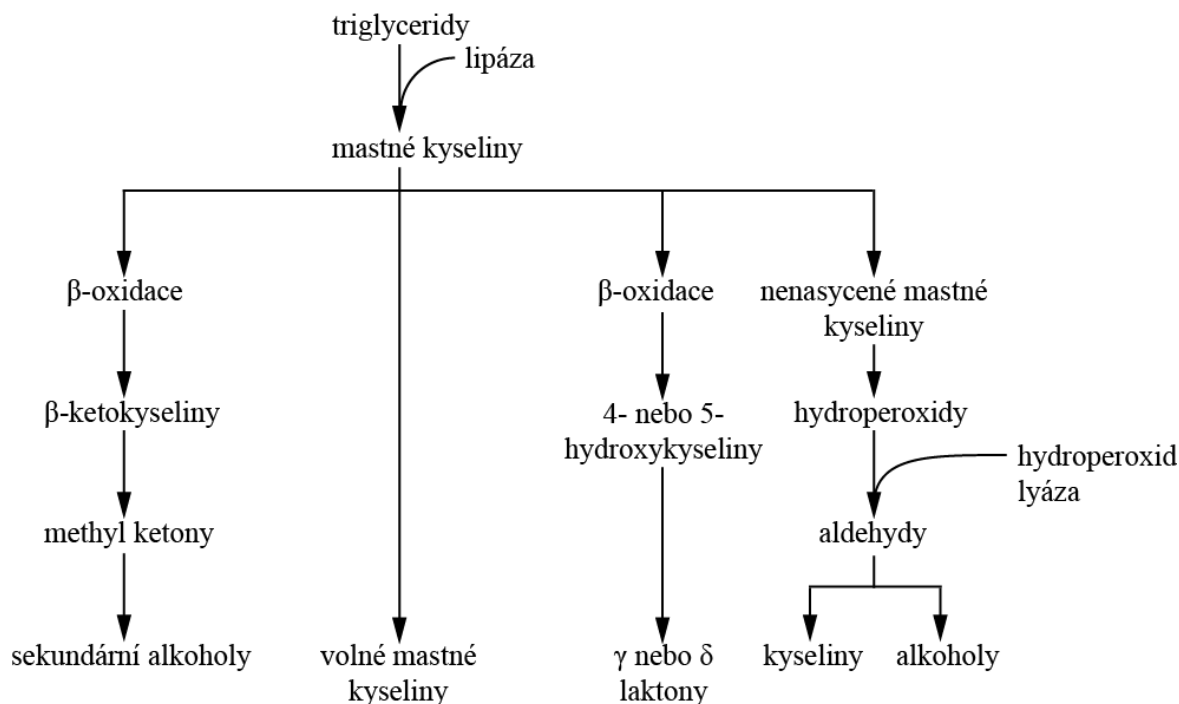
Obr. 5: Metabolismus citrátu u bakterií mléčného kvašení [15]

2.2.2 Lipolýza, metabolismus mastných kyselin

Stupeň lipolýzy a jeho dopad na kvalitu sýru závisí na druhu sýru. Pokud je stupeň lipolýzy u sýrů švýcarského typu a polotvrdých sýrů vyšší než 0,25-1,5 % (Čedar), 1,5 % (Gouda), 1 % (Ementál), 2 % (Comté), pak to může způsobit vadu flavouru, jako je například žluklost. Naopak u některých tvrdých italských sýrů, plesnivých sýrů a u sýrů z kozího mléka je lipolýza mnohem rozsáhlejší a je také důležitá pro jejich typický flavour. Lipolýza v sýrech je výsledkem aktivity mléčných lipoproteinových lipáz spolu s lipázami a esterázami startovacích kultur, popřípadě kultur vyskytujících se přirozeně v mléce. Pouze mastné kyseliny obsahující více jak 6 atomů uhlíku pocházejí výhradně z lipolýzy. Vyšší stupeň lipolýzy je v sýrech vyrobených ze syrového mléka oproti sýrům z pasterizovaného mléka, tudíž se liší i různými druhy volných mastných kyselin [16].

Lipázový a esterázový systém bakterií startovacích kultur byl studován podstatně méně, než jejich proteolytický systém. *Lactococcus* sp. mají slabou lipolytickou aktivitou. Obligátně homofermentativní laktobacily (*Lb. helveticus*, *Lb. delbruecki* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbruecki* subsp. *lactis*) produkují také esterázy, z nichž některé byly studovány. Fakultativně heterofermentativní laktobacily (*Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*), jež se vyskytují v přirozené flóře mléka, mají také slabou lipolytickou aktivitu [17].

Volné mastné kyseliny se účastní flavouru sýrů nepřímo - slouží jako prekurzory pro tvorbu aromaticky aktivních látek viz Obr. 6. [12].



Obr. 6: katabolismus volných mastných kyselin [17]

Estery se běžně nacházejí u mnoha druhů sýrů, vznikají při reakcích volných mastných kyselin spolu s alkoholy. Nejběžnější dostupný alkohol pro tuto reakci je ethanol, proto jsou ethylestery dominantními estery v sýrech. Ethanol je limitující reaktant ve tvorbě esterů, pochází z metabolismu laktózy nebo z katabolismu aminokyselin. Nicméně v sýrech nalezneme také methyl, propyl a butylestery. Thioestery vznikají díky reakci volných mastných kyselin se sulfhydrylovou skupinou, většinou s methanthiolem [12].

Laktony jsou cyklické sloučeniny, které vznikají intramolekulární esterifikací hydroxymastných kyselin. Produkce laktonů během zrání sýru je limitovaná jejich prekurzory, tedy hydroxykyselinami. Hydroxykyseliny mohou vznikat např. redukcí ketonů. Hlavními laktony v sýrech jsou γ - a δ - laktony, které jsou tvořeny pěti až šestistrannými kruhy, tudíž jsou stabilní. Tyto sloučeniny vytváří silný flavour a mohou vznikat z γ - a δ -hydroxy mastných kyselin. V plnotučných sýrech dosahují laktony maximální koncentrace přibližně ve čtrnáctém týdnu zrání, poté jejich koncentrace začíná klesat. Na druhou stranu v nízkotučných sýrech je jejich koncentrace přibližně stejná po celou dobu zrání. Hydroxylace mastných kyselin může být výsledkem běžného katabolismu mastných kyselin nebo může pocházet z nenasycených mastných kyselin díky působení lipoxygenáz nebo hydratáz. [17].

2.2.3 Proteolýza

Proteolýza je důležitý a komplexní děj, odehrávající se během zrání sýrů. Hraje důležitou roli při:

- texturních změnách v důsledku rozpadu proteinové sítě, poklesu vodní aktivity jejíž prostřednictvím jsou vázány volné karboxy a amino skupiny, a vzrůstu pH.
- přímém příspěvku ke tvorbě flavouru a pravděpodobně také off flavouru (kyselost) díky formaci peptidů a volných aminokyselin.
- uvolňování substrátu (aminokyseliny) k sekundárním katabolickým změnám (deaminace, dekarboxylace, transaminace, atd.).
- změnách matrice sýrů, které napomáhají uvolňování aromaticky aktivních látek [17].

Během zrání je proteolýza v sýrech katalyzována enzymy z:

- mléka (plasmin, cathepsin D a pravděpodobně i další somatické buněčné proteinázy),
- koagulantů (chymosin, pepsin, proteinázy z plísní a rostlin),
- startovacích kultur,
- z kultur vyskytujících se přirozeně v mléce,
- sekundárních startovacích kultur (*P. camemberti*, *P. roqueforti*, *Propionibacterium*..),
- exogenních proteináz nebo peptidáz použitých k urychlení zrání [17].

U většiny sýrů je počáteční iniciace hydrolýzy kaseinu způsobena koagulanty a v menší míře plasminy a pravděpodobně somatickými buněčnými proteinázami (cathepsin D), jejichž výsledkem je tvorba dlouhých (ve vodě nerozpustných) a středních (ve vodě rozpustných) peptidů. Tyto peptidy jsou následně rozkládány koagulanty a enzymy ze startovacích kultur, popřípadě kultur vyskytujících se přirozeně v mléce. Produkce kratších peptidů a volných aminokyselin je způsobena aktivitou mikrobiálních proteináz a peptidáz [17].

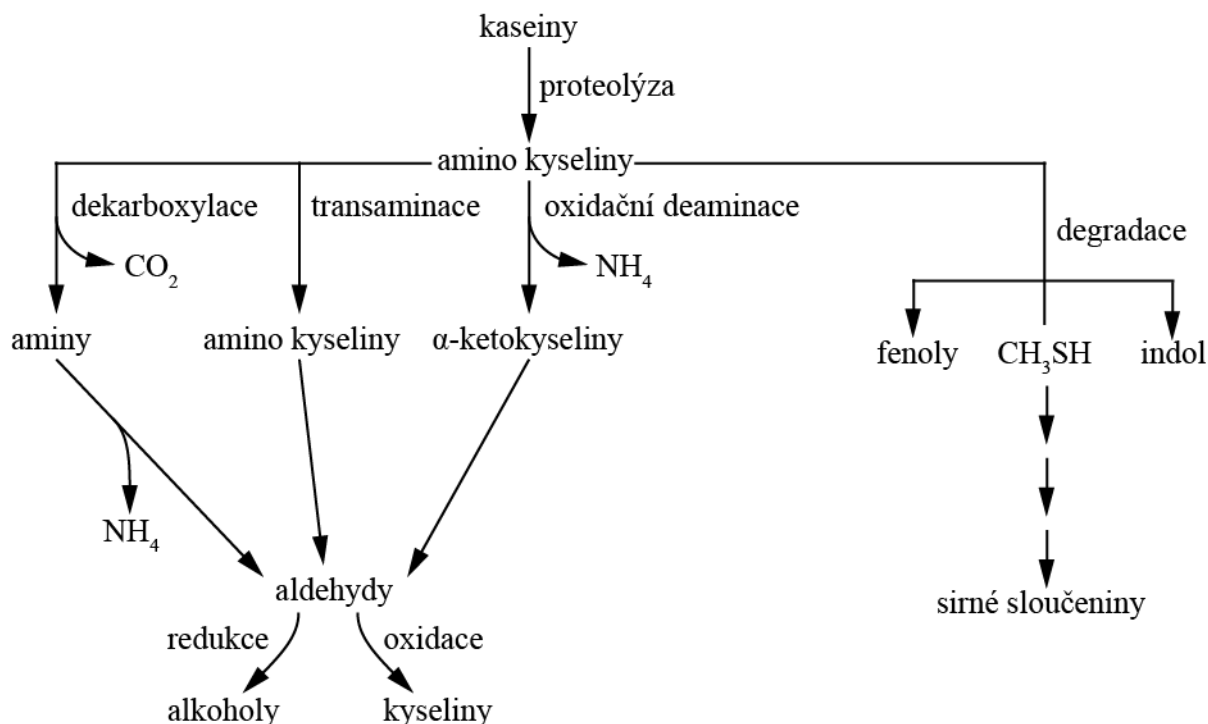
Finálními produkty proteolýzy jsou volné aminokyseliny, jejich koncentrace obecně stoupá během zrání s výjimkou argininu. Stupeň peptidů a volných aminokyselin rozpuštěných v 5% kyselině fosfowolframové se považuje za indikátor míry rozvoje flavouru. Složení aminokyselinových frakcí a relativní poměr individuálních aminokyselin je taktéž důležitý pro vývoj charakteristického flavouru [17].

Malé a středně velké peptidy spolu s volnými aminokyselinami ovlivňují pozadí flavouru mnoha druhů sýrů. Některé konkrétní peptidy jsou charakteristické svou hořkou, oříškovou nebo sladkou příchutí. Nevyvážená proteolýza může vést k nadbytku hořkých peptidů, což může vést k znehodnocení sýru. V dnešní době se využívají specifické kultury se schopností degradovat tyto peptidy a jsou často využívány u různých druhů sýrů [17, 18].

2.2.4 Katabolismus aminokyselin

Katabolismus volných aminokyselin vede k mnoha různorodým látkám, jako jsou amoniak, aminy, aldehydy, fenoly, indoly a alkoholy, všechny tyto látky mohou být součástí aroma sýrů. První fáze katabolismu zahrnuje dekarboxylaci, deaminaci, transaminaci, desulfuraci a pravděpodobně hydrolýzu na bočním řetězci aminokyselin. Druhá fáze zahrnuje konverzi vzniklých látek (aminy, α -aminokyseliny), stejně jako konverzi samotných aminokyselin na aldehydy a to za působení deamináz na aminy. Posledním stupněm katabolismu aminokyselin je redukce aldehydů na alkoholy nebo jejich oxidace na kyseliny.

Aminokyseliny obsahující síru podléhají značné konverzi, jež vede ke tvorbě mnoha sloučenin zahrnující methanthiol a další deriváty síry [17]. Hlavní metabolické dráhy shrnující metabolismus aminokyselin se nachází na Obr. 7



Obr. 7: Katabolismus aminokyselin [17]

Aminotransferázy, spolu s pyridoxal-5'-fosfát dependentními enzymy, přeměňují aminokyseliny na korespondující α -ketokyseliny. Tyto α -ketokyseliny jsou dále degradovány na řadu dalších látek, ať už díky enzymově katalyzovaným reakcím, nebo chemickým reakcím. Nejvíce byly prostudovány aminotransferázy u bakterií mléčného kvašení, avšak pozornost se také upíná na enzymy *Proponibacterium* spp. a *Br. linens* a některé další mikroorganismy. α -ketokyseliny, produkované pomocí aminotransferáz, jsou degradovány pomocí mikroorganismů na aromaticky aktivní sloučeniny pomocí 4 metabolických drah. Mohou být redukovány na příslušné hydroxykyseliny pomocí 2-hydroxykyselin dehydrogenáz. Tyto sloučeniny nemají velký význam, co se týče flavouru, tudíž tato dráha snižuje množství α -ketokyselin, ze kterých by mohly vzniknout aromaticky aktivní látky. α -ketokyseliny (hlavně ty, které vznikly z aromatických aminokyselin) mohou degradovat také chemickými reakcemi za vzniku důležitých aromaticky aktivních látek. Mohou být taktéž dekarboxylovány na korespondující aldehydy. Tyto možnosti jsou však v sýrech méně důležité. Aminotransferázová aktivita byla navržena jako limitující krok v produkci aromaticky aktivních látek v sýrech během jejich zrání. Proto bylo provedeno množství pokusů ke zlepšení flavouru sýrů, kdy byl do sýrů přidán α -ketoglutarát pro zvýšení aminotransferázové aktivity. Po přidavku α -ketoglutarátu do Čedaru byl zjištěn lepší vývoj flavouru; u sýru typu St. Paulin byl pozorován rychlejší katabolismus aminokyselin, ale došlo ke hromadění α -ketokyselin. Tento výsledek napovídal tomu, že degradace α -ketokyselin

na aromaticky aktivní látky by mohla být více limitujícím krokem, než produkce α -ketokyselin z aminokyselin [12].

Aromaticky aktivní látky obsahující síru jsou velmi důležitou součástí flavouru a nacházejí se v mnoha druzích sýrů. Obsah cysteinu v kaseinech je nízký, proto sirné sloučeniny pocházejí především z metabolismu methioninu. Mezi důležité sirné aromaticky aktivní látky patří methanthiol, dimethyldisulfid (DMDS), dimethyltrisulfid (DMTS), methional (β -methyl merkaptopropionaldehyd) a thioestery (vzniklé z reakce thiolu, často methanthiolu, s karboxylovou kyselinou). Mezi enzymy účastníci se reakcí vedoucích k těmto sloučeninám patří methionin- γ -lyáza (přeměňuje methionin na α -ketobutyřát, methanthiol a amoniak), cystathionin- β -lyáza (přeměňuje cystathionin na cystein, α -ketobutyřát a amoniak) [12].

První krok u katabolismu tryptofanu, tyrosinu a fenylalaninu (aromatických aminokyselin) je katalyzován aktivitou aminotransferáz za vzniku α -ketokyselin. Tyto dále degradují za vzniku mnoha aromaticky aktivních látek důležitých pro flavour sýrů. Rozvětvené aminokyseliny leucin, isoleucin a valin jsou degradovány pomocí aminotransferáz za vzniku příslušných α -ketokyselin, jež jsou dále rozkládány na různé sloučeniny. Aminotransferázy schopné transaminace u rozvětvených aminokyselin byly studovány např. u laktokoků, *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* a *Pr. freudenreichii* [12].

Aminokyseliny mohou degradovat také pomocí deaminačních reakcí, kde jsou zapotřebí dehydrogenázy nebo oxidázy. Amoniak vzniklý těmito reakcemi přispívá ke flavouru určitých sýrů švýcarského typu (Gruyère a Comté), sýrů tvořících maz a pravděpodobně u sýrů typu Camembert. Pokud se amoniak produkuje v dostatečném množství, může způsobit vzrůst pH sýrů během jejich zrání [12].

Dekarboxylaci aminokyselin vznikají aminy, které produkují silné a nepříjemné aroma. Navíc mají některé tyto látky (biogenní aminy) na některé konzumenty nepříznivý fyziologický efekt. Dekarboxylace obvykle probíhá při kyselém pH (kolem 5,5) a obvykle také vyžaduje pyridoxal-5'-fosfát spolu s kofaktorem. Rychlost produkce aminů v sýrech závisí na koncentraci prekurzorů - aminokyselin a hlavně také na mikroflóře sýrů, která může být ovlivněna faktory zrání, jako jsou teplota, pH a koncentrace soli. Většinou se nepoužívají startovací kultury s vysokou dekarboxylázovou aktivitou. Některé kmeny *Br. linens* jsou schopny snížit množství biogenních aminů u sýrů tvořících maz [12].

Mnoho různých bakterií mléčného kvašení, a další mikroorganismy vyskytující se v sýrech, byly hodnoceny podle schopnosti degradovat aminokyseliny za tvorby aromaticky aktivních látek. Tato schopnost se stanovovala za využití inkubace zbylých buněk nebo buněčných extraktů v modelových sýrech nebo v syntetických médiích, která obsahovala kasein nebo volné aminokyseliny. Analýza vzniklých produktů byla provedena pomocí GC/MS, popřípadě HPLC. Mnoho mikroorganismů vyskytujících se v sýrech (bakterie mléčného kvašení, *Corynebacterium*, kvasinky, *Geotrichum candidum*) je schopno tvorby aromaticky aktivních látek z aminokyselin; tato schopnost je však silně závislá na kmeni. Propionové bakterie, jako jsou *Propionibacterium freudenreichii* nebo *Probionibacterium shermanii*, jsou spojovány s produkcí karboxylových kyselin z rozvětvených aminokyselin a jsou pravděpodobně nejvíce zodpovědné za jejich tvorbu v sýrech švýcarského typu [20].

Nedávno se ukázalo, že bakterie mléčného kvašení, vyskytující se přirozeně v syrovém mléce, hlavně některé kmeny *Lactobacillus paracasei*, produkují také malé množství alkoholů a aldehydů z rozvětvených aminokyselin, fenylalaninu a methioninu, pokud médium obsahuje casamino kyseliny (směs aminokyselin a některých krátkých peptidů pocházejících z hydrolýzy kaseinu) nebo hydrolyzát laktalbuminu [20, 21]. Některé bakterie mléčného kvašení jako jsou *Lb. lactis* subs. *lactis* a *cremoris*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus* a *Lactobacillus casei* jsou také schopny degradovat methionin na methanthiol, DMDS a DMTS. Nicméně mikrokoky a koryneformní bakterie, hlavně *Brevibacterium linens*, se často používají jako povrchová flóra u mnoha druhů sýrů, vzhledem k lepší produkci methanthiolu a DMDS oproti bakteriím mléčného kvašení. Navíc jsou tyto bakterie schopny tvorby S-methylthioesterů z methanthiolu a různých karboxylových kyselin jako jsou kyselina octová, propionová, isomáselná nebo isovalerová [20].

2.2.5 Těkavé (aromaticky aktivní) látky Ementálu

V následujících tabulkách 1-7 jsou uvedeny aromatické látky nalezené v Ementálu. Tučně jsou vyznačené sloučeniny, které jsou považovány za součást tzv. klíčového aroma. Tyto látky byly stanoveny pomocí plynové chromatografie s olfaktometrickým detektorem [22, 23].

Tabulka 1: Ketony [5, 22, 23]

propanon	2-propanon
3-hydroxybutan-2-on (acetoin)	3-methylbutan-2-on
2,3-butandion (diacetyl)	4-methylpentan-2-on
2-butanon	2-hexanon
2-pentanon	cyklopentanon
2,3-pentandion	2-methylcyklopentanon
2-hexanon	3-methylcyklopentanon
4-methylcyklohexanon	4-heptanon
2-heptanon	2-nonanon
5-methylheptan-2-on	2-undekanon
6-methylheptan-2-on	Acetofenon
6-methylhept-5-en-2-on	1-octen-3-on
2-oktanon	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon
2-ethyl-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon	

Jedním z nejdůležitějších diketonů v sýrech je 2,3-butandion (diacetyl). Diacetyl pochází z metabolismu citrátu díky *Lc. lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis*, *Leconostoc* spp. nebo díky některým laktobacilům. Tvoří důležité aroma u mnoha druhů sýrů, byl identifikován jako klíčový pro aroma Camembertu, Čedaru a Ementálu. Diacetyl je oceňován pro své máslové a oříšky připomínající aroma. Během zrání sýrů jeho koncentrace klesá. Diacetyl může být přeměněn na acetoin, dále na 2,3-butandiol a 2-butanon a ten nakonec na 2-butanol. 2-butanon spolu s 2-butanolem, na rozdíl od diacetylu a acetoinu, během zrání narůstají, stejně jako další methylketony a sekundární alkoholy. Transformace diacetylu na více redukované sloučeniny postupuje během zrání díky působení enzymů mikroorganismů. Lze tedy předpokládat, že mikroorganismy syrového mléka mají také vliv na vývoj těchto sloučenin. Diacetyl a acetoin byly nalezeny v menším množství v sýrech vyrobených ze syrového mléka, než u sýrů z pasterizovaného mléka příp. mléka podrobeného mikrofiltraci [5, 23, 24].

Methylketony pocházejí z β -oxidace mastných kyselin, jsou spojovány s ovocným, květinovým a/nebo zatuchlým aroma (2-oktanon, 2-nonanon, 2-dekanon, 2-undekanon). 2-heptanon je také důležitou součástí flavouru Ementálu a popisuje se jako ovocný, květinový a/nebo skořicový. 2-nonanon je typický pro Gorgonzolu, zatímco 2-undekanon tvoří klíčové aroma u Camembertu. 1-octen-3-on je spojován s žampionovým aroma [5,23,24].

Tabulka 2: Aldehydy [5, 22, 23]

acetaldehyd	oktanal
2-methylpropanal	nonanal
3-methylbutanal	dekanal
2-methylbutanal	benzaldehyd
2-methylbutenal	butanal
pentanal	2-butenal
hexanal	heptanal

Aldehydy s rozvětveným řetězcem pocházejí pravděpodobně z enzymatické nebo neenzymatické degradace aminokyselin (Streckerova degradace). 2-methylpropanal, 2-methylbutanal a 3-methylbutanal se tvoří z valinu, isoleucinu a leucinu. Aroma 3-methylbutanal se popisuje jako svěží, nasládlé. Aldehydy s přímým řetězcem, jako jsou např. butanal, pentanal, hexanal, nonanal, jsou běžné v různých sýrech. Tyto látky jsou charakterizovány pachem připomínajícím svěží trávu s bylinkami. Pocházejí z β -oxidace mastných kyselin. Aldehydy s přímým řetězcem nejsou žádoucí, pokud jejich koncentrace dosáhne určitého prahu. Z této skupiny je nejběžnější aromatickou látkou nonanal [24].

Tabulka 3: Alkoholy [5, 22, 23]

ethanol	2-heptanol
1-propanol	3-methylbut-3-en-1-ol
1-butanol	fenol
2-butanol	methanol
2-propanol	1-penten-3-ol
prop-2-en-1-ol	2-pentanol
2-pentanol	3-methylbutanol
4-methylpent-4-en-2-ol	1-pentanol

V biosyntéze alkoholů je zahrnuto mnoho metabolických cest, jako metabolismus laktózy, redukce methylketonů, metabolismus aminokyselin, příp. degradace kyseliny linolové a linolenové. Přítomnost rozvětvených primárních alkoholů, jako je 3-methylbutanol, indikuje redukci aldehydu produkovaného z leucinu. Tento alkohol byl identifikován jako minoritní aromatická látka Mozzareilly a byl popsán jako příjemné aroma čerstvého sýru. Sekundární alkoholy se tvoří enzymatickými redukcemi z korespondujících methylketonů, které vznikají β -oxidací mastných β -ketokyselin. 2-heptanol byl identifikován jako klíčové aroma Gorgonzoly a sýrů Grana Padano [24].

Množství alkoholů závisí též na přítomnosti původní mikroflóry, která ovlivňuje produkci alkoholů v sýrech. Sýry vyrobené ze syrového mléka obsahují větší množství alkoholů, než sýry vyrobené z pasterizovaného, popřípadě mikrofiltrovaného mléka. Toto platí jak pro n-alkoholy, tak pro 2-alkanoly. Vzhledem k tomu že alkoholy pocházejí z dříve vytvořených sloučenin, pak lze tvrdit, že původní mikroflóra způsobuje rychlejší zrání sýrů [5].

Tabulka 4: Estery [5, 22, 23]

methyl-acetát	butyl-acetát
methyl-propanoát	butyl-propanoát
methyl-butanoát	2-methylpropyl-propanoát
methyl-hexanoát	2-methylpropyl-butanoát
ethyl-acetát	3-methylbutyl-acetát
ethyl propanoát	2-methylbutyl-butanoát
ethyl-butanoát	3-methylbutyl-butanoát
ethyl-hexanoát	isopropyl-propanoát
ethyl-oktanoát	hexyl-propanoát

propyl-acetát	isobutyl-propanoát
propyl-propanoát	3-methylbutyl-propanoát
propyl-butanoát	2-methylbutyl-propanoát
pentyl-propanoát	ethyl-heptanoát
methyl-heptanoát	

Estery jsou běžné těkavé látky vyskytující se v sýrech. Vznikají kondenzací kyselin a alkoholů. V sýrech se jedná o spontánní reakci, která však může být také zprostředkována mikrobiálními esterázami. Obecně mají estery sladké, ovocné a/nebo květinové aroma. Zvláště ethyl-estery jsou známy pro jejich důležitou roli ve tvorbě ovocného charakteru sýrů. Některé estery mají velmi nízký práh vnímání, navíc mohou ovlivnit aroma sýrů díky schopnosti minimalizovat ostrost a hořkost způsobenou mastnými kyselinami příp. aminy. Ethyl-butanoát byl identifikován jako nejběžnější klíčové aroma Čedaru, Ementálu, Gorgonzoly, sýrů Grana Padano a Pecorino. Jeho aroma se popisuje jako ovocné, sladké. Také ethyl-hexanoát hraje důležitou roli v aromatickém profilu Čedaru, Gorgonzoly, sýrů Grana Padano, Pecorina aj.; aroma je popisováno jako ovocné, ananasové. Ethyl-oktanoát je významný v Guia sýrech, má květinové aroma. Obecně se přítomnost původní mikroflóry mléka spojuje s větší tvorbou esterů. Nejvíce se objevují ethyl-estery, v sýrech švýcarského typu je jejich největší diverzita [5, 23, 24].

Tabulka 5: Sloučeniny obsahující síru [5, 22, 23]

methanthiol	dimethyl disulfid
dimethyl sulfid	methional
dimethyltrisulfid	

Nejběžnější sloučeninou obsahující síru je methional. Tato těkavá látka může být produkována Streckerovou degradací a její aroma připomíná vařené brambory, dále se popisuje jako palčivé a trpké. Hraje důležitou roli v aromatickém profilu mnoha druhů sýrů, jako jsou Camembert, Čedar, Ementál, kozí sýr, Gorgonzola, Grana Padano, Gruyère, Pecorino a mnoho dalších. V nízkých koncentracích má pozitivní vliv na flavour sýrů. Jestliže je však jeho koncentrace vysoká, tak již způsobuje off-flavour připomínající brambory (sýr Gruyère) [24].

Methanthiol je další důležitou sloučeninou obsahující síru. Vzniká z methioninu a může být prekurzorem dalších sirných sloučenin, jako jsou dimethyldisulfid (DMDS) a dimethyltrisulfid (DMTS) díky oxidativním reakcím. Dimethylsulfid je popisován intenzivní, sirný, popřípadě jako vařené zelí [23, 24].

Tabulka 6: Kyseliny s krátkým řetězcem [23]

propionová kyselina	isovalerová kyselina
kyselina máselná	hexanová kyselina
kyselina octová	

Obecně mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (>12 atomů uhlíku) nemají velký význam ve flavouru vzhledem k jejich vysokému prahu vnímání. Kyseliny s krátkým řetězcem však mají mnohem nižší práh vnímání a každá z nich má své charakteristické aroma. Kyselina octová má typické octové aroma, propionová kyselina má palčivý, ovocný pach. Tyto kyseliny jsou klíčovým aromatem Čedaru, Gruyèru, Roncalu a sýrů ementálského typu. Propionová kyselina je konečným produktem kvašení laktátu. Kyselina máselná má žluklé aroma a je důležitou součástí flavouru sýrů různých typů (Camembert, Čedar, Grana Padano, Pecorino aj.). Vysoká koncentrace této kyseliny je však nežádoucí. Kyselina máselná pochází z katabolismu triglyceridů, ale zároveň může pocházet také z fermentace laktátu díky přítomnosti klostridií. Kyselina máselná, spolu s isovalerovou, mají podobné aroma. Kyselina hexanová se uvolňuje během lipolýzy z triglyceridů a je charakteristickou součástí flavouru sýrů Grana Padano a Roncal sýrů [5, 24].

Tabulka 7: Laktony [23]

δ-dekalakton

Laktony jsou výsledkem spontánní cyklizace hydroxykyselin, které se přirozeně vyskytují v mléčném tuku. Jejich výskyt v sýrech může také souviset s krměním. Laktony jsou obecně spojovány s broskvovým, meruňkovým a/nebo kokosovým aroma. Jedním z nejběžnějších laktonů je δ-dekalakton. Tato sloučenina je klíčovým aroma Camembertu a sýrů ementálského typu [5, 24].

2.3 Použité metody a experimentální techniky

2.3.1 Izolace aromaticky aktivních látek ze sýrů

Aromatické látky se řadí do mnoha rozlišných skupin, některé jsou vysoce reaktivní a v potravinách jsou přítomny ve velmi nízké koncentraci; díky tomu není jejich přímé stanovení většinou možné. Před analýzou je třeba cílené analyty nejdříve extrahovat a následně zkoncentrovat [25, 26].

2.3.1.1 *Extrakce rozpouštědlem (SE-solvent extraction)*

Extrakce je proces, při kterém prochází složky fázovým rozhraním mezi dvěma vzájemně nemísitelnými kapalinami. Při extrakci kapalina-pevná látka jsou analyty z pevné fáze extrahovány do rozpouštědla. Extrakce analytu z jedné fáze do druhé závisí na rozdělovacím koeficientu daného analytu. Rozdělovací koeficient je závislý na chemické povaze analytu a dalších dvou rozpouštědel, stejně jako na teplotě [27, 28].

Využití extrakce rozpouštědlem pro získání aromatických látek ze sýrů

Extrakce ethyletherem byla využita např. při charakterizaci květinového aroma v Čedaru. Pomocí GC-MS a GC-O bylo v extraktech sýrů identifikováno 50 aromaticky aktivních látek [29].

Extrakce pomocí rozpouštědla byla využita také při identifikaci aromatických látek v sýru Parmigiano-Reggiano. Po extrakci následovala destilace za vysokého vakua. Aromatické sloučeniny byly identifikovány za využití GC-O. Butanová, hexanová, oktanová a dekanová kyselina tvořily hlavní volné mastné kyseliny podílející se na sýrovém aroma. Ethyl-butanoát, ethyl-hexanoát, ethyl-oktanoát, ethyl-propanoát, ethyl-pentanoát, ethyl-heptanoát a ethyl-dekanoát byly hlavními estery podílející se na ovocném aroma. 2-Methylbutanal, 3-methylbutanal, 2,4-hexadienal, 2-butenal, pentanal, hexanal, heptanal, diacetyl, fenylacetaldehyd, dimethyltrisulfid, 2,6-dimethyl-pyrazin, 2,5-dimethyl-3-ethylpyrazin, trimethyl-pyrazin, 5-ethyl-2-methylpyridin, 2,3-dimethyl-5-ethylpyrazin, 2,3,5-trimethyl-6-ethyl-pyrazin, furfural a 2-furanmethanol se podílely na oříškovém, praženém aroma [30].

2.3.1.2 *Extrakce superkritickou tekutinou (SFE-supercritical fluid extraction)*

Superkritická tekutina vzniká zahřátím plynu nebo kapaliny na teplotu vyšší než je jeho/její kritická teplota při současném stlačení na hodnotu vyšší než je jeho/její kritický tlak. Nejedná se ani o kapalinu, ani o plyn, a nemůže být zkapalněna, popřípadě odpařena zvýšením tlaku nebo teploty. Superkritická tekutina kombinuje vlastnosti kapaliny, jako je vysoká hustota a rozpouštěcí schopnost, spolu s vlastnostmi plynu, což je nízká viskozita, nulové povrchové napětí a vysoká difuzní rychlost pro analyty. Nejčastěji používanou látkou je oxid uhličitý, vzhledem k jeho nízké kritické teplotě a tlaku, je netoxický, nehořlavý a relativně levný. Často se k němu přidávají modifikátory ke zlepšení extrakce více polárních analytů. Typickými modifikátory jsou methanol a dichlormethan [28].

K provedení SFE je nezbytný přístroj, který je schopný vytvořit superkritickou tekutinu, kontrolovat tlak, teplotu a rychlost průtoku. Obvykle je extrakce prováděna v dynamickém módu, ale může být použita i statická extrakce, popřípadě kombinace obou. Extrakt je sbírán do vhodného rozpouštědla nebo do pasti z pevné fáze (solid-phase trap). Extrakce vyžaduje většinou 10-20 ml rozpouštědla a extrakční čas se pohybuje od 20 do 60 minut. Obecně se extrakce superkritickou tekutinou používá k extrakci organických analytů z pevných vzorků. Je také vhodná pro termolabilní vzorky [28].

Využití extrakce superkritickou tekutinou pro získání aromatických látek ze sýrů

Extrakce superkritickou tekutinou (CO_2) byla použita např. u stanovení těkavých látek u ovčího sýru Idiazábal. Nejlepších výsledků extrakce bylo dosaženo při použití adsorbentu alumina (poměr 1:1 se sýrem) a jako rozpouštědla byly použity n-hexan s acetonem v poměru 2:1. Pomocí plynové chromatografie byly stanoveny např. tyto látky: 2-hexanon, 2-heptanon, 3-ethyl-hexanoát, 2-heptanol, 1-octen-3-ol atd. [31].

Aromatické extrakty u Roncal sýru byly získány extrakcí CO_2 za použití různých poměrů rozpouštědel (směs n-hexanu a acetonu) [32].

2.3.1.3 Simultánní destilace a extrakce (SDE-Simultaneous Distillation-Extraction)

Extrakce kombinovaná s destilací může být provedena pomocí Likens-Nickerson aparatury. Většinou se používají rozpouštědla s nízkým bodem varu ke zjednodušení zakonzentrování aroma. Proto tento proces probíhá za normálního nebo lehce sníženého tlaku [26].

Využití simultánní destilace a extrakce pro získání aromatických látek ze sýrů

Tato metoda byla aplikována např. ke studiu přežití probiotických bakterií *Lactobacillus casei* LC2W a vlivu tohoto kmene na proteolýzu sýrů a složení aromatických sloučenin sýrů Čedar. K extrakci aromatických látek byla využita SDE s využitím pentanu jako rozpouštědla. Aromatické látky byly identifikovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem. Sýry vyrobené s probiotickými bakteriemi obsahovaly více aromatických sloučenin, než sýry bez jejich přídavku. Tato studie prokázala, že *Lactobacillus casei* LC2W může být použit jako přídatná kultura při výrobě Čedaru za vzniku funkční potraviny [33].

K extrakci těkavých látek tří italských sýrů (Canestrato Pugliese, Fiore Sardo, Pecorino Romano) byla využita SDE, která trvala přibližně 2 hodiny a prováděla se do dichlormethanu. K identifikaci byl použit plynový chromatograf s hmotnostní detekcí. Celkem bylo identifikováno 62 těkavých látek, aromatický profil uvedených sýrů byl velmi odlišný. Estery tvořily hlavní skupinu těkavých látek u sýru Canestrato Pugliese, zatímco u Fiore Sardo tvořily nejmenší skupinu. Ketony a alkoholy byly hlavní složkou Fiore Sardo spolu s Pecorinem Romanem. Laktony a sloučeniny obsahující síru se vyskytovaly ve značné míře přibližně stejně u všech tří sýrů, na druhou stranu aldehydů bylo poměrně málo. Celkem bylo identifikováno 30 karboxylových kyselin, z nichž nejvíce jich obsahoval Canestrato Pugliese [34].

2.3.1.4 Mikroextrakce pevnou fází (SPME-Solid Phase MicroExtraction)

Mikroextrakce pevnou fází je postavena na zachycení analytu pomocí sorpce. SPME křemenné vlákno je pokryto polymerem, na který se váže vzorek. Obvykle je vlákno instalováno do zařízení připomínající injekční stříkačku, která usnadňuje manipulaci. Analyty jsou rozdělovány mezi matrici a stacionární fází, dokud není dosaženo rovnováhy; analyty obvykle nejsou plně extrahovány z matrice. Po dosažení rovnováhy je vlákno přesunuto do injektoru plynového chromatografu a termálně desorbováno. K odstranění analytu je také možno použít vhodné rozpouštědlo. SPME může být použita jak pro plynné, tak pro kapalné vzorky. Mezi výhody SPME patří, že je to jedna z mála metod, která nepotřebuje rozpouštědla a neničí vzorek [28].

Odběr vzorku pomocí SPME může být proveden třemi různými způsoby: přímou extrakcí, headspace extrakcí a extrakcí s membránovou ochranou. Při použití extrakce s membránovou ochranou je vlákno kryté membránou, která zabraňuje přímému kontaktu se vzorkem, respektive s vysokomolekulárními sloučeninami. Vzorek je většinou během extrakce promícháván. Existuje mnoho materiálů, které se využívají k výrobě vláken, ale mezi nejčastěji používané patří vlákno z polydimethylsiloxanu [28].

Využití mikroextrakce pevnou fází pro získání aromatických látek ze sýrů

Metoda SPME byla použita např. pro získání těkavých látek ze tří druhů sýrů (Čedar, tvrdý sýr ke strouhání a sýr s modrou plísní). Bylo použito Carboxen/PDMS vlákno, látky byly následně identifikovány pomocí GC-MS a GC-O. Methanthiol, methional, dimethyl trisulfid a butanová kyselina byly přítomny u všech vzorků a podílely se na tvorbě aroma těchto sýrů. Bylo identifikováno také mnoho alkyl-pyrazinů, jež se podílejí na praženém oříškovém aroma, dále aroma připomínající syrové brambory příp. bujón [35].

Aromatický profil kozího sýru s přídavkem a bez přídavku probiotických bakterií byl zkoumán za použití SPME v kombinaci s GC/MS. Bylo použito vlákno Divinylbenzen/Carboxen/Polydimethylsiloxan. Výsledky ukázaly, že délka skladování a přídavek probiotických kultur měly vliv na aromatický profil kozího sýra. Celkově bylo identifikováno 25 aromatických sloučenin, z čehož estery a ketony mohou mít pozitivní vliv na aroma kozích sýrů a potlačit některé nepříjemné pachy [36].

2.3.1.5 Headspace techniky

Headspace techniky se využívají k získání těkavých sloučenin jak u kapalných, tak u pevných vzorků. Dělí se do dvou skupin: statické a dynamické. Při statickém módu jsou analyty sbírány z uzavřené nádoby, kdy se předpokládá, že za specifické teploty a tlaku je vzorek v rovnováze s jeho parami. V dynamickém módu jsou analyty sbírány proudem inertního plynu proudícího skrz nebo nad vzorkem. Tato technika se běžně spojuje s plynovou chromatografií [28].

Využití headspace technik pro získání aromatických látek ze sýrů

Tradiční řecký sýr Kopanisti byl zkoumán ohledně obsahu aromatických látek. K tomuto účelu byla využita headspace technika ve spojení s plynovým chromatografem s hmotnostní

detekcí. V sýru byly nalezeny alkoholy, estery a těkavé volné mastné kyseliny. Ethanol a některé ethylestery byly hlavními těkavými sloučeninami. Intenzivní lipolýza přispěla k silnému flavouru a pikantní chuti. Flavour tohoto sýru byl přisouzen hlavně těkavým mastným kyselinám a různým dalším sloučeninám, stejně jako interakcím probíhajícím mezi nimi [37].

Vývoj metabolitů během zrání byl zkoumán u sýrů typu Camembert. Těkavé látky byly extrahovány pomocí dynamické headspace a identifikovány díky plynové chromatografii s hmotnostní detekcí [38].

2.3.2 Analytické metody stanovení aromatických látek v sýrech

2.3.2.1 Plynová chromatografie (GC-Gas Chromatography)

Plynová chromatografie je separační metoda, kdy dochází k dělení složek mezi stacionární a plynnou mobilní fází. Používá se hlavně k identifikaci a stanovení složitějších směsí plynů a těkavých látek a především organických sloučenin s bodem varu menším jak 400 °C. Podle převažujícího mechanismu separace se plynová chromatografie dělí na adsorpční a rozdělovací [39].

Využití plynové chromatografie pro stanovení aromatických látek v sýrech

Pomocí metody headspace-SPME-GC byly zkoumány např. eidamské sýry. Vzorky byly odebrány z mléka a dále v průběhu zrání. V sýrech i mléku bylo nalezeno celkem 37 různých organických sloučenin patřících do 5 různých skupin. Jejich celkový obsah v průběhu produkce rostl. První nárůst byl pozorován po lisování a největší nárůst v poslední fázi zrání. Ve zralých sýrech se nejvíce vyskytovaly ethanol, acetoin, 2-methylpropanol, kyselina octová a acetaldehyd [40].

U enzymově modifikovaných sýrů byly stanoveny volné mastné kyseliny pomocí metody SPME/GC. Tato studie ukázala, že flavour imitací sýrů je ovlivněn stupněm lipolýzy enzymově modifikovaných sýrů a také pH [41].

2.3.2.2 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS-Gas Chromatography/Mass Spectrometry)

Hmotnostní spektrometrie je separační metoda, kdy se ionizované částice dělí na základě hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje (m/z) [39].

Spojení GC kolony s hmotnostním spektrometrem je dosaženo zavedením eluátu z GC kolony do iontového zdroje hmotnostního spektrometru, který ve většině případů funguje pod vysokým vakuem. Toto je možné provést buď přímo, nebo pomocí napojení. Průtok nosného plynu vstupující do iontového zdroje nesmí být příliš velký [42].

Využití plynové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení aromatických látek v sýrech

Metoda SPME-GC-MS, spolu s metodou GC-O, byla aplikována např. při zkoumání těkavých látek tradiční slovenské bryndzy vyrobené ze syrového ovčího mléka. Celkem 27 klíčových

aromaticky aktivních látek bylo nalezeno v meziproduktech (ovčí sýřenině, která zrála 0, 1, 2, 4, 8 dní) a také ve finálním produktu. Hlavní nárůst aromaticky aktivních látek byl během prvního dne zrání, aroma kulminovalo na konci zrání. Během posledního technologického kroku, kdy se Bryndza pomlela s roztokem NaCl, 8 aromaticky aktivních látek zmizelo [43].

Těkavé sloučeniny ovčího sýru Terrincho byly zkoumány pomocí SPME-GC-MS. K extrakci bylo vyzkoušeno 6 různých SPME vláken. Carboxen–polydimethylsiloxanové vlákno 75 mm (CAR–PDMS) dosáhlo nejvíce kompletního profilu těkavých sloučenin [44].

2.3.2.3 Plynová chromatografie s olfaktometrií (GC-O Gas Chromatography-Olfactometry)

Plynová chromatografie ve spojení s olfaktometrií je využívána ke zkoumání flavouru a k popisu pachově aktivních látek. Jednotlivé látky vycházející z kolony jsou nasávány nosem, následně je popisováno jejich aroma. Je však třeba mít na paměti, že se posuzují jednotlivé sloučeniny a tento přístup nám neposkytuje informace o jejich chování ve směsi [45].

Využití plynové chromatografie s olfaktometrií pro stanovení aromatických látek v sýrech

Aromaticky aktivní látky kozího sýra byly stanoveny pomocí GC-O a GC-MS. 2,3-butandionu bylo přiřazeno máslové aroma, 1-okten-3-onu houbové aroma, *o*-aminoacetofenonu grepové aroma, laktonům kokosové a broskvové aroma, oktanové kyselině kyselé a voskové aroma, 4-methyl a 4-ethyl oktanové kyselině bylo přiřazeno voskové a zvířecí aroma [46].

K vytvoření aroma profilu tří komerčně vyrobených švýcarských Tilsit sýrů byla využita headspace-SPME-GC-MS analýza spolu s GC-O. Zkoumány byly hlavně sloučeniny obsahující síru a jejich dopad na kvalitu celkového aroma sýrů. Máslové, sýrové aroma bylo přiřazeno: kyselině máselné, 3-methylbutanové a butan-2,3-dionu. Ze sirných sloučenin ovlivnily pachový profil především tyto: methanthiol, dimethyl disulfid, bis(methylthio)methan, dimethyl trisulfid a 3-(methylthio)propanal [47].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Analyzované vzorky

Celkem bylo analyzováno 13 modelových vzorků přírodních sýrů typu Moravský bochník (45 % t. v s., 60 % suš.) (Tabulka 8). Tyto sýry byly vyrobeny na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně standardním technologickým postupem (viz kapitola 3.1.2). U každého vzorku byl použit jiný poměr mlékařských kultur (viz kapitola 3.1.1). Vzorky byly ihned po odběru zmrazeny a uchovávány při teplotě -18 °C až do doby analýzy. Před analýzou byl vzorek vždy rozmražen, nastrohán na jemném struhadle, promíchán a na analytických vahách bylo naváženo potřebné množství sýru pro analýzu.

Tabulka 8: Přehled všech analyzovaných vzorků

Vzorek	Poměr mlékařských kultur LHB02:STI-12:Flora Danica	Doba zrání
V1	15:8:77	4 měsíce
V2	19:9:72	4 měsíce
V3	15:9:76	4 měsíce
V4	50:25:25	4 měsíce
V5	19:9:72	3 měsíce
V6	15:8:77	3 měsíce
V7	50:25:25	3 měsíce
V9	15:9:76	2 měsíce
V10	15:15:70	2 měsíce
V1-8m	15:8:77	8 měsíců
V2-8m	19:9:72	8 měsíců
V3-8m	15:9:76	8 měsíců
V9-6m	15:9:76	6 měsíců

3.1.1 Použité mlékařské startovací kultury

Pro výrobu modelových sýrů byly použity tři komerčně dostupné lyofilizované kultury vhodné k přímému zaočkování do mléka (Chr. Hansen, Dánsko).

Termofilní kultura LH-B02 – Lactobacillus helveticus

Kultura obsahuje mikroorganismy *Lactobacillus helveticus*.

Termofilní kultura STI-12–Streptococcus thermophilus

Tato kultura obsahuje mikroorganismy *Streptococcus thermophilus*.

Mezofilní aromatická kultura, typ LD Flora Danica

Tato kultura je složena z následujících mikroorganismů: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc* spp.

3.1.2 Technologie výroby modelových sýrů

Pro výrobu sýrů bylo použito 35 litrů nestandardizovaného mléka. Mléko bylo pasterováno na teplotu min. 72 °C s výdrží 30 sekund. Dále se napustilo do výrobníku, kde bylo vytemperováno na 32 °C a inokulováno lyofilizovanými čistými mlékařskými kulturami. V požadovaném poměru (viz Tabulka 8) byly k inokulování použity kultury Flora Danica, LH B02 a STI-12 (Chr. Hansen, Dánsko). Po 15 minutách byl za stálého míchání přidán 36% (w/w) CaCl₂ roztok (50 ml na 100 litrů mléka) a zředěné syřidlo (950 IMCU/ml, CHY-MAX M, Chr. Hansen, Dánsko, 3,2 ml na 100 litrů mléka) a mléko bylo ponecháno v klidu pro srážení po dobu 30 minut. Vzniklá sýřenina se prokrojila sýrařskou harfou na hranoly velikosti cca 2×2 cm a byla ponechána 10 min. v klidu. Následně se drobila (cca 10 min.) do podoby rovnoměrně velkého zrna a zrno se vytužilo mícháním dalších 10 min. Pomocí pláště výrobníku se za stálého míchání zvýšila teplota zrna na 47 °C a zrno se při této teplotě 60 min. dosoušelo. Hotové zrno se vypustilo do předlisovací vany vyložené plachetkou, kde se předlisovalo vlastní hmotností nebo pomocí mírného tlaku po dobu 15 min. Předlisovaná sýřenina se rozkrojila, vložila do lisovacích forem a lisovala se po dobu 2,5 hod. Po 90 min lisování se sýr otočil. Bloky sýra o hmotnosti 1,5 kg se solily v solné lázni o koncentraci 20 % (w/w), při teplotě 8 °C po dobu 14 hod. Poté se ponechaly oschnout, zabalily se do smrštitelné polopropustné folie a uložily se do zrací komory při teplotě 8 – 14 °C.

Celkem bylo vyrobeno 10 sérií vzorků, které se lišily kombinací kultur (5 různých variant) (viz Tabulka 9). Vzorky pro analýzu byly odebírány po 2, 3, 4, 6 a 8 měsících zrání (viz Tabulka 10).

Tabulka 9: Použité kombinace kultur (LH B02:STI-12:Flora Danica)

Poměr kultur		
15 : 8 : 77	V1	V6
19 : 9 : 72	V2	V5
15 : 9 : 76	V3	V9
50 : 25 : 25	V4	V7
15 : 15 : 70	V10	

Tabulka 10: Uspořádání experimentu

Doba zrání				
2 měsíce	3 měsíce	4 měsíce	6 měsíců	8 měsíců
V9	V5	V1	V9	V1
V10	V6	V2		V2
	V7	V3		V3
		V4		

3.2 Laboratorní vybavení

3.2.1 Přístroje

- plynový chromatograf TraceTM 1310 se split/splitless injektorem (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- hmotnostní detektor ISQTM LT Single Quadrupole (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- knihovna spekter NIST/EPA/NIH, Verze 2.0 (Gaithersburg, Maryland, USA)
- analytické digitální váhy HELAGO, GR-202-EC, Itálie

3.2.2 Plyny

- helium, čistota 4.8, v tlakové lahvi s redukčním ventilem (SIAD, Česká republika)

3.2.3 Pracovní pomůcky

- SPME vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30 μm , Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA
- vialky o objemu 10 ml se šroubovacím magnetickým uzávěrem

3.3 Použitá metoda SPME-GC- MS

Pro identifikaci těkavých látek ve vzorcích sýrů byla použita mikroextrakce pevnou fází ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (SPME-GC-MS).

3.3.1 Podmínky SPME extrakce

- doba inkubace (temperování) 10 min
- doba extrakce 20 min
- teplota extrakce a inkubace (teplota agitátoru) 40°C
- agitátor zapnutý 5 s, vypnutý 60s
- množství vzorku 2 g
- hloubka ponoření vlákna do vialky 20 mm

3.3.2 Podmínky GC-MS analýzy

- kapilární kolona TG-WaxMS (30 m x 0,25 mm x 0,5 μm)

- teplota injektoru (desorpce) 240 °C
doba desorpce 20 min
- dávkování splitless, ventil uzavřen 10 min
- hloubka ponoření vlákna do injektoru 40 mm
- nosný plyn helium, průtok 1 ml·min⁻¹
- teplotní program: 40 °C s výdrží 2 min, vzestupný gradient 3 °C·min⁻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 modu EI, energie ionizačních elektronů 70 eV, teplota iontového zdroje 200 °C, skenovací rozsah m/z 30-370 amu, rychlost skenování 0,2 s

3.4 Statistické zpracování výsledků

Vyextrahované těkavé látky byly identifikovány pomocí programu Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) na základě srovnání hmotnostních spekter s dostupnou knihovnou spekter (viz kap. 3.3.1). Každý vzorek byl analyzován dvakrát (n=2); k vypočtení průměrných retenčních časů a relativní směrodatné odchylky byl použit MS Excel 2010.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce je součástí rozsáhlého projektu, který probíhá ve spolupráci s Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně, a zároveň ve spolupráci s nejmenovaným výrobcem, který má zájem komerčně vyrábět sýry typu Moravský bochník. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně disponuje potřebným technologickým vybavením, jako základ byl zvolen standardní technologický postup pro výrobu sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou, kde budou postupně zkoušeny různé varianty výrobních podmínek; cílem bude nalézt takové podmínky výroby, aby byl dosažen nutričně cenný a zároveň senzoricky atraktivní produkt. Během výroby modelových sýrů bude sledována řada fyzikálních, chemických, mikrobiologických a senzorických parametrů, v rámci této práce to bude stanovení aromaticky aktivních látek, které významným způsobem ovlivňují senzorickou kvalitu vzorků.

První experimenty jsou zaměřeny na použití vhodných mikrobiálních kultur, resp. vhodného poměru jejich kombinace; hlavním cílem této práce tedy bude posoudit vliv různých kombinací mikrobiálních kultur na těkavé (aromaticky aktivní) látky v sýrech; v neposlední řadě pak sledovat jejich příp. změny v průběhu zrání sýrů.

Podle plánovaného experimentu bylo vyrobeno 5 různých variant modelových sýrů, lišících se poměrem mikrobiálních kultur. V různých fázích zrání potom byly odebrány vzorky pro analýzu (po 2, 3, 4, 6 a 8 měsících zrání). Vzhledem k většímu množství měřených charakteristik však nebyly k dispozici všechny vzorky v dostatečném množství; z tohoto důvodu byly vzorky měřeny v nepravidelných intervalech, pokusili jsme se, podle dostupných vzorků, vyjádřit u každé série alespoň několik fází zrání. Přehledně je uspořádání experimentu popsáno v Tabulce 10.

Pro stanovení aromaticky aktivních látek v sýrech byla zvolena metoda SPME-GC-MS. Tato metoda je zavedena a používána na ÚCHPBT pro analýzu různých typů vzorků v rámci diplomových a bakalářských prací. Její optimalizace a validace pro sýry byla provedena již v předchozích bakalářských a diplomových pracích, lze uvést například práci Koubka [52]. Podmínky analýzy jsou uvedeny v kapitole 3.3.

4.1 Identifikace těkavých látek ve vzorcích sýrů

Identifikace těkavých látek byla provedena na základě srovnání hmotnostních spekter s dostupnou knihovnou spekter. V tabulce viz Příloha 1 je uveden přehled všech těkavých látek identifikovaných ve všech vzorcích sýrů. Hodnoty v tabulkách udávají pravděpodobnost shody dané sloučeniny s knihovnou spekter v %. Vzhledem k mírným odchylkám retenčních časů je uveden vždy průměr a relativní směrodatná odchylka (ze všech měřených vzorků), která se většinou pohybovala < 1 %, což lze považovat za výbornou reprodukovatelnost.

Identifikaci a popisu aroma těkavých látek v různých typech potravin se v současné době věnuje řada publikací, o Moravském bochníku je však dostupných velmi málo informací, resp. žádná publikace, která by se věnovala problematice aromatických látek. Jak již bylo zmíněno, pro popis aroma dané sloučeniny se používá GC-O [45]. Naše výsledky tak byly porovnány s některými dostupnými publikacemi [24,25,48-51]. Látky v tabulce označené symbolem ** byly v těchto studiích prokázány jako aromaticky aktivní, látky označené * byly

identifikovány v našich vzorcích, ale v dostupné literatuře nebyly nalezeny; lze předpokládat, že jsou také aromaticky aktivní a v další práci bude tento předpoklad ověřen analýzou vzorků sýrů pomocí GC-O.

Celkově bylo ve vzorcích sýrů identifikováno 148 těkavých sloučenin, jejich rozdělení do chemických skupin je upřesněno v tabulce viz Příloha 1 a přehledně uvedeno v Tabulce 11 v sestupném pořadí. Nejvíce bylo stanovených alkoholů. Nejmenší skupinu tvoří furanoidy spolu s látkami obsahujícími síru, kdy od každého byla nalezena pouze jedna sloučenina, cis-linalool oxid a dimethylsulfon.

Získané chromatogramy jsou uvedeny v Přílohách 2-14.

Vzhledem k tomu, že zatím nebyly k dispozici veškeré potřebné standardy, obsah těkavých látek ve vzorcích byl sledován pouze z hlediska kvalitativního. Rozdíly mezi vzorky jsou tak vyjádřeny pouze změnami počtu identifikovaných sloučenin a příp. změnami v rámci různých chemických skupin.

Je jasné, že pro lepší vyjádření rozdílů mezi vzorky, resp. změn během výroby a zrání sýrů bude daleko zajímavější kvantitativní stanovení, proto bude následující práce především zaměřena na výběr a ověření vhodné metody kvantifikace. Vzhledem k poměrně velkému počtu identifikovaných sloučenin se nabízí využití metody vnitřního standardu. Tato bude následně aplikována na vzorky sýrů pro vyjádření změn obsahu aromatických látek v závislosti na změnách různých podmínek výroby.

Tabulka 11: Počet identifikovaných těkavých látek podle chemických skupin

skupina	počet
alkohol	39
terpenoid	27
ester	22
keton	18
kyselina	17
aldehyd	9
uhlovodík	9
lakton	3
látky obsahující dusík	2
furanoid	1
látky obsahující síru	1
celkem	148

4.2 Srovnání identifikovaných sloučenin ve vzorcích modelových sýrů

Hlavním cílem této práce bylo posoudit vliv aplikace různých poměrů mikrobiálních kultur použitých pro výrobu modelových sýrů. Přídavek startovacích kultur je nezbytným předpokladem výroby sýrů. Účelem je pomnožení přidaných mikroorganismů ve mléce, čímž se dosáhne žádaného stupně kyselosti; jejich hlavní uplatnění nastává během zrání sýrů, kdy účinkem příp. proteolytické a/nebo lipolytické aktivity dochází v konečném důsledku ke vzniku senzorických vlastností sýra (aroma, chuť, textura, tvorba ok aj.) (viz kap. 2.2.).

Základní kulturou pro prakticky všechny druhy sýrů je mezofilní kultura, podle typu sýra bývá doplněna dalšími kulturami [2]. Při výrobě sýrů s vysokodohřivanou sýřeninou se do mléka přidává mezofilní a termofilní kultura a v případě ementálských sýrů i propionová kultura (viz kap. 2.1.1.2.). Zajímavé je, že se z dostupné literatury nepodařilo bezpečně zjistit, zda jsou propionové bakterie nezbytné i pro výrobu sýrů typu Moravský bochník; tyto sýry nemají oka, a lze tedy předpokládat, že aplikace propionové kultury není nutná.

Pro výrobu modelových vzorků pro tuto práci byla proto použita klasická mezofilní aromatická kultura a dva typy termofilních kultur. Jejich složení je uvedeno v kap. 3.1.1. Mezofilní startovací kultura bývá složená z mezofilních koků *Lactococcus* spp. a *Leuconostoc* spp. V kultuře obvykle dominují (> 90%) tzv. kyselinotvorné koky, které fermentují laktózu na kyselinu mléčnou, zbytek tvoří tzv. aromatvorné koky, které navíc rozkládají citráty za produkce CO₂ a aromatických látek. Jejich proteolytická schopnost však je, v porovnání např. s termofilními sýrařskými kulturami, malá [15]. Použitá kultura, tzv. typu LD, obsahuje kyselinotvorné i aromatvorné koky; tento typ se používá tam, kde je žádoucí produkce CO₂ a aromatických látek, jako je tomu např. v sýrech s tvorbou ok. Podle výrobce je určena pro výrobu širokého spektra sýrů včetně sýrů tvrdých.

Použité termofilní kultury obsahují bakterie *Lactobacillus helveticus* a *Streptococcus thermophilus*. Podle výrobce je lze používat buď samostatně, nebo v kombinaci. Tyto kultury jsou určeny pouze pro výrobu sýrů s vysokodohřivanou sýřeninou; jejich optimální teplota je vyšší (cca 45-55 °C) a uplatňují se ve fázi dohřívání a dosoušení sýrů. Kromě fermentace laktózy na kyselinu mléčnou mají i mírnou proteolytickou aktivitu a spolu s reziduální aktivitou syřidlových enzymů tak ovlivňují chuť, vůni a texturu sýrů [2]. Kultura *Lactobacillus helveticus* podle výrobce navíc sýrům dodává oříškovou chuť a zabraňuje jejich hořkosti. Všechny kultury jsou běžně komerčně dostupné v lyofilizovaném stavu, vhodné k přímému zaočkování do mléka, což velmi usnadňuje jejich aplikaci.

V následujících kapitolách je uvedeno srovnání různých variant kultur vždy u sýrů stejného stáří (Tabulky 12-15). Celkový přehled jednotlivých sloučenin je v tabulce v Příloze 1.

4.2.1 Těživé sloučeniny identifikované ve vzorcích V1 – V4

V této kapitole jsou uvedeny výsledky sýrů V1-V4, vyrobených s použitím 4 různých kombinací uvedených mikrobiálních kultur (viz Tabulky 9, 10), odebrané po 4 měsících zrání.

Vzorky V1 a V3 jsou velmi podobné, ve směsi převažovala mezofilní kultura; u vzorku V2 byl mírně zvýšen obsah termofilní kultury LH B02 a u vzorku V4 byla provedena radikální

změna, kdy ve směsi tentokrát převažovala termofilní kultura LH B02 (*Lactobacillus helveticus*).

Tabulka 12: Srovnání identifikovaných těkavých látek ve vzorcích V1-V4 (zrání 4 měsíce)

chemická skupina	vzorek			
	V1	V2	V3	V4
aldehyd	3	2	4	4
alkohol	15	18	15	16
ester	6	6	5	5
furanoid	0	0	0	0
keton	6	9	6	8
kyselina	11	9	9	7
lakton	0	0	0	0
sloučeniny obsahující dusík	2	1	0	0
sloučeniny obsahující síru	1	1	1	1
terpenoid	8	9	10	9
uhlovodík	3	6	1	2
celkem	55	61	51	52

Mezi vzorky nejsou výrazné rozdíly v počtu identifikovaných sloučenin. Nejvíce těkavých látek bylo stanoveno u vzorku V2 (viz Tabulka 12), kde byl použit poměr kultur 19:9:72 (mírně vyšší přídavek termofilní kultury). Překvapivě nebyla nalezena výrazná odlišnost vzorku V4. Z celkového pohledu se však jednotlivé skupiny látek v rámci V1-V4 mnoho nelišily, byly identifikovány většinou totožné sloučeniny. Obecně převažovaly skupiny alkoholů a kyselin následované terpenoidy. Ve vzorcích se vůbec nevyskytovaly laktony ani furanoidy. Sloučeniny obsahující dusík byly identifikovány pouze ve vzorcích V1 a V2, konkrétně 2,6-dimethyl pyrazin a trimethyl pyrazin, jejichž aroma se popisuje jako oříškové [35].

V této fázi zrání se tedy neprojevil vliv převahy mezofilní nebo termofilní kultury, přestože vzhledem k vyšší proteolytické aktivitě termofilní kultury [17] by bylo možné ve vzorku V4 očekávat bohatší spektrum identifikovaných těkavých látek.

4.2.2 Těkavé sloučeniny identifikované ve vzorcích V5 – V7

V této kapitole je uvedeno srovnání sýrů z výrob V5-V7, vyrobených s použitím 3 různých kombinací mikrobiálních kultur (viz Tabulka 9); v podstatě se jednalo o opakování kombinací

z předchozího pokusu. Ve vzorku V6 (obdoba V1) převažovala mezofilní kultura; u vzorku V5 (obdoba V2) byl mírně zvýšen obsah termofilní kultury a u vzorku V7 (obdoba V4) převažovala termofilní kultura. Sýry byly tentokrát odebrány už po 3 měsících zrání.

Tabulka 13: Srovnání identifikovaných těkavých látek ve vzorcích V5-V7 (zrání 3 měsíce)

chemická skupina	vzorek		
	V5	V6	V7
aldehyd	3	2	5
alkohol	15	17	20
ester	2	6	4
furanoid	0	0	0
keton	5	6	8
kyselina	9	8	8
lakton	3	3	3
sloučeniny obsahující dusík	0	0	1
sloučeniny obsahující síru	1	1	1
terpenoid	10	14	11
uhlovodík	2	2	2
celkem	50	59	63

Nejvíce těkavých látek (prakticky všech chemických skupin) bylo stanoveno u vzorku V7 (poměr kultur 50:25:25) a naopak nejméně u vzorku V5 (poměr kultur 19:9:72). Nejsilnější skupinou byly alkoholy a terpenoidy, nebyl identifikován žádný furanoid (viz Tabulka 13). Pouze vzorek V7 obsahoval sloučeninu obsahující dusík.

V této fázi se mírně projevil vysoký přídavek termofilní kultury; avšak vzhledem k tomu, že se vzorek V7 příliš nelišil od vzorku V6, nebyl prokázán významný vliv převahy termofilní kultury na identifikované těkavé sloučeniny.

4.2.3 Těkavé sloučeniny identifikované ve vzorcích V9 – V10

V této kapitole je uvedeno srovnání sýrů z výrob V9 a V10, vyrobených s použitím 2 různých kombinací mikrobiálních kultur (viz Tabulka 9), totožných s předchozími experimenty. Výroba V9 je opakováním výroby V3 (převaha mezofilní kultury), v případě výroby V10 byla provedena obměna s mírně nižším přídavkem mezofilní kultury (nahrazena tentokrát termofilní kulturou STI-12). Vzorky byly odebrány už po 2 měsících zrání.

Tabulka 14: Srovnání identifikovaných těkavých látek ve vzorcích V9-V10 (zrání 2 měsíce)

Chemická skupina	Vzorek	
skupina	V9	V10
aldehyd	4	4
alkohol	19	18
ester	8	7
furanoid	1	1
keton	9	9
kyselina	8	9
lakton	3	3
látky obsahující dusík	2	1
látky obsahující síru	1	1
terpenoid	14	9
uhlovodík	1	1
celkem	70	63

Zvýšený přídavek termofilní kultury *Streptococcus thermophilus* měl překvapivě za následek nižší počet identifikovaných sloučenin. Vzorek V9 obsahoval o 7 těkavých látek více jak vzorek V10 (viz Tabulka 14). Největší rozdíl je vidět u skupiny terpenoidů, kdy jejich počet byl o 5 větší než u V 10. V ostatních skupinách se počty mnoho nelišily. Největší skupinu opět tvořily alkoholy a terpenoidy.

Opět nebyl prokázán významný pozitivní vliv převahy termofilní kultury na identifikované těkavé sloučeniny.

4.2.4 Těkavé sloučeniny identifikované ve vzorcích V1 – V3 (konečná fáze zrání)

V této kapitole je uvedeno srovnání sýrů z výrob V1-V3, vyrobených s použitím 3 různých kombinací mikrobiálních kultur (viz Tabulka 9), odebraných po 8 měsících zrání.

Vzhledem k ekonomické náročnosti zrajeho procesu v praxi tyto sýry běžně zrají cca 2 měsíce a poté jsou expedovány do tržní sítě. To však může mít negativní vliv na jejich sensorické vlastnosti, neboť nemohou v dostatečném rozsahu proběhnout žádoucí biochemické procesy. Naše modelové vzorky proto byly ponechány zrát při obvyklé teplotě (8 – 14 °C) až 8 měsíců. V této „konečné fázi zrání“ byly analyzovány pouze dostupné vzorky, tak aby reprezentovaly vybrané kombinace kultur (konkrétně výroba V1, V2, V3). Vzorky V1 a V3 – převaha mezofilní kultury; vzorek V2 - mírně zvýšený obsah termofilní kultury LH B02. Tyto kombinace se osvědčily i z hlediska sensorické kvality (hodnocené v rámci souběžně probíhajících prací).

Vzorky V4 a V7 v konečné fázi zrání bohužel nebyly k dispozici; zkoumání vlivu převahy termofilní kultury na identifikované těkavé sloučeniny v pozdějších fázích zrání tak bude náplní dalších navazujících prací.

Tabulka 15: Srovnání identifikovaných těkavých látek ve vzorcích V1-V3 (zrání 8 měsíců)

chemická skupina	vzorek		
	V1	V2	V3
aldehyd	5	5	4
alkohol	17	13	19
ester	7	6	6
furanoid	0	0	0
keton	4	6	5
kyselina	8	9	8
lakton	1	1	1
látky obsahující dusík	1	2	2
látky obsahující síru	1	1	1
terpenoid	3	2	2
uhlovodík	2	2	2
celkem	49	47	50

Mezi vzorky opět nebyly nalezeny výrazné rozdíly, nejvíce těkavých látek obsahoval vzorek V3 (viz Tabulka 15). U této série vzorků nebyly identifikovány furanoidy. Nejvíce obsaženou skupinu tvořily alkoholy, ostatní skupiny byly zastoupeny výrazně v menším počtu.

Ani v konečné fázi zrání se neprojevil významný pozitivní vliv převahy termofilní kultury na identifikované těkavé sloučeniny.

4.2.5 Změny identifikovaných těkavých sloučenin v průběhu zrání sýrů

Kromě hlavního cíle, tedy vliv složení použitých kultur na těkavé sloučeniny v sýrech, byl zároveň posouzen i průběh zrání, resp. jeho vliv na obsah těkavých látek v sýrech.

Jak již bylo zmíněno, vzorky sýrů byly analyzovány v určitých intervalech zrání; ne všechny vzorky však byly k dispozici. Pro porovnání tedy byly použity dostupné vzorky, výsledky jsou uvedeny v Tabulkách 16 - 19. Konkrétně jsou prezentovány čtyři řady vzorků, pro lepší přehlednost označené tentokrát A-D.

Poměr kultur (LH B02 : STI-12 : Flora Danica)

- řada A – 15 : 8 : 77 – převaha mezofilní kultury
- řada B – 15 : 9 : 76 – převaha mezofilní kultury
- řada C – 19 : 9 : 72 – mírně zvýšen obsah termofilní kultury LH B02
- řada D – 50 : 25 : 25 – převaha termofilní kultury LH B02

Jak je patrné z Tabulek 16 – 19 oproti očekávání u všech řad dochází v průběhu zrání většinou ke snižování počtu identifikovaných sloučenin.

Tabulka 16: Změny identifikovaných těkavých sloučenin v průběhu zrání sýrů (řada A - zastoupení MB kultur LH B02 : STI-12 : Flora Danica v poměru 15:8:77)

chemická skupina	doba zrání [měs.]		
	3	4	8
aldehyd	2	3	5
alkohol	17	15	17
ester	6	6	7
furanoid	0	0	0
keton	6	6	4
kyselina	8	11	8
lakton	3	0	1
látky obsahující dusík	0	2	1
látky obsahující síru	1	1	1
terpenoid	14	8	3
uhlovodík	2	3	2
celkem	59	55	49

V případě řady A bylo největší množství těkavých látek identifikováno ve třetím měsíci zrání. Ve čtvrtém a osmém měsíci došlo k jejich poklesu. V samotných skupinách nedošlo k velkým výkyvům při úbytku. Počet látek obsahující síru se nezměnil vůbec (viz Tabulka 16). Pokud by byl vybrán tento poměr kultur (15:8:7), bylo by vhodné sýry expedovat nejpozději ve třetím měsíci zrání, kdy byl počet aromatických látek největší.

Tabulka 17: Změny identifikovaných těkavých sloučenin v průběhu zrání sýrů (řada B - zastoupení MB kultur LH B02 : STI-12 : Flora Danica v poměru 15:9:76)

Chemická skupina	Doba zrání [měs.]			
	2	4	6	8
aldehyd	4	4	5	4
alkohol	19	15	16	19
ester	8	5	9	6
furanoid	1	0	0	0
keton	9	6	7	5
kyselina	8	9	9	8
lakton	3	0	2	1
látky obsahující dusík	2	0	2	2
látky obsahující síru	1	1	1	1
terpenoid	14	10	6	2
uhlovodík	1	1	2	2
celkem	70	51	59	50

U řady B byl největší počet těkavých látek zaznamenán ve druhém měsíci zrání. V osmém měsíci došlo k výraznému poklesu a to hlavně u terpenoidů (viz Tabulka 17). Terpenoidy jsou těkavé i při nízkých teplotách. Pokud sýr neměl dostatečně tvrdou kůru, mohlo dojít k jejich úniku. K poklesu došlo také u laktonů, což je v souladu s literaturou, která popisuje v průběhu zrání pokles koncentrace těchto látek [17]. Ve 4. měsíci zrání laktony přechodně nebyly nalezeny vůbec; v této fázi mohl být přechodný nedostatek volných mastných kyselin, tudíž nedošlo k vytvoření hydroxy kyselin, ze kterých by se vytvořily laktony. Ostatní skupiny látek se vyskytovaly zhruba ve stejných počtech s mírným kolísáním. Pokud by byl při výrobě použit tento poměr kultur, bylo by vhodné sýr balit nejpozději po dvouměsíčním zrání, kdy se v něm nacházelo nejvíce těkavých látek.

Tabulka 18: Změny identifikovaných těkavých sloučenin v průběhu zrání sýrů (řada C - zastoupení MB kultur LH B02 : STI-12 : Flora Danica v poměru 19:9:72)

chemická skupina	doba zrání [měs.]		
	3	4	8
aldehyd	3	2	5
alkohol	15	18	13
ester	2	6	6
furanoid	0	0	0
keton	5	9	6
kyselina	9	9	9
lakton	3	0	1
látky obsahující dusík	0	1	2
látky obsahující síru	1	1	1
terpenoid	10	9	2
uhlovodík	2	6	2
celkem	50	61	47

Oproti ostatním řadám, u řady C bylo ve třetím měsíci identifikováno 50 těkavých látek (viz Tabulka 18), jejich počet ale vzrostl ve 4. měsíci zrání a v 8. měsíci zrání došlo opět k jejich poklesu. Největší pokles byl u terpenoidů, alkoholů a ketonů. Jedná se o těkavé látky, kdy mohlo dojít k jejich úniku v důsledku měkké kůry sýra. Došlo také k poklesu laktonů, jejichž koncentrace během zrání klesá. Dle dostupné literatury by měla být jejich nejvyšší koncentrace ve třetím měsíci zrání [17]. Pokud by byl využit tento poměr kultur (19:9:72), bylo by vhodné sýry balit nejpozději ve čtvrtém měsíci zrání.

Tabulka 19: Změny identifikovaných těkavých sloučenin v průběhu zrání sýrů (řada D - zastoupení MB kultur LH B02 : STI-12 : Flora Danica v poměru 50:25:25)

chemická skupina	doba zrání [měs.]	
	3	4
aldehyd	5	4
alkohol	20	16
ester	4	5
furanoid	0	0
keton	8	8
kyselina	8	7
lakton	3	0
látky obsahující dusík	1	0
látky obsahující síru	1	1
terpenoid	11	9
uhlovodík	2	2
celkem	63	52

U řady D bylo ve třetím měsíci zrání identifikováno 63 těkavých látek, ve čtvrtém měsíci zrání došlo ke ztrátě 11 z nich (viz Tabulka 19). Jednalo se hlavně o alkoholy a terpenoidy, jak již bylo zmíněno, mohlo dojít k jejich úniku v důsledku měkké kůry sýra. Počet ostatních látek zůstal přibližně stejný. Pokud by byl vybrán tento poměr kultur (50:25:25), bylo by vhodné sýry expedovat nejpozději ve třetím měsíci zrání.

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo identifikovat aromaticky aktivní látky v modelových vzorcích sýrů typu Moravský bochník, vyrobených standardním technologickým postupem na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně. Bylo vyrobeno pět různých variant modelových sýrů, lišících se poměrem použitých mikrobiálních kultur, v různých fázích zrání byly odebírány vzorky pro analýzu.

Pro identifikaci těkavých látek byla vybrána metoda SPME-GC-MS, látky byly identifikovány na základě srovnání hmotnostních spekter s dostupnou knihovnou spekter. Celkově bylo ve vzorcích identifikováno 148 těkavých sloučenin, jež byly rozděleny do 11 chemických skupin. Největší skupinu tvořily alkoholy, terpenoidy a kyseliny, naopak nejmenší skupinu tvořily furanoidy a látky obsahující síru. Na základě srovnání s dostupnou literaturou 82 z identifikovaných sloučenin bylo označeno jako aromaticky aktivní.

Pro výrobu modelových sýrů byly použity tři komerčně dostupné lyofilizované kultury (mezofilní aromatická kultura, obsahující *Lactococcus* spp. a *Leuconostoc* spp., a dva typy termofilních kultur, *Lactobacillus helveticus* a *Streptococcus thermophilus*), resp. jejich různé kombinace s převažující mezofilní nebo termofilní kulturou. Nepodařilo se prokázat očekávaný vliv převahy termofilní kultury, mezi vzorky nebyly výrazné rozdíly v počtu identifikovaných sloučenin; z hlediska senzorické kvality výrobků se dokonce více osvědčily kombinace s převažující mezofilní kulturou.

Oproti očekávání docházelo během zrání sýrů ke snižování počtu identifikovaných sloučenin u všech sledovaných kombinací kultur. Tento trend je zvláště výrazný u terpenoidů a laktonů. U kombinací s převahou mezofilní kultury bylo dosaženo nejvyššího počtu sloučenin už po 2-3 měsících zrání, při zvýšeném obsahu termofilní kultury po 3-4 měsících zrání. Z tohoto hlediska je možné za optimální dobu zrání tohoto typu sýrů považovat cca 3 měsíce.

Jako nejvhodnější pro praktické používání lze předběžně navrhnout kombinaci kultur LH B02 : STI-12 : Flora Danica v poměru 15:9:76; zde byl identifikován největší počet těkavých látek už po 2 měsících zrání.

Pro lepší vyjádření rozdílů mezi vzorky, resp. změn během výroby a zrání sýrů, bude v následující práci vybrána a ověřena vhodná metoda pro kvantifikaci těkavých látek, založená na metodě vnitřního standardu. Tato bude následně aplikována na vzorky sýrů pro vyjádření změn obsahu těkavých látek v závislosti na změnách různých podmínek výroby a především jejich vliv na senzorickou kvalitu sýrů.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2012, 569 s. ISBN 978-80-7418-145-0.
- [2] FOX, P. F. *Cheese: chemistry, physics, and microbiology*. 3rd ed. London: Elsevier, 2004. ISBN 0122636538.
- [3] CROW, V. – CURRY, B. *Lactobacillus helveticus*. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 1. vyd. Amsterdam: Academic Press, 2003. ISBN 0-12-227238-2. s. 1497-1500.
- [4] PEARCE, L. – FLINT, S. *Streptococcus thermophilus*. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 1. vyd. Amsterdam: Academic Press, 2003. ISBN 0-12-227239-0. s. 2577-2582.
- [5] FOX, P. – Biochemistry of Cheese Ripening. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 1. vyd. Amsterdam: Academic Press, 2003, 557 s., ISBN 0-12-227236-6. s. 320-326.
- [6] FRÖHLICH-WYDER, Marie-Therese, Hans-Peter BACHMANN a Michael Gerard CASEY. Interaction between propionibacteria and starter / non-starter lactic acid bacteria in Swiss-type cheeses. *Le Lait* [online]. 0201n. l., 82(1), 1-15 [cit. 2017-03-04]. DOI: 10.1051/lait:2001001. ISSN 0023-7302.
- [7] BAER, Augustin; RYBA, Irène. Interactions between propionic acid bacteria and thermophilic lactic acid bacteria. *Le Lait*, 1999, 79.1: 79-92.
- [8] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin II*. Praha: VŠCHT, 2002, 236 s. ISBN 80-7080-510-2.
- [9] KNĚZ, Václav a Zdeněk ŽÁČEK, SEDLÁČKOVÁ, Hana, ed. *Sýry a příprava sýrových pokrmů*. Praha: SNTL, 1992. ISBN 80-03-00461-6
- [10] BUŇKA, František, Jan HRABĚ a Stanislav KRÁČMAR. The effect of sterilisation on amino acid contents in processed cheese. *International Dairy Journal* [online]. Elsevier, 2004, 14(9), 829-831 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.1016/j.idairyj.2004.02.008. ISSN 0958-6946.
- [11] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin. II. Rozš. a přeprac.* 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, xx, 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6
- [12] MCSWEENEY, Paul L H. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 2004, 57(2-3), 127-144. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2004.00147.x. ISSN 1364-727x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-0307.2004.00147.x>
- [13] MARILLEY, L. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, 90(2), 139-159. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00304-0. ISSN 01681605. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160503003040>

- [14] MCSWEENEY, Paul L.H. a Maria José SOUSA. *Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review*. DOI: 10.1051/lait:2000127. ISBN 10.1051/lait:2000127. Dostupné také z: <http://www.edpsciences.org/10.1051/lait:2000127>
- [15] CADWALLADER, K.R. a T.K. SINGH. Flavours and Off-Flavours in Milk and Dairy Products: A review. *Advanced Dairy Chemistry*. New York, NY: Springer New York, 2009. DOI: 10.1007/978-0-387-84865-5_14. ISBN 978-0-387-84864-8. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-84865-5_14
- [16] FOX, P. F. *Cheese: chemistry, physics, and microbiology*. 3rd ed. London: Elsevier, 2004. ISBN 01-226-3652-X.
- [17] HASSAN, Fatma A.M., Mona A.M. ABD EL-GAWAD a A.K. ENAB. *Flavour compounds in cheese (review)*. DOI: 10.7813/2075-4124.2012/4-5/A.20. ISBN 10.7813/2075-4124.2012/4-5/A.20. Dostupné také z: [http://www.ijar.lit.az/pdf/ijar/2012\(19A-20\).pdf](http://www.ijar.lit.az/pdf/ijar/2012(19A-20).pdf)
- [18] SMIT, G, B SMIT a W ENGELS. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, 29(3), 591-610. DOI: 10.1016/j.femsre.2005.04.002. ISSN 01686445. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.femsre.2005.04.002>
- [19] FOX, P. F., T. K. SINGH a P. L. H. MCSWEENEY. *Biogenesis of Flavour Compounds in Cheese: revue littéraire mensuelle*. DOI: 10.1007/978-1-4615-1913-3_6. ISBN 10.1007/978-1-4615-1913-3_6. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-1913-3_6
- [20] YVON, Mireille, Liesbeth RIJNEN a P. L. H. MCSWEENEY. Cheese flavour formation by amino acid catabolism: revue littéraire mensuelle. *International Dairy Journal*. 2001, 11(4-7), 185-201. DOI: 10.1016/S0958-6946(01)00049-8. ISBN 10.1007/978-1-4615-1913-3_6. ISSN 09586946. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694601000498>
- [21] MUELLER, J. HOWARD, et al. Acid hydrolysates of casein to replace peptone in the preparation of bacteriological media. *J. Immunol*, 1941, 40: 33-38.
- [22] THIERRY, A. *Varied volatile compounds are produced by Propionibacterium freudenreichii in Emmental cheese*. DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.12.018. ISBN 10.1016/j.foodchem.2003.12.018. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814604000081>
- [23] FRIEDRICH, Jane E.; ACREE, Terry E. Gas chromatography olfactometry (GC/O) of dairy products. *International Dairy Journal*, 1998, 8.3: 235-241.
- [24] CURIONI, P. M. G.; BOSSET, J. O. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*, 2002, 12.12: 959-984

- [25] VÍTOVÁ, E. *Hodnocení tvorby těkavých senzoricky účinných látek mikrobiálních metabolitů a jejich charakterizace*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2003. 110 s.
- [26] BELITZ, H.-D., W. GROSCH a P. SCHIEBERLE. *Aroma Compounds*. DOI: 10.1007/978-3-662-07279-0_6. ISBN 10.1007/978-3-662-07279-0_6. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-07279-0_6
- [27] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [28] MERMET, Jean-Michel., Matthias. OTTO a Miguel. VALCÁRCEL CASES. *Analytical chemistry: a modern approach to analytical science*. 2nd ed. /. Great Britain: Wiley-VCH, c2004. ISBN 35-273-0590-4
- [29] CARUNCHIA WHETSTINE, Mary E., Keith R. CADWALLADER a MaryAnne DRAKE. *Characterization of Aroma Compounds Responsible for the Rosy/Floral Flavor in Cheddar Cheese*. DOI: 10.1021/jf048278o. ISBN 10.1021/jf048278o. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf048278o>
- [30] QIAN, M., G. REINECCIUS a P. SCHIEBERLE. Identification of Aroma Compounds in Parmigiano-Reggiano Cheese by Gas Chromatography/Olfactometry. *Journal of Dairy Science*. 2002, 85(6), 1362-1369. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74202-1. ISBN 10.1007/978-3-662-07279-0_6. ISSN 00220302. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030202742021>
- [31] LARRÁYOZ, P., et al. Optimization of indirect parameters which affect the extractability of volatile aroma compounds from Idiazábal cheese using analytical supercritical fluid extractions (SFE). *Food chemistry*, 1999, 64.1: 123-127.
- [32] LARRAYOZ, P., et al. Evaluation of supercritical fluid extraction as sample preparation method for the study of Roncal cheese aroma. *International dairy journal*, 2000, 10.11: 755-759.
- [33] HONG-XIN, Jia, Su MI-YA a Gong GUANG-YU. *Influence of Lactobacillus casei LC2W on the proteolysis and aroma compounds of Cheddar cheese during ripening period*. DOI: 10.1080/19476337.2014.1003099. ISBN 10.1080/19476337.2014.1003099. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19476337.2014.1003099>
- [34] DI CAGNO, Raffaella, Jean BANKS, Liz SHEEHAN, Patrick F. FOX, E.Y. BRECHANY, Aldo CORSETTI a Marco GOBBETTI. *Comparison of the microbiological, compositional, biochemical, volatile profile and sensory characteristics of three Italian PDO ewes' milk cheeses*. DOI: 10.1016/S0958-6946(03)00145-6. ISBN 10.1016/S0958-6946(03)00145-6. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694603001456>

- [35] FRANK, Damian Conrad, Caroline Mary OWEN a John PATTERSON. *Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds*. DOI: 10.1016/S0023-6438(03)00144-0. ISBN 10.1016/S0023-6438(03)00144-0. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643803001440>
- [36] BEZERRA, Taliana Kênia Alves, et al. Volatile profile in goat coalho cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 76: 209-215.
- [37] KARALI, Fotini, Aikaterini GEORGALA, Theophilos MASSOURAS a Stelios KAMINARIDES. *Volatile compounds and lipolysis levels of Kopanisti, a traditional Greek raw milk cheese*. DOI: 10.1002/jsfa.5978. ISBN 10.1002/jsfa.5978. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.5978>
- [38] LECLERCQ-PERLAT, Marie-Nolle, Eric LATRILLE, Georges CORRIEU a Henry-Eric SPINNLER. *Controlled production of Camembert-type cheeses. Part II. Changes in the concentration of the more volatile compounds*. DOI: 10.1017/S0022029904000202. ISBN 10.1017/S0022029904000202. Dostupné také z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0022029904000202
- [39] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [40] VITOVA, E., R. MOKANOVA, L. BABAK, J. ZEMANOVA a K. SKLENAROVA. The changes of flavour and aroma active compounds content during production of Edam cheese. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* [online]. 1101, (1), 255-261 [cit. 2017-04-01]. ISSN 1211-8516.
- [41] NORONHA, N., D.A. CRONIN, E.D. O'RIORDAN a M. O'SULLIVAN. Flavouring of imitation cheese with enzyme-modified cheeses (EMCs): Sensory impact and measurement of aroma active short chain fatty acids (SCFAs). *Food chemistry* [online]. 2008, 106, 905-913 [cit. 2017-04-01]. ISSN 0308-8146.
- [42] SCHOMBURG, Gerhard. *Gas chromatography: a practical course*. New York: VCH, c1990. ISBN 08-957-3889-9.
- [43] SÁDECKÁ, Jana, et al. Principal volatile odorants and dynamics of their formation during the production of May Bryndza cheese. *Food chemistry*, 2014, 150: 301-306.
- [44] PINHO, O, C PÉRÈS a I.M.P.L.V.O FERREIRA. Solid-phase microextraction of volatile compounds in "Terrincho" ewe cheese: Comparison of different fibers. *Journal of Chromatography A* [online]. Elsevier B.V, 2003, 1011(1), 1-9 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)01066-5. ISSN 0021-9673
- [45] VAN RUTH, Saskia M. Methods for gas chromatography-olfactometry: a review. *Biomolecular Engineering*, 2001, 17.4: 121-128.
- [46] CARUNCHIAWHETSTINE, M.E., Y. KARAGUL-YUCEER, Y.K. AVSAR a M.A. DRAKE. *Identification and Quantification of Character Aroma Components in Fresh*

Chevre-style Goat Cheese. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb07043.x. ISBN 10.1111/j.1365-2621.2003.tb07043.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2003.tb07043.x>

[47] FUCHSMANN, Pascal, Mireille Tena STERN, Yves-Alain BRÜGGER a Katharina BREME. *Olfactometry Profiles and Quantitation of Volatile Sulfur Compounds of Swiss Tilsit Cheeses*. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b02536. ISBN 10.1021/acs.jafc.5b02536. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.5b02536>

[48] BARRON, Luis Javier R., Yolanda REDONDO, María ORTIGOSA, María CARBONELL, Susana GARCÍA, Paloma TORRE, Mertxe DE RENOBALLES a Estrella FERNÁNDEZ-GARCÍA. Comparison of dynamic headspace methods used for the analysis of the volatile composition of Spanish PDO ewe's raw milk cheeses. *Le Lait*. 2005, 85(6), 491-513. DOI: 10.1051/Le_lait:2005036. ISSN 0023-7302. Dostupné také z: http://www.edpsciences.org/10.1051/Le_lait:2005036

[49] SANCHEZ-PALOMO, E., GARCIA-CARPINTERO, E.G., ALONSO-VILLEGAS, R., GONZALEZ-VINAS, M.A., 2010: Characterization of aroma compounds of Verdejo white wines from the La Mancha region by odour activity values. *Flavour and Fragrance Journal*, 25, 6: 456–462. ISSN: 0882-5734.

[50] Sádecká, J. – Polovka, M. – Kolek, E. – Belajová, E. – Tobolková, B. – Daško, L. – Durec, J.: Orange juice with pulp: Impact of pasteurization and storage on flavour, polyphenols, ascorbic acid and antioxidant activity. *Journal of Food and Nutrition Research*, 53, 2014, pp. 371-388.

[51] Hempfling, K., Fastowski, O., Kopp, M., Nikfardjam, M.P., Engel, K.H. Analysis and Sensory Evaluation of Gooseberry (*Ribes uva crisa* L.) Volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, Vol. 61, No. 26, pp. 6240-6249. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf401310v.

[52] KOUBEK, Miroslav. *Optimalizace a validace GC-MS metody pro stanovení těkavých aromatických látek v sýrech*. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2016, 65 stran : ilustrace.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Lb. = *Lactobacillus*

Subsp. = poddruh

Sc. = *Streptococcus*

DMDS = dimethyl disulfid

DMTS = dimethyl trisulfid

Bv. = biovar

Spp. = species

SE = extrakce rozpouštědlem

SFE = extrakce superkritickou tekutinou

SDE = simultánní destilace a extrakce

SPME = mikroextrakce pevnou fází

GC = plynová chromatografie

GC/MS = plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

GC-O = plynová chromatografie s olfaktometrickým detektorem

8 PŘÍLOHY

Příloha 1: Přehled těkavých (aromaticky aktivních) látek identifikovaných ve všech vzorcích

				Vzorek													
sloučenina	skupina	Tr[min.]	RSD [%]	V1 [%]	V2 [%]	V3 [%]	V4 [%]	V5 [%]	V6 [%]	V7 [%]	V9 [%]	V10 [%]	V1-8m [%]	V2-8m [%]	V3-8m [%]	V9-6m [%]	
ethyl-acetát	ester	3,95	0,00						69; x								** [48]
methanol	alkohol	4,11	0,41	37; 34	25; 43	61; 36	42; 34	92; 88		75; 37	85; 76	73; 50					** [49]
3-methylbutanal	aldehyd	4,48	0,00													68; 63	** [49]
2-hydroxyoctová kyselina	kyselina	4,67	0,00	x; 94													*
ethanol	alkohol	4,86	0,38	59; 76	77; 58	59; 54	70; 45	78; 69	83; 80	75; 64	57; 59	49; 81	65; 53	76; 68	75; 60	80; 50	** [48]
methyl-butanoát	ester	6,12	0,25								87; 87	96; 95	89; 87	84; 79	84; 79	95; 90	** [49]
3-methylbutan-2-on	keton	6,13	0,00		x; 39		x; 15										** [25]
butan-2,3-dion	keton	6,13	0,13	66; 58	66; x	63; 58	23; x	69; 25									**[48]

3-ethylnonan-2-on	keton	6,16	0,11						24; 17	25; 25						*	
ethyl-butyrát	ester	7,59	0,41	82; 86	84; 27	83; x	78; 52		83; 80			78; 80		87; 82		78; 52	** [48]
isobutyl-acetát	ester	8,78	0,00				x; 69										** [48]
butyl-acetát	ester	8,82	0,21	52; x	53; x	73; 89	59; x	49; 58	56; 55	15; 80							** [48]
2,5,6-trimethyldekan	uhlovodík	9,27	2,43		x; 17			43; x									*
hexanal	aldehyd	9,17	0,27	35; x		62; 39	50; 31	10; 49		71; 49	79; 79	44; 58		27; x	21; x		** [48]
undekan	uhlovodík	9,19	0,21						23; 21				17; 18			17; 11	*
2,5,9-trimethyldekan	uhlovodík	9,20	0,00		x; 20												*
2-methylpropan-1-ol	alkohol	9,49	0,05										x; 60		48; 69		** [48]
2-methylbutan	uhlovodík	9,50	0,00	13; x													** [48]
β-thujen	terpenoid	10,16	0,00								30; x						** [50]

sabinen	terpenoid	10,24	0,91					31; 46	x; 37	37; 36							*
β -felandren	terpenoid	10,26	0,78				x; 37		52; x								* [50]
pentan-2-ol	alkohol	10,84	2,81										x; 33		x; 46		** [48]
ethyl-pentanoát	ester	11,16	0,33						52; 41	44; x	75; x	48; 59		23; x	51; 31	71; 42	** [48]
γ -terpinen	terpenoid	11,29	0,00				x; 16										*
1,3-dimethylbenzen	uhlovodík	11,38	0,37											33; 39	x; 52		*
α -pinen	terpenoid	11,38	0,73					31; 22	38; 13	35; 12	x; 28	43; 52					** [48]
3-karen	terpenoid	11,53	0,00		12; x												** [50]
β -ocimen	terpenoid	11,64	0,00							10; x							** [50]
butan-1-ol	alkohol	11,69	0,46				x; 22			x; 41	x; 45	72; x					** [48]
heptan-3-on	keton	11,91	0,31		40; 70							67; x					** [25]

β-myrcen	terpenoid	12,24	0,68	69; 57	56; 76	x; 59	44; x	x; 75	66; 74	x; 60	x; 57	59; 47					*
heptan-2-on	keton	13,12	0,23	45; 52	60; 57	57; 50	60; 50	45; 29	52; 51	40; 31	53; 42	49; 39	60; 62	66; 58	69; 77	47; 52	** [48]
heptanal	aldehyd	13,27	0,19			49; x				x; 41							** [24]
methyl-hexanoát	ester	13,31	0,25								87; 87	89; 80	89; 88	89; 88	89; 90	88; 87	** [48]
4-methylnonan	uhlovodík	13,33	0,00		x; 6												*
dodekan	uhlovodík	13,33	0,18	10; x	23; x		9; x			7; x							** [24]
D-limonen	terpenoid	13,62	0,51	50; 44	55; 42	48; 49	37; 39	49; 46	46; 51	47; 31	43; 23	50; 48	41; 35	31; 19	44; 42	15; 49	** [48]
3-methylbutanol	alkohol	14,14	0,25	25; 10			43; x	47; 20	40; 50	x; 45			x; 42	27; 48	45; 45	60; 43	** [48]
ethyl-hexanát	ester	15,25	0,19	49; 39	44; x	35; x	51; 57	41; 58	48; 48	56; 31	49; 49	47; 47	56; 50	49; 51	52; 69	46; 57	** [48]
ethylester 4-methylpentanové kyseliny	ester	15,26	0,00		x; 34												*
pentan-1-ol	alkohol	15,36	6,54	24; x	33; 26	19; x		27; 36	52; 57	47; 37	32; 18	13; 18	43; 25			24; 19	** [48]

5-methyl-1-fenylhexan-1-on	keton	15,79	0,00				x; 24										*
3-methylbut-3-en-1-ol	alkohol	15,97	0,09											33; 12	x; 14		** [25]
pent-3-en-1-ol	alkohol	16,01	0,26								12; 10				13; x		*
styrene	uhlovodík	16,41	0,15	34; 29	26; 39	35; 39	x; 40	41; 39	37; 42	34; 38	38; 44	31; 39	40; 34	36; 38	36; x	37; 40	** [48]
o-cymen	terpenoid	16,82	0,24	23; x	24; 30	25; 24	28; 31	26; 32	23; 25	21; 31	26; 22						** [48]
hexyl-acetát	ester	16,93	0,00								x; 65						** [48]
acetoin	keton	17,63	0,28	85; 86	80; 82	83; 84	83; 81	82; 80	81; 81	76; 72	84; 85	79; 79	66; 70	71; 71	57; 73	84; 80	** [24]
methyl-acetát	ester	18,33	0,03													60; 77	** [48]
1-hydroxypropan-2-on	keton	18,40	0,16								86; 74	44; 87					*
heptan-2-ol	alkohol	18,97	0,15					41; 57	57; 42	40; 50	44; 21	45; 42	44; 66	48; 43	49; 66	52; 50	** [48]
3-methylbut-2-en-1-ol	alkohol	19,13	0,03	x; 75	71; x	51; x	69; x										** [25]

prenol	alkohol	19,13	0,17						67; 69		47; 65	66; 73	42; x	x; 52	x; 41	38; 62	*
2-methylbut-2-en-1-ol	alkohol	19,14	0,20							48; 48					47; x		*
2,6-dimethylpyrazin	dusík	19,34	0,17	x; 45						39; 36	74; 76	70; 43	48; 53	59; 65	73; 71	73; 70	** [35]
6-methylhept-5-en-2-on	keton	19,80	0,74						29; 45	62; 86	64; 73	55; 75	41; 63		62; 71	49; x	** [51]
ethylester 2-hydroxybutanové kyseliny	ester	20,09	0,00	x; 22													*
pentan-3-ol	alkohol	20,09	0,16		33; 57						25; 18	21; x				15; x	*
butan-2-ol	alkohol	20,10	0,22							x; 26					34; 18		** [48]
2-methylpentan-3-ol	alkohol	20,10	0,00									x; 9					*
ethylester kyseliny mléčné	ester	20,10	0,07										20; 45				** [49]
hexanol	alkohol	20,43	0,12	19; 12	15; x	29; 16	34; 49	44; 23	24; 34	34; 47	32; 22	34; 39	43; 31	40; 34	37; 51	40; 27	** [48]
2-methylpent-1-en	uhlovodík	20,43	0,00		16; x												*

2-hydroxypentan-3-on	keton	20,80	0,15				x; 41				49; 57	61; 63		x; 31		66; 62	** [24]
4-methylpent-1-en-3-ol	alkohol	20,80	0,00		x; 22												*
hex-3-en-1-ol	alkohol	21,83	0,20						21; x	16; 22					19; x		** [49]
methyl-oktanoát	ester	21,97	0,08										66; 56		41; 39	49; 46	** [25]
nonan-2-on	keton	21,99	0,08	45; 58	58; 56	70; 50	53; 62	60; 75	41; 44	62; 76	71; 69	53; 69		69; 64			** [48]
nonanal	aldehyd	22,20	0,11	45; 33	54; 36	67; 46	42; 37	54; 35	67; 57	59; 65	47; 32	44; 70	52; 49	44; 41	45; 42	53; 56	** [24]
trimethyl-pyrazin	dusík	22,48	0,51	x; 57	x; 53						x; 71			94; 83	85; 86	89; 56	** [35]
okt-3-en-2-on	keton	22,81	0,02	20; 47	x; 33												*
β-thujon	terpenoid	23,31	0,07	40; x	41; x	x; 43		29; x		31; 39							*
3,6-dimethyloktan-3-ol	alkohol	23,78	0,00								28; x						*
ethyl-oktanoát	ester	23,87	0,12	57; x		x; 71	58; x		66; 58	47; 53	46; x	71; 70	56; 59		49; x	65; 65	** [25]

cis-linalool oxid	furanoid	24,17	0,06								x; 54	33; 34					*
non-1-en-3-ol	alkohol	24,57	0,00										x; 31				*
okt-1-en-3-ol	alkohol	24,57	0,04	67; 54	66; 50	67; x	25; 67										*
oct-1-en-3-ol	alkohol	24,58	0,12					41; 72	62; 56	48; 55	50; x	28; 35			47; x	18; 41	*** [51]
heptan-1-ol	alkohol	24,77	0,10		12; 26		x; 31	23; 44	41; 30	35; 26	x; 38	29; 26	15; 16	30; 44		37; x	*** [48]
l-menthon	terpenoid	25,08	0,00								27; x						*
kyselina octová	kyselina	25,19	0,17	54; 55	52; 45	52; 47	54; 45	47; 57	55; 52	54; 60	58; 49	51; 48	56; 54	58; 50	49; 57	48; 54	*** [51]
2-ethylhexan-1-ol	alkohol	26,23	0,10	53; 36	32; 41	38; 35	32; 37	35; 37	33; 29	39; 37	37; 42	29; 26	35; 42	30; 32	38; 45	39; 21	*** [48]
dekanal	aldehyd	26,68	0,11							34; 21	42; x	30; 25	x; 24			x; 33	*** [24]
kafr	terpenoid	27,37	0,00		37; x	x; 69											*
nonan-2-ol	alkohol	27,60	0,10	7; x		40; x	42; 50	63; 44	40; 46	46; 34		23; 52	47; 43	49; 67	49; 68		*** [24]

undekan-1-ol	alkohol	27,61	0,00	x; 9	6; x												*
benzaldehyde	aldehyd	28,10	0,12	70; 43	42; 48	43; 52	41; 56	43; 50	40; 50	49; 44	50; 42	46; 43	44; 49	46; 43	55; 52	46; 49	** [49]
butan-2,3-diol	alkohol	28,94	1,56	39; 38	39; 43	43; 41	46; 45	43; 41	49; 38	39; 35	43; 42	37; 37	49; 48	60; 60	57; 51	49; 50	** [49]
linalool	terpenoid	29,22	0,13	56; x			48; 31	35; 30	x; 33	29; 21	51; 55	54; 51	18; 42		48; x	28; 70	** [24]
kyselina propionová	kyselina	29,50	0,00	55; x													** [24]
linalyl-acetát	terpenoid	29,67	0,00									x; 21					*
linalyl-butyrt	terpenoid	29,70	0,00								x; 37						*
2-propylpentyl-acetát	ester	29,74	0,07	20; 28													*
oktan-1-ol	alkohol	29,75	0,12		10; x	18; x	28; 21	50; 22	32; 35	32; 20						20; x	** [48]
oktylester kyseliny mravenčí	kyselina	29,76	0,00		19; 11												*
karyofylen	terpenoid	31,79	0,00			x; 19											** [51]

methyl-undekanoát	ester	32,05	0,00													22; x	*
undekan-2-on	keton	32,31	0,16		32; 47					59; 55	x; 57	50; 39		60; x	51; 45	31; x	** [24]
4-hydroxyhexan-3-on	keton	33,74	0,00							25; x							*
citronellyl-formiát	terpenoid	34,12	0,13						29; x		27; x						*
ethyl-dekanoát	ester	35,39	0,07		68; x						x; 44						** [48]
menthol	terpenoid	35,54	0,23						16; 54	13; 64		8; x		x; 16		12; x	*
kyselina máselná	kyselina	35,84	0,30	52; 50	61; 58	76; 60	75; 68	71; 60	78; 54	50; 61	54; 65	66; 73	81; 76	79; 78	75; 74	58; 77	** [48]
humulen	terpenoid	37,12	0,00			x; 42											** [50]
3,7-dimethyloktan-1-ol	alkohol	37,40	0,02	18; x	10; x	x; 23	20; x										*
2,7-dimethyl-oktan-1-ol	alkohol	37,45	0,09						15; x		24; x						*
(Furan-2-yl)methanol	alkohol	37,70	0,11	x; 37		61; x		67; 73		77; 71			75; x	51; 72	62; 81	77; 79	*

(Furan-3-yl)methanol	alkohol	37,74	0,14		x; 48		x; 50		x; 62		47; 42	45; 63	x; 46				*
kyselina 2-methylbutanová	kyselina	39,10	0,00	63; x													** [48]
kyselina 3-methylbutanová	kyselina	39,11	0,30			x; 56		51; 53				55; 24				x; 23	** [48]
kyselina 2-methylheptanová	kyselina	39,14	0,00		65; 27												*
kyselina 3-methylpentanová	kyselina	39,16	0,00											x; 20			*
isovalerová kyselina	kyselina	39,22	0,07								76; 51					31; x	** [49]
tridekan-7-on	keton	41,68	0,08			55; x										36; x	*
karvon	terpenoid	41,71	0,08	42; 78	70; 40		26; 59	47; 47	42; 44	46; 15	x; 36	45; 43					** [50]
citral	terpenoid	41,88	0,11						32; x		34; x					x; 35	*
kyselina pentanová	kyselina	43,33	0,18	59; x		75; 66	75; x	55; 65	70; 69	63; 74	54; 48	66; 30	x; 52	51; 55	66; 40	54; 57	** [48]
pent-3-en-1-ol	alkohol	43,49	0,00				13; x										*

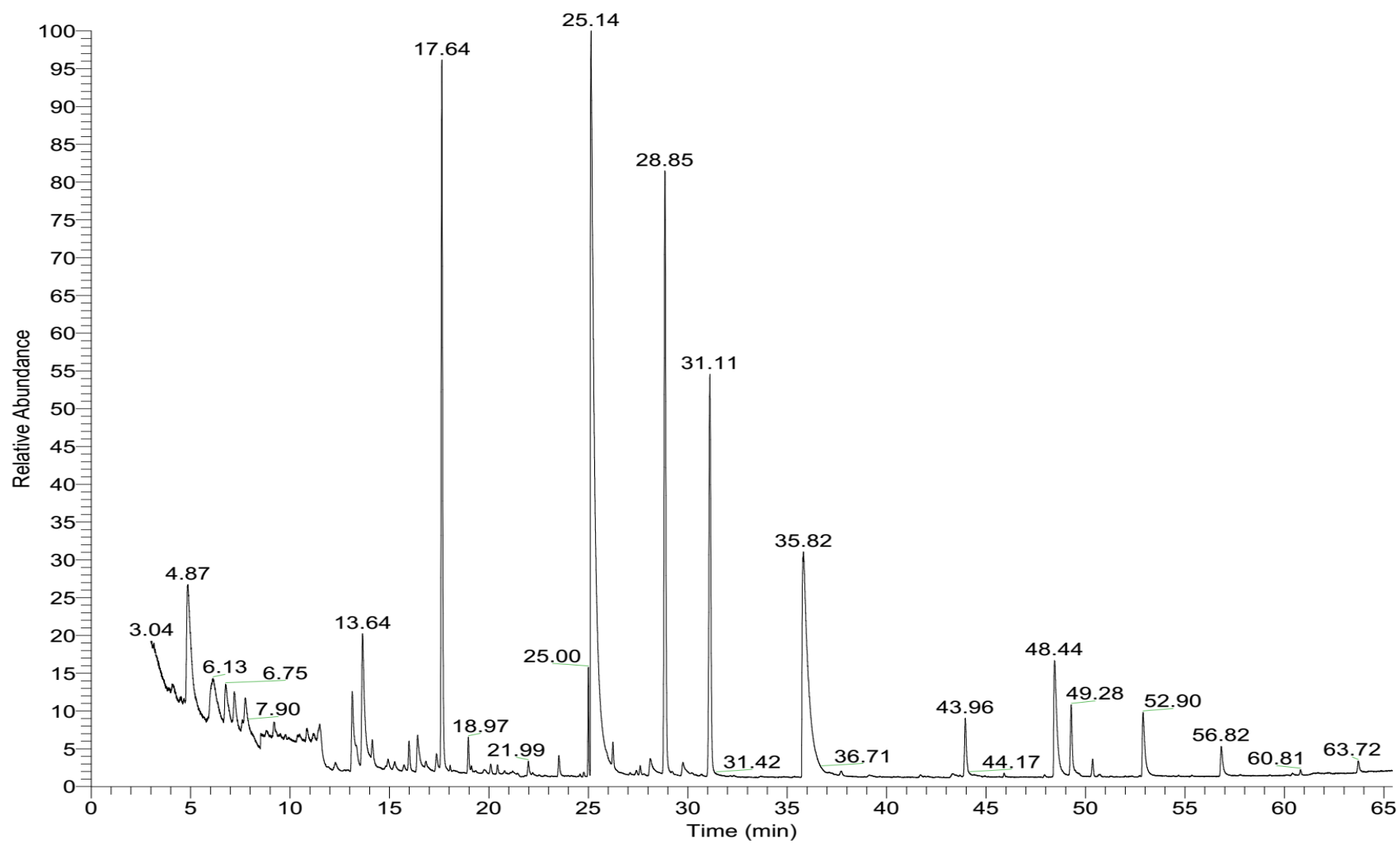
citronellol	terpenoid	43,95	0,07	33; 28	32; 39	39; 38	37; 37	35; 34	35; 30		47; 43	32; 32				10; 10	*
2-methyloktan-4-ol	alkohol	44,27	0,11							x; 20						x; 27	*
δ-kaprolakton	lakton	44,95	0,09					67; 47	x; 56	45; 55	35; 88	57; 87				24; 65	*
tridekan-2-on	keton	45,92	0,05	38; x		x; 53					50; x						*** [24]
isogeraniol	terpenoid	46,13	0,00								65; x						*
2,4,5-trimethylbenzaldehyd	aldehyd	46,89	0,00				13; x										*
α- isomethyljonon	keton	47,62	0,08		40; x		17; 68	34; 25	x; 44	30; x	44; 43	x; 41	x; 44			x; 42	*
geraniol	terpenoid	47,67	1,53	27; 26	38; 41	x; 47	60; 23	16; 27	59; 41	37; x	46; 64	x; 46	x; 57			x; 22	***[49]
kyselina hexanová	kyselina	48,45	0,10	54; 47	53; 54	55; 51	54; 69	56; 50	72; 74	67; 53	48; 48	50; 64	50; 56	46; 53	47; 47	45; 45	** [48]
benzylalkohol	alkohol	49,27	0,07	37; 38	48; 35	40; 45	45; 45	45; 39	41; 43	34; 59	56; 31	54; 53	26; 33	40; 25	62; 43	35; 46	** [49]
dimethylsulfon	síra	50,35	0,07	95; 95	93; 92	94; 95	95; 96	95; 93	94; 93	94; 94	92; 90	89; 82	95; 91	94; 95	95; 94	95; 93	*

fenylethanol	alkohol	50,65	0,06		x; 57	42; x							69; 51	68; 69	73; 82	70; 63	** [49]
δ-oktalakton	lakton	52,75	0,04					33; 65	29; 42	51; x	63; 65	30; 36					** [24]
kyselina heptanová	kyselina	52,90	0,13	85; 83	77; 79	81; 75	71; 88	79; 80	80; 70	85; 84	81; 69	72; 75	65; 70	60; x	85; 67	81; 81	** [24]
3-methylhexanová kyselina	kyselina	52,98	0,00											x; 39			*
fenol	alkohol	54,68	0,05	34; x	29; x	x; 18		66; 50	58; 50	39; x	55; 62	44; 31					*
isopropylmyristat	ester	55,35	0,03								68; 68	52; 33					*
cinnamaldehyd	aldehyd	55,66	0,04										29; 28	x; 33			*
kumarin	keton	56,15	0,07											50; 46	50; x		*
kyselina oktanová	kyselina	56,26	5,83	69; 57	66; 59	55; 78	81; 52	54; 59	49; 56	75; 57	53; 74	52; 68	55; x	67; 29	57; 77	52; 53	** [48]
propylester 2-hydroxybenzoové kyseliny	ester	57,77	0,00		6; x												*
3-methylester pentanové kyseliny	ester	58,85	0,00			x; 26											*

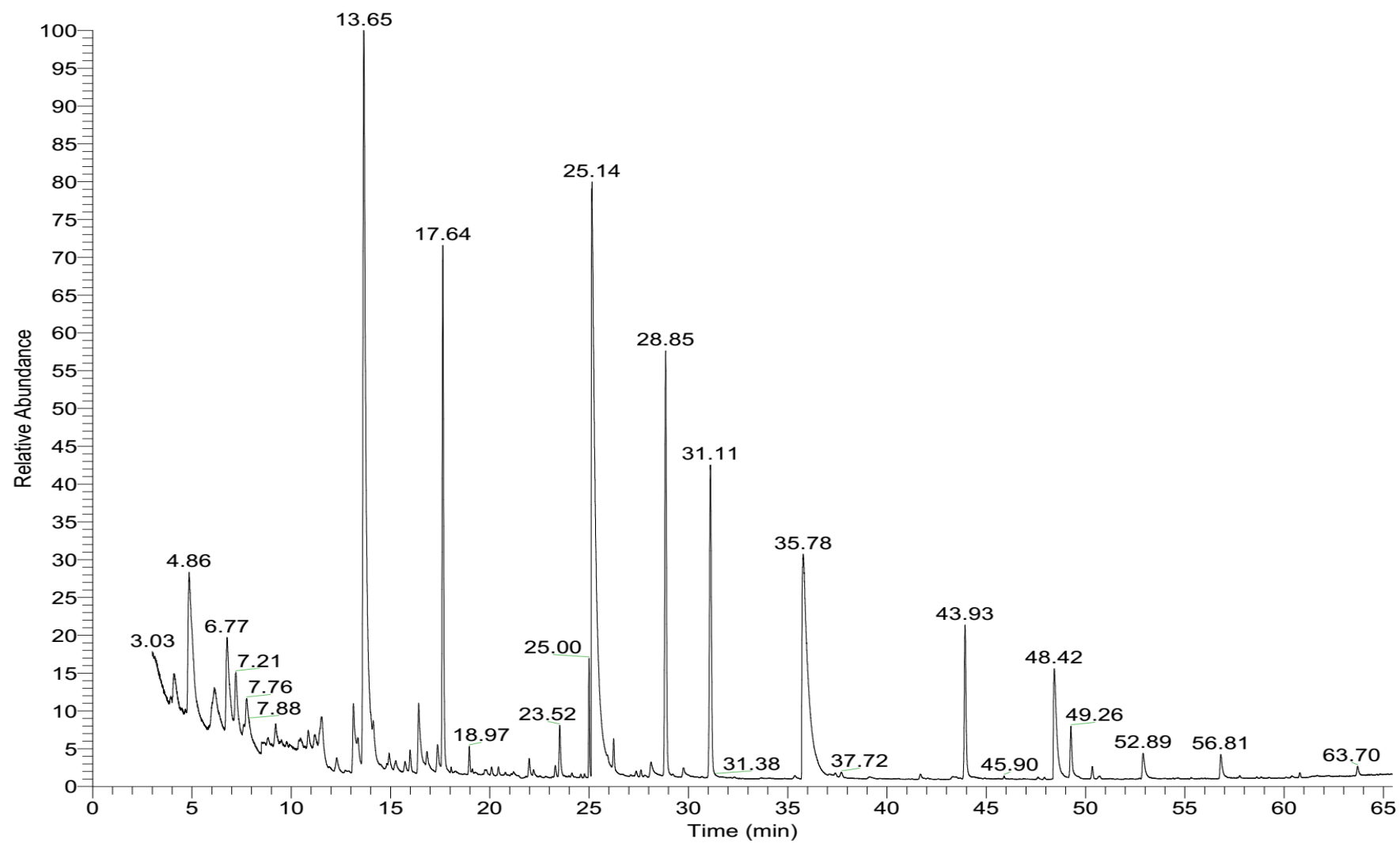
eugenol	alkohol	60,12	0,02								26; 26	25; 23					** [49]
kyselina nonanová	kyselina	60,42	0,05	66; x	73; x	x; 66		79; 69	22; 31	74; 30		60; 62	x; 52		x; 50		** [24]
δ-dekalakton	lakton	60,81	0,05					70; 75	30; 56	53; 68	65; 61	56; 67	65; 52	63; 51	56; 55	61; 48	** [24]
methyhl-hexadekanoát	ester	61,43	0,01										x; 40	52; x			*
thymol	terpenoid	61,67	0,00			x; 29											*
kadalen	terpenoid	61,71	0,02						64; 61								*
α-pentylcinnamaldehyd	aldehyd	62,84	0,03										85; 87	90; 89	86; 87	88; 64	*
kyselina dekanová	kyselina	63,61	0,91	69; 56	70; 79	87; 76	66; 72	64; 84	80; 65	69; 88	42; 42	48; 64	77; 64	81; 73	66; 44	64; 62	** [49]

*Značení vzorků viz Tabulka 8; hodnoty v tabulkách udávají pravděpodobnost shody dané sloučeniny s knihovnou spekter v % (vždy 2 měření); x - v daném měření nebylo detekováno; ** látka aromaticky aktivní; * látka pravděpodobně aromaticky aktivní*

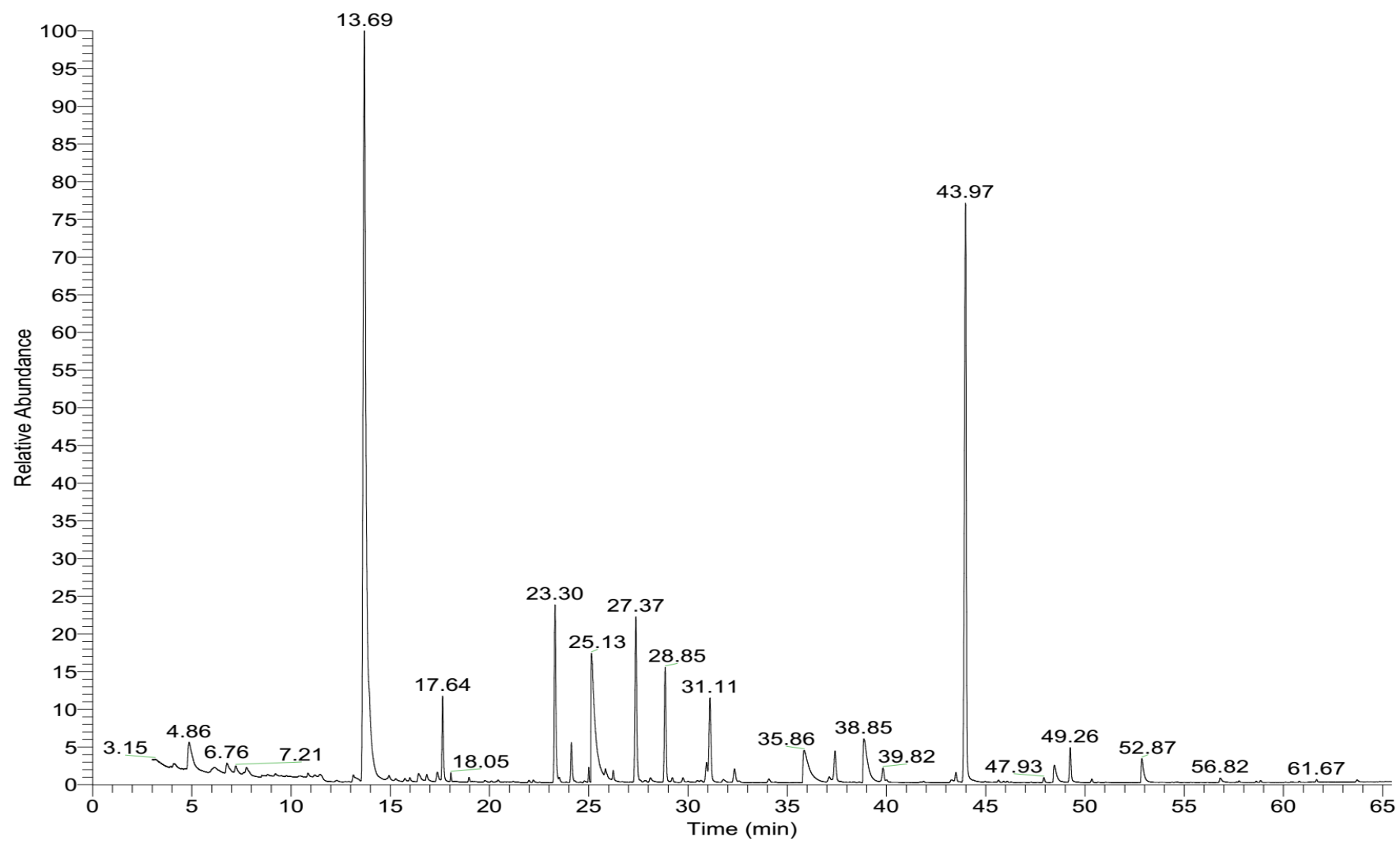
Příloha 2: Chromatogram těkavých látek identifikovaných ve vzorku V1. Identifikace píků viz tabulka v Příloze 1



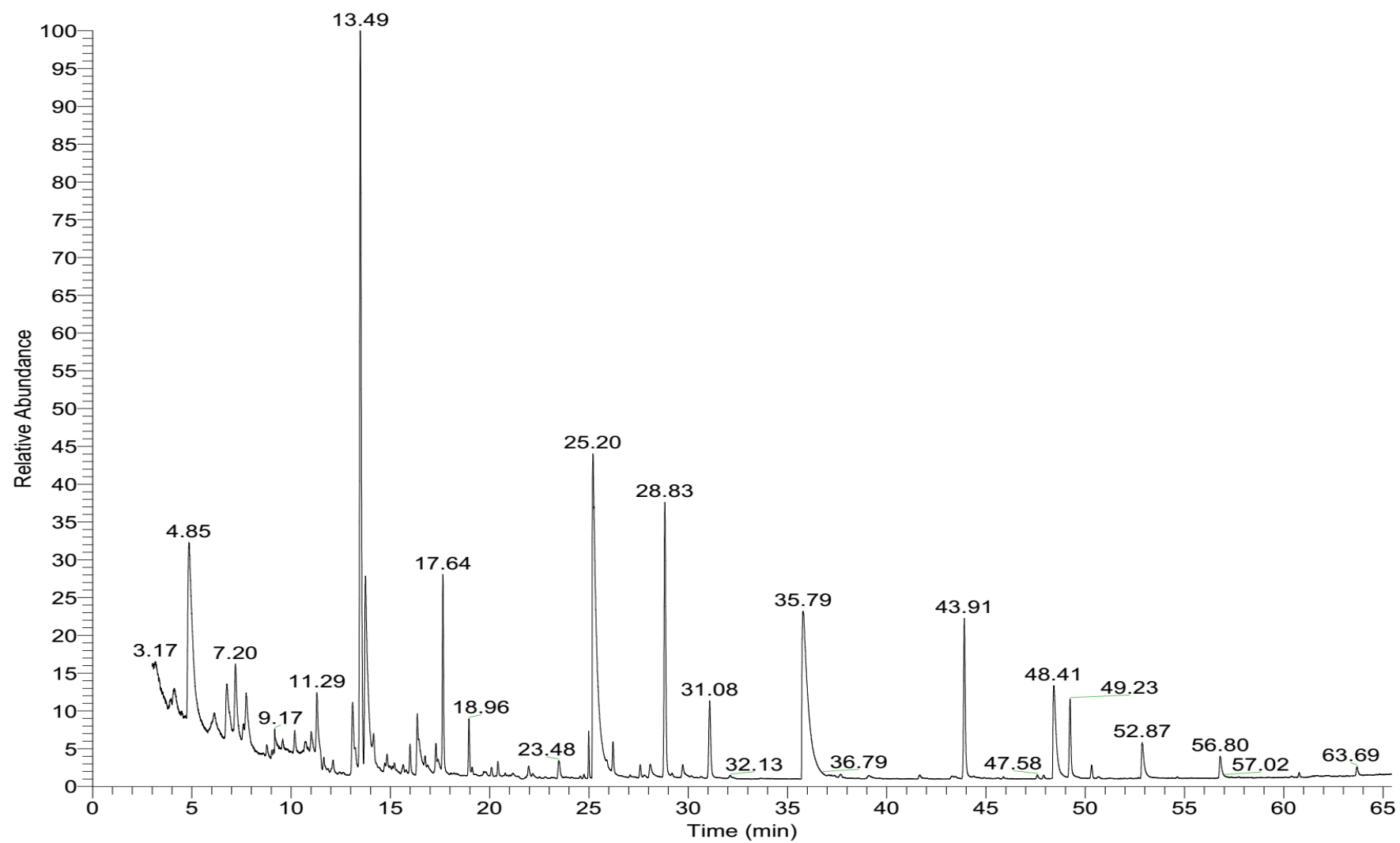
Příloha 3: Chromatogram těkavých látek identifikovaných ve vzorku V2. Identifikace píků viz tabulka v Příloze 1



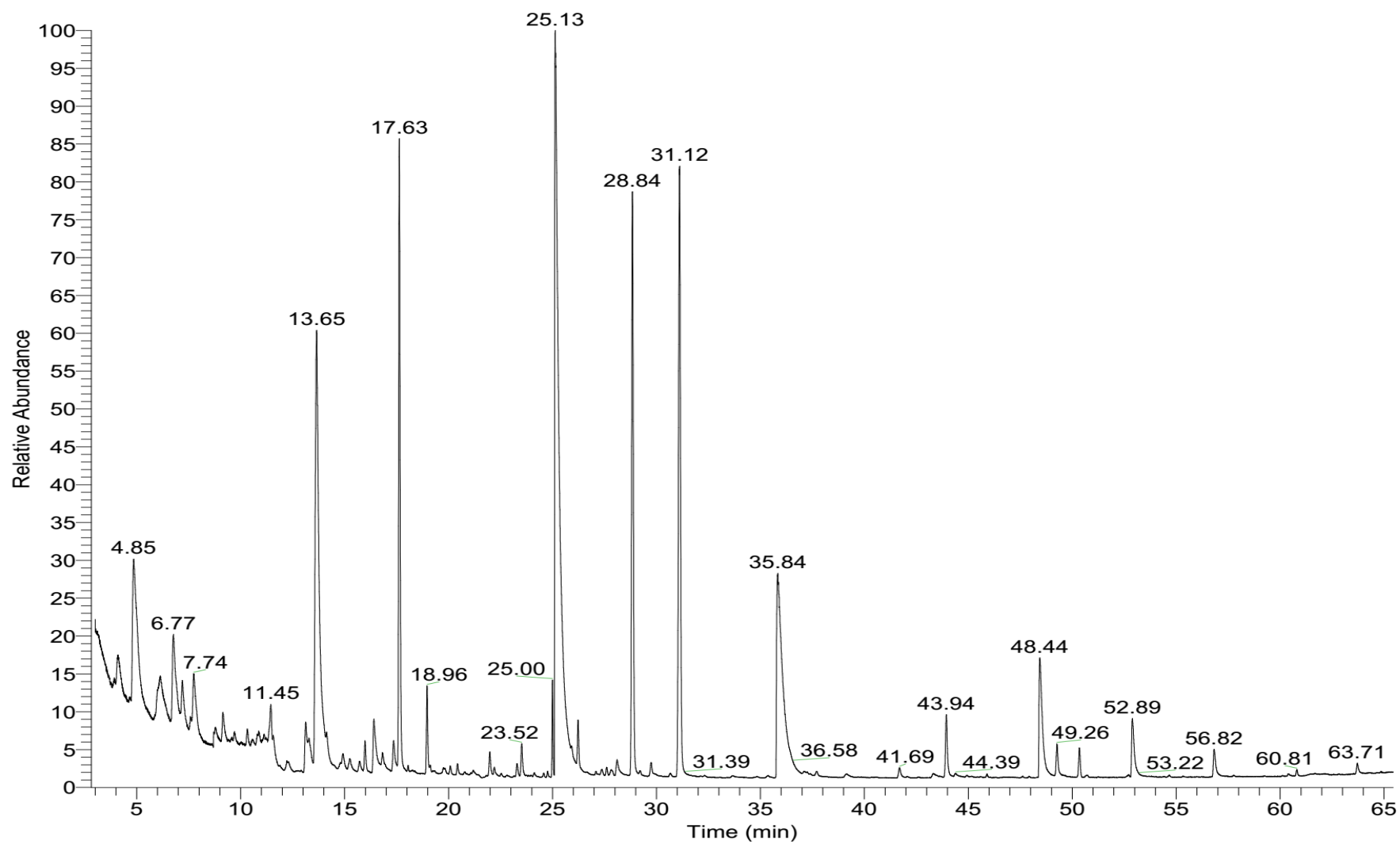
Priloha 4: Chromatogram těkavých látek identifikovaných ve vzorku V3. Identifikace píků viz tabulka v Příloze 1



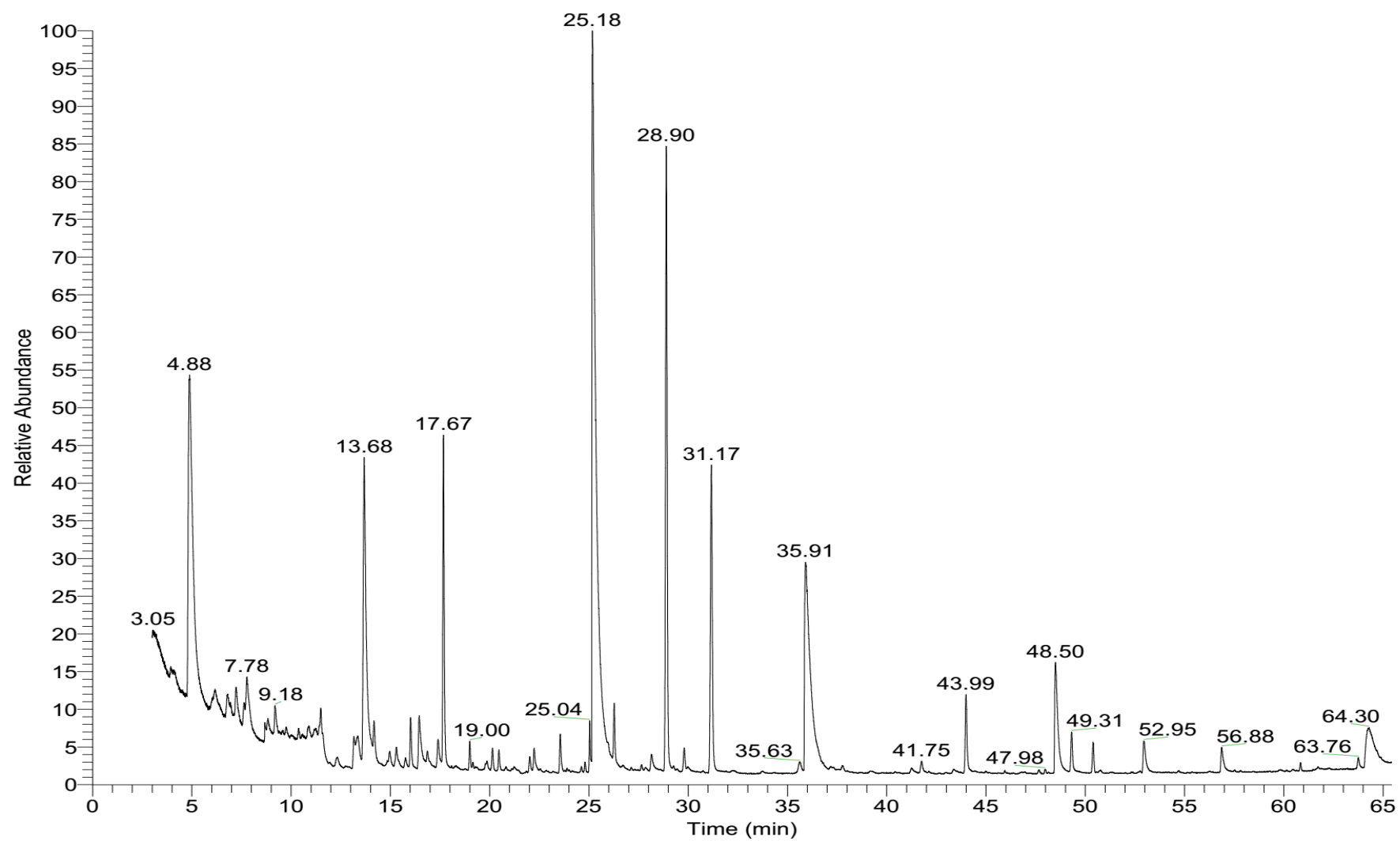
Příloha 5: Chromatogram těkavých látek identifikovaných ve vzorku V4. Identifikace píků viz tabulka v Příloze 1



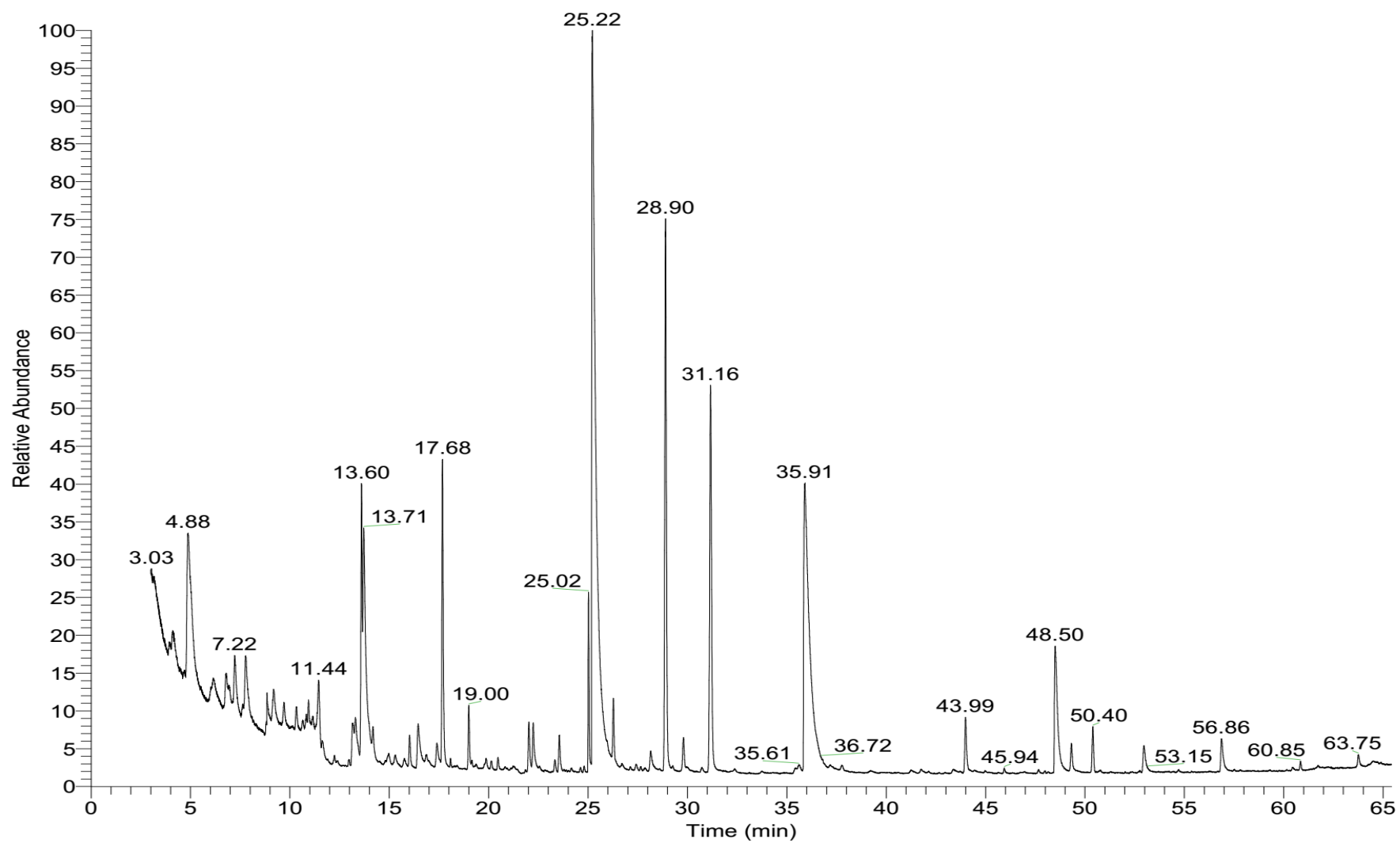
Příloha 6: Chromatogram těkavých látek identifikovaných ve vzorku V5. Identifikace píků viz tabulka v Příloze 1



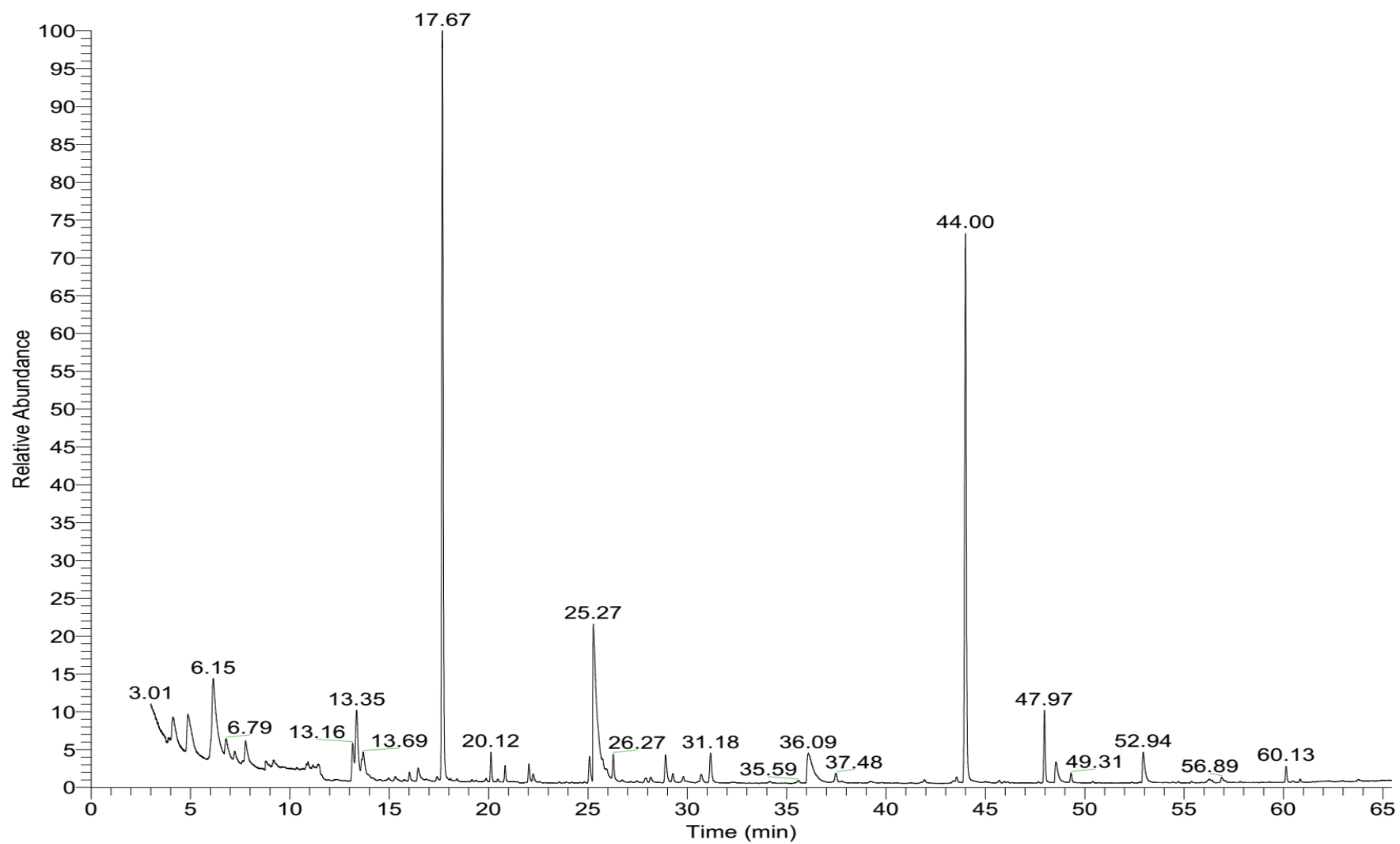
Příloha 7: Chromatogram těkavých látek identifikovaných ve vzorku V6. Identifikace píků viz tabulka v Příloze 1



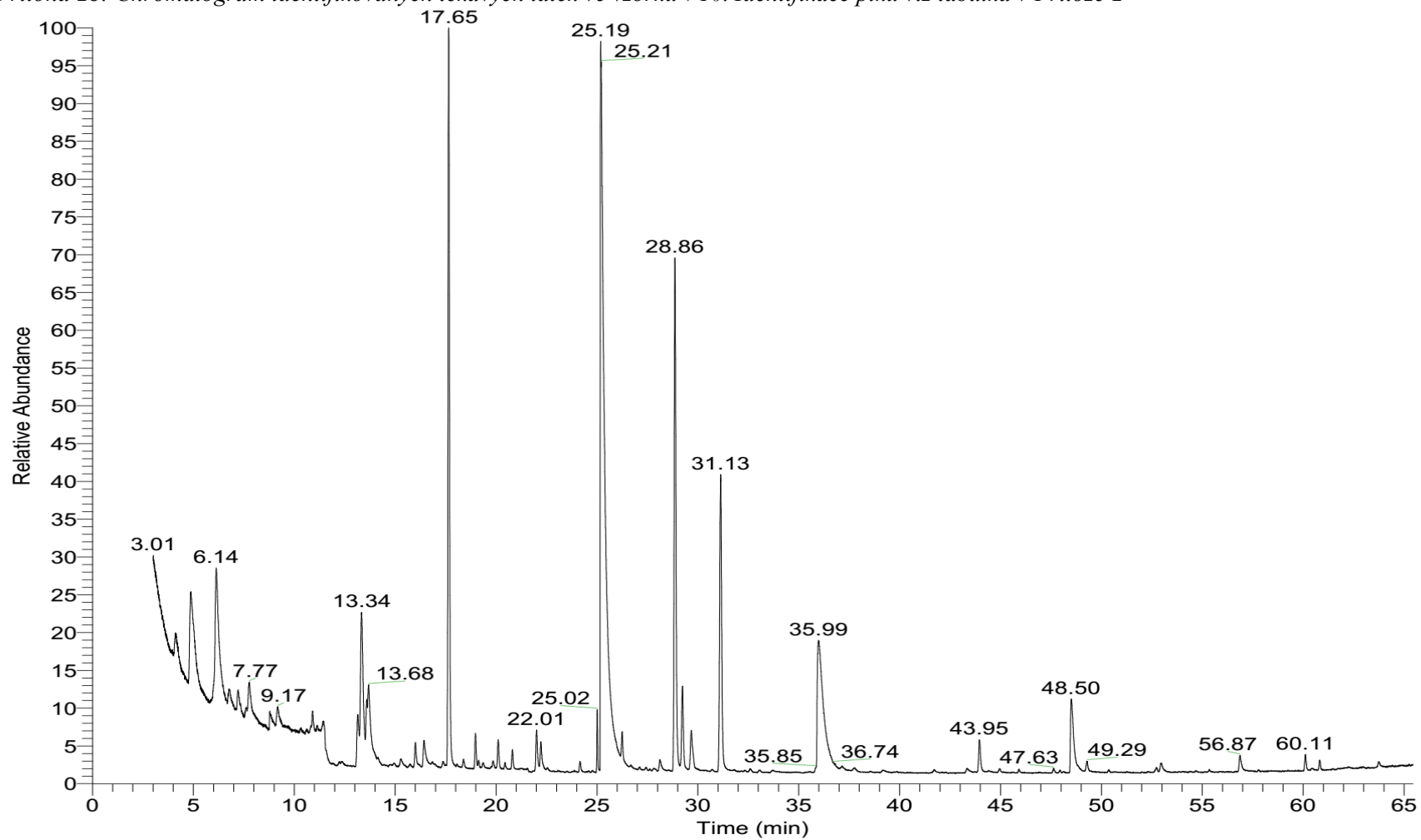
Příloha 8: Chromatogram těkavých látek identifikovaných ve vzorku V7. Identifikace píků viz tabulka v Příloze 1



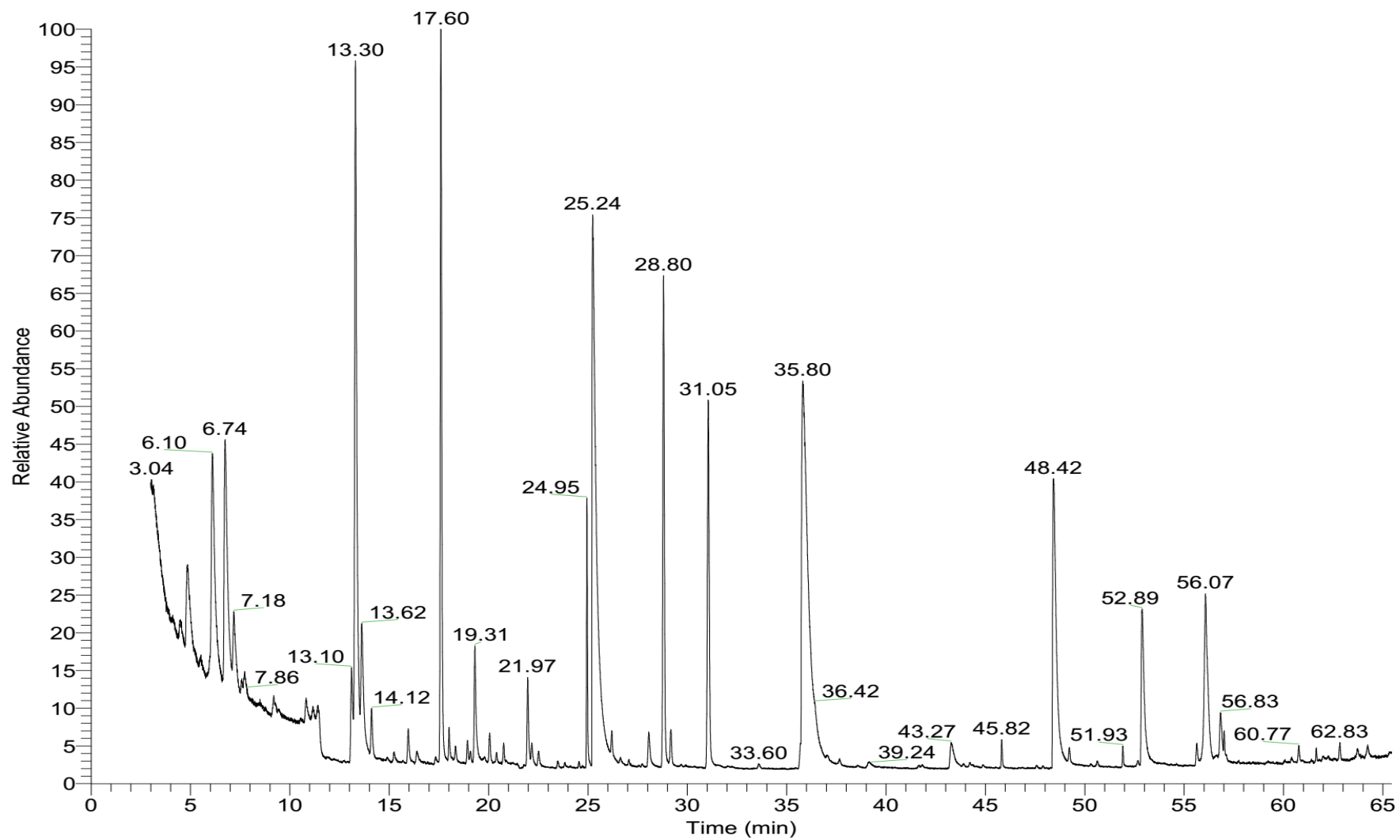
Příloha 9: Chromatogram těkavých látek identifikovaných ve vzorku V9. Identifikace píků viz tabulka v Příloze 1



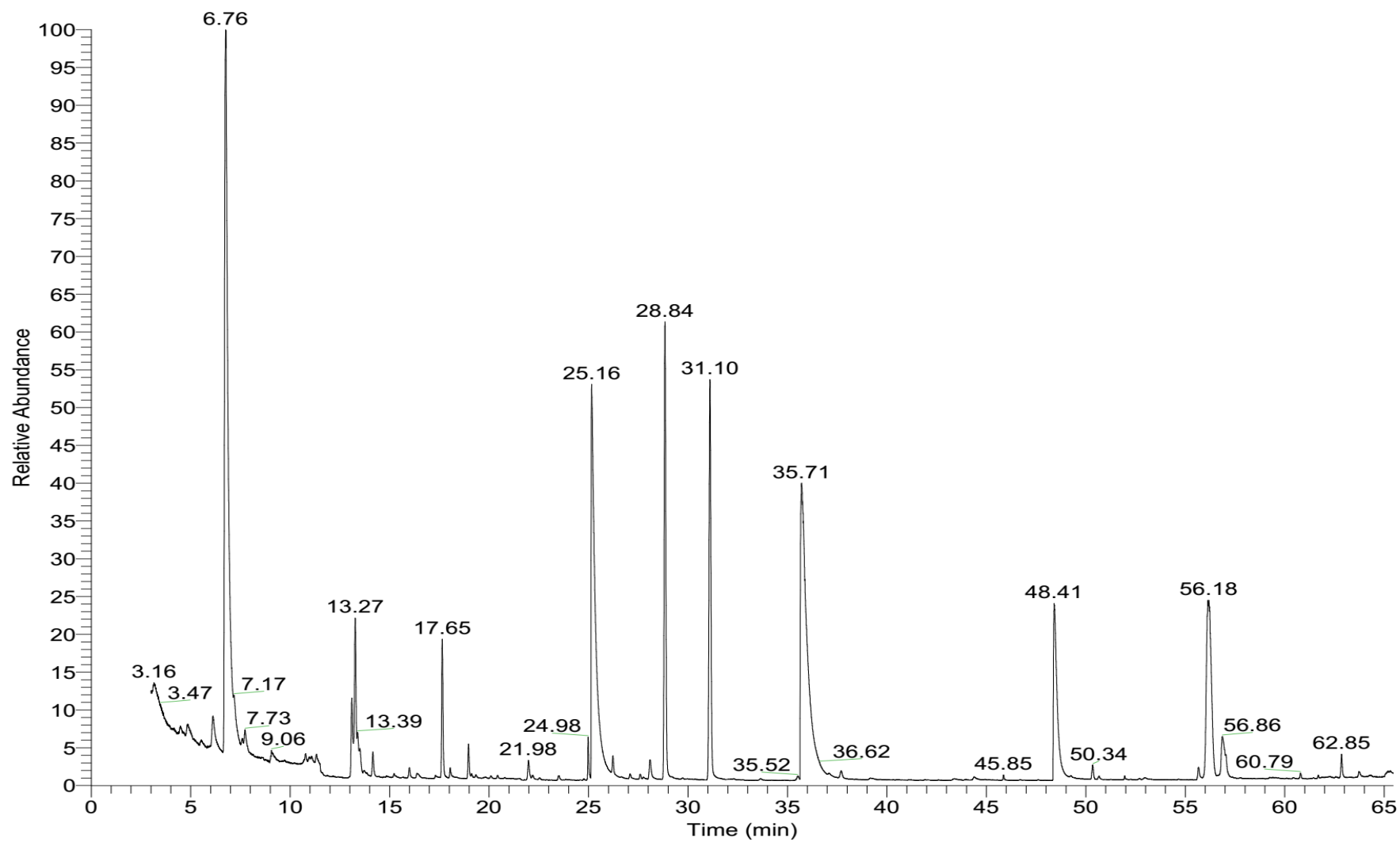
Príloha 10: Chromatogram identifikovaných těkavých látek ve vzorku V10. Identifikace píků viz tabulka v Příloze 1



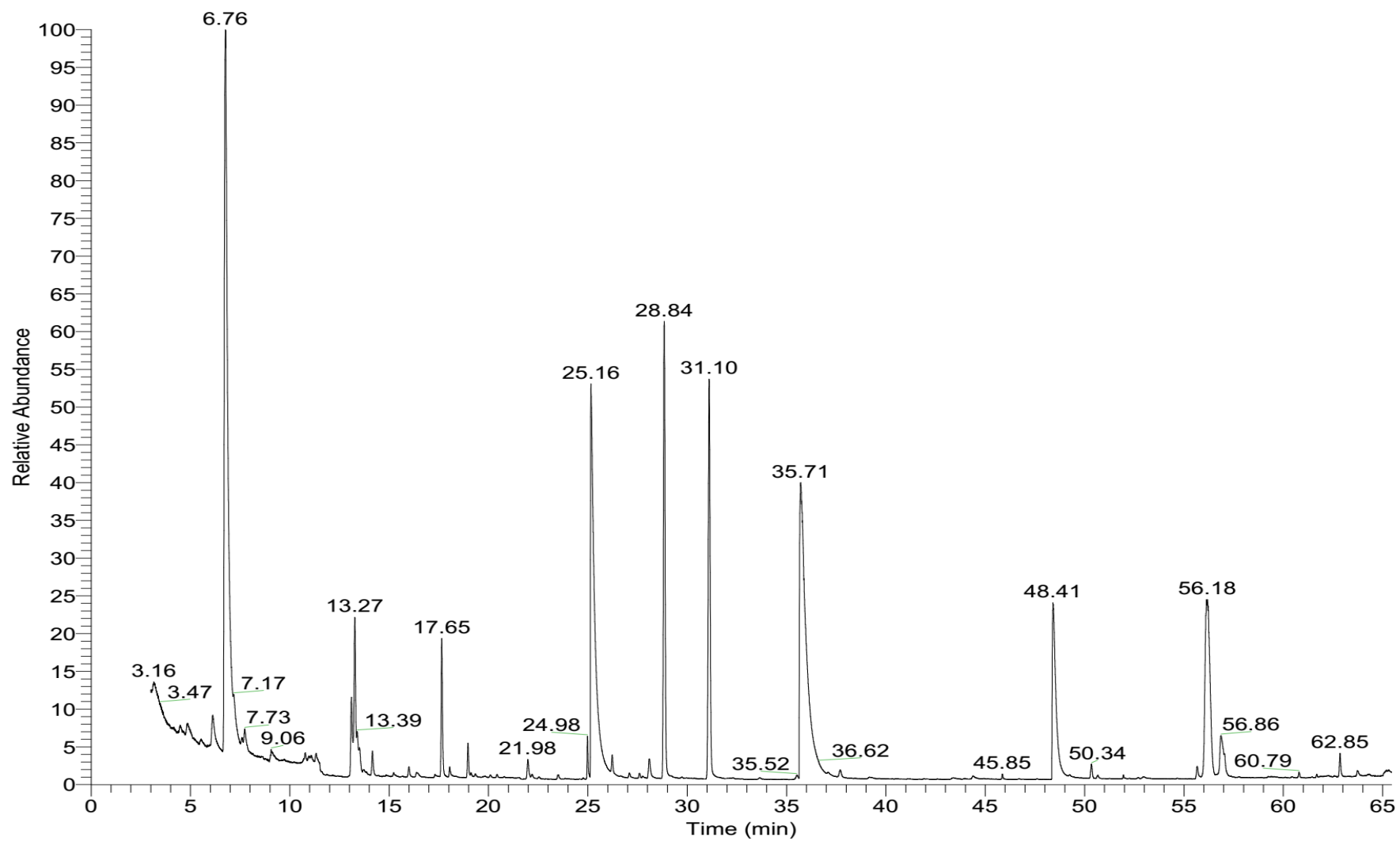
Příloha 11: Chromatogram identifikovaných těkavých látek ve vzorku V9-6m. Identifikace píků viz tabulka v Příloze 1



Příloha 12: Chromatogram těkavých látek identifikovaných ve vzorku V1-8m. Identifikace píků viz tabulka v Příloze 1



Príloha 13: Chromatogram těkavých látek identifikovaných ve vzorku V2-8m. Identifikace píků viz tabulka v Příloza 1



Příloha 14: Chromatogram těkavých látek identifikovaných ve vzorku V3-8m. Identifikace píků viz tabulka viz tabulka v Příloze 1

