

Změna mikroflóry pařených sýrů v průběhu výroby a skladování

Bc. Iva Martinková

Diplomová práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav biochemie a analýzy potravin
akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Iva MARTINKOVÁ**
Osobní číslo: **T09825**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Změna mikroflóry pařených sýrů v průběhu výroby a skladování**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika pařených sýrů
2. Výroba pařených sýrů
3. Mikrobiologická kvalita pařených sýrů

II. Praktická část

1. Stanovení mikrobiální kvality [celkový počet psychrotrofních, mezofilních mikroorganismů a kvasinek, mléčné bakterie] pařených sýrů v průběhu výroby [zaměřit se na vliv paření] a skladování
2. Izolace bakteriálních kmenů z pařených sýrů a jejich charakteristika

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Micro-organisms in foods, 2. vydání, New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005.**

[2] SEDLÁČEK, I. **Taxonomie prokaryot. Brno : Masarykova Univerzita, 2006.**

[3] FOX, P. **Cheese : chemistry, physics, and microbiology, 3.vydání San Diego : Academic, 2004.**

[4] ADAMS, M; MOSS, M. **Food microbiology, 3.vydání, Cambridge, UK : RSC Publishing, 2008.**

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

25. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

20. května 2011

Ve Zlíně dne 21. března 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



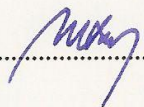
doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 21.4.2011



.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Pařené sýry jsou charakteristické procesem paření při zpracování sýřeniny, kdy se sýřenina stává plastickou a je možná ji tvarovat do nejrůznějších podob. Paření sýřeniny dodává sýrům také typickou vláknitou texturu. Cílem práce bylo stanovit mikrobiologickou kvalitu pařených sýrů v průběhu jejich výroby a skladování. Ve vzorcích suroviny v jednotlivých fázích výroby sýrů byl stanoven počet psychrotrofních a mezofilních mikroorganismů, koliformních bakterií, kvasinek a mléčných bakterií. Na základě výsledků bylo zjištěno, že proces paření má inaktivační účinek na koliformní bakterie a kvasinky. Na laktobacily a mléčné streptokoky pařící proces nemá vliv. Dalším úkolem byla charakteristika bakteriálních kmenů izolovaných ze suroviny v průběhu výroby pařených sýrů z morfologického, fyziologického a biochemického hlediska.

Klíčová slova: pařené sýry, proces paření, mléčné bakterie

ABSTRACT

Pasta filata cheeses are characteristic by steaming process of curd. The steaming process gives them plasticity and thanks to this, it's possible to form it into assorted shapes. The steaming process gives them also a fibrillar texture. The aim of this thesis was to determine microbiological quality of pasta filata cheeses during their production and storage. There was determined a count of psychrotrophic and mesophilic microorganisms, coliform bacteria, yeasts and lactic acid bacteria in samples of material during the production. It was found out that the steaming process has an inactivation effect on coliform bacteria and yeasts. There was no effect of steaming process on lactic acid bacteria. The further task was to characterize bacterial strains isolated from the material during the production of pasta filata cheeses.

Keywords: pasta filata cheeses, steaming process, lactic acid bacteria

Na tomto místě děkuji vedoucí mé diplomové práce Mgr. Magdě Doležalové, Ph.D. za cenné připomínky, rady a odborné vedené diplomové práce. Rovněž děkuji laborantkám mikrobiologické laboratoře, Bc. Hance Miklíkové a Olze Haukové, za jejich vstřícnou pomoc během mé práce v laboratoři. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu během celého studia na univerzitě.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 DEFINICE PAŘENÉHO SÝRA	11
2 TYPY PAŘENÝCH SÝRŮ A PARAMETRY JEJICH VÝROBY	12
3 VÝROBA PAŘENÝCH SÝRŮ	17
3.1 MIKROBIOLOGICKÁ JAKOST MLÉKA PRO VÝROBU PAŘENÝCH SÝRŮ	17
3.2 TECHNOLOGICKÝ POSTUP VÝROBY PAŘENÝCH SÝRŮ	18
3.3 CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ POUŽÍVANÝCH PŘI VÝROBĚ PAŘENÝCH SÝRŮ	21
4 MIKROBIOLOGICKÉ POŽADAVKY NA PAŘENÉ SÝRY	24
5 CÍL PRÁCE	27
II PRAKTICKÁ ČÁST	28
6 POUŽITÝ MATERIÁL A METODY	29
6.1 CHEMIKÁLIE A POMŮCKY	29
6.2 METODIKA PRÁCE	30
6.2.1 Odběr vzorků.....	30
6.2.2 Příprava ředění	31
6.2.3 Příprava kultivačních médií, jejich inokulace a kultivace	31
6.2.4 Odečet výsledků	33
6.2.5 Charakteristika izolovaných bakterií.....	34
7 VÝSLEDKY A DISKUSE	36
7.1 ZMĚNA MIKROFLÓRY PAŘENÝCH SÝRŮ V PRŮBĚHU VÝROBY	36
7.1.1 Mikroflóra mléka pro výrobu pařených sýrů	36
7.1.2 Vliv pařícího procesu na sledované skupiny mikroorganismů	37
7.1.3 Mikroflóra finálního výrobku	39
7.2 MIKROFLÓRA PAŘENÝCH SÝRŮ V PRŮBĚHU SKLADOVÁNÍ.....	42
7.2.1 Mikroflóra mozzareilly v průběhu skladování	42
7.2.2 Mikroflóra soleného sýra v průběhu skladování	43
7.3 CHARAKTERISTIKA IZOLOVANÝCH KMENŮ	45
7.3.1 Kmeny izolované z půdy M17	45
7.3.2 Kmeny izolované z půdy MRS	48
7.3.3 Kmeny izolované z půdy MSA	49
7.3.4 Kmeny izolované z půdy EA	50
ZÁVĚR	52
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	54
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	60
SEZNAM OBRÁZKŮ	61
SEZNAM TABULEK	62

ÚVOD

Pařené sýry tvoří zvláštní skupinu v sortimentu sýrů. Jejich jedinečnost spočívá v zařazení procesu paření sýřeniny do technologie výroby. Paření probíhá ve vodě o teplotách 75 – 90 °C. Díky tomuto kroku získá výsledná pařenina plasticitu a je možné ji vytahovat na vlákna či jinak tvarovat. Tato konzistence umožňuje tvarování sýrů do rozmanitých podob. Pařené sýry se často dále upravují nasolováním či uzením. Tradiční výrobu pařených sýrů z ovčího nebo buvolího mléka, popř. jejich směsi s mlékem kravským nahrazuje v průmyslové výrobě pouze výroba z kravského mléka. Pro českého spotřebitele jsou pravděpodobně nejznámějšími a nejdostupnějšími zástupci těchto sýrů slovenské oštiepky, korbáčiky či parenica a původem italská mozzarella. Tyto typy pařených sýrů jsou přiblíženy v teoretické části společně s technologií výroby pařených sýrů a charakteristikou bakterií mléčného kvašení, které jsou při jejich výrobě použity.

Proces paření, charakteristický pro tyto sýry, lze díky rozsahu aplikovaných teplot považovat z mikrobiologického hlediska za pasteraci pařené hmoty. Míra vlivu teploty při paření suroviny byla v této práci studována na základě stanovení celkového počtu psychrotrofních a mezofilních mikroorganismů, koliformních bakterií, kvasinek a mléčných bakterií v surovině před a po pařícím procesu. Pozornost byla věnována také změnám celkového počtu zmiňovaných skupin mikroorganismů během skladování sýrů. Doplněním práce byla izolace bakteriálních kmenů a jejich charakteristika z morfologického, fyziologického a biochemického hlediska. Jako vzorky pro tyto rozborů byly použity pařené sýr typu mozzarella a pařené sýry v soleném nálevu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 DEFINICE PAŘENÉHO SÝRA

Sýr je Vyhláškou č. 77/2003 Sb. definován jako mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením podílu syrovátky [1]. Pařenými sýry se rozumí sýry charakteristické tím, že sýřenina z ovčího, směsi ovčího a kravského, nebo pouze kravského mléka či buvolího mléka se po dosažení potřebného stupně kysnutí drobí a zpracovává tzv. pařením. Paření se provádí ve vodě při teplotách 75 – 90 °C dokud sýřenina nezíská plastickou konzistenci, která se vyznačuje tím, že je sýřeninu možné vytahovat na vlákna [2,3].

2 TYPY PAŘENÝCH SÝRŮ A PARAMETRY JEJICH VÝROBY

Pařené sýry, ve světě známé také pod pojmem sýry „pasta filata“, mají širokou škálu zástupců. Ve většině případů jsou charakteristické zemí s tradicí své výroby a také svým tvarováním. Je to například řecký sýr kasseri, rumunský cascaval, slovenské korbáčiky či parnica. Světově nejznámějšími zástupci této skupiny jsou sýry mozzarella a provolone s tradicí výroby v Itálii [4].

Mozzarella tradičně vyráběná v Itálii z buvolího mléka se dnes ve světě vyrábí převážně z kravského mléka. Jedná se o sýr s jemně nakyslou, mléčnou až neutrální chutí, s porcelánově bílou barvou, elastickým těstem a homogenní konzistencí. Obsahuje 45 % tuku v sušině. [5, 6]. Dnes jsou na trhu dostupné dva základní druhy tohoto sýra v různých tvarech a velikostech. Jedná se o tradiční čerstvou mozzarellu expedovanou v nálevu a tzv. „low-moisture mozzarella“, která se balí bez nálevu s maximální vlhkostí 50 % a má tak delší trvanlivost než mozzarella v nálevu [4]. Tradiční výroba mozzarely je v počátečních krocích stejná jako výroba čedaru. Při prokysávání se však využívá vyšších teplot (více než 42 °C), a proto se využívá termofilních kultur. Termofilní kultury obsahují směs bakterií *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbruckeii* spp. *bulgaricus* nebo *Lactobacillus helveticus*. Mléko je standardizováno, pasterováno a zaočkováno termofilní kulturou v množství 1,5 – 2,0 % objemu [7]. Přidává se také syřidlo, následuje prokysávání na hodnotu pH 4,9 – 5,2. Vzniklá sraženina je hnětena ve vodě o teplotě 75 – 85 °C, kdy teplota sýřeniny dosahuje teploty 55 – 50 °C. Pařenina je formována do požadovaných tvarů, zchlazena ve studené vodě a nasolena v solné lázni s obsahem 22 – 23 % NaCl [8].



Obr. 1. Ukázka sýru mozzarella [1]

Druhým z neznámějších pařených sýrů je sýr provolone. Provolone pochází ze severní Itálie. Tradičně se vyrábí z ovčího mléka. Velmi zajímavá je jeho verze *giganti* – jedná se o sýr ve tvaru salámu o délce 1,5 metru a hmotnosti 100 kilogramů. Sýry zrající do tří měsíců mají lahodně jemnou chuť, po delší době zrání je jeho chuť výrazně aromatická. Obsah tuku v sušině je 45 % stejně jako u mozzarely [9]. Při výrobě se pasterované mléko očkuje termofilní kulturou při teplotě 44 – 50 °C, prokysává se na pH 5,1. Vzniklá sýřenina je krájena na plátky a hnětena v horké vodě o teplotě 85 – 90 °C. Tato sýřenina se poté formuje a nakládá do solné lázně při teplotě 10 – 15 °C. Doba solení je závislá na velikosti sýra. Sýry se nechávají zrát jeden až 12 měsíců při teplotě 15 – 16 °C [7]. Velikost sýrů provolone se pohybuje v rozmezí 250 gramů až 100 kilogramů. Sýry provolone se také velmi často udí, čímž získávají jedinečnou chuť a pevnější texturu [4].



Obr. 2. Ukázka sýrů provolone [III]

Na našem trhu se spotřebitel nejčastěji, kromě již zmíněné mozzarely, setkává s tradičními slovenskými pařenými sýry jako oštiepok, parenica, koliba či korbáčiky. Výrobky tradičně produkované ve specifikovaných oblastech Slovenska jsou v registru zeměpisných označení Evropské unie a prodávají se pod ochranným označením Slovenský oštiepok, Slovenská parenica, Oravský nebo Zázrivský korbáčik.

Pařený Slovenský oštiepok je polotvrdý sýr. Základní surovinou pro jeho výrobu je ovčí mléko, směs ovčího a kravského mléka nebo kravské mléko. Vyrábí se ve tvaru velkého vejce většinou zdobený ornamentem. Jedná se o sýr se zlatožlutou či zlatohnědou barvou

po uzení na povrchu, uvnitř je bílý až máslově žlutý. Má příjemnou, lahodnou, jemně pikantní chuť a typickou dýmovou vůni. Obsah tuku v sušině u oštiepku tvoří minimálně 38 %. Šetrně pasterované mléko se při teplotě 32 – 38 °C inokuluje vybranými originálními kulturami mléčných bakterií pocházejících z ovčího mléka a sýra ze Slovenska. Mléko se zasýří a vzniklá sýřenina se krájí a dohřívá při 37 – 42 °C. Nechá se odkapat a lisuje se. Po vylisování se sýřenina paří a hněte při teplotě minimálně 55 °C. Pařená sýřenina se formuje do „oštiepku“ a chladí. Sýr se solí v solné lázni při 12 °C maximálně 24 hodin, nasolený se potom udí při maximální teplotě 30 °C 4 hodiny [10].



Obr. 3. Ukázka sýru oštiepok [III]

Slovenská parenica je pařený jemně uzený sýr svinutý do dvou svitků propojených ve tvaru S. Vyrábí se z čerstvého syrového ovčího mléka, směsi čerstvého syrového ovčího a kravského mléka nebo čerstvého syrového kravského mléka. Tento sýr má jemnou, příjemně slanou sýrovou chuť po ovčím mléce. Na povrchu má žlutou až hnědou barvu, ve vnitř je bílý až máslově žlutý. Obsah tuku v sušině činí minimálně 50 %. Obsah soli nemá překročit 3 %. Parenica obsahuje přirozené mikroorganismy z ovčího mléka z rodu *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* a *Streptococcus*. Pařením při teplotě 60 – 70 °C nastává částečná pasterace, kdy se sníží obsah přirozené mikroflóry řádově z 10^5 na 10^2 . Při výrobě se čerstvé mléko zasíří při teplotě 29 – 32 °C. Sýřenina se mísí a krájí, nechá se usadit a ručně se formuje do tvaru hrudky, která se sýrařskou plenu vyzdvihne ze syrovátky a nechá se okapat. Váha ovčí hrudky je po vytažení z pleny 3 – 5 kg. Odkapaná a ztuhlá hrudka se nechává při 20 – 23 °C prokysávat 24 hodin do dosažení pH 5,3. Takto připravená sýřenina se paří ve vodě teplé 60 – 70 °C, poté se opakovaně vytahuje a překlá-

dá. Z pařeného těsta se poté tvarují stuhy o délce 4 – 6 m a šířce 6 cm, které se vkládají do chladného nasyceného solného roztoku. Po nasolení se stuha uprostřed přeloží, z obou konců se proti sobě svine do tvaru „S“ a převáže se sýrovými nitěmi. Parenica se udí kouřem z tvrdého dřeva po dobu asi dvou hodin [11].



Obr. 4. Ukázka sýru parenica [IV]

Zázrivské a Oravské korábčiky jsou charakteristické svým tvarováním – pařený sýr je upravený do nití se splétá do copů – korbáčiků. Surovinou pro jejich výrobu je hrudkový sýr z kravského mléka (syrového či pasterovaného) s přidavkem bakterií mléčného kvašení. Sýry mají mléčnou, lahodné sýrovou, slanou chuť. Uzené sýry se vyznačují typickou dýmovou chutí. Jejich barva je nažloutlá a v případě uzených sýrů zlatožlutá. Nejmenší obsah tuku v sušině v těchto sýrech je 25 % hmot. Obsah soli je u neuzených výrobků 4,5 % a u uzených tvoří 5,5 %. Korbáčiky obsahují především termorezistentní kultury mléčných bakterií z rodů *Lactococcus*, *Streptococcus* a *Lactobacillus*. Výroba korbáčiků se uvádí v deseti krocích:

1. *Paření* a mísení hrudkového sýra ve vodě o teplotě 70 – 95 %.
2. Ruční *hnětení* pařeniny.
3. *Tvarování* vytahováním do tvaru nití, tzv. „vojek“.
4. *Chlazení* ve studené vodě 2 – 10 minut.
5. *Namotávání* na motovidlo.

6. *Solení* namotaných nití v nasyceném solném roztoku.
7. *Částečné osušení* odkapáním přebytečné slané vody.
8. *Pletení* do korbáčiků z minimálně dvou nití.
9. *Uzení* (v případě výroby uzených sýrů) přímým studeným kouřem teplotou kolem 30 °C do získání zlatožluté barvy.
10. *Balení*. [12].



Obr. 5. Ukázka sýru korbáčik [V]

3 VÝROBA PAŘENÝCH SÝRŮ

V následujících kapitolách budou popsány jednotlivé kroky při výrobě pařených sýrů. Výroba jednotlivých druhů pařených sýrů, jak je patrné v kapitole 2, je však odlišná např. použitím druhů bakterií mléčného kvašení, aplikací různých teplot při paření sýřeniny či tvarováním, které dodává sýru jeho specifickou chuť. Liší se také průmyslová výroba, kdy hlavní surovinu tvoří pasterované kravské mléko, od výroby na farmách, kde se často používá i mléko ovčí, popř. směs ovčího a kravského mléka. Popis technologických kroků bude zaměřen zejména na mikrobiologii suroviny v jednotlivých fázích výroby.

3.1 Mikrobiologická jakost mléka pro výrobu pařených sýrů

Mléko je svým pH (kolem 6,6), se svou teplotou ve vemeni (kolem 38 °C) a s vysokou nutriční hodnotou ideální živnou půdou pro růst bakterií. Mléko ve vemeni zdravých krav není sterilní, vždy obsahuje nízké počty mikroorganismů obvykle nepřesahující počet $10^2 \cdot \text{ml}^{-1}$. Převládající mikroflórou v mléce zdravých krav jsou mikrokoky, v menšině se potom vyskytují streptokoky a *Corynebacterium bovis*. Koliformní ani patogenní mikroorganismy přítomny nejsou. Čerstvé mléko obsahuje účinné látky působící inhibičně na mikroorganismy. Tato inhibiční schopnost není však natolik silná, aby mléko ochránila před další kontaminací [13,14]. Proto musí provozovatel zpracovatelského podniku přijmout veškeré nezbytné kroky zajišťující, že syrové mléko je tepelně ošetřeno

- co nejdříve po příjmu, pokud mléko nebylo zchlazeno,
- do 36 hodin po příjmu, pokud je mléko uchováváno při teplotě do 6 °C,
- do 48 hodin po příjmu, pokud je mléko uchováváno při teplotě do 4 °C,
- do 72 hodin po příjmu, pokud jde o buvolí, ovčí a kozí mléko [16].

V průběhu získávání se potom mléko kontaminuje mikroorganismy především z vemene, které ani po očištění není sterilní a do mléka tak vnikají např. koliformní mikroby a zástupci rodů *Bacillus*, *Pseudomonas* a *Clostridium*. Závažnější kontaminace pochází z dojícího zařízení, která jsou při nedostatečné dezinfekci a sanitaci zdrojem velkého množství mikroorganismů. Jedná se o mléčné streptokoky, koliformní bakterie, zástupce rodů *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* a další [13]. Nežádoucí je také přítomnost psychrotrofní mikroflóry, která je schopna se množit i v mléce vychlazeném na 4 °C, čímž se zhoršuje jeho mikrobiologická kvalita. Psychrotrofní mikroorganismy produkují termorezistentní proteolytické a lipolytické enzymy, jejichž aktivita se projeví při zrání sýrů

a ovlivňují tak jejich organoleptické vlastnosti [36]. Dalšími zdroji kontaminujících mikroorganismů mohou vedle vemene a dojícího zařízení tvořit podestýlka a krmivo, ovzduší, voda používaná k omytí vemene a skladovací zařízení [43].

Kravske mléko určené pro výrobu sýrů nesmí obsahovat antibiotika ani dezinfekční prostředky, které by mohly překážet fermentaci. Antibiotika mohou být v mléce obsažena v případě, že byla použita při léčbě dojníc. Nejčastěji se jedná o penicilin a streptomycin. Mohou být také vytvářena některými mikroorganismy přítomnými v mléce, např. nisin, laktobacilin nebo diplococin. Některá antibiotika mohou svým účinkem potlačovat bakterie mléčného kvašení a nepříznivě tak působit při výrobě sýrů [35, 37].

Základní parametry pro syrové mléko jsou podle nařízení EP a Rady 853/2004 tyto:

- obsah mikroorganismů v syrovém kravském mléce při 30 °C: $\leq 10^5$ KTJ v 1 ml,
- obsah mikroorganismů v mléce od jiných druhů než krav při 30 °C: $\leq 1,5 \cdot 10^6$ KTJ v 1 ml (pokud je určeno na produkci výrobků ze syrového mléka postupem bez tepelné úpravy snižuje se tato hodnota na $\leq 5 \cdot 10^5$), počítáno jako klouzavý geometrický průměr za dvouměsíční období, alespoň dva vzorky za měsíc,
- obsah somatických buněk v 1 ml kravského mléka $\leq 4 \cdot 10^5$, počítáno jako klouzavý geometrický průměr za tříměsíční období, alespoň jeden vzorek za měsíc [38].

3.2 Technologický postup výroby pařených sýrů

Před vlastním zpracováním mléka je potřeba jej podrobit několika technologickým operacím, mezi které patří pasterace, odstředování, standardizace tučnosti, přídavek technologicky důležitých přísad, přídavek bakterií mléčného kvašení [31].

Při mlékárenském ošetření mléka je z hygienického hlediska nejzávažnější technologickou úpravou pasterace. Při výrobě pařených sýrů se používá šetrná pasterace – jedná se o tepelné ošetření záhřevem suroviny na teplotu nejméně 71,7 °C po dobu nejméně 15 sekund. Při pasteraci se v mléce usmrtí vegetativní formy mikroorganismů, spory však inaktivovány nejsou [39, 15]. Cílem pasteračního zákroku je snížit počet potencionálně patogenních vegetativních forem bakterií tak, aby nepředstavovaly nebezpečí pro veřejné zdraví. Právě pasterované mléko obsahuje obvykle méně než 10^3 KTJ/ml. Pasteraci mohou přežít mikroorganismy sporulující (např. endospory rodu *Bacillus* a *Clostridium* subsp.) a termorezistentní (např. *Micrococcus* subsp., *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*). Významným zdrojem mikroorganismů v pasterovaném mléce je sekundární kontaminace

po provedení tepelného zákroku. Typickými představiteli této kontaminace jsou pseudomonády, mohou se objevit také *Bacillus* subsp. Přeživší mikroorganismy se mohou držet a množit v chladicí sekci pasteru, proto je velmi důležité věnovat pozornost pravidelné sanitaci zařízení pro pasteraci [14].

Vedle pasterace je hygienického hlediska důležitý také proces odstředování, jehož cílem je odtučnění mléka [13]. Používají se talířové samoodkalovací odstředivky, kde na základě rozdílných měrných hmotností tuku a mléčné plazmy dochází k rozdělení mléka. Odstředěné mléko, se zbytkovým obsahem tuku obvykle 0,05 %, proudí společně s mechanickými nečistotami v prostoru mezi talíři odstředivky do kalového prostoru při obvodu bubnu. Vlivem odstředivé síly se při průchodu mléka odstředivkou oddělují také částice s vyšší měrnou hmotností (nečistoty, shluky mikroorganismů, somatické buňky) a usazují se na stěně bubnu jako tzv. odstředivkový kal (asi 1 kg na 10 000 l mléka). K jeho odstranění dochází při samoodkalování nebo po zastavení odstředování a rozebrání odstředivky. Protože kal obsahuje vysoký obsah mikroorganismů, je nutné s ním zacházet jako s konfiskátem a sterilovat jej [34, 33].

Po odstředění mléka následuje standardizace tučnosti smícháním odstředěného mléka se smetanou v požadovaném poměru. U pařených sýrů se obsah tuku v sušině pohybuje v rozmezí 40 – 50 % [3].

Před sýřením je z technologického hlediska důležité do mléka dodat některé látky, které zajistí požadovaný průběh koagulace. Kvůli zlepšení sýřitelnosti a pevnosti vzniklé sraženiny se přidávají vápenaté ionty. Vápenaté ionty se dodávají ve formě CaCl_2 v objemu 10 – 40 ml jeho nasyceného roztoku na 100 l zpracovávaného mléka [18].

Z důvodu potlačení činnosti koliformních bakterií se aplikuje přídavek KNO_3 . Tyto bakterie vlivem heterofermentativního rozkladu laktózy produkují H_2 a zapříčiňují tak duření sýrů. Přidává se v závislosti na druhu vyráběného sýra a použité technologii v množství 5 – 10 g na 100 l mléka. Přídavek KNO_3 se však stále častěji nahrazuje jinými preparáty (např. na bázi antibiotik nisinu či lysozymu). Jeho vysoká dávka může totiž brzdit činnost kvasových kultur. Dalším negativem užití KNO_3 je riziko tvorby nitrosaminů [31].

Protože při pasteraci dochází k inhibici nejen nežádoucí, ale i žádoucí mikroflóry, která má nezastupitelný technologický význam, je nutné do mléka přidat kulturní mikroorganismy [18].

Funkce těchto kultur jsou následující:

- úprava kyselosti mléka před sýřením,
- fermentace laktózy a tvorba kyseliny mléčné během koagulace a zpracování sraženiny – snížení pH má do jisté míry i konzervační účinek a brání rozvoji hnilobných bakterií, podílí se na koagulaci a podporuje odkapávání sýřeniny,
- uplatnění proteolytické a lipolytické aktivity v průběhu zrání,
- utváření sensorických vlastností (tvorba kyseliny mléčné a dalších organických kyselin, aromatických sloučenin, produkty proteolýzy a lipolýzy),
- vliv na texturu a konzistenci [34].

U pařených sýrů se k šetrně pasterovanému mléku o teplotě 30 – 32 °C přidává nejčastěji 0,5 – 1,5 % mezofilního zákysu, který obsahuje *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* [3]. Tyto kultury se mohou používat v různých komerčních formách:

- tekuté kultury pro zaočkování matečné kultury,
- lyofilizované kultury pro zaočkování matečné kultury,
- koncentrované hlubokozmrazené nebo lyofilizované kultury pro zaočkování provozního zákysu,
- koncentrované hlubokozmrazené nebo lyofilizované kultury přímé pro zaočkování produktu ve výrobníku [33].

Přidává se také syřidlo a to v takovém množství, aby sraženina vznikla za 40 – 45 minut. Sýřenina se pokrájí a drobí na zrno o velikosti 4 – 5 mm, přihřívá se na teplotu 39 – 40 °C a při této teplotě se dosouší 45 – 50 minut.

Vzniklé zrno se po oddělení syrovátky na lisovacím vozíku, kde probíhá i prokysávání sýřeniny na kyselost odtékající syrovátky asi 16 SH, pokrájí se na menší hranoly. Správně vykysaná sýřenina se paří ve vodě vyhřáté na 80 – 90 °C, následuje její mechanické mísení ve žlabu se šnekem. Paření trvá průměrně do jedné minuty. Během paření vzniká plastická hmota, která se dá vytahovat na vlákna nebo jinak formovat. Při paření probíhá z mikrobiologického hlediska také pasterizace této hmoty. Protože jsou zničeny aerobní koliformní bakterie, nehrozí při dodržení správné výrobní praxe nebezpečí duření pařených sýrů [3]. Kombinace účinku vysoké teploty a nízkého pH (pH sýřeniny nabývá hodnoty kolem 5,2) během hnětení zapříčiní agregaci kasinu a kontrakci vláken parakaseinového gelu, čímž dojde ke tvorbě parakaseinových vláken s vysokou pevností v tahu [42]. Po ukončení paření sýřeniny následuje její mechanické mísení, kdy se z ní vytlačí pařící

voda a s ní i zbylá syrovátka. Takto upravená sýřenina se formuje do požadovaných rozměrů a hmotností a ochladí se studenou vodou, dokud se nedosáhne přiměřené tuhosti. Po osušení se solí v solné lázni o koncentraci 18 % NaCl a teplotě 8 – 10 °C nejdéle 4 hodiny [3]. Solení sýrů je zákrok, který reguluje růst mikroorganismů, tím usměrňuje zrání a ovlivňuje tažnost. Solení také dodává sýru chuť a zlepšuje jeho stravitelnost, zpevňuje povrch sýra a podílí se na vzniku konzistence [3, 23]. Vyrobené sýry se velmi často po opětovném osušení udí v udírně s dýmem z bukové drti. Než dým přijde do styku se sýry, zbavuje se dehtu. Uzení trvá 14 – 16 hodin nebo 2 – 4 hodiny při teplotě udírny 28 – 35 °C [3]. Finální výrobky mají hladký, lesklý povrch, tuhou konzistenci s vláknitou strukturou. Vychlazené sýry se vakuově balí, vkládají do přepravních obalů a expedují [25].

3.3 Charakteristika bakterií mléčného kvašení používaných při výrobě pařených sýrů

Bakterie mléčného kvašení tvoří heterogenní skupinu mikroorganismů, které mají společnou metabolickou vlastnost – produkci kyseliny mléčné jako hlavní konečný produkt fermentace sacharidů. Typické druhy bakterií mléčného kvašení náleží do rodů *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pedococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus* a *Leuconostoc* [44]. Z biochemického hlediska lze bakterie mléčného kvašení rozdělit na homofermentativní, které produkují 85 % kyseliny mléčné z glukózy a heterofermentativní, které produkují 50 % kyseliny mléčné z glukózy a také oxid uhličitý a etanol [45].

K výrobě pařených sýrů se, jak již bylo výše popsáno, používají mezofilní a termofilní zákysové kultury. Mezofilní kultury mohou podle účelu a použití obsahovat všechny nebo některé z těchto homofermentativních a heterofermentativních bakterií mléčného kvašení:

- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*,
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*,
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*,
- *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*,
- *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextrancium*.

Uvedené druhy a kmeny se využívají ve vhodné kombinaci jako složené nebo směsné kultury. Mohou se vytvářet z kmenů a druhů, které mají dobrou snášenlivost a schopnost doplňování v metabolismu. Nesmí však docházet k antagonismu, jako je např. tvorba antibiotických látek [46]. Pro zakysání mléka určeného k výrobě pařených sýrů se využívají kultury *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* [3].

Mikroorganismy z rodu *Lactococcus* jsou nepohyblivé, grampozitivní, nesporulující bakterie sférického nebo ovoidního tvaru, které se vyskytují po dvou nebo v krátkých řetězcích. Jsou to bakterie fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní s fermentatorním metabolismem – využívají množství cukrů a hlavním produktem fermentace je L(+)-kyselina mléčná [21]. Jejich optimální růstová teplota je 37 °C. Laktokoky jsou kataláza- i oxidázanegativní. Nerostou při 6,5 % NaCl [30]. *Lactococcus lactis* s subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* se zdánlivě liší jen v několika málo fyziologických vlastnostech. Přinejmenším dvě z těchto odlišností jsou však v průběhu fermentace mléka podstatné. Nejvyšší teplota, při které je většina kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* schopna růstu je 40 °C, zatímco většina kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* nerostou při teplotách nad 38 °C. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* mají navíc vyšší toleranci k NaCl (až 4 % NaCl) [47].

Termofilní kultury jsou tvořeny kokovitými až tyčinkovitými termofilními bakteriemi mléčného kvašení [46]:

- *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*,
- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*,
- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*,
- *Lactobacillus helveticus*.

Rod *Streptococcus* představuje řadu odlišných druhů s širokou škálou hostitelů. Tento rod zahrnuje lidské i zvířecí patogeny, orální a intestinální komenzály a jeden druh – *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, který se využívá ve výrobě fermentovaných potravin.

Streptococcus salivarius subsp. *thermophilus* je grampozitivní, fakultativně anaerobní, nepohyblivý, katalázanegativní mikroorganismus s obligátně homofermentativním metabolismem [47, 48]. Tvoří sférické či ovoidní buňky, které se vyskytují po dvou nebo v řetězcích [30]. Teplotní optimum tvoří rozmezí 40 – 42 °C, teplota růstového maxima je 52 °C, má toleranci k teplotám nad 60 °C. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* má ve srovnání s laktokoky větší nároky na živiny, je totiž slabě proteolytický, a vyžaduje proto v prostředí přítomnost volných aminokyselin. Je také tolerantní k obsahu NaCl v prostředí [47]. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* spolupracuje s dalšími bakteriálními kmeny rostoucími v mléce, jedná se např. o *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, se kterým žije ve vzájemné symbióze. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulga-*

ricus rozkládá kasein na peptidy a aminokyseliny, které využívá k růstu *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Jelikož je aerotolerantnější, roste zpočátku intenzivněji. Produkuje kyselinu mléčnou, která snižuje pH prostředí k hodnotě 5 a vytváří tak optimální pH pro růst *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a kyselinu mravenčí, která jeho růst podporuje [49, 50].

Rod *Lactobacillus* tvoří buňky tvaru pravidelných tyčinek, které jsou obvykle delší, mohou však být také kokovité. Tyčinky jsou uspořádány v palisádách nebo krátkých řetězcích. Zřídka mohou být také pohyblivé pomocí peritrichálních bičičků. Jedná se o grampozitivní, nesporulující, fakultativně anaerobní, někdy také mikroaerofilní mikroorganismy [30]. Laktobacily jsou kataláza- a cytochromoxidáza negativní [58]. Jejich růst je podporován obsahem 5 % CO₂ v atmosféře. Optimální teplota pro růst laktobacilů spadá do rozmezí 30 – 40 °C, optimální pH nabývá hodnot 5,5 – 6,2. Na základě konečných produktů při fermentaci cukrů lze laktobacily rozdělit do tří skupin: obligátně homofermentativní (např. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*), fakultativně heterofermentativní (např. *Lactobacillus casei*) a obligátně heterofermentativní (např. *Lactobacillus kefir*) [30].

4 MIKROBIOLOGICKÉ POŽADAVKY NA PAŘENÉ SÝRY

Mikrobiologická kritéria pro potraviny jsou dána Nařízením komise č. 2073/2005 v planém znění. Pařené sýry zde spadají do kategorie „Sýry vyrobené z tepelně ošetřeného mléka či tepelně ošetřené syrovátky“, a proto by měly splňovat požadavky uvedené v následující tabulce (Tab. 1). *Escherichia coli* zde slouží jako indikátor úrovně hygieny [32]:

Tab. 1. Požadavky na sýry vyrobené z tepelně ošetřeného mléka či tepelně ošetřené syrovátky (Nařízením komise č. 2073/2005 v planém znění)

mikroorganizmy	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	5	2	10 ² KTJ/g	10 ³ KTJ/g

n = počet jednotek tvořících vzorek,

m = množství mikroorganismů, které se připouští u všech vzorků výběru *n*

M = množství mikroorganismů, které se ještě připouští u počtu vzorků, který je nižší nebo se rovná *c*

c = počet jednotek vzorku, jejichž hodnoty leží mezi *m* a *M*

Kromě výše zmíněného Nařízení je doporučeno řídit se také požadavky normy ČSN 56 9609. Pokud podle jejich vlastností zařadíme pařené sýry do kategorie „Polotvrdé sýry“, podléhají těmto požadavkům (Tab. 2) [19]:

Tab. 2. Požadavky na polotvrdé sýry (ČSN 56 9609)

mikroorganizmy	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	5	2	10 ² KTJ/g	10 ³ KTJ/g
Koagulázapozitivní stafylokoky	5	2	5 · 10 ² KTJ/g	5 · 10 ³ KTJ/g

n = rozsah výběru, čímž se rozumí počet vzorků určený k vyšetření,

m = množství mikroorganismů, které se připouští u všech vzorků výběru *n*

M = množství mikroorganismů, které se ještě připouští u počtu vzorků, který je nižší nebo se rovná *c*

c = rozhodné číslo, tzn. počet vzorků z výběru *n*, u nichž se připouští hodnota *M*

Koagulázapozitivní stafylokoky tvoří skupinu patogenních, aerobních nebo fakultativně anaerobních, nepohyblivých, nesporulujících gram pozitivních koků sférického tvaru, které se vyskytují jednotlivě, ve dvojicích či v nepravidelných shlucích a jsou nenáročné na přítomnost živin. Jedná se o mikroorganismy kataláza pozitivní a oxidáza negativní. Tyto stafylokoky mají schopnost v prostředí reaktivního faktoru srážet krevní plazmu *in vitro*,

což je vlastnost charakteristická pro druhy *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* a některé kmeny *Staphylococcus hyicus* [20, 29].

Z hlediska výroby pařených sýrů (i celé potravinářské výroby) je nejdůležitějším zástupcem této skupiny druh *Staphylococcus aureus* – jeho přirozené prostředí tvoří pokožka člověka. *Staphylococcus aureus* tvoří žluté až oranžové, popř. i bílé kolonie [21]. Je typickým zástupcem mezofilních bakterií s širokým rozpětím teplot 7 – 48°C při optimu 37 °C. Je však poměrně rezistentní vůči nízkým teplotám. Optimální pH pro jeho růst je 6 – 7, přičemž minimální hodnotou je pH 4 a maximální hodnotu tvoří rozpětí 9,8 – 10,0. Velmi důležitým znakem je tolerance k NaCl a nízké vodní aktivitě. *Staphylococcus aureus* roste rychle na médiích s obsahem 5 – 7 % soli, některé druhy jsou schopny růst i při 20 % [22]. V potravinách produkuje enterotoxiny bílkovinné povahy – proto je možné je inaktivovat delším záhřevem. K otravě dochází při počtu buněk v řádu 10^5 až 10^7 na gram potraviny. [21]. Rozsah teplot, při kterých jsou tímto druhem produkovány enterotoxiny, je v rozmezí 35 – 40 °C. Enterotoxiny jsou tvořeny při pH 6, přesné hodnoty se však budou měnit v závislosti na povaze média. Produkce enterotoxinů je limitována minimální hodnotou vodní aktivity 0,86. Zjištění stafylokoků v potravinách je založeno na jejich odolnosti k chloridu sodnému a na schopnosti tvořit kyseliny z manitolu [22].

Escherichia coli z čeledi *Enterobacteriaceae* tvoří gramnegativní, podmíněně patogenní, rovné tyčinky s peritrichálními bičíky vyskytující se jednotlivě nebo ve dvojicích. Jedná se o fakultativně anaerobní mikroorganismy, oxidáza negativní, kataláza pozitivní. Optimum růstu je teplota 37 °C [27, 30]. Optimální pH růstu *Escherichia coli* se nachází v rozmezí hodnot 6 – 7, minimální hodnotou je pH 4,4 a maximální hodnou je pH 9 [51]. *Escherichia coli* je běžnou součástí střevní mikroflóry zdravých lidí. Jeho přítomnost je ukazatelem fekálního znečištění a poukazuje na fakt, že stejným způsobem se do potraviny mohly dostat i jiné patogenní střevní bakterie (příslušníci rodu *Salmonella* nebo *Shigella*) [21]. Je komenzálem, částečně saprofytem a také symbiontem. Svým působením znemožňuje průnik patogenů a organismu je prospěšná také přímo – podílí se na tvorbě některých vitaminů, především vitaminu K. Jedná se však o podmíněně patogenní mikroorganismus. Ve střevě je patogenní pouze tehdy, když je kmen vybaven specifickými faktory virulence. Mimo střevo je *Escherichia coli* patogenní téměř vždy [28]. Nemoci způsobené infekcí *Escherichia coli* mohou být rozděleny do dvou skupin, a to specifické infekce a nespecifické infekce. U specifických infekcí je primárním znakem osídlení sliznice bakteriemi, symptomy onemocnění jsou spojeny s tímto místem osídlení.

Jedná se např. o intestinální či urinální onemocnění. Nespecifické infekce se odlišují tím, že symptomy nejsou spojeny s místem osídlení *Escherichia coli* a osídlení sliznice není primárním znakem. Mohou být zapříčiněny např. přímou kontaminací ran. Běžným případem je septikémie, která je následována infekcí močových cest [40].

5 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo stanovit mikrobiologickou kvalitu pařených sýrů v průběhu jejich výroby a skladování. Ve vzorcích sýřeniny a sýrů byl stanoven počet psychrotrofních a mezofilních mikroorganismů, koliformních bakterií kvasinek a mléčných bakterií. Dalším úkolem byla charakteristika bakteriálních kmenů izolovaných ze suroviny v průběhu výroby pařených sýrů. Výsledky byly diskutovány na základě informací zpracovaných v teoretické části práce.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 POUŽITÝ MATERIÁL A METODY

6.1 Chemikálie a pomůcky

Chemikálie:

- Hydroxid draselný (Ing. Petr Lukeš, Česká republika)
- Peroxid vodíku (Ing. Petr Lukeš, Česká republika)
- Imerzí olej (PENTA, Ing. Petr Švarc, Česká repulika)
- Lugolův roztok (připraveno v laboratoři pro výuku)
- Krystalová violet' (připraveno v laboratoři pro výuku)
- Karbolfuchsin (připraveno v laboratoři pro výuku)
- Laktóza (Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Česká republika)
- Glukóza (Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Česká republika)
- Chlorid sodný (Ing. Petr Lukeš, Česká republika)
- Činidlo pro VPT I (Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Česká republika)
- Činidlo pro VPT II (Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Česká republika)
- Činidlo pro PYRA test (Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Česká republika)

Kultivační media:

- Plate Count Agar – PCA (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
- Violet Red Bile Agar – VRBA (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
- GKCH Agar – GKCHA (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
- M17 Broth (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
- Agar (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
- MRS Agar (Oxoid Ltd., Velká Británie)
- Manitol Salt Agar – MSA (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie)
- ENDO Agar – EA (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie)

Biochemické testy:

- VP test (Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Česká republika)
- PYRA test (Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Česká republika)
- STAPHY test (Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Česká republika)
- STREPTO test (Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Česká republika)
- OXI test (Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Česká republika)

Přístroje a pomůcky:

- Autokláv 135 S, H+P VARIOKLAV, H+P Labortechnik AG, Německo
- Denzitometr DENZI-LA-METER, Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Česká republika
- Mikrovlnná trouba (Electrolux, Švédsko)
- Mikroskop (Wedgwood AV Ltd., Velká Británie)
- Předvážky (KERN, Německo)
- Termostat (Memmert, Německo)
- Chladnička (Elektrolux, Švédsko)
- Stomacher (Seward, Velká Británie)
- Očkovací box (Clean Air, Nizozemí)
- Mikropipety a další běžné laboratorní a mikrobiologické pomůcky a vybavení

6.2 Metodika práce

6.2.1 Odběr vzorků

Pro mikrobiologické rozbory byly odebírány vzorky z různých stupňů výroby sýrů mozzarella a pařeného soleného sýra, a to:

- pasterované mléko,
- sýřenina před pařením,
- sýřenina po paření,

- finální výrobek.

Tuhé vzorky byly odebrány do sterilních sáčků, tekuté do sterilních skleněných vzorkovnic a přepravovány v chladicí tašce. Vzorky sýrů byly odebírány v období od května 2010 do března 2011. Vzorky byly po dopravě ihned podrobeny rozboru v laboratoři. Pro porovnání celkového počtu mikroorganismů během skladování byly zakoupeny nízkotučné sýry mozzarella.

6.2.2 Příprava ředění

Z každého pevného vzorku (sýřenina před pařením, sýřenina po paření, finální výrobek) bylo asepticky odebráno a odváženo 5 g hmoty. K odváženému množství bylo potom přidáno 45 ml fyziologického roztoku. Z tekutých vzorků (mléko, nálev) byl odebrán 1 ml do 9 ml fyziologického roztoku. Připravené směsi byly homogenizovány. Z homogenizovaných směsí byla připravena potřebná ředění desítkovou řadou.

Pro stanovení celkového počtu:

- mezofilních mikroorganismů byla připravena ředění $10^{-2} - 10^{-7}$,
- psychrotrofních mikroorganismů byla připravena ředění $10^{-2} - 10^{-7}$,
- koliformních bakterií byla připravena ředění $10^{-1} - 10^{-3}$,
- kvasinek byla připravena ředění $10^{-1} - 10^{-4}$,
- laktoacilů byla připravena ředění $10^{-1} - 10^{-5}$,
- mléčných streptokoků byla připravena ředění $10^{-1} - 10^{-5}$.

V případě stanovení změn mikroflóry během skladování, byly vzorky uchovávány v chladničce při teplotě 8 °C. V daných intervalech byly potom odebírány jednotlivé sýry a podrobeny rozboru. Rozboru byly postupně podrobeny výrobky jedné šarže výroby. Byly sledovány změny mezofilních a psychrotrofních mikroorganismů, koliformních bakterií a kvasinek.

6.2.3 Příprava kultivačních médií, jejich inokulace a kultivace

Půda PCA byla použita pro stanovení celkového počtu psychrotrofních a mezofilních mikroorganismů. Podle návodu na balení bylo 23,5 g dehydrované půdy rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Půda byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Na sterilní Petriho misky byl přelivem zaočkován 1ml inokula jednotlivých ředění.

Zaočkované misky byly se zavěšeným agarem inkubovány při 30 °C 48 hodin pro mezofilní mikroorganismů a při 8 °C 14 dní psychrotrofní mikroorganismů.

Pro stanovení celkového počtu koliformních bakterií byla použita půda VRBA. Podle návodu na balení bylo 38 g dehydrované půdy rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Půda byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Na sterilní Petriho misky byl přelivem zaočkován 1ml inokula jednotlivých ředění. Zaočkované misky byly se zavěšeným agarem inkubovány při 37 °C 24 hodin.

Pro stanovení celkového počtu kvasinek byla použita půda GKCHA. Podle návodu na balení bylo 36,1 g dehydrované půdy rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Půda byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Na sterilní Petriho misky byl přelivem zaočkován 1ml inokula jednotlivých ředění. Zaočkované misky byly se zavěšeným agarem inkubovány při teplotě laboratoře 10 dní.

Pro stanovení celkového počtu mléčných streptokoků byl použit M17 agar. K přípravě pevné půdy bylo 39,1 g M17 Broth a 14,9 g Agarů rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Byly připraveny 10% roztoky glukózy a laktózy. Půda i roztoky cukrů byly sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. V očkovacím boxu bylo ke sterilizované půdě přidáno 54,3 ml roztoku laktózy a 100 ml roztoku glukózy. K zaočkování roztěrem byly připraveny sterilní Petriho misky s M17 agarem. Na ztuhlou osušenou půdu bylo roztěrem zaočkováno 0,1 ml z jednotlivých ředění. Zaočkované misky byly se zavěšeným agarem inkubovány při teplotě 37 °C 48 hodin.

Pro stanovení celkového počtu laktobacilů byl použito MRS agaru. Podle návodu na balení bylo 62,0 g dehydrované půdy rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Půda byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. K zaočkování roztěrem byly připraveny sterilní Petriho misky s MRS agarem. Na ztuhlou osušenou půdu bylo roztěrem zaočkováno 0,1 ml z jednotlivých ředění. Zaočkované misky byly se zavěšeným agarem inkubovány při teplotě 37 °C 48 hodin se zvýšenou tenzí CO₂ (5 %).

Pro izolaci a následnou charakteristiku izolátů byly použity půdy MSA a EA. Podle návodu na balení bylo 111,0 g dehydrované půdy rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Půda byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Na sterilní Petriho misky byl přelivem zaočkován 1ml inokula jednotlivých ředění. Zaočkované misky byly se zavěšeným agarem inkubovány při teplotě laboratoře 30 °C 48 hodin.

Při přípravě EA bylo podle návodu na balení 41,4 g dehydrované půdy rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Půda byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. K zaočkování roztěrem byly připraveny sterilní Petriho misky s EA agarem. Na ztuhlou osušenou půdu bylo roztěrem zaočkováno 0,1 ml z jednotlivých ředění. Zaočkované misky byly se zavěšeným agarem inkubovány při teplotě 37 °C 24 hodin

6.2.4 Odečet výsledků

Po uplynutí doby příslušné doby kultivace pro jednotlivá média byly na Petriho miskách spočteny narostlé kolonie. Celkový počet mikroorganismů na 1 g (popř. 1 ml) daných vzorků byl vypočítán podle vztahu:

$$N = \frac{\Sigma_C}{V \cdot (n_1 + 0,1n_2) \cdot d}$$

Kde:

N ... počet mikroorganismů [KTJ/g, KTJ/ml],

Σ_C ... počet všech kolonie tvořících jednotek na všech miskách použitých k výpočtu,

n_1 ... počet misek prvního ředění použitého pro výpočet,

n_2 ... počet misek druhého ředění použitého pro výpočet,

d ... ředící faktor prvního ředění použitého pro výpočet,

V ... objem inokula zaočkovaného na misku [ml].

Výsledky byly statisticky zpracovány T – testem v softwarovém systému pro analýzu dat StatSoft, Inc. (2001) STATISTICA Cz, verze 6, www.StatSoft.cz.

6.2.5 Charakteristika izolovaných bakterií

KOH test

Na podložní sklíčko byla nanesena kapka 3% roztoku KOH, ve které se sterilní kličkou rozmíchala čerstvá kultura. Test byl pozitivní v případě, že se roztok s kulturou z kličky „táhnul“ a ultra byla takto identifikován jako gramnegativní [52].

Test důkazu produkce katalázy

Na podložní sklíčko byla nanesena kapka 3% roztoku peroxidu vodíku, ve které se sterilní kličkou rozmíchala čerstvá kultura. Test byl vyhodnocen jako pozitivní, pokud se v roztoku viditelně uvolňovaly bublinky kyslíku, které vznikly rozkladem peroxidu vodíku katalázou – jednalo se tedy o katalázapozitivní kulturu. V opačném případě byly testované kultury vyhodnoceny jako katalázanegativní [24].

OXI test

Test je určen pro detekci bakteriální cytochromoxidázy. Na navlhčenou zónu proužek testu byla nanesena čerstvá kultura. Po 1 – 2 minutách byla odečtena reakce. O pozitivní reakci, produkci cytochromoxidázy, se jedná v případě vzniku modrého nebo slabě modrého zbarvení, negativní reakce je bez modrého zbarvení [54].

OF test

Dvě zkumavky s médiem byly zaočkovány vpichem čerstvou kulturou. Jedna ze zaočkových zkumavek byla přelita parafinem a obě potom byly kultivovány v termostatu při 37 °C 24 hodin.

Testem se stanovuje oxidačně fermentační aktivita – tzn., zda je kultura schopná využít daný cukr jen za přítomnosti vzduchu nebo kvašením. Pozitivní reakce je indikována změnou barvy media ze zelené na žlutou, popřípadě také vznikem vzduchových bublin či trhlin. V případě, že cukr není rozkládán, barva media se nezmění nebo zmodrá, což poukazuje na alkalizaci media [53].

Voges – Proskauerův test (VP test)

Tento test je určen pro rychlou detekci produkce acetoinu. Do zkumavky s 1 ml suspenze se zákalem 3. stupně McFarlandovy zákalové stupnice byl vložen proužek VP testu. Tato zkumavka byla následně inkubována v termostatu při 37 °C po dobu 2 hodin. Po inkubaci byla zhodnocena reakce ve zkumavce a byly přidány nejprve 3 kapky činidla VPT I, poté

činidla VPT II. Obsah zkumavky byl protřepán a opět inkubován při teplotě 37 °C po dobu 30 minut, byla odečtena reakce. Pozitivní reakce je důkazem tvorby acetoinu a je indikována vznikem červeného zbarvení. Negativní reakce se projeví jako bezbarvá či slabě růžová [55, 56].

PYRA test

Tento test je určen pro rychlé předpokládané stanovení enterokoků a *Streptococcus pyogenes* z bakteriální kultury na principu pozitivní reakce pyrrolidonylarylamidázy. Na navlhčenou zónu proužku testu byla sterilní kličkou nanесena čerstvá kultura. Proužek byl při laboratorní teplotě inkubován 10 minut. Poté bylo na zónu proužku nanесeno činidlo pro PYRA test. Po uplynutí 1 – 2 minut byla odečtena barevná reakce. Důkazem pozitivní reakce je vznik červeného nebo červenooranžového zbarvení, negativní reakce je indikována žlutým zbarvením [57].

STREPTO test

Z čerstvé kultury byla ve fyziologickém roztoku připravena suspenze o 3. Stupni McFarlandovy zákalové stupnice. Test byl proveden a vyhodnocen podle návodu v příbalovém letáku soupravy STREPTO testu.

STAPHY test

Z čerstvé kultury byla ve fyziologickém roztoku připravena suspenze o 2. Stupni McFarlandovy stupnice. Test byl proveden a vyhodnocen podle návodu v příbalovém letáku diagnostické soupravy.

Gramovo barvení

Na podložní sklíčko byla do kapky destilované vody nanесena kultura. Po zaschnutí byl preparát zafixován trojím protažením v plameni. Takto připravený preparát byl na 60 sekund převrstven roztokem krystalové violeti. Barvivo bylo opláchnuto destilovanou vodou a preparát převrstven Lugolovým roztokem na dobu 60 sekund. Lugolův roztok byl slit a preparát opět opláchnut destilovanou vodou. Následně byl preparát odbarven etanolem, opláchnut destilovanou vodou. Poté bylo provedeno dobarvení karbolfuchsinem po dobu 30 – 60 sekund. Karbolfuchsin byl opláchnut destilovanou vodou po dobu 1 sekundy. Na usušený obarvený preparát byla nanесena kapka imerzního oleje. Mikroskopování bylo provedeno pomocí imerzního objektivu při zvětšení 16 x 100 [26].

7 VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro mikrobiologický rozbor byly odebírány vzorky z jednotlivých fází výroby – pasterované mléko, sýřenina před a po paření, finální výrobek. Byly sledovány celkové počty mezofilních a psychrotrofních mikroorganismů, koliformních bakterií, kvasinek, mléčných streptokoků a laktobacilů.

7.1 Změna mikroflóry pařených sýrů v průběhu výroby

7.1.1 Mikroflóra mléka pro výrobu pařených sýrů

Pro průmyslovou výrobu pařených sýrů se používá šetrně pasterované mléko (71,7 °C po dobu nejméně 15 sekund [12]). Takto upravené mléko by mělo obsahovat méně než 3 log KTJ/ml. Celkový obsah mikroorganismů je závislý na kvalitě syrového mléka a celkové hygieně při provádění pasterace mléka [7]. V testovaných vzorcích pasterovaného mléka byl zjištěn celkový počet mezofilních mikroorganismů průměrně $3,81 \pm 0,41$ log KTJ/ml, počet psychrotrofních mikroorganismů $3,83 \pm 0,86$ log KTJ/ml a počet koliformních bakterií $2,51 \pm 0,51$ log KTJ/ml. Kvasinky se ve vzorcích pasterovaného mléka nevyskytovaly.

Celkový počet mezofilních mikroorganismů v pasterovaném mléce je podle citované literatury v počtu 4,48 log KTJ/ml celkový počet psychrotrofních mikroorganismů je uveden v počtu 5 log KTJ/ml [59]. Stanovené počty mezofilních a psychrotrofních mikroorganismů nepřekračují hodnoty uvedené v literatuře. Počty koliformních bakterií v pasterovaném mléce jsou v citované literatuře uvedeny v hodnotách menších než 2 log KTJ/ml [59]. Výskyt koliformních bakterií v počtu $2,51 \pm 0,51$ log KTJ/ml může poukazovat na nedostatečný účinek pasterace nebo sekundární kontaminaci při pasteraci mléka a manipulaci s ním. V případě kvasinek lze podle výsledků soudit, že teplota šetrné pasterace je dostatečná pro jejich inaktivaci.

7.1.2 Vliv pařícího procesu na sledované skupiny mikroorganismů

Pasterované mléko je napouštěno do nerezových velkoobjemových van, kde se nechává prokysávat pomocí přidavku bakterií mléčného kvašení a syřidla. Teplota mléka při zaočkování bakteriemi mléčného kvašení závisí na druhu použitých bakterií (mezofilní kultury 30 – 32 °C, termofilní kultury 44 – 50 °C). Mléko se nechává prokysávat na požadovanou hodnotu pH, která je u pařených sýrů 5,15. Od vzniklé sýřeniny se odpouští syrovátka, sýřenina se dosouší [61]. Vzorokly takto připravené sýřeniny, zbavené syrovátky, byly podrobeny mikrobiologickému rozboru.

Výroba sýřeniny má pro oba druhy analyzovaných pařených sýrů stejné podmínky. Jak je ale z výsledků (Tab. 3, Tab. 4) patrné, celkové počty sledovaných skupin mikroorganismů se liší. U sýřeniny (surovina po paření) pro výrobu sýra v solném nálevu byly ve všech skupinách mikroorganismů stanoveny vyšší průměrné hodnoty jejich celkového počtu. Největší rozdíl je patrný v počtech psychrotrofních mikroorganismů a kvasinek, v sýřenině pro výrobu soleného sýra byl v obou případech jejich počet o tři řády vyšší. Na základě těchto poznatků lze usuzovat, že v provozu pro výrobu soleného sýra se mohly objevit nedostatky v dodržování hygieny během zpracování pasterovaného mléka na sýřeninu.

Připravená sýřenina zbavená syrovátky se paří a hněte ve vodě o teplotách 75 – 90 °C [3]. Pařená sýřenina se tak z mikrobiologického hlediska pasteruje. Celkový počet mezofilních mikroorganismů v pařící vodě byl stanoven na $3,33 \pm 0,02$ log KTJ/ml, celkový počet psychrotrofních mikroorganismů byl velmi nízký, $1,75 \pm 0,15$ KTJ/ml. Přítomnost koliformních bakterií ani kvasinek v pařící vodě nebyla prokázána.

Když se zaměříme na účinek pařícího procesu na jednotlivé skupiny mikroorganismů v pařenině mozzarely (Tab. 3), zjistíme, že u mezofilních a psychrotrofních mikroorganismů byl shledán statisticky významný rozdíl v počtu mikroorganismů v sýřenině před a po paření. Na koliformní bakterie a kvasinky má paření jednoznačně inaktivační účinek, v pařenině se nevyskytovaly. Jak již bylo popsáno výše, jejich přítomnost nebyla prokázána ani v pařící vodě, což potvrzuje účinek paření na tyto skupiny mikroorganismů. Vliv pařícího efektu na laktobacily a mléčné streptokoky prokázán nebyl.

Tab. 3. Porovnání průměrných hodnot celkového počtu sledovaných skupin mikroorganismů suroviny pro výrobu mozzarely před a po pařícím procesu

Mikroorganismy	Fáze výroby	
	Surovina před pařením [log KTJ/g]	Surovina po paření [log KTJ/g]
Mezofilní	5,87 ± 0,77 ^A	5,16 ± 1,11 ^B
Psychrotrofní	5,26 ± 0,50 ^a	4,03 ± 0,50 ^b
Koliformní	4,64 ± 0,82 ^a	0,00 ^b
Kvasinky	3,18 ± 0,54 ^a	0,00 ^b
Laktobacily	3,53 ± 1,20 ^A	3,56 ± 1,12 ^A
Mléčné streptokoky	5,04 ± 2,20 ^A	4,83 ± 1,45 ^A

Rozdílná písmena (A,B/a,b) v horních indexech hodnot znázorňují statisticky významný rozdíl v rámci řádku. Velká písmena (A, B) reprezentují statisticky významný rozdíl na hladině významnosti 95 %, malá písmena statisticky významný rozdíl na hladině významnosti 99 %. V případě shodných písmen (A,A/a,a) nebyl statisticky významný rozdíl shledán.

U pařeniny pro výrobu soleného sýra byl v porovnání se sýřeninou před pařením sledován významný rozdíl v hodnotách celkového počtu mezofilních a psychrotrofních mikroorganismů. U těchto mikroorganismů byl pozorován významnější vliv pařícího efektu (Tab. 4) než u pařeniny mozzarely. U psychrotrofních mikroorganismů byl zaznamenán nejvyšší pokles celkového počtu a to o 4 řády. Tato skutečnost byla zapříčiněna vyššími celkovými počty sledovaných skupin mikroorganismů v sýřenině před pařením pro výrobu soleného sýra než u sýřeniny před pařením mozzarely. U koliformních bakterií a kvasinek nastaly během rozborů dvě situace. Pařenina jedné šarže koliformní bakterie ani kvasinky neobsahovala. V pařenině druhé šarže však přítomny byly. Je tedy pravděpodobné, že v tomto případě se mohla vyskytnout chyba v technologickém postupu, mohlo se jednat např. o nedostatečně vysokou teplotu pařící vody nebo sekundární kontaminaci pařeniny po přesunu z pařícího zařízení. U laktobacilů a mléčných streptokoků nebyl vliv pařícího efektu pozorován stejně jako v případě pařeniny pro výrobu mozzarely.

Tab. 4. Porovnání průměrných hodnot celkového počtu sledovaných skupin mikroorganismů suroviny pro výrobu pařeného soleného sýra před a po pařícím procesu

Mikroorganizmy	Fáze výroby	
	Surovina před pařením [log KTJ/g]	Surovina po paření [log KTJ/g]
Mezofilní	6,73 ± 1,98 ^a	4,21 ± 0,65 ^b
Psychrotrofní	8,34 ± 0,46 ^a	4,20 ± 0,64 ^b
Koliformní	5,68 ± 1,15 ^a	3,44 ± 0,19 ^b
Kvasinky	6,00 ± 0,70 ^a	4,09 ± 0,30 ^b
Laktobacily	4,38 ± 1,10 ^A	4,79 ± 0,49 ^A
Mléčné streptokoky	5,00 ± 0,49 ^A	5,35 ± 0,34 ^A

Rozdílná písmena (A,B/a,b) v horních indexech hodnot znázorňují statisticky významný rozdíl v rámci řádku. Velká písmena (A, B) reprezentují statisticky významný rozdíl na hladině významnosti 95 %, malá písmena statisticky významný rozdíl na hladině významnosti 99 %. V případě shodných písmen (A,A/a,a) nebyl statisticky významný rozdíl shledán.

U vzorku sýřeniny pro výrobu mozzarely byl proveden také rozbor syrovátky. Ta obsahovala průměrně 4,99 ± 0,16 log KTJ/g mezofilních mikroorganismů, 4,73 ± 0,03 log KTJ/g psychrotrofních mikroorganismů, 3,19 ± 0,05 log KTJ/g koliformních bakterií a 1,10 ± 0,00 log KTJ/g kvasinek. Laktobacily byly přítomny v počtu 2,69 ± 0,00 log KTJ/g a mléčné streptokoky 3,32 ± 0,00 log KTJ/g. V porovnání se sýřeninou mozzarely obsahovala syrovátka o jeden řád menší počty sledovaných skupin mikroorganismů.

7.1.3 Mikroflóra finálního výrobku

Pařenina se ještě za tepla formuje do požadovaných tvarů. V případě mozzarely probíhá tvarování na válci s půlkulovitými otvory. Pařená sýřenina přichází z procesu paření přímo na válec s otvory o požadovaných rozměrech, kde se vytvaruje. Z válce vypadávají do vody určené k okamžitému vychlazení již vytvarované finální sýry.

Pokud porovnáme celkové počty sledovaných skupin mikroorganismů ve finálním výrobku mozzarely se surovinou po paření (Tab. 5), zjistíme, že byl shledán významný rozdíl při porovnání celkového počtu mezofilních mikroorganismů a mléčných streptokoků paře-

niny a finálního výrobku. V obou případech se celkový počet mikroorganismů ve finálním výrobku oproti pařenině zvýšil. Kvasinky, které byly při paření inaktivovány, se již ve finálním výrobku nevyskytovaly. Koliformní bakterie se však v několika případech ve finálním výrobku objevily i přes to, že v pařenině daného výrobku přítomny nebyly. Jejich počet byl v těchto případech průměrně 3,02 log KTJ/g. Pravděpodobností se jednalo o sekundární kontaminaci finálních výrobků během jejich tvarování nebo chlazení. Nařízení komise č. 2073/2005 v platném znění připouští hodnotu 3 log KTJ/g pouze pro počet *Escherichia coli*. S hodnotou celkového počtu všech koliformních bakterií 3,02 log KTJ/g mozzarella podmínky nařízení splňuje.

Tab. 5. Porovnání průměrných hodnot celkového počtu sledovaných skupin mikroorganismů suroviny pro výrobu mozzarely po pařícím procesu s finálním výrobkem

Mikroorganizmy	Fáze výroby	
	Surovina po paření [log KTJ/g]	Finální výrobek [log KTJ/g]
Mezofilní	5,16 ± 1,11 ^a	6,71 ± 0,36 ^b
Psychrotrofní	4,03 ± 0,50 ^A	4,24 ± 0,39 ^A
Koliformní	0,00 ^a	3,02 ± 1,03 ^b
Kvasinky	0,00 ^a	0,00 ^a
Laktobacily	3,56 ± 1,12 ^A	3,58 ± 1,10 ^A
Mléčné streptokoky	4,83 ± 1,45 ^A	5,57 ± 2,00 ^B

Rozdílná písmena (A,B/a,b) v horních indexech hodnot znázorňují statisticky významný rozdíl v rámci řádku. Velká písmena (A, B) reprezentují statisticky významný rozdíl na hladině významnosti 95 %, malá písmena statisticky významný rozdíl na hladině významnosti 99 %. V případě shodných písmen (A,A/a,a) nebyl statisticky významný rozdíl shledán.

Pro porovnání byly provedeny také rozborů finální mozzarely balené v nálevu a balené bez nálevu, kdy v počtu mezofilních mikroorganismů, laktobacilů a mléčných streptokoků nebyl shledán s 95% pravděpodobností statisticky významný rozdíl. V případě koliformních bakterií byl s 95% pravděpodobností statisticky významný rozdíl pozorován, mozzarella s nálevem obsahovala průměrně 5,68 ± 0,15 log KTJ/g a mozzarella bez nálevu 2,53 ± 0,09 log KTJ/g. Větší vlhkost v případě mozzarely v nálevu tvořila pro tyto mikroorganismy vhodnější prostředí.

V případě pařeného soleného sýra se pařenina splétala ručně do copů, poté nakládala do solného roztoku. Při porovnání celkových počtů mikroorganismů pařeniny a finálního výrobku (Tab. 6) zjistíme, že byl shledán významný rozdíl celkových počtů mezofilních, psychrotrofních a koliformních mikroorganismů a mléčných streptokoků při srovnání pařeniny a finálního výrobku. U psychrotrofních a mezofilních mikroorganismů došlo k nárůstu jejich celkového počtu. Ve srovnání s celkovým počtem mezofilních mikroorganismů v mozzarella je v soleném sýru jejich obsah menší. Tato skutečnost může být dána citlivostí mikroorganismů na obsah NaCl v nasoleném sýru. Celkový počet koliformních bakterií i streptokoků se snížil, což lze také přisuzovat citlivosti k obsahu NaCl. Nařízení komise č. 2073/2005 v platném znění připouští hodnotu 3 log KTJ/g pouze pro počet *Escherichia coli*. S hodnotou celkového počtu všech koliformních bakterií 2,33 log KTJ/g mozzarella podmínky nařízení splňuje.

Tab. 6. Porovnání průměrných hodnot celkového počtu sledovaných skupin mikroorganismů suroviny pro výrobu pařeného soleného sýra po pařicím procesu s finálním výrobkem

Mikroorganismy	Fáze výroby	
	Surovina po paření [log KTJ/g]	Finální výrobek [log KTJ/g]
Mezofilní	4,21 ± 0,65 ^A	4,66 ± 0,42 ^B
Psychrotrofní	4,20 ± 0,64 ^a	5,29 ± 0,26 ^b
Koliformní	3,44 ± 0,19 ^a	2,33 ± 0,23 ^b
Kvasinky	4,09 ± 0,30 ^A	3,99 ± 0,38 ^B
Laktobacily	4,79 ± 0,49 ^A	4,71 ± 0,61 ^A
Mléčné streptokoky	5,35 ± 0,34 ^a	4,07 ± 0,22 ^b

Rozdílná písmena (A,B/a,b) v horních indexech hodnot znázorňují statisticky významný rozdíl v rámci řádku. Velká písmena (A, B) reprezentují statisticky významný rozdíl na hladině významnosti 95 %, malá písmena statisticky významný rozdíl na hladině významnosti 99 %. V případě shodných písmen (A,A/a,a) nebyl statisticky významný rozdíl shledán.

7.2 Mikroflóra pařených sýrů v průběhu skladování

V průběhu skladování pařených sýrů dochází k řadě biochemických změn, které jsou podstatou zrání sýrů a následně i jejich kažení. Dochází k rozkladu laktózy obsažené v sýru, a to již během odkapávání syrovátky po vytvoření sýřeniny. Během zrání a skladování dochází ke snižování kyselosti vlivem přeměny kyseliny mléčné na jiné produkty nebo její vazbou. V průběhu skladování dochází také k různě intenzivnímu rozkladu bílkovin vlivem proteolýzy [18, 61]. U skladovaných finálních výrobků byly sledovány změny mezofilních a psychrotrofních mikroorganismů, koliformních bakterií a kvasinek.

7.2.1 Mikroflóra mozzarely v průběhu skladování

Skladované finální sýry mozzarella byly podrobeny rozboru v týdenních intervalech (Tab. 7). U tohoto sýra byly zaznamenány vysoké nárůsty sledovaných skupin mikroorganismů. Během prvního týdne byl sýr ještě před prošlou minimální trvanlivostí. Šarže použitá ke stanovení změn mikroflóry celkově vykazovala poměrně vysoké nárůsty sledovaných skupin mikroorganismů. Ve třetím týdnu skladování dosahovaly počty mezofilních mikroorganismů průměrně 12,52 log KTJ/g, kdy k největšímu nárůstu došlo v posledním týdnu skladování. U psychrotrofních mikroorganismů se na konci doby skladování jednalo o hodnotu 8,17 log KTJ/g. V nárůstech mezofilních i psychrotrofních mikroorganismů byl s 95% pravděpodobností po každém týdnu skladování shledán statisticky významný rozdíl. Obsah koliformních bakterií byl stanoven na 3,48 log KTJ/g. Nařízení komise č. 2073/2005 v platném znění připouští hodnotu 3 log KTJ/g pouze pro počet *Escherichia coli*. Proto je možné soudit, že tato podmínka byla splněna se stanoveným počtem pro všechny koliformní bakterie.

Po třech týdnech skladování narostly koliformní bakterie na průměrnou hodnotu 5,53 log KTJ/g, přičemž k významnému nárůstu došlo po prvním a druhém týdnu skladování. Po třetím týdnu se jejich počet již výrazně nezměnil. K nárůstu kvasinek během skladování došlo i přesto, že se v čerstvém finálním výrobku již nevyskytovaly. Do výrobku mohly být zaneseny sekundární kontaminací při balení. Během prvních dvou týdnů skladování narostly do počtu 4,66 log KTJ/g, ve třetím týdnu však jejich počet klesl na 3,88 log KTJ/g. Pro stanovení změny mikroflóry během skladování byl použit také sýr mozzarella nízkotučný. V tomto případě došlo během čtyř měsíců skladování k nárůstu mezofilních mikroorganismů z průměrné hodnoty 6,51 log KTJ/g na hodnotu 10,76 log KTJ/g.

Při porovnání vzorku mozzarely skladované tři týdny s tímto vzorkem je patrné, jak vysoké nárůsty byly stanoveny u vzorku skladovaného tři týdny.

Velmi vysoké nárůsty u mozzarely skladované v týdenních intervalech mohly být způsobeny hygienickými nedostatky při výrobě této šarže. Chybu v metodice práce lze vzhledem k tomu, že postup zpracování vzorků byl vždy stejný a nárůsty v jednotlivých týdnech skladování se postupně zvyšují, vyloučit.

Tab. 7. Porovnání průměrných hodnot celkového počtu sledovaných skupin mikroorganismů během skladování finálního výrobku mozzarely

Mikroorganismy	Doba skladování			
	Čerstvý výrobek [KTJ/g]	1 týden [KTJ/g]	2 týdny [KTJ/g]	3 týdny [KTJ/g]
Mezofilní	6,71 ± 0,36 ^a	7,27 ± 0,14 ^{b_a}	7,93 ± 0,15 ^{a_b}	12,52 ± 0,42 ^b
Psychrotrofní	4,24 ± 0,39 ^a	6,84 ± 0,08 ^{b_A}	7,69 ± 0,46 ^{A_B}	8,17 ± 5,49 ^B
Koliformní	3,02 ± 1,03 ^A	3,48 ± 0,21 ^{B_a}	5,50 ± 0,28 ^{A_b}	5,53 ± 0,24 ^A
Kvasinky	0,00 ^A	2,64 ± 0,09 ^{B_A}	4,66 ± 0,69 ^{A_B}	3,88 ± 0,33 ^B

Rozdílná písmena (A,B/a,b) v indexech hodnot znázorňují statisticky významný rozdíl v rámci řádku. Velká písmena (A, B) reprezentují statisticky významný rozdíl na hladině významnosti 95 %, malá písmena statisticky významný rozdíl na hladině významnosti 99 %. V případě shodných písmen (A,A/a,a) nebyl statisticky významný rozdíl shledán. Porovnávají jsou vždy dvě sousedící hodnoty, odpovídají si písmena ve shodných indexech (horní, dolní index).

7.2.2 Mikroflóra soleného sýra v průběhu skladování

Solený sýr (Tab. 8) byl skladován po dobu tří měsíců. V tomto případě má na mikroorganismy vliv také obsah NaCl v sýru, který jejich růst potlačuje. Nebyly sledovány tak významné nárůsty celkového počtu sledovaných skupin mikroorganismů, i když se jednalo o rozbory v intervalech měsíců. U mezofilních mikroorganismů byl shledán významný nárůst během prvního a třetího měsíce. U psychrotrofních mikroorganismů došlo k významnému nárůstu v prvním měsíci, během druhého měsíce potom k poklesu celkového počtu, který se v posledním měsíci skladování významně nezměnil. V případě koliformních bakterií došlo již během prvního měsíce k poklesu na nulové hodnoty. Prostředí soleného sýra se tak jeví jako nepříznivé pro jejich vegetaci. U kvasinek nedošlo k významným změnám jejich celkového počtu.

Tab. 8. Porovnání průměrných hodnot celkového počtu sledovaných skupin mikroorganismů během skladování finálního výrobku pařeného soleného sýra

Mikroorganismy	Doba skladování			
	Čerstvý výrobek [log KTJ/g]	1 měsíc [log KTJ/g]	2 měsíc [log KTJ/g]	3 měsíc [log KTJ/g]
Mezofilní	4,66 ± 0,42 ^A	5,27 ± 0,15 ^{B_A}	5,34 ± 0,16 ^{A_A}	6,01 ± 0,27 ^B
Psychrotrofní	5,29 ± 0,26 ^a	6,23 ± 0,10 ^{b_A}	5,26 ± 0,10 ^{A_B}	5,19 ± 0,09 ^A
Koliformní	2,33 ± 0,23 ^a	0,00 ^{b_a}	0,00 ^{a_a}	0,00 ^{a_a}
Kvasinky	3,99 ± 0,38 ^A	4,04 ± 0,64 ^{A_A}	4,56 ± 0,09 ^{A_A}	4,70 ± 0,26 ^A

Rozdílná písmena (A, B/a,b) v horních indexech hodnot znázorňují statisticky významný rozdíl v rámci řádku. Velká písmena (A, B) reprezentují statisticky významný rozdíl na hladině významnosti 95 %, malá písmena statisticky významný rozdíl na hladině významnosti 99 %. V případě shodných písmen (A,A/a,a) nebyl statisticky významný rozdíl shledán. Porovnávány jsou vždy dvě sousedící hodnoty, odpovídají si písmena ve shodných indexech (horní, dolní index).

7.3 Charakteristika izolovaných kmenů

Kmen izolované z půd M17, MRS, MSA a EA byly pomocí Gramova barvení, biochemických testů (KOH test, test na produkci katalázy, OXI test, PYRA test, STREPTO test, STAPHY test) charakterizovány z morfologického, fyziologického a biochemického hlediska.

7.3.1 Kmeny izolované z půdy M17

Kmeny 1 a 2 byly izolovány ze zakoupeného nízkotučného sýru mozzarella. Ke křížovému roztěru byly vybrány dvě kolonie. Tyto byly sněhové bílé, lesklé, vypouklé s hladkým okrajem, jejich průměr byl menší než 0,5 mm. Podle provedeného Gramova barvení se jednalo o grampozitivní, oválné diplokoky a řetízky koků. Kmen 3 byl izolován z pařeniny (sýřeniny po paření) pro výrobu mozzarely. Byla izolována lesklá, bílá kolonie s šedivým nádechem. Kolonie byla vypouklá s hladkým okrajem o průměru přibližně 0,5 mm. Gramovým barvením byly bakterie určeny jako grampozitivní koky, které byly ve srovnání s kmeny 1 a 2 kulatějšího tvaru. Tyto koky vytvářely řetízky a shluky. Z finální mozzarely byl izolován kmen 4. Izolovaná kolonie byla sněhově bílá, lesklá, vypouklá s hladkým okrajem. Průměr kolonie byl 1 mm. Jednalo se o oválné koky v řetízcích. Kmeny 1 – 4 byly podrobeny STREPTO testu. Výsledky testu byly zaznamenány do archu (Obr. 6) a vyhodnoceny v identifikačním programu TNW Lite 6.5. Ani jeden z testovaných kmenů se však nepodařilo identifikovat.

MIKROTEST®		Datum/Dátum/Date/Дата		Zprac./Sprac./Ref./Идент. провед		PLIVA-Lachema											
STREPTOtest 16		10.2.		1P.4.		Diagnostika s.r.o.											
Kmen č./Kmeň č./Strain No./Ho. анализа		1		Poznámky/Notes/Отметки		Karásek 1											
						621 33 Brno, CZ											
Proužek Průžok Strip Полоска	STREPTOtest 16																
	Řádek/Riadok/Strip/Стрип 1								Řádek/Riadok/Strip/Стрип 2								
	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A	
PYR	VPT	HIP	PHS	LAP	GLR	aGA	ESL	ARG	URE	MAN	SOR	TRE	LAC	RAF	INU	MLB	RIB
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
		-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Profil/Profile/Профиль																	
ABC		HEM		Dodatkové testy/Additional tests/Дополнительные тесты													
				Identifikace/Identifikácia/Identification/Идентификация													
				NI													

8/06

Obr. 6. Ukázka archu pro STREPTO test 16

Kmeny 5 a 6 byly izolovány ze sýřeniny před pařením pro výrobu mozarely. Obě kolonie byly sněhově bílé, lesklé a vypouklé s hladkým okrajem. Průměr kolonie u kmene 5 byl 0,5 mm, u kmene 6 potom 0,75 mm. Kmeny byly v obou případech určeny jako grampozitivní koky, diplokoky a shluky koků. Kmen 7 byl izolován z pařeniny soleného sýra. Izolovaná kolonie byla vypouklá, lesklá, šedivě zbarvená, měla průměr 0,5 mm. Podle Grama byly určeny jako grampozitivní drobkobuněk koky a diplokoky. Kmen 8 byl izolován ze sýřeniny před pařením pro výrobu soleného sýra. Jednalo se o vypouklou, lesklou kolonii, bíle zbarvenou, s průhledným středem a hladkým okrajem o průměru menším než 0,5 mm. Kmen byl určen jako grampozitivní oválné koky v řetízcích.

U katalázapozitivních kmenů 5, 6 a 7 byl proveden STAPHY test. Výsledky testu byly zaznamenány do archu (Obr. 7) a vyhodnoceny v identifikačním programu TNW Lite 6.5. Kmeny 5 a 6 byly s velmi dobrou identifikací určeny jako *Kocuria varians*. Kmen 5 s identifikačním skóre 97,84 a hodnotou T indexu 0,628. Kmen 6 s identifikačním skóre 98,18 a T indexem 0,602. Kmen 7 byl rovněž určen jako *Kocuria varians* s dobrou identifikací (identifikační skóre 96,36, T index 0,391).

Pozn.: Identifikační skóre udává pravděpodobnost, s jakou daný výsledek odpovídá danému taxonu. T index je hodnota udávající do jaké míry daný výsledek odpovídá nejtypičtějším výsledku pro daný taxon, zcela typickému výsledku odpovídá hodnota 1, přičemž může ležet v rozmezí 0 – 1.

MIKROLATEST®

STAPHYtest 16

Datum/Dátum/Date/Дата: 10. 2.

Zprac./Sprac./Ref./Идент. провёл: 18. 4.

PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o.
Karásek 1
621 33 Brno, CZ

Kmen č./Kmeň č./Strain No./Но. анализа: 5

Poznámky/Notes/Отметки:

STAPHYtest 16																	
Řádek/Riadok/Strip/Стрип 1									Řádek/Riadok/Strip/Стрип 2								
VPT	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A	
	URE	ARG	ORN	bGA	GLR	ESL	NIT	PHS	GAL	SUC	TRE	MAN	XYL	MLT	MNS	LAC	
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	
	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Profil/Profile/Профиль																	
Dodatkové testy/Additional tests/Дополнительные тесты																	
Identifikace/Identifikácia/Identification/Идентификация velmi dobře (97,84; 0,628) <i>Kocuria varians</i>																	

5/05

Obr. 7. Ukázka archu pro STAPHY test 16

Všechny kmeny byly podrobeny biochemickým testům, jejichž výsledky jsou zaznamenány v Tab. 9:

Tab. 9. Výsledky biochemických testů kmenů izolovaných z M17

Původ	Kmen	Biochemické testy					
		KOH	Gramovo b.	Tvar buněk	KAT	OXI	PYRA
Nízkotučná mozzarella	1	-	+	koky	-	-	-
	2	-	+	koky	-	-	-
Pařenina mozzarely	3	-	+	koky	-	-	-
Finální mozzarella	4	-	+	koky	-	-	-
Sýřenina mozzarely	5	-	+	koky	+	-	+
Pařenina soleného sýra	6	-	+	koky	+	-	+
	7	-	+	koky	+	-	-
Sýřenina soleného sýra	8	-	+	koky	-	-	-

M17 agar s přidavkem laktózy a glukózy je půda určená pro kultivaci mléčných streptokoků. Mléčné streptokoky jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní, nepohyblivé, kataláznegativní mikroorganismy neprodukující cytochromoxidázu [47, 48]. Tvoří sférické či ovoidní buňky, které se vyskytují po dvou nebo v řetězcích [30]. Izolované kmeny byly grampozitivní, kataláznegativní koky s výjimkou kmenů 5, 6 a 7, které byly katalázapozitivní. Žádný kmeny neprodukoval cytochromoxidázu. Negativním výsledkem PYRA testu byla u všech kmenů kromě 5 a 6 vyloučena možnost, že by se mohlo jednat o enterokoky nebo *Streptococcus pyogenes*. Katalázapozitivní kmeny 5, 6 a 7 byly podle výsledků STAPHY testu určeny s velmi dobrou a dobrou identifikací jako *Kocuria varians*. *Kocuria varians* se vyskytuje na kůži savců, na rukou či nohu lidí, v půdě, ve vodě [30, 60]. V při-

padě, že se skutečně jedná o *Kocuria varians* je možné, že se mohlo jednat o kontaminaci např. z vody nebo nedodržením správné hygienické praxe. *Kocuria varians* je kataláza- i oxidázapozitivní, naproti tomu je *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* kataláza- i oxidázanegativní [30, 60]. Na základě výsledků testů na tvorbu oxidázy, je možné i přes výsledek STAPHY testu vyloučit, že se jedná o *Kocuria varians*.

Na základě výsledků testů by se dalo usuzovat, že kmeny 1 – 4 by mohly být mléčné streptokoky. Provedeným STREPTO testem se však tyto kmeny nepodařilo identifikovat.

Tab. 10. Porovnání biochemických vlastností *Kocuria varians* se *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* [30, 60]

Test	<i>Kocuria varians</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
KAT	+	-
OXI	+	-
KOH	-	-
Gramovo barvení	+	+

7.3.2 Kmeny izolované z půdy MRS

Kmen 9 byl izolován ze suroviny před pařením pro výrobu mozzarely. Izolovaná kolonie měla světle šedou barvu, byla lesklá a vypouklá s hladkým okrajem o průměru 0,5 mm. Bakterie byly podle Grama určeny jako grampozitivní kokovité tyčinky. Kmeny 10 a 11 byly izolovány z pařeniny pro výrobu mozzarely. Izolovaná kolonie 10 měla krémové zbarvení, byla lesklá, vypouklá s hladkým okrajem a průměrem 1,5 mm. Kolonie 11 byla zbarvená sněhové bíle, byla lesklá, vypouklá s okrajem hladkým o průměru 1 mm. Oba kmeny byly tvořeny tyčinkami. Kmeny 12 a 13 byly izolovány z pařeniny pro výrobu pařeného sýra v solném nálevu. Kolonie 12 byla zbarvená bíle, byla lesklá, vypouklá s okrajem hladkým o průměru 1 mm. Kolonie 13 byla průhledná, lesklá, vypouklá s hladkým okrajem, její průměr byl menší než 0,5 mm. Oba kmeny tvořily kokovité tyčinky.

Všechny kmeny byly podrobeny biochemickým testům, jejichž výsledky jsou zaznamenány v Tab. 11:

Tab. 11. Výsledky biochemických testů kmenů izolovaných z MRS

Původ	Kmeny	Biochemické testy					
		KOH	Gramovo b.	Tvar buněk	KAT	OXI	PYRA
Sýřenina mozzrelly	9	-	+	tyčinky	-	-	-
Pařenina mozzrelly	10	-	+	tyčinky	-	-	-
	11	-	+	tyčinky	-	-	-
Pařenina soleného sýra	12	-	+	tyčinky	+	-	-
	13	-	+	tyčinky	+	-	-

MRS agar je určen pro kultivaci laktobacilů. Laktobacily tvoří buňky tvaru pravidelných tyčinek, které jsou obvykle delší, mohou být také kokovité. Jsou grampozitivní, nesporulující, kataláza a cytochromoxidáza negativní [30, 58]. Na základě výsledků biochemických testů i morfologického popisu se proto lze domnívat, že kmeny 9 – 11 by mohly náležet k rodu *Lactobacillus*. Kmeny 12 a 13 byly kataláza pozitivní, což laktobacily vylučuje. Mohlo by se jednat o sporulující zástupce rodu *Bacillus* nebo *Geobacillus*, které jsou katalázapozitivní a oxidázanegativní. Ve formě spor by byly schopny přežít pařicí proces [22, 30].

7.3.3 Kmeny izolované z půdy MSA

Kmeny 14, 15 a 16 byly izolovány z finálního sýra mozzarella. Kolonie 14 byla tvořena růžově zbarvenými, lesklými, vypouklá s hladkým okrajem, její průměr byl 2 mm. Kolonie 15 byla světle žlutá, vypouklá s hladkým okrajem o průměru 2 mm. Kolonie 16 byla stejně jako kolonie 15 světle žlutá, vypouklá s hladkým okrajem, její průměr byl 1 mm. Kolonie 14, 15 a 16 vytvářely na agaru žluté precipitační zóny. Kolonie 17 byla izolována ze sýřeniny před pařením pro výrobu mozzarely. Kolonie byla světle růžová, lesklá, zploštělá s hladkým okrajem, o průměru 4 mm.

Kmeny byly podrobeny biochemickým testům, jejichž výsledky jsou zaznamenány v Tab. 12:

Tab. 12. Výsledky biochemických testů kmenů izolovaných z MSA

Původ	Kmeny	Biochemické testy					
		KOH	Gramovo b.	Tvar buněk	KAT	OXI	PYRA
Finální mozzarella	14	-	+	koky	+	-	-
	15	-	+	koky	+	-	-
	16	-	+	koky	+	-	-
Sýřenina mozzrelly	17	-	+	koky	+	-	-

Půda MSA je určena pro kultivaci stafylokoků. Stafylokoky jsou grampozitivní koky uspořádané jednotlivě, po dvou, v tetradách nebo nepravidelných shlucích. Jsou katalázapozitivní, cytochromoxidáza negativní. Na základě výsledků testů by se dalo usuzovat, že kmeny náleží do rodu *Staphylococcus*, negativní výsledky PYRA testu vylučují enterokoky a koaguláza negativní stafylokoky.

7.3.4 Kmeny izolované z půdy EA

Kmen 18 byl izolován ze sýřeniny před pařením pro výrobu mozzarely. Jednalo se o kolonii s kovovým leskem, vypouklou, s hladkým okrajem, o průměru 1 mm. Kmen 19 byl izolován z finální mozzarely. Izolované kolonie byla sytě růžová, lesklá, vypouklá s hladkým okrajem, o průměru 1,5 mm. Obě tyto kolonie byly tvořeny tyčinkami. Při srovnání byly tyčinky kmene 18 kratší než tyčinky kmene 19. Kmeny byly podrobeny také OF testu a bylo tak zjištěno, že jsou schopny využít glukózu jak za přítomnosti kyslíku, tak bez jeho přítomnosti za současné tvorby plynu.

Výsledky biochemických testů jsou zaznamenány v Tab. 13:

Tab. 13. Výsledky biochemických testů kmenů izolovaných z EA

Původ	Kmeny	Biochemické testy				
		KOH	Gramovo b.	Tvar bu- něk	KAT	OXI
Sýřenina mozzarella	18	+	-	tyčinky	+	-
Finální mozzarella	19	+	-	tyčinky	+	-

EA se využívá pro kultivaci koliformních bakterií, které zahrnují rody *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* a druh *Escherichia coli* [30]. Koliformní bakterie jsou aerobní nebo fakultativně anaerobní, gramnegativní, nesporující tyčinky, katalázapozitivní, bez produkce cytochromoxidázy. Fermentují glukózu za vzniku kyseliny a plynu [59]. Podle výsledku testů by se dalo usuzovat, že kmeny náleží do skupiny koliformních bakterií. OF testem byla zjištěna utilizace glukózy fermentací i oxidací za tvorby plynu, což potvrzuje domněnku, že izolovaný kmeny náleží do skupiny koliformních mikroorganismů. Kmen 18 tvořil kolonii s kovovým leskem typickým pro *Escherichia coli*.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo stanovit mikrobiologickou kvalitu pařených sýrů v průběhu jejich výroby a skladování. Byl sledován celkový počet psychrotrofních a mezofilních mikroorganismů, koliformních bakterií, kvasinek a laktobacilů, mléčných streptokoků. Doplněním této práce byla charakteristika bakteriálních kmenů izolovaných ze sýřeniny, pařeniny a finálního výrobku.

Na základě stanovených výsledků byl sledován vliv pařicího procesu na sledované skupiny mikroorganismů. Rozbory pařené sýřeniny ukázaly, že teplota paření (75 – 90 °C) má jednoznačně inaktivační účinek na koliformní bakterie a kvasinky. Tato skutečnost byla potvrzena rozborem samotné pařicí vody, ve které přítomnost koliformních bakterií ani kvasinek nebyla prokázána. U mezofilních a psychrotrofních mikroorganismů nebyly v případě pařeniny pro výrobu mozzarely pozorovány významné změny. V případě pařeniny pro výrobu soleného sýra k významnému snížení celkového počtu u psychrotrofních mikroorganismů, a to o čtyři řády. U mezofilních mikroorganismů byl zaznamenán pokles o dva řády. Výsledné hodnoty celkových počtů sledovaných skupin bakterií jsou v případě mozzarely i soleného sýru srovnatelné. Významný pokles psychrotrofních a mezofilních mikroorganismů v pařenině pro výrobu soleného sýru byl zaznamenán díky jejich vyšším počtům v sýřenině před pařením. Účinek paření na laktobacily ani mléčné streptokoky nebyl prokázán u žádného z testovaných pařených sýrů.

Při izolaci a charakteristice kmenů bakterií z půd pro kultivaci laktobacilů a mléčných streptokoků bylo zjištěno, že v případě izolátů z půdy MRS by se mohlo jednat o laktobacily ve třech případech. Jeden z těchto kmenů byl izolován ze sýřeniny a dvě z pařeniny mozzarely. U kmenů izolovaných z půdy M17 by se o mléčné streptokoky mohlo jednat ve čtyřech případech. Jednalo se o dva kmény izolované ze zakoupené nízkotučné mozzarely, jeden kmen izolovaný z finální mozzarely a jeden kmen z pařeniny mozzarely.

Po srovnání mikroflóry finální mozzarely a pařeného soleného sýru bylo zjištěno, že celkový počet mezofilních mikroorganismů je u mozzarely nižší. Lze předpokládat, že je to zapříčiněno obsahem NaCl v soleném sýru, který některým mikroorganismům zabraňuje v růstu. Počet psychrotrofních mikroorganismů byl v soleném sýru o jeden řád vyšší. Surovina však vykazovala vyšší počty této skupiny mikroorganismů již během výroby. Celkové počty koliformních bakterií a kvasinek byly ve finální mozzarelle nulové s výjimkou jedné šarže, kdy pravděpodobně došlo k sekundární kontaminaci během balení. V soleném

sýru byly přítomny koliformní bakterie i kvasinky. Jejich přítomnost byla s největší pravděpodobností způsobena opět sekundární kontaminací. Tato kontaminace se u výroby pařeného sýru dá předpokládat, protože se ručně tvarují a riziko kontaminace je tak vysoké.

Při třítydenním skladování mozzarely byly zjištěny velmi vysoké nárůsty všech sledovaných skupin mikroorganismů. U sýru v solném nálevu nebyly tyto nárůsty tak vysoké ani po skladování po dobu tří měsíců. U soleného sýru je možné menší nárůsty předpokládat díky obsahu soli, který brzdí růst mikroorganismů. Solený sýr má také větší obsah sušiny a podmínky pro růst mikroorganismů nejsou tak vhodné jako u mozzarely.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [2] *Vyhláška 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje* [online]. [cit 2011 – 02 – 05]. Dostupný z WWW: http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_vyhlaska-2003-77-potraviny.html
- [2] BŘEZINA, P.; HRABĚ, J.; KOMÁR, A. *Technologie, zbožíznalství a hygiena potravin II. část*. Vyškov: Vysoká vojenská škola pozemního vojska 2001. 177 s.
- [3] GÖRNER, F.; VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin : princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [4] THE CULINARY INSTITUTE OF AMERICA. *Hors D'Oeuvre at Home with the Culinary Institute of America*. 1st ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2007. 214 p. ISBN 978-0-7645-9562-2.
- [5] TAMIME, A.Y. *Strucutre od Diary Products*. 1st ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2007. 288 p. ISBN 13: 978-1-4051-2975-6.
- [6] IBURG, A. *Lexokon sýrů*. 1. vyd. Čestlice: Rebo Productions CZ, 2004. 301 s. ISBN 80-7234-379-3.
- [7] EARLY, R. *The technology of diary products*. 2nd ed. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 466 p. ISBN 0-7514-0344-X.
- [8] BŘEZINA, P.; JELÍNEK, J. *Chemie a technologie mléka, II. část*. Vyd. 1. Praha: MON, 1990. 166 s. ISBN 8070800755.
- [9] CALLEC, CH. *Encyklopedie sýrů*. 1. vyd. Čestlice: Rebo Productions CZ, 2002. 256 s. ISBN 80-7234-225-8.
- [10] *NARIADENIE RADY (ES) č. 510/2006, ŽIADOSŤ O ZÁPIS: ČLÁNOK 5 A ČLÁNOK 17 (2), Slovenský oštiepok* [online]. [cit 2011 – 03 – 29]. Dostupný z WWW: http://www.upv.sk/swift_data/source/pdf/specifikacie_op_oz/slovensky_ostiepok.pdf

- [11] *NARIADENIE RADY (ES) č. 510/2006, ŽIADOSŤ O ZÁPIS: ČLÁNOK 5 A ČLÁNOK 17 (2), Slovenská parenica* [online]. [cit 2011 – 02 – 04]. Dostupný z WWW: http://eur_lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2007:249:0026:0030:CS:PD
- [12] *NARIADENIE RADY (ES) č. 510/2006, ŽIADOSŤ O ZÁPIS: ČLÁNOK 5 A ČLÁNOK 17 (2), Oravský korbáčik* [online]. [cit 2011 – 03 – 04]. Dostupný z WWW: http://www.indprop.gov.sk/swift_data/source/pdf/specifikacie_op_oz/oravsky_korbacik.pdf
- [13] GROSSMANN, M. *Mikrobiologie v hygieně: speciální část*. Vyd. 1. Vyškov: Vysoká vojenská škola pozemního vojska, 1999. 175 s. ISBN 80-7231-037-2.
- [14] FOX, P., F. *Cheese: General Aspects*. 3rd ed. London, UK: Academic Press, 2004. 640 p. ISBN 0-1226-3652-X.
- [15] KYZLINK, V. *Základy konzervace potravin*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1980. 516 s.
- [16] *Vyhláška 203/2003 Sb. ze dne 30. června 2003 v platném znění, o veterinárních požadavcích na mléko a mléčné výrobky* [online]. [cit 2011 – 02 – 05]. Dostupný z WWW: <http://www.sagit.cz/pages/sbirkatxt.asp?zdroj=sb03203&cd=76&typ=r>
- [17] BŘEZINA, P.; JELÍNEK, J. *Chemie a technologie mléka, I. část*. Vyd. 1. Praha: MON, 1990. 166 s. ISBN 8070800755.
- [18] *Mlékárenská technologie II* [online]. [cit 2011 – 02 – 05]. Dostupný z WWW: http://utbfiles.cepac.cz/modules/M0029_mlekarenska_technologie/distančni_text_I/modul.xml
- [19] ČSN 56 9609. *Pravidla správné hygienické a výrobní praxe - Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace*. Český normalizační institut, 2008. 40 p.
- [20] CROSSLEY, K., B. et al. *Staphylococci in Human Disease*. 2nd ed. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, 2010. 623 p. ISBN 978-1-4051-6332-3.
- [21] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008. 363 s. ISBN 978-80-200-1703-1.

- [22] ADAMS, M; MOSS, M. *Food microbiology*. 3rd ed. Cambridge, UK : RSC Publishing, 2008. 463 p. ISBN 978-0-85404-284-5.
- [23] DRDÁK, M. *Základy potravinářských technologií : spracovanie rastlinných a živočišných surovín. Cererálne a fermentačné technológie. Uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 1996. 495 s. ISBN 8096706411.
- [24] JANŠTOVÁ, B. *Hygiena a technologie mléka a mléčných výrobků, praktická cvičení I*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2009. 84 s. ISBN 978-80-7305-061-0.
- [25] JANŠTOVÁ, B. *Hygiena a technologie mléka a mléčných výrobků, praktická cvičení II*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2009. 65 s. ISBN 978-80-7305-060-3.
- [26] ČÍŽEK, A. *Praktika z veterinární bakteriologie a mykologie*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2006. 145 s.
- [27] VAŘEJKA, F.; MRÁZ, O; SMOLA, J. *Speciální veterinární mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: SZNP, 1987. 258 s. ISBN 80-209-0042-X.
- [28] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vyd. Praha: NEPTUN, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
- [29] KOLÁŘ, M. *Microbiology II*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2002. 84 s. ISBN 80-244-0503-2.
- [30] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [31] ZIMÁK, E. *Technologie pro 4. ročník SPŠ oboru zpracování mléka*. Vyd. 1. Praha: SNTL, 1988. 362 s.
- [32] *Nariadení komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu o mikrobiologických kritériích pro potraviny, v platném znění* [online]. [cit 2011 – 01 – 25]. Dostupný z WWW:http://eur_lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2005R2073:20060101:CS:PDF
- [33] *Mlékárenská technologie* [online]. [cit 2011 – 02 – 23]. Dostupný z WWW:<http://utb.cepac.cz/Screens/Explorer.aspx?id=32>

- [34] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin II*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. 236 s. ISBN 80-7080-510-2.
- [35] *Microorganisms in foods*. 2nd ed. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005. 763 s. ISBN 030648675X.
- [36] LOSADA, M. M. *El Análisis Sensorial de Los Quesos*. 1. pub. Madrid: Mundi – Prensa Libros, 2002. 235 p. ISBN 84-8476-025-1.
- [37] DOLEŽÁLEK, J. *Mikrobiologie mlékárenského a tukařského průmyslu*. Vyd. 1. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1962. 545 s.
- [38] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004 v platném znění, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu [online]. [cit 2011 – 02 – 05]. Dostupný z WWW: http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_vyhlaska-2003-77-potravin.htmlnařízení
- [39] *Potravinářská mikrobiologie III* [online]. [cit 2011 – 02 – 05]. Dostupný z WWW: <http://utb.cepac.cz/Screens/Explorer.aspx?id=7>
- [40] SUSSMAN, M. *Escherichia coli, Mechanisms of virulence*. 1st ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1997. 639 p. ISBN 0-521-45361-5.
- [41] FOX, P., F. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 2nd ed. Gaithersburg, USA: Aspen Publishers, 1999. 577 p. ISBN 0-8342-1339-7.
- [42] FOX, P., F et al. *Fundamentals of cheese science*. 2nd ed. Gaithersburg, USA: Aspen Publishers, 2000. 587 p. ISBN 0-8342-1260-9.
- [43] ROBINSON, R., K. *Diary microbiology handbook*. 3rd ed. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2002. 765 p. ISBN 0-471-38596-4.
- [44] MOZZI, F.; RAYA, R., R.; VIGNOLO, G., M. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. 1st ed. , Ames, USA: Blackwell Publishing Ltd, 2010. 393 p. ISBN 978-0-8138-1583-1.
- [45] PARES, R.; JUARÉZ, A. *Bioquímica de los microorganismos*. 1. pub. Barcelona: Editorial REVERTÉ, 1997. 404 p. ISBN 84-291-7454-0.
- [46] potravinářská mikrobiologie, cepac
- [47] HUTKINS, R., W. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. 1st ed., Ames, USA: Blackwell Publishing Ltd, 2006. 473 p. ISBN-13: 978-0-8138-0018-9.

- [48] HARVEY, R., A.; CHAMPE, P., C.; FISHER, B., D. *Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology*. 2nd ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. 432 p. ISBN-13: 978-0-7817-8215-9.
- [49] MENDEZ – VILAS, A. *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 2nd ed. Singapore: World Scientific, 2009. 771 p. ISBN-13: 978-981-283-754-7.
- [50] CHANDANM, R., C. *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*. 1st ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2006. 364 p. ISBN-13: 978-0-8138-2304-1.
- [51] GRASSAIN, V., H. *Nanoscience and Nanotechnology: Enviromental and Health Impacts*. 1st ed. USA: John Wiley & Sons, 2008. 469 p. ISBN: 978-0-470-08103-7.
- [52] QUINN, P., J.; CARTER, M., E.;MARKEY, B.; CARTER, G., R. *Clinical veterinary microbiology*. 1st ed. UK: Elsevier Helath Sciences, 1994. 648 p. ISBN: 0-7234-1711-3.
- [53] GARG, N.; GARG, K., L.;MUKERJI, K., G. *Laboratory Manual of Food Microbiology*. 1st ed. India: I. K. International Publishing House Pvt. Ltd, 2010. 208 p. ISBN: 978-93-80578-01-9.
- [54] ENGELKIRK, P., G.; DUBEN-ELGERKIRK, J. *Laboratory Diagnosis of Infectious Deseases, Essential of Diagnostic Microbiology*. 1st ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. 754 p. ISBN-13: 978-0-7817-9701-6.
- [55] ENGELKIRK, P., G.; DUBEN-ELGERKIRK, J. *Microbiology for the Analytical Chemists*. 1st ed. UK: Royal Society of Chemistry, 1996. 159 p. ISBN: 0-85404-524-4.
- [56] SINGLETON, P. *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine*. 6th ed. UK: John Wiley & Sons, 2004. 559 p. ISBN: 0-470-09027-8.
- [57] WIN, W et al. *Color Atlas of Medical Bacteriology*. 6th ed. Washington: AMS Press, 2004. 316 p. ISBN: 1-470-55581-206-6.
- [58] MAZA, L., M.; PEZZLO, M., T.; SHIGEI, J., T.; PETERSON, E., M. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. 1565 p. ISBN 13: 978-0-7817-3014-3.

- [59] DOWNES, F., P.; ITO, K. *Compendium od Methods for the Microbiological Examination of Food*. 4th ed. USA: American Pulic Health Association, 2001. 676 p. ISBN: 0-87553-175-x.
- [60] WILSON, M. *Bacteriology of Humans, An Ecological Perspective*. 1st ed. USA: Balckwell Publishing, 2008. 351 p. ISBN 13: 978-1-4051-6165-7.
- [61] McSWEENY, P.L.H., University of College Cork, Ireland. Odborná přednáška ze dne 29.4.2011, UTB Fakulta technologická.
- [I] *Obrázek* [online]. [cit 2011 – 04 – 05]. Dostupný z WWW: http://www.gransasso.cz/mozzarella_cz.htm
- [II] *Obrázek* [online]. [cit 2011 – 04 – 05]. Dostupný z WWW: <http://www.nadiafrigeri.com/articles/article5/article5.htm>
- [III] *Obrázek* [online]. [cit 2011 – 04 – 05]. Dostupný z WWW: <http://aktualne.centrum.sk/domov/zdravieskolstvospolocnost/clanek.phtml?id=1161299> parenica
- [IV] *Obrázek* [online]. [cit 2011 – 04 – 05]. Dostupný z WWW:http://peniaze.pravda.sk/sk_pspotrebitel.asp?c=A081006_174446_sk_psporteb_p01
- [V] *Obrázek* [online]. [cit 2011 – 04 – 05]. Dostupný z WWW: <http://www.ireceptar.cz/zajimavosti/tipy-na-vylet/orava-hafirovica-hrad-plte-korbaciky-termalni-koupani/>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

EA	Endo agar
GKCHA	GKCH agar ke stanovení počtu kvasinek a plísni
KTJ	kolonie tvořící jednotky
MRS	živná půda ke stanovení laktobacilů
MSA	mannitol salt agar
PCA	plate count agar
pH	aktivní kyselost
Popř.	po případě
Pozn.	poznámka
SH	stupně titrační kyselosti
Sb.	sbírky
Subsp.	subspecies
Tab.	tabulka
Tzv.	tak zvané
VRBA	violet red bile agar

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr.1. Ukázka sýru mozzarella.....</i>	<i>12</i>
<i>Obr.2. Ukázka sýrů provolone</i>	<i>13</i>
<i>Obr.3. Ukázka sýru oštiepok.....</i>	<i>14</i>
<i>Obr.4. Ukázka sýru parenica</i>	<i>15</i>
<i>Obr.5. Ukázka sýru korbáčik</i>	<i>16</i>
<i>Obr.6. Ukázka archu pro STREPTO test 16.....</i>	<i>37</i>
<i>Obr.7. Ukázka archu pro STAPHY test 16</i>	<i>38</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Požadavky na sýry vyrobené z tepelně ošetřeného mléka či tepelně ošetřené syrovátky (Nařízením komise č. 2073/2005 v planém znění)</i>	24
<i>Tab. 2. Požadavky na polotvrdé sýry (ČSN 56 9609)</i>	24
<i>Tab. 3. Porovnání průměrných hodnot celkového počtu sledovaných skupin mikroorganismů suroviny pro výrobu mozzarely před a po pařícím procesu</i>	38
<i>Tab. 4. Porovnání průměrných hodnot celkového počtu sledovaných skupin mikroorganismů suroviny pro výrobu pařeného soleného sýra před a po pařícím procesu</i>	39
<i>Tab. 5. Porovnání průměrných hodnot celkového počtu sledovaných skupin mikroorganismů suroviny pro výrobu mozzarely po pařícím procesu s finálním výrobkem</i>	40
<i>Tab. 6. Porovnání průměrných hodnot celkového počtu sledovaných skupin mikroorganismů suroviny pro výrobu pařeného soleného sýra po pařícím procesu s finálním výrobkem</i>	41
<i>Tab. 7. Porovnání průměrných hodnot celkového počtu sledovaných skupin mikroorganismů během skladování finálního výrobku mozzarely</i>	43
<i>Tab. 8. Porovnání průměrných hodnot celkového počtu sledovaných skupin mikroorganismů během skladování finálního výrobku pařeného soleného sýra</i>	44
<i>Tab. 9. Výsledky biochemických testů kmenů izolovaných z M17</i>	47
<i>Tab. 10. Porovnání biochemických vlastností <i>Kocuria varians</i> se <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> [30, 60]</i>	48
<i>Tab. 11. Výsledky biochemických testů kmenů izolovaných z MRS</i>	49
<i>Tab. 12. Výsledky biochemických testů kmenů izolovaných z MSA</i>	50
<i>Tab. 13. Výsledky biochemických testů kmenů izolovaných z EA</i>	51