

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Mikrobiologická kvalita sýrů Cottage

Bakalářská práce

Vedoucí práce: prof. Ing. Karel Voříšek, CSc.

Autor práce: Martin Wolf

2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma **Mikrobiologická kvalita sýrů Cottage** vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne:

Podpis

Poděkování:

Rád bych na tomto místě poděkoval svému vedoucímu bakalářské práce prof. Karlu Voříškovi z katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky za neocenitelné rady během její přípravy v průběhu školního roku. Můj velký dík patří rovněž mé matce Romaně Wolfové, která mi poskytla řadu odborných informací a materiálů z oblasti potravinářského průmyslu a mikrobiologického sledování kvality výroby. Během práce v laboratoři mi byla často nápomocna Ing. Eva Popelářová, které patří rovněž můj velký dík. Samotné téma práce je pak nápadem paní profesorky Vaňkové ze Střední průmyslové školy potravinářských technologií v Praze, která byla mojí obětavou vyučující během středoškolských studií.

V Praze dne:

Martin Wolf

SOUHRN

Bakalářská práce se zabývá mikrobiologií sýrů Cottage. V práci jsou shrnuty informace o sensorických vlastnostech sýru, jeho nutričních hodnotách, výrobě sýru a možných vad způsobených nežádoucími mikroorganismy. Dále jsou popsány požadavky na mikrobiologickou kvalitu sýrů Cottage a způsoby kontroly kvality. Těžištěm práce jsou mikrobiologické analýzy vybraných druhů sýrů Cottage, zakoupených v obchodní síti. Výsledky práce jsou shrnuty ve výsledcích a závěru.

Klíčová slova: sýr Cottage, mléko, kontaminace, bakterie mléčného kvašení, celkový počet mikroorganismů, enterokoky, koliformní bakterie, mikrobiologická kvalita

SUMMARY

The presented bachelor's work deals with the Cottage cheese microbiology. Information about sensory characteristics of the cheese, its nutritional values, cheese production and possible defects caused by microorganisms are collected. The quality requirements of Cottage cheese are also described. Microbiological analyses of selected Cottage cheese produced commercially were also the aim of this thesis. Our results are summarized in the chapter Results and Conclusions.

Keywords: Cottage cheese, milk, total count of microorganisms, contamination, lactic acid bacteria, enterococci, coliforms, microbiological quality

1	Úvod	7
2	Cíl práce.....	7
3	Literární přehled	8
3.1	Popis sýrů Cottage	8
3.1.1	Původ sýrů Cottage.....	8
3.1.2	Senzorické vlastnosti sýru Cottage.....	8
3.1.3	Nutriční vlastnosti sýrů Cottage	9
3.1.4	Druhy a výrobci v ČR.....	11
3.2	Technologický postup výroby sýrů Cottage.....	12
3.2.1	Suroviny pro výrobu sýru Cottage	12
3.2.2	Výroba sýru Cottage.....	12
3.2.3	Kontinuální výroba sýru Cottage (viz obrázek č. 2).....	13
3.2.4	Smetanový zákys – čistá mlékařská kultura	16
3.2.5	Studie HACCP.....	16
3.3	Vady sýru Cottage	17
3.3.1	Nejčastější příčiny vad u sýrů.....	17
3.3.2	Nejčastější vady sýrů Cottage.....	18
3.4	Požadavky na mikrobiologickou kvalitu mléka při výrobě sýrů Cottage	18
3.4.1	Zdroje kontaminace mléka	18
3.4.2	Mikrobiologické požadavky na sýry Cottage.....	19
3.5	Odběr vzorků sýrů Cottage.....	21
3.6	Mikrobiologická kontrola sýrů Cottage.....	21
3.6.1	Příprava vzorků	22
3.6.2	Ředění vzorků.....	22
3.6.3	Stanovení celkového počtu aerobních a fakultativně aerobních mikroorganismů 22	
3.6.4	Stanovení počtu bakterií čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	23
3.6.5	Stanovení počtu koliformních bakterií	23
3.6.6	Stanovení počtu enterokoků	24
3.6.7	Stanovení počtu kvasinek a plísní	25
3.6.8	Stanovení počtu bakterií mléčného kvašení	26
4	Metody stanovení a materiál.....	26

4.1	Příprava ředícího roztoku	26
4.2	Příprava kultivačních půd	26
4.2.1	Příprava kultivační půdy pro stanovení celkového počtu mikroorganismů	27
4.2.2	Příprava kultivační půdy pro stanovení bakterií mléčného kvašení	27
4.2.3	Příprava kultivační půdy pro stanovení koliformních bakterií	28
4.2.4	Příprava kultivační půdy pro stanovení enterokoků	28
4.3	Příprava analytického vzorku	29
4.4	Inokulace	30
4.4.1	Zalévání inokula živnou půdou	30
4.4.2	Roztěr inokula na povrch živné půdy	30
4.4.3	Inokulace na Petrifilmech	30
4.5	Inkubace	30
4.6	Počítání kolonií	31
4.6.1	Počítání kolonií na pevných půdách	31
4.6.2	Počítání kolonií na Petrifilmech	32
4.7	Test průkazu katalázy	32
4.8	Oxidázový test	32
4.9	Vyjádření výsledků	33
5	Výsledky	33
6	Diskuse	36
7	Závěr	39
8	Seznam literatury	40
8.1	Tištěné publikace	40
8.2	Legislativní předpisy	41
8.3	Elektronické zdroje	43

1 Úvod

Sýry jsou nezbytnou součástí zdravé výživy. Podle současných názorů na správnou výživu by dospělý člověk měl denně sníst 2 až 3 porce mléčných výrobků, mezi které patří jogurty, mléko, tvaroh a sýry (Štafen, 2011).

Sýry jsou zdrojem mnoha cenných látek, zejména bílkovin a dobře vstřebatelného vápníku. Bílkoviny obsahují veškeré esenciální aminokyseliny (leucin, izoleucin, lysin, metionin, fenyloalanin, treonin, tryptofan a valin), které jsou nezbytné pro život a ovlivňují některé fyziologické pochody v těle. Mají např. protistrážlivé a antibakteriální účinky, podporují obranyschopnost a příznivě ovlivňují krevní tlak. Vápník je nezbytný pro tvorbu kostí, zubů a má zásadní funkci v nervovém systému.

Důležitá je i přirozená přítomnost fosforu v sýrech, který je rovněž důležitý pro stavbu kostí a zubů. Fosfor se navíc v mléce a mléčných výrobcích vyskytuje v optimálním poměru vůči vápníku. (Štafen, 2011). Sýry dále obsahují různé vitamíny a výživově významné stopové prvky. Sýry Cottage mají navíc oproti jiným sýrům nízký obsah tuku, proto jsou vhodné při redukční dietě, pro sportovce a pro všechny, kdo chtějí udržovat zdravý životní styl.

Na druhou stranu jsou však sýry, včetně sýrů Cottage, vzhledem ke svému složení dobrým živným prostředím pro mikroorganismy, které mohou způsobit jejich kažení nebo zdravotní potíže spotřebitelům. Zdrojem mikrobiologické kontaminace sýru Cottage může být výchozí surovina, kterou je syrové kravské mléko. Ke kontaminaci mikroorganismy může rovněž dojít během výroby sýrů, pokud nejsou dodrženy zásady správné výrobní praxe, správné hygienické praxe a HACCP.

Výrobci mají samozřejmě povinnost zaručit, že jejich výrobky jsou zdravotně nezávadné. Problematikou zdravotní nezávadnosti z pohledu mikrobiologie se zabývá tato práce.

2 Cíl práce

Cílem práce je získat literární údaje o kvalitě sýrů Cottage a metodách jejich hodnocení. Získané poznatky využít pro hodnocení mikrobiologické kvality sýrů Cottage získaných v maloobchodní síti v různém období jejich použitelnosti. Práce je založena na hypotéze, že v průběhu skladování se mění mikrobiologická kvalita těchto sýrů.

3 Literární přehled

3.1 Popis sýrů Cottage

Sýr Cottage patří mezi čerstvé nezrající sýry, které jsou určeny k rychlé spotřebě. Vyhláška č. 77/2003 definuje čerstvý sýr jako nezrající sýr tepelně neošetřený po prokysání.

Zrání těchto sýrů je ukončeno mléčným prokysáním sýřeniny. U čerstvých nezrajících sýrů nenastávají žádné podstatné změny bílkovin, dochází pouze k mléčnému kvašení. Lahodnou a smetanovou chuť dodávají těmto sýrům bakterie smetanového zákysu (Doležálek, 1962).

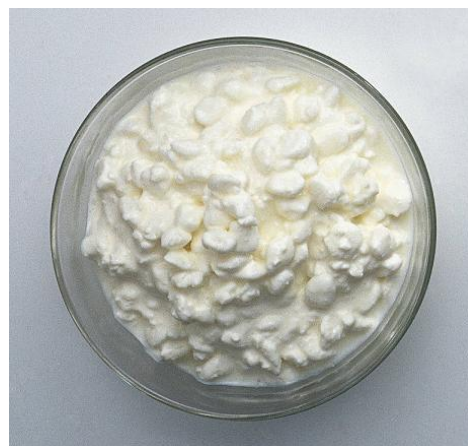
3.1.1 Původ sýrů Cottage

Kolébkou sýru s názvem Cottage cheese je Anglie, kde se sýr začal v 17. století vyrábět na venkovských farmách. Postupem času se rozšířil i do venkovských chalup, odkud pochází jeho název (Rajo). Cottage totiž původně znamená chalupa.

Robinson (1995) uvádí, že popularita tohoto sýru stoupla hlavně díky snaze zemědělců využít odstředěné mléko po oddělení smetany. Odstředěného mléka měli farmáři přebytek, a proto z něj začali vyrábět nízkotučný sýr, který je vhodný při držení mnoha redukčních diet. To je hlavní důvod, proč stoupla popularita sýrů Cottage zejména u spotřebitelů, kteří dbají o svoji linii, a sportovců. Pravděpodobně je to i důvod, proč podle studie Drake et al. (2009) klesla spotřeba tučných sýrů Cottage o 17 % a začala narůstat spotřeba nízkotučných sýrů.

3.1.2 Senzorické vlastnosti sýru Cottage

Hotový sýr by měl mít zářivě bílý vzhled (jako na obrázku č. 1), a to i když jsou malá sýrová zrnka maskována smetanou. Sýr má hrudkovitou konzistenci. Zrnka by měla být markantní v ústech tak, aby sýr měl trochu „žvýkáčí“ texturu. Sýr má nevýraznou, jemně mléčnou nakyslou chuť (Schmidová, 2007). Aroma sýrů je pak závislé na způsobu zvoleného postupu výroby sýrů (Guneser et al., 2011). Chuť se může upravit a vylepšit



Obrázek 1: Sýr Cottage (Miller, 2008)

přidáním různých příměsí, jako jsou bylinky, zelenina nebo ovoce. Protože se jedná o čerstvý sýr, je určen k rychlé spotřebě. Minimální trvanlivost se pohybuje od 14 do 28 dnů, a to podle druhu sýrů a podle výrobce. Výrobce Rajo, a.s. uvádí, že minimální trvanlivost je 28 dní (www.cottagecheese.sk). V průběhu doby trvanlivosti se mění konzistence sýrů Cottage. Na počátku doby trvanlivosti je sýr řidší a sýrová zrnka plavou ve smetaně. Na konci doby

trvanlivosti je sýr hustý, neboť přímo v kelímku došlo k prokysání smetany, a to díky nepřítomnosti stabilizátorů. (www.madeta.cz).

3.1.3 Nutriční vlastnosti sýrů Cottage

Sýry Cottage patří mezi nízkotučné sýry, neboť obsah tuku v sušině je menší než 25 %. (Vyhláška č. 77/2003 Sb.) V porovnání s ostatními sýry má sýr Cottage nízkou energetickou hodnotu a nízký obsah tuku. Obsahují vysoký obsah vápníku, minerálních látek, vitamínů a lehce stravitelných bílkovin.

Z výživového hlediska je významný rovněž vysoký podíl živých mléčných bakterií v sýrech Cottage (www.madeta.cz). Ferenčík a kol. (2000) tvrdí, že bakterie mléčného kvašení vykazují zdravotně prospěšné neboli probiotické účinky. Probiotické účinky jsou charakterizovány zlepšením zdraví konzumentů působením pozitivních vlastností mikroorganismů v ústní dutině, střevech a stejně tak v dýchací a urogenitální soustavě (Chumchalová, 2003). K těmto pozitivním změnám dochází při konzumaci výrobků, např. sýrů Cottage, ve kterých jsou přítomny živé bakterie mléčného kvašení. Ferenčík a kol. (2000) uvádí, že mezi hlavní probiotické účinky patří:

- schopnost metabolizovat laktózu a upravovat průjemové stavy,
- inhibovat mutagenní účinky střevního obsahu,
- snižovat hladinu cholesterolu,
- zvyšovat obranyschopnost organismu.

Jednou z možností, jak zvýšit nutriční hodnotu sýrů Cottage (Obando et al., 2012) je jejich obohacení probiotickými mikroorganismy (např.: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* BB12), které přispívají k optimalizaci mikrobioty trávicího traktu. Sensorické vlastnosti takto upravených sýrů nedoznávají žádné změny.

Podobně i Araujo et al. (2010) za stejným účelem obohacoval sýr Cottage bakterií *Lactobacillus delbrueckii* a inulinem, což se rovněž nepromítlo ve fyzikálně-chemických vlastnostech sýrů.

Kromě probiotických účinků, bakterie mléčného kvašení zvyšují bezpečnost potravin působením antimikrobiálních látek, které produkují. Pomáhají významně snížit riziko růstu a přežívání patogenních mikroorganismů a mikroorganismů způsobujících kažení potravin (Chumchalová, 2003). Bakterie mléčného kvašení produkují tři základní skupiny antimikrobiálních látek. Mezi tyto antimikrobiální látky patří:

- organické kyseliny např. kyseliny mléčná, octová, propionová, benzoová
- ostatní nízkomolekulární látky např. peroxid vodíku, diacetyl a acetaldehyd
- bakteriociny, tj. bílkoviny kolicinového typu.

Lücke a Earnshaw (1991) tvrdí, že všechny tyto látky působí samostatně nebo mohou působit ve vzájemné kombinaci.

Ke zvýšení bezpečnosti sýru Cottage se může používat podle studie McAuliffe et al. (1999) *Lactococcus lactis* DCP 4275 produkující lakticin. Tento transkonjugant je účinný při potlačování růstu bakterií *Listeria monocytogenes* v sýru Cottage, kdy po jednom týdnu dochází ke snížení původní dávky 10^4 KTJ/g o tři řády.

Většina výrobců potravin uvádí na obalech průměrné nutriční hodnoty na 100 g výrobku, někteří i doporučená denní množství. GDA (Guideline Daily Amount = doporučené denní množství).

GDA jsou doporučená denní množství energie, bílkovin, sacharidů, cukrů, tuků, nasycených mastných kyselin, vlákniny a sodíku, která představují optimální složení každodenního vyváženého jídelníčku zdravého jedince. Požadavky na výživu se však mění v závislosti na věku, hmotnosti, pohlaví a úrovni fyzické aktivity. Proto tato doporučená denní množství představují orientační hodnoty, které byly stanoveny pro zdravého člověka s průměrnou hmotností a průměrnou fyzickou aktivitou (Potravinářská komora ČR).

Průměrné nutriční hodnoty, které výrobce Madeta a.s. uvádí na obale sýru Báječně český Cottage přírodní jsou v tabulce 1.

Tabulka 1: Průměrné nutriční hodnoty sýru Cottage (Madeta a.s.)

	Nutriční hodnoty na 100 g	GDA na 100 g	GDA na porci (200 g)
Energie	437 kJ/104 kcal	5,2 %	10,4 %
Bílkoviny	11,5 g	23 %	46 %
Sacharidy	3,3 g	1,2 %	2,4 %
- z toho cukry	3,3 g	3,6 %	7,2 %
Tuk	5,0 g	7,1 %	14,2 %
- z toho nasycené mastné kyseliny	3,3 g	16,5 %	33 %
Vláknina	< 0,1 g	0 %	0 %
Sodík	0,24 g	10 %	20 %

Z nutriční tabulky vyplývá, že sýr Cottage je bohatý na bílkoviny, ale obsahuje vyšší množství sodíku a zanedbatelné množství vlákniny.

Průměrné hodnoty obsahu vápníku a fosforu jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka 2: Průměrné hodnoty vápníku a fosforu pro čerstvý nezrající sýr (Drbohlav, 2001)

	Na 100 g	DDD*	% DDD*
Vápník	173 mg	800 mg	22 %
Fosfor	175 mg	800 mg	22 %

*DDD = Doporučená denní dávka představuje vědecky stanovené referenční hodnoty, které určují množství různých vitamínů a minerálních látek potřebných pro udržení dobrého zdravotního stavu (Potravinářská komora ČR).

Sýr Cottage obsahuje 2,2 g laktózy neboli mléčného cukru ve 100 g výrobku (Pocedičová, 2011). Nepatří proto mezi potraviny s nízkým obsahem laktózy na rozdíl od zrajících sýrů, které mají obsah laktózy téměř nulový. Z těchto důvodů není sýr vhodný pro osoby trpící laktózovou intolerancí, tj. poruchou příjmu laktózy.

3.1.4 Druhy a výrobci v ČR

V České republice je v současné době pouze jediný průmyslový výrobce, a to firma Madeta, a.s. Ze Slovenské republiky je distribuovaný do našich obchodů sýr značky Rajo a Meggle.

Na českém trhu jsou dostupné následující druhy sýrů Cottage od výrobců Madeta a Rajo.

- Cottage cheese bílý
- Cottage cheese s pažitkou
- Cottage cheese se šunkou
- Cottage cheese chilli
- Cottage cheese s olivou a paprikou
- Cottage cheese s hořčicí a cibulí
- Cottage cheese s jahodami
- Cottage cheese s borůvkami
- Cottage cheese se zeleninou

Sýry se prodávají v plastových kelímcích, aby nevytékala uvolněná syrovátka, popř. přidaná smetana.

3.2 Technologický postup výroby sýrů Cottage

3.2.1 Suroviny pro výrobu sýru Cottage

K výrobě sýru Cottage se používají následující suroviny: odstředěné mléko, smetana, jodidovaná jedlá sůl, popř. další přísady jako jsou bylinky, zelenina nebo ovoce. Všechny použité suroviny musí být zdravotně nezávadné.

3.2.2 Výroba sýru Cottage

Bylund (1995) popisuje tři různé způsoby výroby sýru Cottage, které se liší zejména dobou sýření a teplotou použitého pasterizovaného mléka.

- Dlouhodobá metoda
- Střednědobá metoda
- Krátkodobá metoda

Základní rozdíly mezi třemi způsoby výroby jsou uvedeny v tabulce č. 3

Tabulka 3: Data pro různé způsoby výroby (Bylund, 1995)

	Dlouhodobá	Střednědobá	Krátkodobá
Doba sýření	14 – 16 hodin	8 hodin	5 hodin
Teplota pasterizovaného mléka po ochlazení	22°C	26,5°C	32°C
Přídavek startéru – čisté mlékařské kultury	0,5 %	3 %	5 %
Syřidlo o síle 1:10 000	2 ppm	2 ppm	2 ppm

Z tabulky vyplývá, že teplota pasterizovaného mléka po ochlazení se pohybuje dle zvolené metody od 22 do 32 °C. K pasterizovanému mléku se přidává mikrobiologicky nezávadný mléčnan nebo chlorid vápenatý, aby se dosáhlo správné sýřitelnosti mléka. K pasterovanému mléku je rovněž třeba přidat před zasýřením potřebné množství čisté mlékařské kultury, která zajistí správný průběh kysání mléka a sýřeniny. Jako základní čistá kultura se při výrobě sýru Cottage používá smetanový zákys. Odměřená dávka čisté mlékařské kultury se s mlékem dobře promíchá tak, aby byly mikroorganismy dobře rozloženy v celém obsahu. Doležálek (1962) upozorňuje, že mléko má mít před zasýřením určitou kyselost, která ovlivňuje celý charakter sýřeniny. Nejvhodnější kyselost mléka je při hodnotě pH 6,2, tj. asi 8 – 8,6 °SH.

Při dlouhodobém způsobu výroby se používá nízká hladina mezofilní startovací kultury. Robinson (1995) doporučuje používat dlouhodobou metodu, aby srážení mléka probíhalo přes noc (14-16 hodin).

Bylund (1995) uvádí, že bez ohledu na zvolenou metodu se vzniklá sýřenina nechá po nakrájení 15 až 35 minut v klidu. Jakmile je sraženina pevná a hodnota pH poklesne na 4,5 - 4, nakrájí se na kousky. Výrobce volí velikost kousků (malé, střední, velké) dle poptávky na trhu. Někteří zákazníci upřednostňují sýr Cottage s malými hrudkami, jiní spotřebitelé očekávají velké hrudky. Po odležení, kdy povrch kousků sýřeniny mírně ztuhne, se zvýší teplota v tanku na 50-54 °C po dobu 2 hodin. Na vliv teploty ve své práci upozorňuje i Hahn et al. (2012) – rychlé snížení teploty redukuje agregaci. Při zahřívání se používá mírné míchání, aby sýřenina zůstala v podobě samostatných zrn. Poté následuje promývání sýřeniny, která se postupně promyje postupně třemi dávkami vody o teplotě 30, 16 a 4 °C. Celková doba promytí, včetně vypouštění vody meziproductů syrovátky, trvá asi 3 hodiny (Bylund,1995).

Po vypuštění vody se přidá pasterovaná smetana ochlazená na 4 °C. Smetana obsahuje malé množství soli. Smetana se důkladně zamíchá dovnitř tvarohu. Nakonec se sýr balí do kelímků. Před distribucí do maloobchodů je skladován při teplotě 4-5 °C.

Sýr Cottage může být vyráběn v jediném výrobním tanku. Byly však vyvinuty speciální systémy, které umožňují, aby výroba byla kontinuální.

3.2.3 Kontinuální výroba sýru Cottage (viz obrázek č. 2)

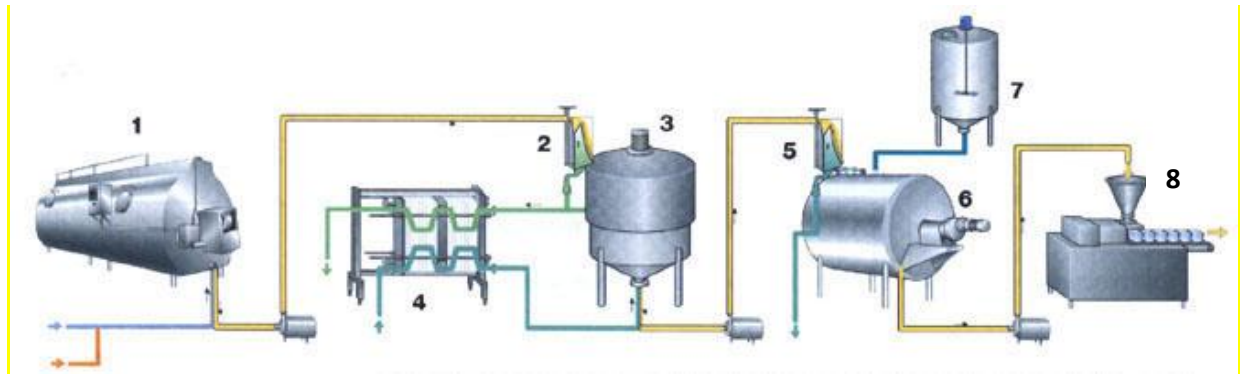
Sýřenina se vyrábí v uzavřeném tanku (1), který slouží mimo jiné k ochraně mléka před vzdušnou infekcí během dlouhé (16-20 hodin) nebo relativně krátké (5 hodin) doby srážení. Směs syrovátky a sýřeniny se čerpá přes statický filtr (2) do chladicího a promývacího tanku (3). Zatímco syrovátka je scezována do sběrného zásobníku, sýřenina padá do nádrže chladicího a promývacího tanku, který obsahuje určité množství čerstvé vody. Ještě předtím, než se všechna sýřenina z tanku (1) přepustí do chladicího tanku, je čerstvá voda načerpána příivodem ze spodu do tanku. V určité výši nádrže je ventil pro přepad přebytečné vody, která prošla pracím tankem. Při přebytku uvolněné kapaliny ze syrovátky, je přítok vody zastaven a voda cirkuluje přes deskový výměník tepla (4), kde se teplota postupně snižuje na 3 – 4 °C. Celý chladicí a promývací proces trvá asi 30 – 60 minut. Plnění a vyprazdňování chladicího a promývacího tanku není do této doby zahrnuto.

Po umytí a chlazení je tvaroh čerpán přes scezovací zařízení (5) do míchačky (6), kde se hotový sýr smíchá se smetanou popřípadě s dalšími komponenty. Míchání se musí provádět

šetrně. Smíchaný sýr se balí do plastových kelímků s připravenými hliníkovými víčky (Bylund, 1995).

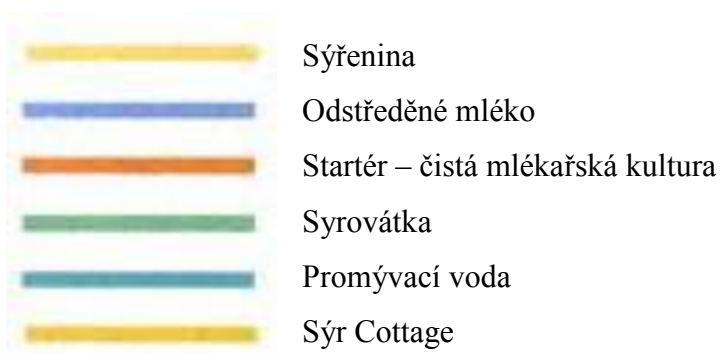
Výrobek je balen v ochranné atmosféře. Skladování při teplotě: 4-8 °C.

Princip fungování kontinuální linky výroby sýrů je zobrazeno na obr. č. 2 (Bylund, 1995).



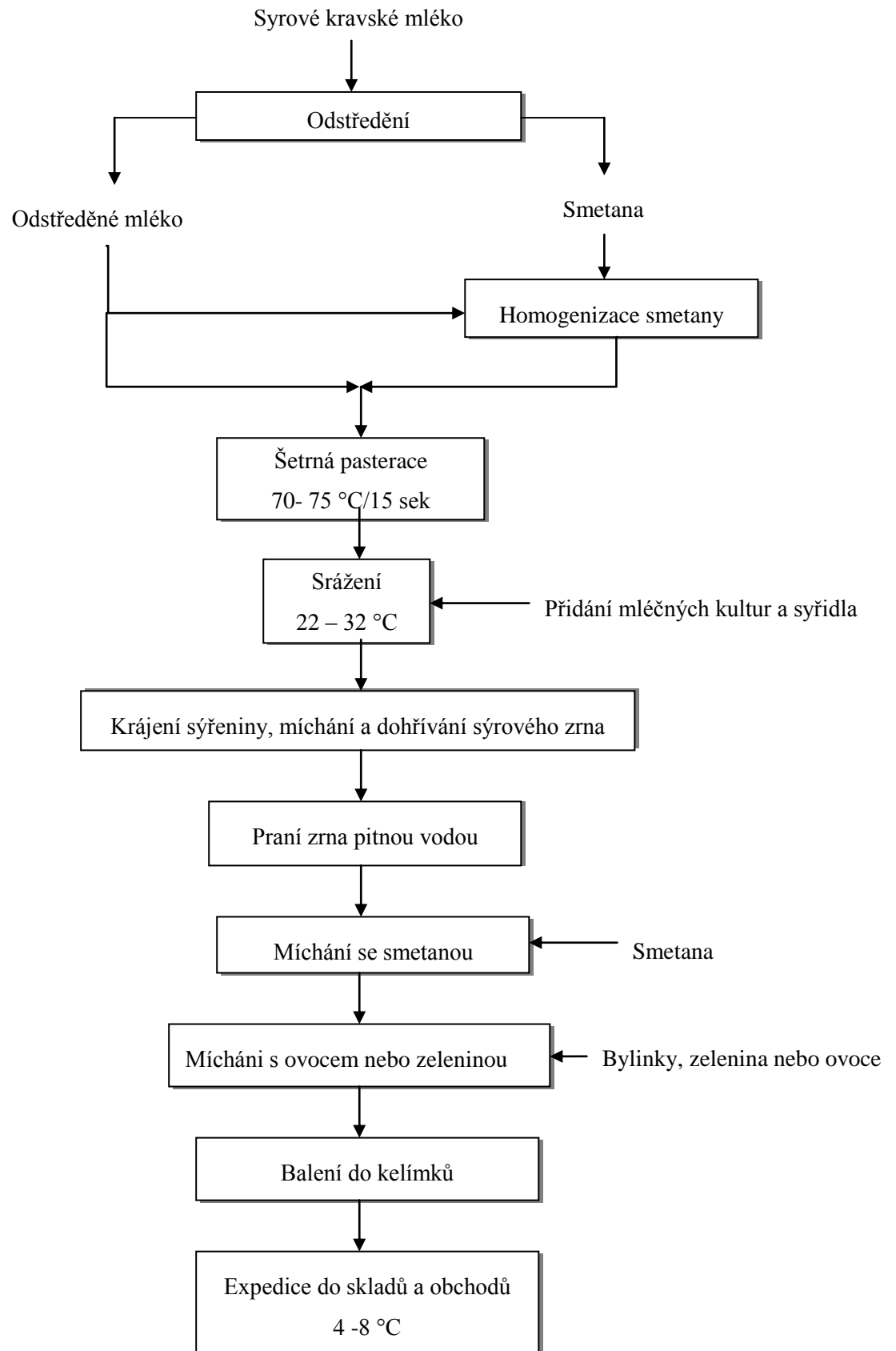
Obrázek 2: Schéma průmyslové výroby sýrů Cottage (Bylund 1995)

- 1 Tank na srážení
- 2 Filtr - scezovací zařízení syrovátky
- 3 Chladicí a promývací tank
- 4 Deskový výměník tepla
- 5 Odkapávač vody
- 6 Míchačka
- 7 Zásobník smetany
- 8 Plnicí zařízení



Princip výroby sýru Cottage je znázorněn ve vývojovém diagramu.

Vývojový diagram výroby sýru Cottage.



3.2.4 Smetanový zákys – čistá mlékařská kultura

Smetanový zákys neboli máslařská kultura patří mezi nejznámější mlékařské kultury. Používá se nejen při výrobě sýrů Cottage, ale i při výrobě dalších sýrů, másla, podmáslí a zákysů. Je to mezofilní směsná kultura, jejíž hlavní složku mikroflóry tvoří bakterie *Streptococcus lactis* a *Streptococcus cremoris* a aromatické mikroorganismy *Leuconostoc cremoris* a *Leuconostoc dextranicum*. Poměr kyselinotvorných bakterií k aromatickým by měl být v dobré mlékařské kultuře přibližně 9:1 (Doležalek, 1962).

Streptococcus lactis v mléce tvoří pravotočivou kyselinu mléčnou v množství až 0,70 – 0,85 %. Kromě kyseliny mléčné vytváří rovněž antibiotikum nisin, který se používá v mlékárenském průmyslu k potlačení klostridií (Šilhánková, 1983).

Streptococcus cremoris v mléce tvoří rovněž pravotočivou kyselinu mléčnou, a to v množství 0,70 %. Kromě kyseliny mléčné produkuje diacetyl ($\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{CO} - \text{CH}_3$), který vytváří příjemné máslové aroma (Šilhánková, 1983).

Leuconostoc cremoris dříve nazývaný *Leuconostoc citrovorum* a *Leuconostoc dextranicum* tvoří v máslařské kultuře za přítomnosti kyseliny citrónové a laktózy acetoin a diacetyl. V malé míře tvoří levotočivou kyselinu mléčnou a značné množství těkavých látek (Doležalek, 1962).

3.2.5 Studie HACCP

Výrobci potravin jsou povinni dle Vyhlášky 196/2002 vypracovat studii HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Points), tj. provést analýzu nebezpečí pro stanovení kritických regulačních a kontrolních bodů. Jedná se o systém komplexních preventivních opatření, pomocí kterých se řídí a ovládá výroba tak, aby na trh byly uvedeny jen zdravotně nezávadné potraviny. Analýza HACCP neznamena systém kontroly kvality, ale součást řízení vedoucího k zabránění chybám (Suková, 1997). HACCP společně s postupy správné hygienické praxe (GHP – Good Hygienic Praxis) a správné výrobní praxe (GMP – Good Manufacturing Praxis) tvoří základní prvky řízení a zabezpečení kvality a zdravotní nezávadnosti potravin. Kritický regulační a kontrolní bod (CCP – Critical Control Point) je dle definice uvedené ve Vyhlášce 147/1998 technologický úsek, jímž je postup nebo operace výrobního procesu nebo procesu uvádění potravin do oběhu, ve kterých je největší riziko porušení zdravotní nezávadnosti potravin a v nichž se uplatňuje ovládání různých druhů nebezpečí ohrožujících nezávadnost potravin s cílem zamezit, vyloučit, popřípadě zmenšit tato nebezpečí. Jedná se o bod, který má rozhodující vliv na řízený proces výroby z hlediska ochrany zdraví.

Z vývojového diagramu výroby sýrů Cottage je patrné, že kritickým kontrolním bodem je pasterace mléka.

Pasterace je jednorázové zahřívání na teplotu do 100 °C. Při pasteraci dochází k usmrcení všech nesporulujících patogenních mikroorganismů a mikroorganismů, které zkracují trvanlivost dané potraviny (Šilhánková, 1983). Vyhláška č.77/2003 definuje pasteraci jako tepelné ošetření mléka a mléčných výrobků zahřátím mléka na teplotu nejméně 71,7 °C po dobu 15 sekund nebo jinou kombinací času a teploty za účelem dosažení rovnocenného účinku. Tento typ pasterace je označován jako šetrná pasterace. Při pasteraci dojde ke zničení patogenních a technologicky škodlivých mikroorganismů. Sporující mikroorganismy však mohou pasteraci přežít. *Bacillus anthracis* je jediný patogenní mikroorganismus, který je schopen přežít pasteraci (Doležálek, 1962). Výskyt tohoto mikroorganismu v mléce je však velmi ojedinělý.

Účinnost pasterace se vykazuje pomocí pasteračního efektu, který je závislý na způsobu pasterace. Pasterační efekt udává procento zničených mikroorganismů a vykazuje až 99,9 %. Pasterací se bohužel zničí kromě nežádoucích mikroorganismů i ty užitečné, které jsou potřebné pro biochemické procesy, na nichž je výroba většiny mlékárenských produktů založena (Doležálek, 1962). Z tohoto důvodu se u mléka používá šetrná pasterace, při které ještě přežívají bakterie mléčného kvašení (Šilhánková, 1983).

Sledování teploty pasterace jako CCP je nezbytné při výrobě sýru Cottage, ale i ostatních mléčných výrobků. Pokud není při pasteraci dosaženo stanovené teploty, tj. nejméně 71,7 °C po dobu nejméně 15 sekund, musí se učinit nápravná opatření. Mléko se musí přepracovat a celý proces pasterace zopakovat.

3.3 Vady sýru Cottage

3.3.1 Nejčastější příčiny vad u sýrů

Příčiny vady čerstvých nezrajících sýrů, mezi které patří i sýr Cottage jsou různého charakteru. Kopáček (2011) je rozděluje do pěti skupin:

- Nevhodná nebo i méně vhodná jakost mléka určeného k sýření (k výrobě sýrů je za potřebí vždy mléko nejvyšší jakosti)
- Nedodržování nebo používání nesprávného technologického procesu
- Nevhodné teplotní a vlhkostní poměry v průběhu zrání sýrů
- Mikrobiální a jiná kontaminace

- A jiné příčiny – zde je možné uvést např. nedostatečně ostré nože sýrařských harf, které mohou zapříčinit nesprávné krájení sýřeniny na kotli, popř. i větší unik sýrového prachu do syrovátky, a řadu dalších.

3.3.2 Nejčastější vady sýrů Cottage

Nejčastější vady čerstvých sýrů včetně sýrů Cottage jsou (Kopáček, 2011):

- **Nedostatečné prokysání** – může být způsobeno špatnou smetanovou kulturou nebo nevhodnou mikrobiologickou jakostí mléka nebo nízkou teplotou v sýrárně.
- **Drobivé těsto** – bývá způsobeno při silném prokysání sýřeniny, pokud je teplota sýrárny vyšší než 20 °C. Teplota by se měla pohybovat od 18 do 20 °C.
- **Netypická chuť** (např. kvasinková nebo zatuchlá chuť) – Způsobuje ji přítomnost nežádoucích kvasinek nebo plísní, které se do sýrů mohou dostat při použití nečistého zařízení, špatnou pasterací mléka, syřidlem nebo v nevyhovující špinavé místnosti.
- **Nadouvání sýrů** – Bývá způsobeno přítomností kvasinek nebo bakteriemi skupiny *coli-aerogenes*.
- **Prázdňá chuť** – Je způsobena nedostatečnou kyselostí nebo nízkým obsahem aromatických látek kvůli nízké vitalitě použitého zákysu. Při vyšší teplotě v sýrárně se aromatické látky rozkládají a tím vzniká prázdňá chuť.

3.4 Požadavky na mikrobiologickou kvalitu mléka při výrobě sýrů Cottage

Kvalitu sýrů nejvíce ovlivňuje kvalita použitého mléka jako základní suroviny. Mléko musí být od zdravých dojnic. V žádném případě není možno používat mléko od dojnic se zánětem vemene způsobeným *Escherichia coli* nebo *Aerobacter aerogenes*. Rovněž mléko od dojnic, které jsou léčeny antibiotiky, je nežádoucí. Při výrobě sýrů je důležité, aby čerstvé mléko obsahovalo co nejmenší celkový počet mikroorganismů a pokud možno žádné organismy rodů *Escherichia*, *Aerobacter*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Listeria* či *Clostridium* (Doležálek, 1962).

3.4.1 Zdroje kontaminace mléka

Mikroorganismy se dostávají do mléka různými způsoby. Jičínská a Havlová (1995) zjistily, že mléko může být kontaminováno přímo ze vzduchu, ale častěji bývá mléko kontaminováno při dojení ze znečištěných vemen řetězcem postupných kontaminací.

Půda → krmivo → zažívací trakt → hnůj → vemeno → dojení (dojící aparáty, ruce) → mléko

Havlová a kol. (1993) popisují rovněž postpasterizační kontaminace, kdy mléko může být po pasterizaci kontaminováno:

- spóry ze syrového mléka, které prošly pasterizací
- z prostředí závodu – stykem s nedostatečně očištěnými povrchy zařízení
- z vnějšího prostředí – z obalového materiálu
- z ovzduší – v důsledku netěsnosti uzávěrů nebo obalů

3.4.2 Mikrobiologické požadavky na sýry Cottage

Legislativní mikrobiologické požadavky na potraviny jsou uvedeny v Nařízení komise (ES) č. 1441/2007. Dle tohoto nařízení musí výrobce dodržet následující požadavky, aby potravina byla bezpečná:

- Na konci výrobního procesu sýrů Cottage je nutno provést analýzu cílenou ke stanovení koagulázopozitivních stafylokoků. Pokud jsou zjištěny hodnoty vyšší než 10^5 KTJ/g, musí být příslušná výrobní šarže sýru vyšetřena na přítomnost stafylokokových enterotoxinů.
- Stafylokokové enterotoxiny nesmí být prokázány v pěti vzorcích po 25 g. Toto stanovení se provádí podle evropské screeningové metody referenční laboratoře Společenství pro koagulázopozitivní stafylokoky.
- Sýry Cottage musí vyhovovat kritérium pro potraviny určené k přímé spotřebě, které podporují růst bakterie *Listeria monocytogenes*. Jedná se o potraviny jiné než určené pro kojence a pro zvláštní léčebné účely.

Do této skupiny jsou sýry Cottage zařazeny, neboť jejich prostředí umožňuje listeriím se snadno pomnožovat. Jičínská a Havlová (1995) uvádí, že sýry jsou nejčastějším důvodem při onemocnění listeriózou. V sýrech mohou listerie přežívat a pomnožovat se po celou dobu minimální trvanlivosti. Přežití a pomnožení je však závislé na kmenu bakterie *Listeria monocytogenes*, neboť pouze některé kmeny se mohou v sýrech pomnožovat. Dále je výskyt listerií v sýrech závislý na technologickém postupu, způsobu skladování, konečném pH sýru a na aktivitě zákysových kultur.

Limity pro sýry včetně sýrů Cottage potraviny jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Tabulka 4: Kriteria bezpečnosti potravin (Nařízení komise (ES) č. 1441/2207 ze dne 5. prosince 2007)

Mikroorganismy /jejich toxiny	Plán odběru vzorku		Limity		Analytická referenční metoda
	n	c	m	M	
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 KTJ/g		EN ISO 11290-2
	5	0	Nepřítomnost ve 25 g		EN ISO 11290-1
Stafylokokové enterotoxiny	5	0	Neprokázány ve 25 g		Evropská screeningová metoda

kde parametry n, c, m a M jsou:

n – rozsah výběru, tj. počet vzorků předepsaný k vyšetření, jehož účelem je rozhodnout zda kontrolovaná dávka bude posouzena jako vyhovující nebo nevyhovující mikrobiologickým požadavkům. V přijímacích postupech jednotlivých poživatin je n obvykle 5 pro mikrobiologicky méně rizikové poživatiny a 10 pro výrobky hygienicky rizikové.

m – nejvyšší množství mikroorganismů posuzovaného znaku, které se ještě připouští, avšak pouze u počtu vzorků, který je rovný nebo nižší než n.

M - nejvyšší počet mikroorganismů posuzovaného znaku, které se ještě připouští, avšak pouze u počtu vzorků, který je rovný nebo nižší než c.

c – rozhodné číslo – počet vzorků z výběru n, u nichž se připouští nejvýše hodnota M.

Jako nevyhovující se hodnotí každá kontrolovaná šarže, která nesplňuje výše uvedené limity. Pokud je kontrolovaná dávka nebo její část posouzena jako nevyhovující nesmí být uvedena na trh. Nevyhovující šarže musí být přepracována nebo musí být vydán příkaz k její likvidaci.

Kontrola je založena na stanovení n náhodně odebraných vzorků. Vzniká tak riziko, že podle výsledku analýzy n vzorku může být kontrolovaná šarže posouzena jako nevyhovující, zatímco šarže jako celek může být vyhovující. Naopak sledovaná šarže může být posouzena jako vyhovující, zatímco je jako celek nevyhovující. Druhý případ se vyskytuje častěji a představuje větší hygienické riziko. Čím nižší je zastoupení nevyhovujících jednotek v kontrolované dávce, tím je větší pravděpodobnost, že ve výběru n nebudou obsaženy

a zjištěny. Se vzrůstajícím n a klesajícím c vzrůstá účinnost kontroly (Jičínská a Havlová, 1998).

3.5 Odběr vzorků sýrů Cottage

Odběr vzorku určený pro mikrobiologické, chemické, fyzikální i sensorické rozborů se provádí podle evropské normy EN ISO 707/1997. V této normě se uvádí:

- Vybavení pro mikrobiologický odběr vzorku musí být umyté a sterilizované, a to buď působením horkého vzduchu po dobu 2 hodin při teplotě 170 až 175 °C nebo působením páry v autoklávu při 121 ± 1 °C nejméně 20 minut.
- Odběr vzorků musí být reprezentativní.
- Úchova a přeprava vzorků musí být provedena tak, aby se stav vzorků negativně nezměnil.
- Vzorky čerstvých sýrů se musí přepravovat ve tmě při teplotě 0 – 4 °C.
- Při odběru vzorků čerstvých sýrů nesmí být balení poškozené a musí být uzavřené. Balení se nesmí otevřít až do doby bezprostředně před analýzou
- K přepravě vzorků se používají přepravní boxy s chladicí vložkou. Teplota vzorku v těchto boxech nesmí poklesnout pod 0 °C a nesmí překročit 5 °C.

3.6 Mikrobiologická kontrola sýrů Cottage

Mikrobiologická kontrola sýrů Cottage a ostatních mléčných výrobků je nejčastěji zaměřena k průkazu patogenních bakterií rodu *Listeria* a bakterií rodu *Salmonella*.

Běžná mikrobiologická kontrola je cílená především ke stanovení (Havlová a kol., 1993)

- počtu aerobních a fakultativně aerobních mikroorganismů
- počtu psychotrofních mikroorganismů
- počtu termorezistentních mikroorganismů
- počtu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* nebo počtu koliformních bakterií
- počtu enterokoků
- počtu kvasinek a plísní
- počtu anaerobních bakterií

Jako doplňkové ukazatele mikrobiologické jakosti se vyhodnocují

- počet proteolytických mikroorganismů
- počet lipolytických mikroorganismů
- počet bakterií mléčného kvašení.

Při provádění jednotlivých mikrobiologických rozborů musí být dodrženy zásady, které jsou popsány v normě ČSN EN ISO 7218. Mikrobiologie potravin a krmiv - Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení. Mikrobiologická kontrola se provádí dle příslušných ISO norem. ISO (*International Standardisation Organisation*) je celosvětovou federací národních normalizačních organizací (Jičínská a kol., 1998).

3.6.1 Příprava vzorků

Vzorky určené k mikrobiologickým rozborům jsou připravovány dle normy ČSN EN ISO 6887-5. Mikrobiologie potravin a krmiv - Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinasobných ředění - Část 5: Specifické pokyny pro vzorky mléka a mléčných výrobků.

10 g vzorku se asepticky naváží do sterilního plastového sáčku a smíchá s 90 ml ředícího roztoku předehřátého na 45 °C. Směs se homogenizuje pomocí peristaltického homogenizátoru (stomacheru) po dobu 1 až 3 minut. Vzniklá pěna se nechá rozptýlit. Teplota disperze nesmí v žádném případě překročit 45 °C.

3.6.2 Ředění vzorků

Ředění vzorků se provádí dle normy ČSN EN ISO 6887-5. Mikrobiologie potravin a krmiv - Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinasobných ředění - Část 5: Specifické pokyny pro vzorky mléka a mléčných výrobků.

3.6.3 Stanovení celkového počtu aerobních a fakultativně aerobních mikroorganismů

Mezofilní aerobní a fakultativně aerobní mikroorganismy jsou bakterie, kvasinky a plísně vytvářející kolonie v neselektivních, nutričně bohatých živných půdách průběhu 72 hodin za aerobních podmínek při teplotě 30 °C (Havlová a kol., 1993).

Aerobní mezofilní organismy jsou běžně používané jako mikrobiologické indikátory kvality všech potravin. Přestože má zjišťování počtu mezofilních organismů omezené použití pro ohodnocení bezpečnosti výrobku, je velmi cenným nástrojem pro zjištění odchylek při výrobě, skladování i přepravě.

Stanovení celkového počtu mikroorganismů je prováděno dle normy ČSN EN ISO 4833 Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C.

Počty jsou vyjadřovány jako kolonie tvořící jednotky (KTJ) na jeden gram.

Princip metody: Podíly desetinásobných ředění vzorku jsou smíchány s živnou půdou v Petriho miskách. Odečítání kolonií se provádí po inkubaci při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin. Poté je vypočítán počet mikroorganismů na jeden gram (sýru Cottage).

3.6.4 Stanovení počtu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*

Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* jsou mikroorganismy, které fermentují glukózu a vykazují negativní oxidázovou reakci.

V případě, že se očekává ve vzorku malé množství bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* (< 100 KTJ/g) používá se průkaz s předpomnožením v tekutém médiu. Tento test je založen na testu přítomnosti/nepřítomnosti a může být použit pro stanovení MPN. Pokud se očekává vyšší počet bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* (>100 KTJ/g) postupuje se při stanovení počtu podle metody počítání kolonií v pevné půdě. Stanovení se provádí dle normy ČSN ISO 21528-2 Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metody pro průkaz a stanovení počtu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*.

Princip metody průkazu s předpomnožením v tekutém médiu: Vzorky jsou naváženy do tekuté neselektivní půdy pro oživení a pomnožení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* – tzv. fáze předpomnožení. Vzorky jsou subkultivovány v tekuté selektivní půdě (tzv. fáze pomnožení) a následně zaočkovány na půdu s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučí a glukózou (VRBG). Kolonie považované za *Enterobacteriaceae* jsou dále subkultivovány na neselektivní půdě a potvrzují se pomocí vhodných testů.

Princip metody stanovení v pevné půdě: Příslušné ředění zkušební vzorku se očkuje do Petriho misek a přelévá se s půdou s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučí a glukózou. Misky se inkubují při 37 °C po dobu 24 hodin. Stanoví se počet charakteristických kolonií. Kolonie, které jsou považovány za *Enterobacteriaceae* se subkultivují na povrch neselektivní půdy a provádí se potvrzení příslušnými biochemickými testy.

3.6.5 Stanovení počtu koliformních bakterií

Koliformní bakterie tvoří samostatnou taxonomickou skupinu. Jsou definovány na základě fyziologických a biochemických charakteristik. Z tohoto důvodu některé druhy bakterií určitého druhu vykazují definované vlastnosti, a proto jsou považovány za koliformní bakterie, zatímco jiné druhy stejného kmene nevykazují tyto vlastnosti, a proto nepatří mezi koliformní bakterie. Koliformní bakterie jsou to gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinky, které fermentují laktózu za tvorby kyseliny a plynu. V mléce a mléčných výrobcích

se vyskytují druhy *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* a *Klebsiella pneumoniae*, které jsou součástí střevní mikroflóry člověka i zvířat (Havlová a kol., 1993).

Koliformní bakterie se považují za hygienický indikátor čistoty ve vodě, jídle i výrobním prostředí. Koliformní bakterie jsou termolabilní, při pasterizaci dochází k jejich zničení. Pokud se najdou v hotovém výrobku, pasterizace byla nedostatečná nebo byl sýr při výrobě sekundárně kontaminován, např. v důsledku špatné hygieny a sanitace (Havlová a kol., 1993). Některé druhy koliformních bakterií jsou psychrotrofní a jsou proto schopny se v mléce a v mléčných výrobcích rozmnožovat při nižších teplotách, popř. při pokojové teplotě. V mléce a ve výrobcích z mléka způsobují vážné vady, jako jsou kysnutí, hořknutí, tvorba trhlin a plynu.

Podobně jako u stanovení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* se při jejich stanovení může zvolit metoda průkazu v tekutých půdách nebo stanovení počtu v pevných půdách.

Stanovení se provádí dle normy ČSN ISO 4832 Mikrobiologie potravin a krmiv -

Horizontální metoda stanovení počtu koliformních bakterií - Technika počítání kolonií.

Princip metody stanovení koliformních bakterií plotnovou metodou: Příslušné ředění zkušební vzorku se očkuje do Petriho misek a přelévá se s půdou s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučí a laktózou. Misky se inkubují při 30 °C po dobu 24 hodin. Stanoví se počet charakteristických kolonií.

3.6.6 Stanovení počtu enterokoků

Bakterie rodu *Enterococcus* patří mezi streptokoky skupiny D. Enterokoky jsou grampozitivní, nesporulující, fakultativně anaerobní mikroorganismy. Od ostatních streptokoků se odlišují vysokou odolností vůči teplotě, antibiotikům a chemoterapeutikům. Vydrží 30 min při 60 °C a rostou při teplotě 10 až 45 °C v přítomnosti 6,5 % NaCl (Betina a kol., 1987).

Způsobují často onemocnění močových a žlučových cest, endokarditid, sepsí a meningitid. Často se vyskytují v mléčných výrobcích (Häusler, 1995).

Podobně jako koliformní bakterie jsou enterokoky indikátory fekálního znečištění, ale přítomnost enterokoků je spolehlivějším indikátorem kontaminace než koliformní bakterie. Jejich výskyt může ukazovat na kontaminaci mléka patogenními bakteriemi, např. bakteriemi rodu *Salmonella* nebo rodu *Listeria* (Havlová a kol., 1993).

Stanovení enterokoků se provádí kultivací na živných půdách, které obsahují azid sodný

a TTC. Azid sodný potlačuje růst doprovodné mikroflóry, TTC způsobuje červenohnědé zabarvení kolonií enterokoků (Häusler, 1995). Stanovení vychází z normy ČSN EN ISO 7899-2 Stanovení intestinálních enterokoků - Část 2: Metoda membránových filtrů. Princip metody: Metoda je modifikována. Její princip spočívá v tom, že příslušné ředění zkušebního vzorku se očkuje do Petriho misek a přelévá selektivní agarovou půdou KF Streptococcus, do které se přidává inhibitor azid sodný, jehož úkolem je potlačovat doprovodnou mikroflóru. Misky se inkubují při 37 °C po dobu 44 hodin (Havlová a kol., 1993).

Hausler (1995) doporučuje stanovení provádět na povrch m-enterokokového agaru dle Slanetz-Bartleye. Misky se inkubují při 37 °C po dobu 48 hodin.

Kolonie, které jsou považovány za enterokoky se v obou případech subkultivují na povrch neselektivní půdy a provádí se katalázový test.

3.6.7 Stanovení počtu kvasinek a plísní

Houby tvoří velkou a rozmanitou skupinu mikroorganismů zahrnující kvasinky a plísně. Plísně jsou definovány jako vláknité houby, zatímco kvasinky jsou definovány jako jednobuněčné houby. Existují však formy, u kterých je rozdíl mezi oběma skupinami nepatrný.

Při výrobě sýrů se kvasinky a plísně vyskytují buď ve formě kultur, nebo jako kontaminující mikroorganismy, které způsobují mnohé vady sýrů. Největší problémy při výrobě sýru Cottage způsobuje v mlékárnách výskyt plísně *Geotrichum candidum*, která se do mléka dostává kontaminací z nedostatečně čistých stájí či při nedodržení čistících režimů při svozu mléka (Havlová a kol., 1993). Kvasinky a plísně jsou rovněž termolabilní a nepřežívají pasterizaci.

Stanovení se provádí dle normy ČSN ISO 21527-1 Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísní - Část 1: Technika počítání kolonií u výrobků s aktivitou vody vyšší než 0,95.

Princip stanovení: při stanovení kvasinek a plísní se vychází z hodnoty vodní aktivity v potravinách. V závislosti na hodnotě a_w výrobku jsou používány různé kultivační půdy a ředící roztoky. Sýr Cottage má hodnotu $a_w > 0,95$, a proto se při stanovení používá agarová půda s kvasničným extraktem, glukózou a oxytetracyklinem (OGY). Po homogenizaci vzorku se očkuje alikvotní část desetinasobného ředění vzorku na povrch kultivační půdy. Odečítání kolonií se provádí po 5 dnech inkubace při teplotě 25 °C.

3.6.8 Stanovení počtu bakterií mléčného kvašení

Mezi bakterie mléčného kvašení patří jedenáct rodů *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* a *Weissella* (Stiles a Holzapfel, 1997). Mezi nejznámější druhy jsou řazeny *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc mesenteroides*. Obecně jsou bakterie mléčného kvašení považovány za bezpečné. Jedná se o nesporotvorné grampozitivní bakterie, které srážejí mléko a současně fermentují laktózu. Hlavním produktem fermentace je kyselina mléčná.

Princip stanovení: Připravená suspenze vzorků a její desetinásobné ředění se očkují do nutričně bohatých nebo selektivně-diagnostických půd, kultivují se podle optimálních podmínek pro daný druh mikroorganismu. Odečítají se všechny kolonie, které vyrostly na nutričně bohatých půdách a typické kolonie, které vyrostly na selektivních půdách.

4 Metody stanovení a materiál

4.1 Příprava ředícího roztoku

Ředící roztok (fyziologický roztok) má následující složení (g/l).

Chlorid sodný	8,5 g
Destilovaná voda	1000 ml

pH 7,0 ± 0,2 (při 25 °C)

Složky se rozpustí ve vodě a je-li třeba, upraví se pH. Ředící roztok se rozplní po 9 ml nebo po jiném vhodném množství do zkumavek, lahví, Erlenmeyerových baněk apod. Sterilizuje se v autoklávu při teplotě 121 ± 1 °C po dobu 15 minut.

4.2 Příprava kultivačních půd

Kultivační půdy používané pro mikrobiologické analýzy hrají základní roli pro získání spolehlivých a přesných výsledků. Půdy musí být připravovány pečlivě, aby byla zajištěna jejich kvalita a vlastnosti.

K analýzám byly použity komerčně vyráběné živné půdy od firmy Oxoid. Dehydratované kultivační půdy jsou vyrobeny za použití moderních principů zajištění kvality. Jsou dodávány s certifikáty o kvalitě.

4.2.1 Příprava kultivační půdy pro stanovení celkového počtu mikroorganismů

Ke stanovení se používá standardní agar pro celkový počet z kaseinového peptonu s dextrózou a kvasničným extraktem.

Složení půdy:

Trypton	5,0 g
Kvasnicový extrakt	2,5 g
Dextróza	1,0 g
Agar-agar	9 – 18 g
Destilovaná voda	1000 ml
pH	$7,0 \pm 2,0$ při teplotě 25 °C

Dehydratovaná půda se rozpustí v destilované vodě. Pokud je třeba, upraví se pH. Sterilizuje se po dobu 15 minut při teplotě 121 ± 1 °C.

4.2.2 Příprava kultivační půdy pro stanovení bakterií mléčného kvašení

Ke stanovení se používá kultivační půda – agar pro laktobacily podle DeMana, Rogosiho a Sharpeho (MRS).

Složení půdy:

Pepton z kaseinu	10,0 g
Masový extrakt	8,0 g
Kvasničný extrakt	4,0 g
Glukóza	20,0 g
Tween® 80	1,0 g
Hydrogenfosforečnan draselný	2,0 g
Síran hořečnatý heptahydrát	0,2 g
Síran manganatý monohydrát	0,035 g
Citrát amonový	2,0 g
Octan sodný	5,0 g
Agar-agar	9 – 18 g
Destilovaná voda	100 ml
pH	$5,7 \pm 0,1$ při teplotě 25 °C

Dehydratovaná půda se rozpustí v destilované vodě. Pokud je třeba, upraví se pH. Sterilizuje se po dobu 15 minut při teplotě 121 ± 1 °C.

4.2.3 Příprava kultivační půdy pro stanovení koliformních bakterií

Ke stanovení koliformních bakterií se používá kultivační půda – agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučí a laktózou (VRBL).

Složení půdy:

Pepton	7 g
Kvasničný extrakt	3 g
Laktóza	10 g
Chlorid sodný	5 g
Žlučové soli	1,5 g
Neutrální červeně	0,03 g
Krystalická violet'	0,002 g
Agar	12 – 18 g
Destilovaná voda	1000 ml

pH $7,4 \pm 0,2$ při teplotě 25 °C

Dehydratovaná půda se smíchá s destilovanou vodou a ponechá se stát 5 minut. Směs se důkladně promíchá a za občasného míchání se přivede k varu. Pokud je třeba, upraví se pH a poté se nechá vařit 2 minuty. Půda se nesterilizuje a nesmí se přehřívat. Půda se ihned ochladí ve vodní lázni na teplotu 45 °C.

15 – 20 ml připravené agarové půdy se rozlije do Petriho misek o průměru 9 – 10 cm. Agar v Petriho miskách se ponechá utuhnout na chladné vodorovné ploše. Pokud je třeba, Petriho misky se před použitím předsuší s pootevřenými víčky v termostatu, až z povrchu půdy vymizí kapky vody.

4.2.4 Příprava kultivační půdy pro stanovení enterokoků

Ke stanovení enterokoků se používá kultivační půda m-enterokokový agar podle Slanetze a Bartleyové.

Složení půdy:

Pepton	20 g
Kvasničný extrakt	5 g
Glukóza	2 g
Hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4)	4 g
Azid sodný (NaN_3)	0,4 g
Agar	15 g
Destilovaná voda	1000 ml

pH $7,2 \pm 0,2$ při teplotě 25 °C

Složení roztoku TTC:

2,3,5-trifenylnitrotetrazoliumchlorid	1,0 g
Destilovaná voda	100 ml

Dehydratovaná půda se rozpustí v destilované vodě. Směs se důkladně promíchá. Za občasného míchání se přivede k varu a nechá se vařit 5 minuty. Půda se nesterilizuje a nesmí se přehřívat. Půda se ihned ochladí ve vodní lázni na teplotu 45 °C.

Roztok TTC se přidá k základnímu roztoku živné půdy ochlazené na 45° C. Pokud je třeba upravit se hodnota pH sterilním 10 % roztokem uhličitanu sodného (Häusler,1995).

4.2.5 Destičky 3M Petrifilm™ - Enterobacteriaceae Count Plate

Destičky 3M Petrifilmu™ se skládají z tenkých vrstev potažených živinami a rozpustným želatinovým činidlem. Metoda použití Petrifilmu™ pro stanovení počtu bakterií čeledi



Enterobacteriaceae byla schválena pro různé potravinářské matrice mezinárodní organizací AFNOR (1997). AFNOR (Association Française de Normalisation) je francouzská národní organizace pro normalizaci, která je členem mezinárodní organizace pro standardizaci.

Obrázek 3: 3M Petrifilm™ - Enterobacteriaceae Count Plate (www.3m.com/microbiology)

4.3 Příprava analytického vzorku

10 g vzorku se asepticky odváží s přesností $\pm 0,1$ g do Erlenmeyerovy baňky, která obsahuje 90 ml sterilního fyziologického roztoku. Ředící roztok je třeba vytemperovat při laboratorní teplotě, aby se zabránilo negativnímu účinku teplotního šoku na mikroorganismy. Obsah baňky se opatrně nechá promíchat po dobu 7 minut na třepače. Vznikne výchozí suspenze neboli primární ředění (10^{-1}) zkušební vzorku.

Další ředění se připraví smícháním 1 ml primárního ředění (10^{-1}) s 9 ml ředícího roztoku. Směs se dobře promíchá pomocí mechanického míchadla – mixeru Vortex. Vzniklá suspenze

se nazývá 10^{-2} ředění. K získání 10^{-3} ředění se odebere 1 ml z 10^{-2} ředění a přenese se do nové zkumavky obsahující 9 ml ředícího roztoku. K získání dalších desetinásobných ředění se celý postup opakuje. Pro přípravu každého ředění se použije jiná sterilní pipeta.

4.4 Inokulace

4.4.1 Zalévání inokula živnou půdou

Do dvou sterilních Petriho misek se napipetuje sterilní pipetou 1 ml ředění určeného ke zkoušení. Při analýze různých ředění se používá jedna sterilní pipeta. Začne se s nejvyšším ředěním a pracuje se zpět k nižším ředěním (např. 10^{-4} , 10^{-3} a 10^{-2}).

Hrdlo Erlenmeyerovy baňky obsahující rozeřtý agar se ožehne plamenem. Inokulum v každé Petriho misce se přelije příslušným agarem a směs se opatrně promíchá. Misky se umístí na chladnou vodorovnou plochu, kde se půda s inokulem ponechá utuhnout.

4.4.2 Roztěr inokula na povrch živné půdy

Použije se vysušená Petriho miska s připraveným agarem. Na povrch agaru se vnese pomocí sterilní pipety 0,1 ml vybraného ředění. Okamžitě poté se inokulum rozetře po povrchu půdy pomocí sterilní skleněné zahnuté tyčinky.

4.4.3 Inokulace na Petrifilmech

Použije se Petrifilm umístěný na rovný povrch. Vrchní film Petrifilmu se opatrně nazdvihne. Do středu spodního filmu se nepipetuje 1 ml vzorku. Vrchní film se opatrně sroluje tak, aby se zabránilo zachycení vzduchových bublin. Inokulum se rovnoměrně rozprostře na kruhové ploše jemným zatlačením na vrchní film. Destička se nechá 1 minutu v klidu, aby mohl gel ztuhnout.

4.5 Inkubace

Inkubace je významný krok mikrobiologické analýzy. Zvláštní pozornost by měla být věnována správným inkubačním podmínkám, zejména dodržování správné teploty a času. Inkubační podmínky pro jednotlivá stanovení jsou uvedena v tabulce č 5.

K inkubaci se používají termostaty s přesností ± 1 °C. Misky se uloží do termostatu dnem vzhůru, kde se inkubují při předepsané teplotě po předepsanou dobu. Destičky Petrifilmů se inkubují vrchní stranou nahoru.

Doba mezi ukončení přípravy výchozí suspenze a okamžikem kdy dojde ke kontaktu inokula s živnou půdou, nesmí překročit 45 minut.

Tabulka 5: Inkubační doby sledovaných mikroorganismů

Stanovení	Teplota inkubace	Doba inkubace
Celkového počtu mikroorganismů	30 °C	72 h
Bakterií mléčného kvašení	30 °C	72 h
Koliformních bakterií	30 °C	24 h
Enterobacteriaceae (Petrifilm)	30 °C	24 h
Enterokoků	37 °C	44 h

4.6 Počítání kolonií

4.6.1 Počítání kolonií na pevných půdách

Po stanovené době inkubace, uvedené v tabulce č. 5, se spočítají charakteristické kolonie sledovaných mikroorganismů v každé misce, ve které nevyrostlo více než 150 kolonií.

Charakteristické kolonie sledovaných mikroorganismů:

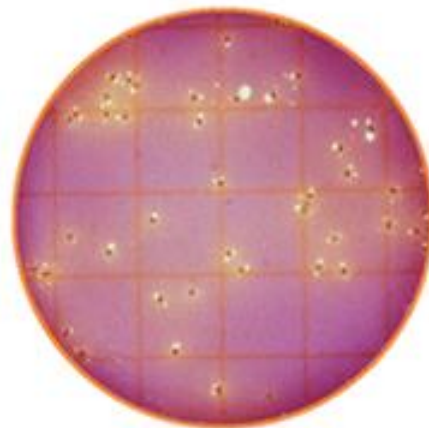
- Mezofilní aerobní a fakultativně anaerobních mikroorganismů – odečítají se všechny vyrostlé kolonie na misce.
- Bakterií mléčného kvašení – odečítají se všechny vyrostlé kolonie na misce. Poté se provádí konfirmace nejméně u pěti pravděpodobných kolonií. Konfirmace se provede pomocí katalázového testu. Pouze kataláza negativní kolonie jsou považovány za bakterie mléčného kvašení.
- Koliformních bakterií – fialově červené kolonie, obvykle obklopené červenavou zónou precipitované žluče. Barva některých kolonií koliformních bakterií se může změnit na růžovou nebo dokonce bílou (počínaje od středu). Kvůli tvorbě kyseliny mohou být kolonie obklopeny žlutými zónami.
- Enterokoky- Červenorůžové kolonie s nádechem do hněda, průměr 2 mm. Pro konfirmaci se vybere pět kolonií a provedou se identifikační testy (Havlová a kol., 1993):
 - katalázový test - negativní
 - růst při teplotě 45 °C - pozitivní
 - růst v přítomnosti 6,5 % NaCl - pozitivní
 - růst v přítomnosti 40 % žluči - pozitivní
 - růst v přítomnosti pH 9,6 - pozitivní
 - rezistence k záhřevu na 60 °C – pozitivní

4.6.2 Počítání kolonií na Petrifilmech

Kolonie mikroorganismů se na Petrifilmech odečítají velmi snadno. Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* jsou červené kolonie obklopené žlutými zónami nebo červené kolonie s bublinkami plynu s nebo bez žlutých zón.

Kolonie, které nemají plynové bublinky a které nemají žluté zóny, nejsou počítány jako bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*.

Konfirmace: pět kolonií z každého Petrifilmu, považované za *Enterobacteriaceae* se naočkuje na misku s živným agarem. Plotny se inkubují při teplotě 37 ± 1 °C po dobu 24 hodin. Poté se provede oxidázový test.



Obrázek 4: Kolonie *Enterobacteriaceae* na Petrifilmech
(www.3m.com/microbiology)

4.7 Test průkazu katalázy

Kataláza je enzym, který rozkládá peroxid vodíku na vodu a kyslík. Tento enzym je přítomen v určitých skupinách bakterií. Katalázu tvoří především aerobní bakterie zatím co anaerobní ne. (Šilhánková, 1981)

Na podložní skříčko se nanese pomocí pipety kapka 30% peroxidu vodíku. Pomocí sterilní plastové očkovací kličky se v kapce peroxidu vodíku rozetře dobře izolovaná kolonie.

Interpretace výsledků:

Více či méně intenzivní tvorba bublin (plynu) – kataláza pozitivní

Nepřítomnost bublin – kataláza negativní

Nepoužívá se platinový drát, který reaguje pozitivně s peroxidem vodíku a vede k falešně pozitivnímu výsledku.

4.8 Oxidázový test

Na běžný filtrační papír se nanese kapka činidla k průkazu oxidázy. Pomocí očkovací kličky se nabere dobře izolovaná kolonie a rozetře se v činidle. Pokud nedojde ke změně barvy do 15 sekund, považuje se test za negativní. Pokud vznikne modré až purpurové zbarvení, test je pozitivní.

4.9 Vyjádření výsledků

Počet N mikroorganismů na 1 gram výrobku se vypočte podle následujícího vzorce:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 * n_2) * d}$$

kde:

- $\sum C$ součet charakteristických kolonií spočítaných na vybraných plotnách,
- n_1 počet ploten použitých pro výpočet z prvního ředění,
- n_2 počet ploten použitých pro výpočet z druhého ředění,
- d je faktor ředění odpovídající prvnímu pro výpočet zvolenému ředění.

Výsledek se zaokrouhlí na dvě platné číslice. Je-li poslední číslice nižší než 5, předchozí číslice se nemění. Je-li poslední číslice 5 nebo vyšší než 5, předchozí číslice se zvýší o hodnotu jedna. Takto se postupuje až do získání dvou číslic různých od nuly.

5 Výsledky

Vzorky určené k rozborům byly zakoupeny v maloobchodní síti. Analýze byly podrobeny následující vzorky.

Vzorek č. 1: **Báječný český Cottage bez příchuti.**

Složení: mléko, smetana, enzym syřidlo, mlékařská kultura, jedlá sůl

Sušina 21 %, tuk min. 5 %

Doba minimální trvanlivosti 17 dní

Minimální trvanlivost do: 7.12.2011

Výrobce: Madeta a.s., České Budějovice



Obrázek 5 Sýr Cottage
(www.madeta.cz)

Vzorek č. 2: **Báječný český Cottage pažitka**

Složení: mléko, smetana, pažitka (0,2 %), enzym syřidlo, mlékařská kultura, jedlá sůl

Sušina 21 %, tuk min. 5 %

Doba minimální trvanlivosti 14 dní

Minimální trvanlivost do: 30.11.2011

Výrobce: Madeta a.s., České Budějovice



Obrázek 6 Sýr Cottage pažitka (www.madeta.cz)

Vzorek č. 3: **Jihočeský Cottage cheese bez příchutí**

Složení: mléko, smetana, syřidlo, mlékařská kultura, jedlá sůl

Sušina 21 %, tuk min. 5 %

Doba minimální trvanlivosti 17 dní

Minimální trvanlivost do: 6.12.2011

Výrobce: Madeta a.s., České Budějovice



Obrázek 7 Sýr cottage (www.madeta.cz)

Vzorek č. 4: **Jihočeský Cottage pažitka**

Složení: mléko, smetana, pažitka (0,2 %) enzym syřidlo, mlékařská kultura, jedlá sůl.

Sušina 21 %, tuk min. 5 %

Doba minimální trvanlivosti 14 dní

Minimální trvanlivost do: 6.12.2011

Výrobce: Madeta a.s., České Budějovice, ČR



Obrázek 8 Sýr Cottage pažitka (www.madeta.cz)

Vzorek č. 5: Jihočeský Cottage jahoda

Složení: mléko, smetana, 16 % jahodová složka, syřidlo, mlékařská kultura, jedlá sůl.

Sušina 22 %, tuk min. 4 %

Doba minimální trvanlivosti 14 dní

Minimální trvanlivost do: 5.2.2011

Výrobce: Madeta a.s., České Budějovice, ČR



Obrázek 9 Sýr Cottage jahoda
(www.madeta.cz)

Vzorek č. 6: Meggle Cottage cheese přírodní

Složení: mléko, smetana, jedlá sůl.

Sušina nejméně 18 %, tuk v sušině 20 %

Doba minimální trvanlivosti 28 dní

Minimální trvanlivost do: 5.2.2012

Výrobce: Rajo a.s., Bratislava, SR



Obrázek 10 Cottage cheese
(www.cottagecheese.sk)

Vzorek č. 7: Meggle Cottage cheese se šunkou

Složení: mléko, smetana, 8 % ochucovací složka šunko-křenová (voda, dušená šunka, obilniny, křen, jedlá sůl, sacharóza, zahušřovadlo: modifikovaný kukuřičný škrob, karubin, kvasničný extrakt, regulátor kyselosti: hydrogensíran sodný, aroma, barvivo: karmín), jedlá sůl, mlékárenská kultura.

Sušina nejméně 18 %, tuk v sušině 20 %

Doba minimální trvanlivosti 28 dní

Minimální trvanlivost do: 7.2.2012

Výrobce: Rajo a.s., Bratislava, SR



Obrázek 11 Cottage cheese
šunka
(www.cottagecheese.sk)

Rozbory byly cílené ke stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM), bakterií mléčného kvašení (BMK), koliformních bakterií a enterokoků. Výsledky analýzy jsou uvedeny v tabulce č 6.

Dále se prováděly rozbory cílené ke stanovení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* pomocí Petrifilmů. Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* nebyly zjištěny u žádného sledovaného vzorku.

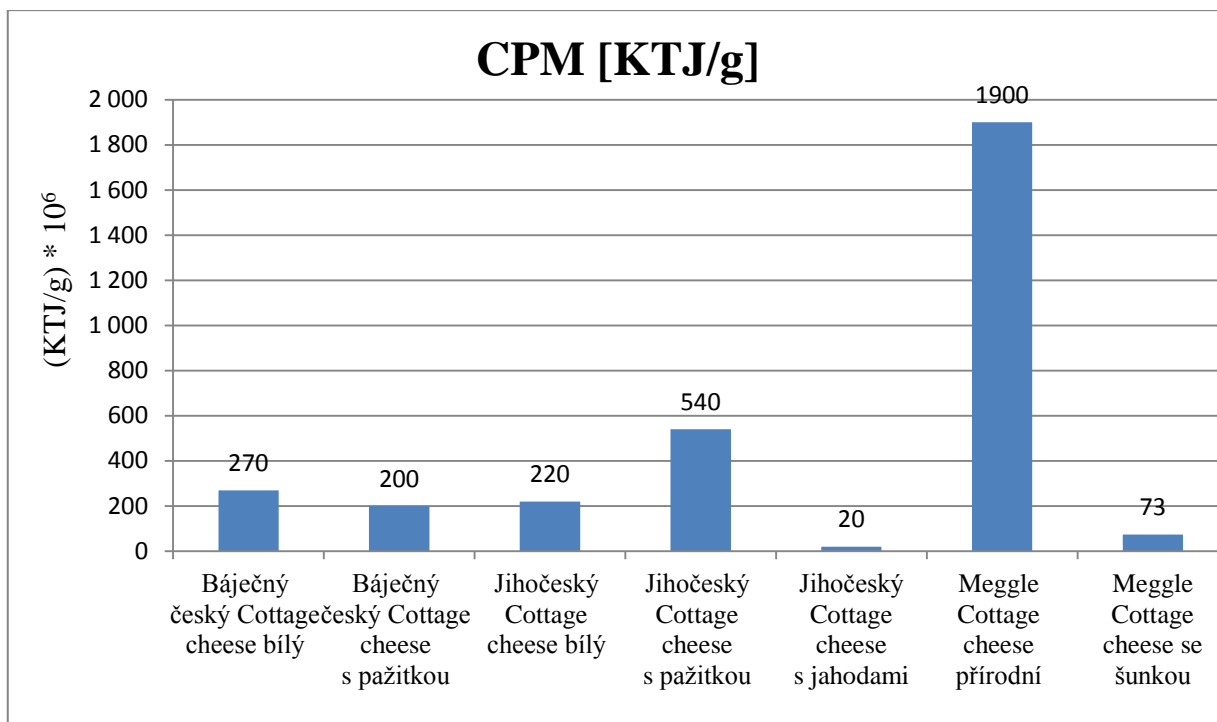
Tabulka 6: Výsledky stanovení

Vzorek č.	Datum analýzy	CPM [KTJ/g]**	BMK [KTJ/g]**	Koliformní bakterie [KTJ/g]**	Enterokoky [KTJ/g]**
1	28.11.2011	$2,7 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$	< 10	< 10
2	28.11.2011	$2,0 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$	< 10	< 10
3	28.11.2011	$2,2 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	< 10	< 10
4	28.11.2011	$5,4 \cdot 10^8$	$3,9 \cdot 10^8$	< 10	< 10
5	30.1.2012	$2,0 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^7$	< 10	< 10
6	30.1.2012	$1,9 \cdot 10^9$	$1,2 \cdot 10^9$	< 10	< 10
7	30.1.2012	$7,3 \cdot 10^7$	$5,5 \cdot 10^7$	< 10	< 10

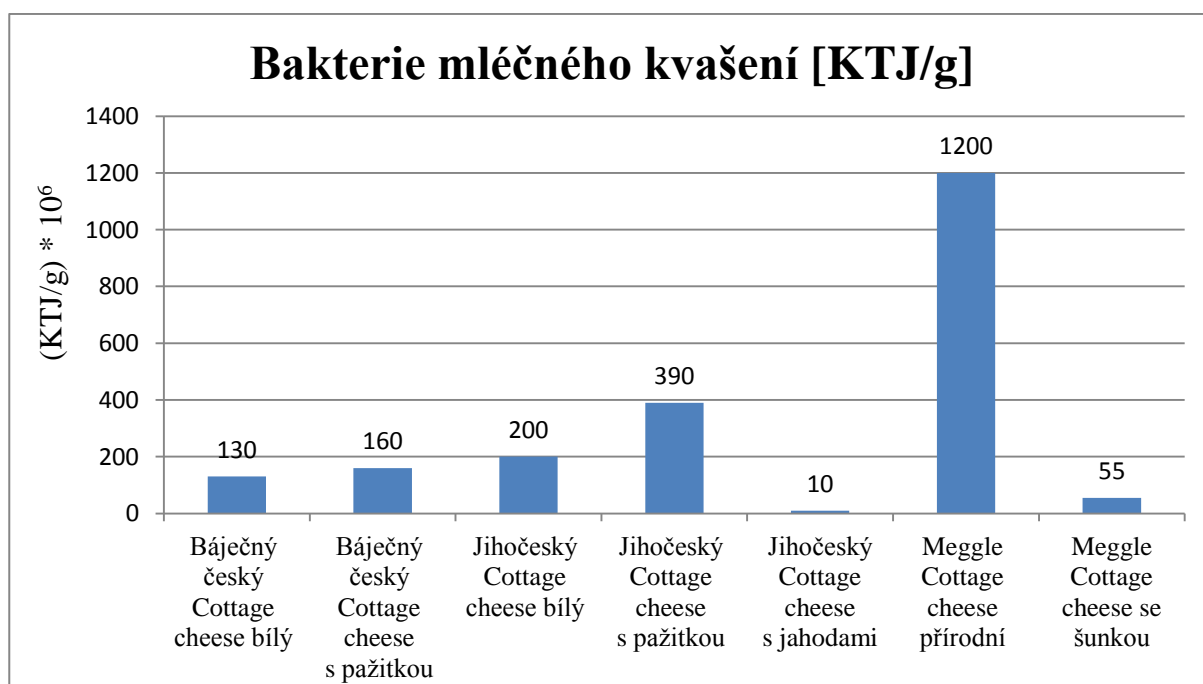
** KTJ/ g – kolonie tvořící jednotky na jeden gram výrobku

6 Diskuse

Z výše uvedených výsledků mikrobiologických analýz vyplývá, že celkový počet mikroorganismů se u sledovaných vzorků pohyboval v rozmezí od $2,0 \cdot 10^7$ KTJ/g až do $1,9 \cdot 10^9$ KTJ/g. Nejmenší počet aerobních a fakultativně aerobních mikroorganismů obsahoval vzorek č. 7 - Jihočeský Cottage cheese s jahodami. Nejmenší počet aerobních a fakultativně aerobních mikroorganismů obsahoval vzorek č. 5 - Meggle Cottage cheese přírodní od firmy Rajo a.s. Podstatnou část těchto mikroorganismů však tvořily prospěšné bakterie mléčného kvašení, proto tyto vysoké celkové počty mikroorganismů nejsou na závadu, ale naopak ve prospěch spotřebitelů.

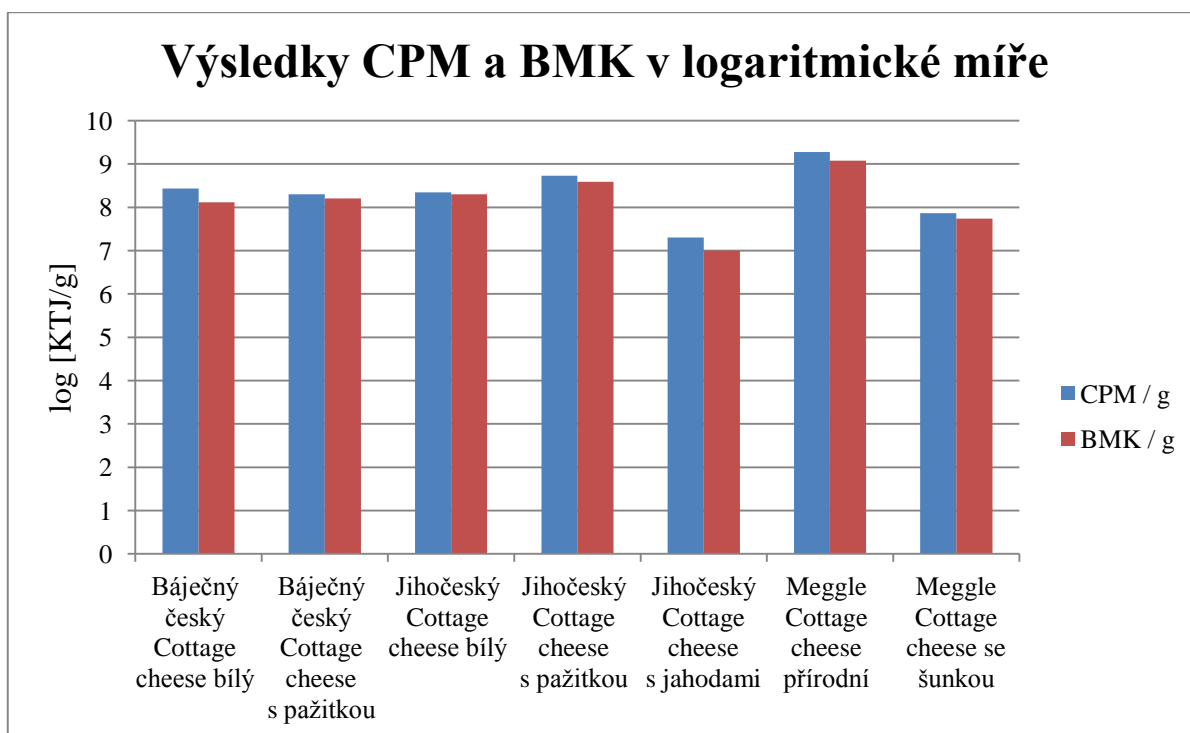


Počet bakterií mléčného kvašení se pohyboval v rozmezí od $1,0 \cdot 10^7$ KTJ/g do $1,2 \cdot 10^9$ KTJ/g. Nejméně bakterií mléčného kvašení obsahoval vzorek č. 1 - Bájecný český Cottage cheese bílý. Nejvíce bakterií mléčného kvašení obsahoval rovněž vzorek č. 5- Meggle Cottage cheese přírodní.



Výskyt bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, koliformních bakterií a enterokoků nebyl zjištěn u žádného sledovaného vzorku.

Pokud budeme ze statistických důvodů transformovat naměřené výsledky do logaritmické stupnice, zjistíme, že jednotlivé výsledky stanovení se od sebe podstatně neliší.



Je zajímavé, že výrobek Meggle Cottage cheese přírodní, který obsahoval nejvíce mikroorganismů a zároveň nejvíce bakterií mléčného kvašení, byl nejstarší a byl analyzován až 22 dní po výrobě. Tato situace zřejmě souvisí se skutečností, že během dlouhodobějšího skladování docházelo k dalšímu rozvoji mikroorganismů, zvláště pak bakterií mléčného kvašení. Toto však již neplatilo pro vzorek č. 8. Do konce trvanlivosti zbývalo pouze 6 dní. Ostatní sledované vzorky byly analyzovány v rozmezí 2 až 8 dnů před koncem minimální trvanlivosti. Vzhledem k tomu, že doba minimální trvanlivosti byla u jednotlivých výrobků odlišná 14 – 28 dnů, stáří výrobků bylo v době analýzy značně rozdílné 6 až 22 dnů – viz tabulka č 7.

Tabulka 7: Datum výroby a minimální trvanlivosti sledovaných vzorků

Vzorek č.	Datum výroby	Minimální trvanlivost do:	Počet dnů od data výroby do analýzy	Počet dnů do konce trvanlivosti
1	21.11.2011	7.12.2011	8	9
2	17.11.2011	30.11.2011	12	2
3	20.11.2011	6.12.2011	9	8
4	23.11.2011	6.12.2011	6	8
5	23.1.2012	5.2.2012	7	7
6	9.1.2012	5.2.2012	22	6
7	11.1.2012	7.2.2012	20	8

Není možno s jistotou tvrdit, že počty sledovaných mikroorganismů se v průběhu trvanlivosti mění. Vzorky byly analyzovány pouze jednou, většinou týden před koncem minimální trvanlivosti. V obchodní síti se nepodařilo sehnat výrobky na začátku doby trvanlivosti. To by bylo zřejmě možné pouze u výrobce. Doba minimální trvanlivosti výrobků od firmy Rajo je dvakrát delší (28 dnů), než doba minimální trvanlivosti sýrů Cottage od firmy Madeta (14 -17 dnů).

7 Závěr

Celkem bylo pro ověření metodických postupů analyzováno 7 vzorků. Analýzy byly cílené ke stanovení celkového počtu mikroorganismů, bakterií mléčného kvašení, enterokoků, bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* a koliformních bakterií.

Výsledky stanovení celého počtu mikroorganismů a bakterií mléčného kvašení nevykazují z mikrobiologického hlediska žádné výrazné rozdíly. Všechny analyzované vzorky sýrů Cottage vyhovovaly ve sledovaných kriteriích mikrobiálním požadavkům dle Nařízení komise (ES) č. 1441 ze dne 5. prosince 2007 o mikrobiologických kriteriích pro potraviny. Všechny vzorky byly z mikrobiologického hlediska zdravotně nezávadné a bezpečné. Přítomnost vysokého počtu bakterií mléčného kvašení ve všech výrobcích, zlepšuje jakost, bezpečnost a nutriční hodnotu sledovaných sýrů. Nebyly zjištěny významnější rozdíly ve vazbě na expirační dobu.

8 Seznam literatury

8.1 Tištěné publikace

- Araujo, E.A., de Carvalho, A.F., Leandro, E.S., Furtado, M.M., de Moraes, C.A. 2010. Journal of functional foods, 2 (1), 85 – 89.
- Betina, V. a kol. 1987. Mikrobiologické laboratorní metody, Alfa – vydavatelství technické a ekonomické literatury, Bratislava, 544 s.
- Bylund, G. 1995. Dairy processing handbook, Tetra Pak Processing System AB, Lund, Sweden, p. 323.
- Doležálek, J. 1962. Mikrobiologie mlékárenského a tukařského průmyslu, SNTL, Praha, 545 s.
- Drake, S.L., Lopedcharat, K., Drake, M.A. 2009. Journal of Dairy Science, 92 (12), 5883-5897.
- Drbohlav, J., Vodičková, M. 2001. Tabulky látkového složení mléka mléčných výrobků, ÚZPI, Praha, 83 s.
- Ferenčík, M., Mikeš, Z., Ebringer, L., Jahnova, E., Čížnar, I. 2000. Imunostimulačné a iné zdravotne prospešné účinky baktérií mliečného kysnutia, Bratislavské lekárske listy, 101(1), 51 – 53.
- Guneser, O., Yuceer, Y.K. 2011. International Journal of Dairy Technology, 64 (4), 517– 525.
- Hahn, C., Sramek, M., Nobel, S., Hinrichs, J. 2012. Dairy Science & Technology, 92 (1), 91-107.
- Havlová, J., Jičínská, E., Hrabová, H. 1993. Mikrobiologické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobků, ÚZPI, Praha, 243 s.
- Häusler, J. 1995. Mikrobiologické kultivační metody kontroly jakosti vod. Díl III. Stanovení mikrobiologických ukazatelů, Ministerstvo zemědělství ČR: Agrospoj, Praha, 407 s.
- Chumchalová, J., Plocková, M. 2003. Antimikrobiální vlastnosti bakterií mléčného kvašení, Sborník ze semináře Mikrobiologie potravin, VŠCHT Praha, Praha, 104 s.
- Jičínská, E., Havlová, J. 1995. Patogenní mikroorganismy v mléce a mlékárenských výrobcích, ÚZPI, Praha, 106 s.
- Jičínská, E., Havlová, J. 1996. Metody detekce patogenních mikroorganismů v potravinách, ÚZPI, Praha, 115 s.

- Jičínská, E., Havlová, J. 1998. Mikrobiologická kontrola potravin a potravinářských surovin v legislativě EU, ÚZPI, Praha, 84 s.
- Kopáček, J. 2011. Vady sýrů a faktory které je ovlivňují. Potravinářská Revue, 7 (3), 71 - 76.
- Lücke, F.K., Earnshaw, R.G. 1991. Starter cultures, in Russell, N.J., Gould, G. W. (ed), Food Preservatives, Blackie Academic , Glasgow, pp. 215-234.
- Mc Auliffe, O., Hill, C., Ross, R.P. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Cottage Cheese Manufactured with a Lactin -3147 producing Started Culture. Journal of applied microbiology, 86 (2), 251-156.
- Obando, M., Brito, C.S., Schobitz, R.P., Baez, L.A., Horzella, M.Y. 2010. Vitae-revista de la facultad de química farmaceutica, 17 (2), 141 – 148.
- Pocedičová, K. 2011. Laktózová intolerance a syntéza prebiotik s využitím β -galaktosidázy. Potravinářská Revue, 7 (6), 10 - 12.
- Robinson, R. K. a kol. 1995. A Colour Guide to Cheese and Fermented Milks, Champan & Hall, London, p. 178.
- Stiles, M. E., Holzapfel, W. H. 1997 Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 36 (1), 1–29.
- Štafen, M. 2011. Zakysané mléčné výrobky a jogurt – nezpochybnitelná součást zdravé výživy. Potravinářská Revue, 7 (2), 12 - 13.
- Šilhánková, L., Demnerová, K., Obdržálek, V. 1981. Laboratorní návody pro cvičení z mikrobiologie, SNTL, Praha, 128 s.
- Šilhánková, L. 1983. Mikrobiologie pro potravináře, SNTL, Praha, 298 s.

8.2 Legislativní předpisy

- Vyhláška 77 ze dne 6. března 2003, kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčný výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. In Sběrka zákonů České republiky. 2003 částka 32, strana 2488 – 2516. Dostupná také z http://aplikace.mvcr.cz/sbirka-zakonu/SearchResult.aspx?q=77/2003&typeLaw=zakon&what=Cislo_zakona_smlouvy
- Vyhláška 147 ze dne 18. června 1998 o způsobu stanovení kritických bodů v technologii výroby. In Sběrka zákonů České republiky. 1998, částka 51, strana 6644 – 6648. Dostupná

také z <http://aplikace.mvcr.cz/sbirka->

[zakonu/SearchResult.aspx?q=147/1998&typeLaw=zakon&what=Cislo_zakona_smlouvy](http://aplikace.mvcr.cz/sbirka-zakonu/SearchResult.aspx?q=147/1998&typeLaw=zakon&what=Cislo_zakona_smlouvy)

Vyhláška 196 ze dne 10. května 2002, kterou se mění vyhláška č. 147/1998 Sb., o způsobu stanovení kritických bodů v technologii výroby. In Sbírnka zákonů České republiky. 2002, částka 81, strana 4829 – 4830. Dostupná také z <http://aplikace.mvcr.cz/sbirka->

[zakonu/SearchResult.aspx?q=196/2002&typeLaw=zakon&what=Cislo_zakona_smlouvy](http://aplikace.mvcr.cz/sbirka-zakonu/SearchResult.aspx?q=196/2002&typeLaw=zakon&what=Cislo_zakona_smlouvy)

Nařízení komise (ES) č. 1441 ze dne 5. prosince 2007, kterým se mění nařízení (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kriteriích pro potraviny. In Úřední věstník Evropské unie. 2007, L 322, s. 12 – 29. Dostupný také z <http://eur->

[lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:322:0012:0029:CS:PDF](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:322:0012:0029:CS:PDF)

ČSN EN ISO 11290-1. Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* - Část 1: Metoda průkazu. Český normalizační institut, Praha, 28 s.

ČSN EN ISO 11290-2. Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* - Část 2: Metoda stanovení počtu. Český normalizační institut, Praha, 7 s.

ČSN EN ISO 707. Mléko a mléčné výrobky - Návod pro odběr vzorků, 2009. Český normalizační institut, Praha, 41 s.

ČSN EN ISO 6887-5. Mikrobiologie potravin a krmiv - Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinásobných ředění - Část 5: Specifické pokyny pro vzorky mléka a mléčných výrobků, 2010, Český normalizační institut, Praha, 15 s.

ČSN EN ISO 7218. Mikrobiologie potravin a krmiv - Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení, 2008. Český normalizační institut, Praha, 66 s.

ČSN EN ISO 4833 Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C, 2003. Český normalizační institut, Praha, 13 s.

ČSN ISO 21528-2 Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metody pro průkaz a stanovení počtu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* - Část 2: Technika počítání kolonií, 2006. Český normalizační institut, Praha, 11 s.

ČSN ISO 4832 Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu koliformních bakterií - Technika počítání kolonií, 2010. Český normalizační institut, Praha, 11 s.

ČSN ISO 21527-1 Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísní - Část 1: Technika počítání kolonií u výrobků s aktivitou vody vyšší než 0,95, 2009. Český normalizační institut, Praha, 11 s.

ČSN ISO 15214 Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu mezofilních bakterií mléčného kvašení - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C, 2000. Český normalizační institut, Praha, 11 s.

ČSN EN ISO 7899-2 Jakost vod - Stanovení intestinálních enterokoků - Část 2: Metoda membránových filtrů, 200. Český normalizační institut, Praha, 12 s.

AFNOR validation certificate 3M 01/6-09/97, 2nd renewal 2005, Petrifilm
Enterobacteriaceae Count Plate.

8.3 Elektronické zdroje

Madeta, a.s., Tak chutná mléko [online] Tak chutná Cottage [cit. 2011-8-31]. Dostupné z <http://www.madeta.cz/cs/vite-ze/tak-chutna-mleko/159>

Meggle, Informace o výrobku [online]. Výroba Cottage cheese [cit. 2011-8-31]. Dostupné z <http://www.cottage-cheese.cz/Informace-o-vyrobcu/Vyroba-Cottage-cheese.aspx>

Miller A, Cottage Cheese Nutrition Facts – How Many Calories Are In Cottage Cheese? [online]. 2008 [cit. 2012-2-05]. Dostupné z http://www.thefatlossauthority.com/fat_loss_tips/cottage-cheese-nutrition-facts-how-many-calories-are-in-cottage-cheese

Rajo, a.s. Cottage Cheese chutne a zdravo [online]. [cit. 2011-9-23]. Dostupné z <http://www.cottagecheese.sk/produkty/cottage-cheese-biely>

Schmidová, S. Cottage sýr [online]. Potraviny 26. srpna 2007 [cit. 2011-9-15]. Dostupné z <http://www.viviente.cz/cottage-syr/>