

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2017

VERONIKA SKÝPALOVÁ



**Vyhodnocení kvality a trvanlivosti sýrů s protektivní
kulturou**
Diplomová práce

Vedoucí práce:
prof. Ing. Květoslava Šustová, Ph.D.

Vypracovala:
Bc. Veronika Skýpalová

Originál zadání

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci **Vyhodnocení kvality a trvanlivosti sýrů s protektivní kulturou** vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla moc poděkovat vedoucí mé diplomové práce paní prof. Ing. Květoslavě Šustové, Ph.D., která mi byla velmi nápomocná, ochotna naslouchat a dát správný směr, jakým psát diplomovou práci. Moje další poděkování patří laborantce paní Pospíškové a Ing. Kiliánovi za ochotu a pomoc v laboratoři, přáteli, rodině děkuji za podporu při psaní diplomové práce a kamarádkám za korekturu.

„Výstupy a výsledky závěrečné práce byly zpracovány na přístrojovém vybavení financovaném z projektu OP VaVpI CZ.1.05/4.1.00/04.0135 Výukové a výzkumné kapacity pro biotechnologické obory a rozšíření infrastruktury“.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá tématem protektivních kultur. V práci je stručně popsáno, jaké mají protektivní kultury účinky na polotvrdý zrající sýr a jejich vliv na zrání sýrů. Důležitou část této práce tvoří kapitola o bakteriocinech, jejich vlastnostech a účincích v potravinářství. V praktické části je pozorován vliv protektivních kultur na chemické vlastnosti. Zaměřila jsem se na kyselost sýrů, pH, sušinu a obsah soli v sýru. Porovnávány byly sledované ukazatele u sýrů bez a s přidáním protektivních kultur. Je sledováno, zda protektivní kultury ovlivňují kvalitu a trvanlivost polotvrdých zrajících sýrů.

Klíčová slova: sýr, protektivní kultury, bakteriociny, zrání.

ABSTRACT

The aim of this thesis is to investigate the topic of protective cultures. The work deals with the effects of protective cultures on semi-hard ripened cheeses, and their impact on a process of ageing on given types of cheese. An important part of this thesis is represented in a chapter that deals with bacteriocins, their properties and effect in food processing. The effect of protective cultures on the chemical properties is observed in the practical part of the thesis. This part monitors mainly acidity of cheeses, pH, dry matter, and content of salt in cheeses. Given indicators are compared with and without addition of protective cultures on cheeses. In conclusion, this thesis observes if the protective cultures affect quality and shelf-life of semi-hard ripened cheeses.

Keywords: cheese, protective culture, bacteriocins, ripening

Obsah

1	ÚVOD.....	9
2	CÍL PRÁCE.....	10
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1	Zrání sýrů	11
3.1.1	Fáze zrání.....	12
3.1.1.1	Primární fáze	12
3.1.1.2	Sekundární fáze	13
3.1.1.3	Terciální fáze	13
3.2	Mikrobiální změny v průběhu zrání sýrů.....	14
3.3	Protektivní kultury	14
3.3.1	Charakteristika protektivních kultur	15
3.4	Vliv a účinek protektivních kultur	16
3.4.1	Proteolytická a lipolytická aktivita	17
3.4.2	Citrátový metabolismus	18
3.4.3	Konjugovaná kyselina linolová	18
3.4.4	Produkce bakteriocinů	19
3.5	Charakteristika bakterií mléčného kysání s protektivními účinky.....	20
3.5.1	Charakteristika <i>Lactobacillus plantarum</i>	20
3.5.2	Charakteristika <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	21
3.5.3	Charakteristika <i>Lactobacillus sakei</i>	22
3.5.4	Charakteristika <i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermani</i>	25
3.5.5	Charakteristika <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	25
3.5.6	Charakteristika <i>Pediococcus acidilactici</i>	26
3.5.7	Charakteristika <i>Streptococcus thermophilus</i>	27
3.5.8	Charakteristika <i>Enterococcus faecium</i>	28
3.6	Rozdělení a působení bakteriocinů	29
3.6.1	Rozdělení bakteriocinů	29
3.6.1.1	Bakteriociny I. Třídy - Lantibiotika	30
3.6.1.2	Bakteriociny II. třídy	34
3.6.1.3	Bakteriociny III. třídy	35
3.7	Aplikace a použití bakteriocinů	36
3.7.1	Bakteriociny a aplikace v potravinách a potravinářství.....	36
3.7.2	Bakteriociny a aplikace v lékařství.....	38
3.8	Ochranné a zrací materiály.....	38
3.8.1	Sýrařské vosky.....	39

3.8.2	Plastické nátěry	40
3.8.3	Smršťovací obaly – vakuové balení.....	41
4	MATERIÁL A METODIKA.....	42
4.1	Použitý materiál	42
4.1.1	Mléko	42
4.1.2	Syřidlo.....	42
4.1.3	Chlorid vápenatý.....	43
4.1.4	Zákysové kultury	43
4.1.5	Ochranný nátěr.....	44
4.1.6	Sůl	44
4.2	Pomůcky.....	44
4.3	Metodika	46
4.3.1	Postup výroby polotvrdého zrajícího sýra	46
4.3.2	Laboratorní výroba sýrů.....	48
4.3.3	Chemická analýza	49
4.3.3.1	Stanovení sušiny	49
4.3.3.2	Stanovení aktivní kyselosti.....	49
4.3.3.3	Stanovení titrační kyselosti.....	50
4.3.3.4	Stanovení obsahu soli	51
4.3.3.5	Statistické zpracování dat	51
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	52
6	ZÁVĚR	60
7	LITERATURA	62
8	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	74
9	SEZNAM TABULEK	75
10	PŘÍLOHY	76

1 ÚVOD

Činnost startovacích a zracích kultur je významná pro kvalitu a mikrobiální zdravotní nezávadnost sýrů. Bakterie mléčného kysání (dále BMK) jsou v dnešní době přidávány do mléka, ze kterého je vyráběn sýr, aby produkovaly z laktózy kyselinu mléčnou. Některé druhy těchto bakterií jsou známy i tím, že umí produkovat např. ethanol, oxid uhličitý nebo organické kyseliny. Dále přispívají k biochemickým změnám během zrání a vyvíjí charakteristiku sýrů. BMK se vyskytují ve fermentovaných produktech (fermentovaná zelenina, nápoje, maso), v mléce a mase. V potravinářství jsou využívány především BMK, které dokáží produkovat tzv. bakteriociny. Tyto kultury nazýváme protektivní, které mají přírodní charakter ochrany potravin. Mají schopnost inhibovat nebo zpomalovat růst patogenních mikroorganismů (znehodnocování a kažení potravin). Díky produkci bakteriocinu pomáhají protektivní kultury zlepšovat organoleptické vlastnosti potravin a přispívají k prodloužení trvanlivosti potravin.

Bakteriociny jsou tvořeny peptidy. Tyto peptidy mají různou velikost, strukturu, způsob účinku, antimikrobiální účinnost, imunitní mechanismus. Používání bakteriocinů je považováno za přírodní konzervaci, která prodlužuje trvanlivost, je šetrnější a zvyšuje bezpečnost potravin. Díky tomu se snižuje používání chemické konzervace nebo tepelného ošetření.

2 CÍL PRÁCE

Diplomová práce na téma „Vyhodnocení kvality a trvanlivosti sýrů s protektivní kulturou“, se zabývá problematikou používání bakterií mléčného kysání s protektivními účinky a vlivem na kvalitu a trvanlivost polotvrdých sýrů. Práce dále rozvíjí problematiku bakteriocinů a informuje o využití protektivních kultur.

Cílem práce bylo posoudit vliv vybraných protektivních kultur na průběh zrání sýrů. Zaměřit se přitom především na sledování kvalitativních ukazatelů vyrobených sýrů (pH, SH, sušiny, obsah soli).

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Zrání sýrů

Zrání je jednou z posledních fází výroby sýrů, při které se dotváří konečný vzhled, konzistence, vůně, chuť a osobitý charakter. Mluvíme o složitém biochemickém procesu, na kterém se podílejí zejména enzymy syřidla (chymozin, pepsin), nativní enzymy mléka (plasmin, proteinázy somatických buněk), enzymy kyselých a doplňkových kultur (zástupci rodu *Lactococcus* a *Lactobacillus*) a v neposlední řadě enzymy nezákových mikroorganismů (NSLAB). Tyto nezákové kultury ovlivňují mikroflóru sýra v průběhu zrání (RANDAZZO et al., 2013; SETTANNI, MOSCHETTI, 2010).

Schopnost lyzovat je důležitou schopností uvedených mikroorganismů, při které dochází k uvolnění intracelulárních 29 enzymů. Tyto enzymy pak během zrání procesu ovlivňují proteolýzu (rozklad bílkovin), lipolýzu (rozklad tuků), katabolismus aminokyselin a volných mastných kyselin. Tyto procesy jsou nezbytné pro vývoj chuti a vůně sýrů. Největším změnám v průběhu zrání podléhají mléčné bílkoviny a laktóza, u některých druhů i tuk a zastoupení solí. Dochází také k texturním změnám. Sýry se stávají stejnoměrnější a elastičtější díky tomu, že sýrové zrno ztrácí svou původní strukturu a rozptyluje se v celé sýrové hmotě. Ze sýru se také postupně odpařuje voda a díky enzymové aktivitě mírně vzrůstá pH sýru (PLOCKOVÁ et al., 2010; MCSWEENEY, 2007; ŠUSTOVÁ et al., 2014).

Technologické operace při výrobě sýrů různých typů jsou zaměřeny na regulaci aktivity kultur. Ty závisí na rozsahu a rychlosti fermentace laktózy. Laktóza je u většiny sýrů fermentovaná už během lisování, nejpozději však během prvního nebo druhého týdne zrání. Fermentace laktózy probíhá při fázi tzv. předběžného zrání sýrů, která spočívá ve zpracování mléka, sýřeniny, formování a solení. Během 24 hodin je nutno dosáhnout požadované hranice kyselosti (u tvrdých sýrů pH 5,2, u měkkých sýrů 4,8 – 5). Také titrační kyselost musí dosáhnout vysokých hodnot (v průměru okolo 80 – 90 °SH). Kyselina mléčná je neutralizovaná pufráčními složkami mléka. Dále je pak jako sraženina zachycena jako mléčnan. Mléčnan je poté využíván jako substrát pro další kultury (např. propionové kvašení). Při máselném kvašení může být mléčnan rozkládán za vzniku vodíku, oxidu uhličitého a těkavých mastných kyselin. Vzhledem k vysoké tvorbě vodíku dochází k popraskání sýrů při tzv. pozdním duření (KADLEC et al., 2012; CARROLL, 2002).

U polotvrdých a tvrdých sýrů je charakteristickým znakem zrání rozklad bílkovin. Na rozkladu bílkovin se podílí syřidlo, mikrobiální proteolytické enzymy a plasmin (nativní proteáza mléka). Při nevhodném zrání mohou vzniknout nežádoucí až škodlivé produkty degradace aminokyselin – amoniak, močovina, kyselina máselná, vodík, biogenní aminy. Na chuti sýra se podílejí také vznikající těkavé mastné kyseliny (KADLEC et al., 2012).

Zrání probíhá buď v celé hmotě sýra (anaerobně) nebo od povrchu dovnitř (aerobně) působením povrchové mikroflóry. V mnoha případech se oba typy zrání doplňují. U tvrdých sýrů převažuje zrání anaerobní (KADLEC et al., 2012).

3.1.1 Fáze zrání

Veškeré probíhající biochemické procesy v sýrech mohou být rozděleny do tří základních fází, které na sebe vzájemně navazují a nejsou od sebe nijak výrazně odděleny (GAJDŮŠEK, 2002).

3.1.1.1 Primární fáze

Tato fáze je charakterizována přeměnou laktózy na kyselinu mléčnou pomocí bakterií mléčného kysání a současný částečný rozklad bílkovin. Primární fáze začíná již během úpravy mléka a syření, dále během zpracování syřeniny, formování, lisování a solení. Jedná se o tzv. předběžné zrání ovlivňující strukturu, konzistenci a další průběh zrání (ŠUSTOVÁ, SÝKORA, 2013). V této fázi je nutné dosáhnout během 24 h požadované hranice kyselosti. U tvrdých sýrů se jedná o pH 5,2 a u měkkých sýrů o pH 4,8 – 5,0 (KADLEC, 2012).

Bakterie uplatňované v průběhu zrání jsou rodu *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* buď mezofilní (např. smetanový zákys) nebo termofilní pro sýry s vysoko dohřívanou syřeninou (např. *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) (BERESFORD et al., 2001).

K dokysávání může dojít i v průběhu solení, pak se v první fázi solení používá solná lázeň o vyšší teplotě. V prvních dnech zrání dochází u tvrdých sýrů k úplnému vymizení posledních stop laktózy. Vzniklá kyselina mléčná uvolňuje z kaseinu vápník za vzniku mléčnanu vápenatého. V konečné fázi z kaseinu vzniká monokalciumpkaseinát, který bobtná ve vodě a v roztoku chloridu sodného. Vápenatá sůl kaseinu výrazně

ovlivňuje slepování sýřeniny a vznik homogenní struktury sýrů. Zastoupení solí v sýrech ovlivňuje kyselina mléčná. Během 24 h dochází k přeměně anorganických solí fosfátu a převážné části (80 %) vápenatých solí v rozpustné soli. Tyto soli pak ovlivňují výslednou kyselost sýra (GAJDŮŠEK, 2002).

3.1.1.2 Sekundární fáze

Sekundární fáze začíná snížením titrační kyselosti sýra jednak vazbou kyseliny mléčné a jednak jejím mikrobiologickým rozkladem na kyselinu propionovou (popřípadě octovou, máselnou), oxid uhličitý a vodu, případně i další sloučeniny, nebo její vazbou na rozkladné produkty bílkovin. Vzhledem k typu sýra dochází k mikrobiologickému rozkladu kyseliny mléčné a to buď v celé hmotě (tvrdé sýry, kde se z oxidu uhličitého vytvoří typická oka a kyselina propionová), nebo aerobně od povrchu dovnitř mikroflórou na povrchu sýra (GAJDŮŠEK, 2002).

3.1.1.3 Terciální fáze

Tato fáze je také označována jako vlastní (hlavní) zrání, kde dochází k dalšímu rozkladu bílkovin a rovněž k hydrolýze tuků (KALHOTKA, 2014). Míra zrání je přímo úměrná a to k obsahu vlhkosti sýra během zrání, kdy se v důsledku mikrobiologických, biochemických a chemických procesů mění důležité složky v sýru. Jedná se o bílkoviny, lipidy a laktózu, které jsou transformovány na primární a později sekundární produkty zrání. Z bílkovin se postupně rozkládají peptidy, aminokyseliny, aminy a thiole. Z tuků se rozkládají mastné kyseliny, methylketony, laktony, estery. Vyskytují se zde i organické kyseliny (mléčná, octová nebo propionová) aj. Míra zastoupení těchto sloučenin a výše jejich obsahu jsou odpovědné za charakteristickou chuť sýrů. (WALLACE, FOX, 1998).

Hlavní zrání sýrů probíhá ve zracích sklepech nebo komorách, kde musí být vytvořené a udržované optimální podmínky odpovídající danému druhu sýra. V místnostech, kde probíhá zrání, musí být udržována stálá požadovaná teplota a potřebná vlhkost, případně regulována intenzita proudění vzduchu. Neměly by tam pronikat přímé sluneční paprsky. Ve zracích místnostech by měla být pouze mikroflóra, která je potřebná pro daný druh sýra. Dbát se musí také na ochranu před nežádoucími plísněmi a před škůdci sýrů (mouchy, hlodavci) (KADLEC et al., 2012; ŠUSTOVÁ, 2014).

V průběhu zrání se sýry obracejí, umývají a propíchávají. Některé sýry zrají v obalech, které následně slouží i jako expediční obal. Jiné zase zrají pod ochrannými nátěry. Tímto se snižuje pracnost při ošetřování a regulují se ztráty během zrání. Podmínky zrání jsou závislé na typu sýra a určují ztráty hmotnosti, rychlost zrání, tvorbu kůry, mazu apod. Základními parametry pro zrání jsou doba zrání a teplota. U sýrů nezrajících v obalech ještě mluvíme o relativní vlhkosti (KADLEC et al., 2012; ŠUSTOVÁ, 2014).

3.2 Mikrobiální změny v průběhu zrání sýrů

Zákysové kultury během solení sýrů mohou dosáhnout počtů přibližně $10^7 - 10^{9-10}$ CFU/g. V průběhu několika prvních týdnů jejich počet u většiny sýrů klesá, přičemž rychlost poklesu závisí na použitých kmenech zákysových kultur. Přírodní sýr je pro mikroorganismy nehostinným prostředím, a to z důvodu jeho nízkého pH, relativně vysokého obsahu soli a absence významného množství zkrasitelných sacharidů. Po buněčné smrti nastává lyze buněk a uvolněné enzymy také přispívají ke zrání sýrů (MCSWEENEY, 2013).

U většiny sýrů platí, že po přibližně dvou měsících zrání zákysové kultury nejsou dominantní mikroflórou. Dominují z velké části spíše "divoké" nezákysové mikroorganismy (non-starterové bakterie mléčného kvašení; NSLAB). Jedná se o sekundární mikroflóru, jejíž počty se na počátku zrání pohybují v množství $< 10^2$ CFU/g, a ve zralých sýrech se zvyšují na hodnoty $10^7 - 10^8$ CFU/g. NSLAB jsou tvořeny zejména heterofermentativními laktobacily především *Lactobacillus paracasei* a *Lactobacillus casei*. Růst NSLAB je velkou měrou ovlivněn teplotou zrání a rychlostí chlazení jednotlivých šarží sýrů (MCSWEENEY, 2013).

3.3 Protektivní kultury

Součástí startovacích kultur mohou být protektivní kultury. Startovací kultury se používají při výrobě fermentovaných potravin jako např. jogurty, sýry, klobásy, zelenina aj. (COELHO et al., 2014; SETTANNI, MOSCHETTI, 2010).

Již od starověku bylo praktikováno použití bakterií mléčného kvašení (BMK), které zpomalují růst nežádoucích mikroorganismů. Tímto použitím BMK bylo docíleno prodloužení údržnosti potravin. Z počátku se jednalo o intuitivní praktiky, ty ale byly

následně opřeny výsledky vědeckých pokusů. Za jednoho z prvních badatelů věnujících se této oblasti byl považován Louis Pasteur. Během první poloviny dvacátého století byla provedena základní charakteristika antimikrobiálních látek, které mikroorganismy produkují (bakteriociny). V roce 1953 byl v Anglii jako první na trh uveden jeden z nejvýznamnějších zástupců bakteriocinů nisin. Za posledních třicet let se gram-pozitivní bakterie a především BMK staly významnou součástí při přírodní konzervaci potravin a součástí protektivních kultur označovaných taky jako „ochranné“ kultury (LACROIX, 2011).

Zavedení těchto protektivních kultur v sýrařském průmyslu může prospět ostatním klasickým opatřením (např. pasterizace mléka, užití definované startovací kultury) ke kontrole rozvoje nechtěných mikroorganismů a dalšímu vylepšení kvality a bezpečnosti sýrů (GRATTEPANCHE et al., 2008).

V posledních letech je protektivním kulturám a bakteriocinům, které je mohou produkovat, věnována velká pozornost. Tyto kultury jsou schopny omezovat růst patogenních mikroorganismů a to především *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. botulinum* a *C. tyrobutyricum*, vyskytujících se především u sýrů. Vzhledem k jejich metabolickým vlastnostem přispívají ke konečné chuti výrobků a antimikrobiální aktivita prodlužuje jejich trvanlivost. Použití protektivních kultur při výrobě sýrů a mléčných výrobků vede ke zvýšení bezpečnosti daných potravin a dále ke zlepšení organoleptických a nutričních vlastností (COELHO et al., 2014).

Christiansen et al. (2005) pozorovali antiklostridiální aktivitu laktobacilů, které byly izolovány z polotvrdých sýrů. Bylo vyizolováno kolem 400 kmenů laktobacilů z těchto sýrů, z nichž nejvyšší počet měl *Lactobacillus paracasei*. Výsledky ukázaly, že *Lactobacillus* rostoucí ve vysoce kvalitních polotvrdých sýrech, by mohl být užitečný i jako ochrana pomocných kultur proti růstu klostridií.

3.3.1 Charakteristika protektivních kultur

Přírodní konzervace potravin zahrnují procesy ke zlepšení a zachování zdravotní nezávadnosti za použití mikroorganismů nebo jejich extracelulárních metabolitů, které jsou schopny inhibovat růst jiných mikroorganismů v důsledku produkce antimikrobiálních látek. Dále dané procesy vedou k prodloužení údržnosti potravin. Jedná-li se o potraviny k přímé spotřebě, je nejdůležitějším aspektem zdraví spotřebitele. Startovací kultura má především technologický význam (zejména cílená produkce

kyseliny mléčné), kdežto aplikace kultury protektivní má za účel produkovat látky s antimikrobiálním účinkem, které mají nezanedbatelný potenciál ke zlepšení mikrobiologické bezpečnosti potravin. Tím se podporuje systém správné výrobní praxe a dochází ke snížení rizika růstu a přežívání patogenů. Důležitým předpokladem pro úspěšnou aplikaci protektivních kultur je tedy schopnost produkovat dostatečně aktivní metabolity působící proti širokému spektru příslušného patogenního mikroorganismu, původcům znehodnocujícím potraviny nebo plísním (MESSENS, VUYST, 2002; GHANBARI et al., 2013).

Obecné mechanismy interference nejsou zcela objasněny. Předpokládá se, že mezi organizmy dochází ke konkurenčnímu boji o živiny (využívají dostupný zdroj uhlíku rychleji než konkurence, která je nežádoucí) a adhezní místa, k nežádoucím změnám životního prostředí nebo ke kombinaci těchto popsanych jevů (LACROIX, 2011).

Každá antimikrobiální látka, která se používá při konzervaci potravin, nepůsobí samostatně, ale dochází k součinnosti dalších látek, což má za následek vyšší účinnosti a vznik tzv. bariérového efektu (SCHNÜRER, MAGNUSSON, 2014).

Některé BMK jsou spojovány s negativní činností, a to s kažením potravin či možnou patogenitou, ale většina z nich je neškodná. Některé kmeny BMK jsou obecně považovány za bezpečné (seznam GRAS). Protektivní kultury musejí splňovat tyto důležité požadavky:

- musejí být bezpečné a nesmějí představovat zdravotní riziko;
- schválené, zapsané na seznamu GRAS;
- nesmějí mít negativní vliv na senzorické vlastnosti produktu;
- účinné i při nízkých koncentracích;
- dostupné ekonomicky a jednoduché na přípravu;
- musejí být stabilní při zpracování a skladování;

(GHANBARI et al, 2013; LACROIX, 2011; JAY, 2005).

3.4 Vliv a účinek protektivních kultur

K výrobě mléčných fermentovaných výrobků jako jsou např. sýry, jogurty jsou nejdůležitější BMK, které díky fermentaci přeměňují laktózu na kyselinu mléčnou a další organické kyseliny. Ty pak mají za následek snížení pH, čímž dochází k inhibici nežádoucích patogenních mikroorganismů a následného znehodnocení potraviny. BMK

navíc vyprodukují celou řadu sekundárních metabolitů, které mohou mít za následek znehodnocení chuti, vůně a struktury. Tyto bakterie díky svým proteínázám a peptidázám napomáhají k trávení mléčných bílkovin (HATI et al., 2013).

Funkční startovací kultury BMK jsou definovány jako kmeny, které se používají při potravinářských fermentacích a které mají určité funkční vlastnosti poskytující konečnému produktu přidanou hodnotu (např. u výrobců bakteriocin). Těmito vlastnostmi mohou přispět k mikrobiální bezpečnosti nebo k senzorické, technologické, nutriční nebo zdravotní výhodě u dané potraviny. Kultury produkují antimikrobiální látky např. bakteriociny, čímž se zajistí bezpečnost potravin, cukerné polymery pro zlepšení struktury, aromatické sloučeniny, které jsou žádoucí k posílení chuťových vlastností (HATI et al., 2013).

3.4.1 Proteolytická a lipolytická aktivita

V mlékárenské technologii je proteolytické působení bakterií mléčného kysání velmi důležité. Na jedné straně se projevuje produkcí inhibičních látek a změnou prostředí, které je pro ostatní bakterie nevhodné (nízké pH, nízký redoxní potenciál, organické kyseliny, peroxid vodíku, antibiotické látky), na druhé straně mění svými enzymy složky potravin tak, aby vyhovovaly jejich náročným nutričním požadavkům (GÖRNER, VALÍK, 2004).

Proteolytický systém laktobacilů a nezákysových bakterií mléčného kysání je složen ze dvou skupin proteolytických enzymů. Jedná se o proteázy, které jsou schopny hydrolyzovat bílkoviny, a peptidázy, které štěpí peptidy vzniklé z bílkovin. Proteolytické enzymy bakterií mléčného kysání hrají významnou roli při rozkladu kaseinu a peptidů za vzniku volných aminokyselin. Některé enzymy jsou schopny hydrolyzovat peptidy zodpovědné za hořkou chuť sýrů (TŮMA, PLOCKOVÁ, 2007).

Mnoho laktobacilů má lepší proteolytické schopnosti než laktokoky, zejména aminopeptidasovou aktivitu, a tvoří lépe volné aminokyseliny. Podle předpokladů jsou aminopeptidasy zodpovědné za redukci hořkosti v sýrech, neboť štěpí tzv. hořké peptidy (TŮMA, PLOCKOVÁ, 2007).

V procesu zrání sýrů se štěpení bílkovin uplatňuje ve významné míře. Jednou z hlavních úloh BMK je vytvořit pro požadované biochemické pochody vhodné vnitřní prostředí v sýrech z hlediska jejich kysnutí a zrání. Jedná se například o substrát, aktivitu vody, pH, redoxní potenciál nebo texturu a vhodné vnější podmínky, mezi které patří například teplota, vlhkost vzduchu, složení atmosféry nebo čas procesu. Během zrání jsou

změněny reologické vlastnosti sýřeniny. Textura zmiňované sýřeniny se mění z pružné na neelastickou. K těmto změnám textury dochází především štěpením α_{s1} – kaseinu, který tvoří silné interakce s ostatními kaseiny a váže je strukturálně. Tyto vazby jsou pak oslabovány štěpením vazeb α_{s1} – kaseinu. Při zrání také vznikají nízkomolekulární peptidy a volné aminokyseliny, které se účastní na tvorbě chuti a aromatu sýrů, zvyšují pufrační kapacitu suroviny a podporují růst sekundární mikroflóry (GÖRNER, VALÍK, 2004).

Proteolytické vlastnosti bakterií mléčného kysání se využívají v potravinářské technologii hlavně k prodlužování trvanlivosti a dále při výrobě zralých a fermentovaných potravin k získání požadovaných organoleptických a reologických vlastností (GÖRNER, VALÍK, 2004).

BMK obsahují různé druhy a kmeny. Tyto druhy a kmeny se od sebe liší především schopností hydrolyzovat proteiny. Je to částečně způsobeno organizací jejich proteolytického enzymového systému. Termofilní tyčinky bakterií mají obvykle vyšší proteolytickou kapacitu na rozdíl od druhu mezofilních a termofilních koků. Lipolytická aktivita BMK je častokrát nějak limitována. Zahrnuje hydrolýzu mono- a diglyceridů, které vznikají z triglyceridů cizími lipázami. BMK mohou mít cholinesterázy, které usnadňují esterifikaci mastných kyselin (WALSTRA et al., 2006).

3.4.2 Citrátový metabolismus

Citrát se nachází v mléku, zelenině, ovocných džusech a může být přidáván také jako konzervační látka do potravin. Při metabolizování citrátu bakteriemi mléčného kysání vzniká stejně jako při glykolýze pyruvát. Přeměna pyruvátu pomocí BMK může vytvářet různé konečné produkty jako je například laktát, formiát, acetát, ethanol a aromatické sloučeniny se čtyřmi atomy uhlíku (C4) diacetyl, acetoin a butadiol. Máslové aroma mléčných výrobků, které sledujeme u másla, kyselý smetany či tvarohu, způsobuje diacetyl. Je také důležitou složkou chuti u některých druhů sýrů a jogurtu. Využití citrátu v mléce má velice pozitivní vliv na kvalitu konečných produktů (LÓPEZ et al., 2008).

3.4.3 Konjugovaná kyselina linolová

Konjugovaná kyselina linolová může mít významné zdravotní přínosy pro člověka včetně prevence rakoviny, modulaci imunitní odpovědi a hubnutí. Prospěšná je taky díky antimikrobiálním, antikarcinogenním a protizánětlivým účinkům a inhibuje nástup diabetu. Pozitivní nutriční obraz těchto potravin se zvyšuje vzhledem k zjištění, že mléčné

produkty jsou dobrým zdrojem konjugované kyseliny listové (CLA). Obsah v mléčných výrobcích je ovlivněn plemenem, stářím a stravou, přičemž strava je nejdůležitější a nejjednodušší na manipulaci za účelem zvýšení konečného obsahu CLA mléčných výrobků. V sýrech se vyskytuje CLA v rozmezí od 3,6 do 8 mg.g⁻¹ celkového množství tuku (MERAZ-TORRES, HERNANDEZ-SANCHEZ, 2012; YDAV et al., 2008).

3.4.4 Produkce bakteriocinů

Bakteriociny, které jsou produkovány mléčnými bakteriemi, jsou bílkovinné látky vykazující antimikrobiální aktivitu vůči významným potravním patogenům a také mikroflóře způsobující kažení. Kmeny bakterií, které je produkují, nebo přímo purifikované bakteriociny, mohou nacházet uplatnění v systému konzervace potravin. Jejich použití může vést ke snížení chemické konzervace nebo snížení tepelného ošetření. Díky použití bakteriocinů šetrněji a přirozeněji prodlužujeme trvanlivost potravin a zvyšujeme jejich bezpečnost. V poslední době dochází u potravin ke změně převažující škodlivé mikroflóry, a to především díky tomu, že se k prodlužování údržnosti potravin používají ve značné míře postupy, jako je například vakuové balení, balení v modifikované atmosféře a chlazení. Při tomto způsobu prodloužení údržnosti se negativně projevují hlavně psychrotrofní bakterie jako *C. botulinum* typ E, *Aeromonas Hydrophyla*, *L. monocytogenes* a *Yersinia enterocolitica*. Proto je pro minimálně opracované potraviny vhodnější alternativou biologický proces, za který se pokládá využití konkurujících bakterií, které navíc produkují antimikrobiální látky. Vzhledem ke své nezávadnosti prověřené historicky dlouhodobým používáním se tedy bakteriociny produkované bakteriemi mléčného kysání zdají být při výrobě fermentovaných potravin vhodnější než grampozitivní a gramnegativní bakterie (KVASNIČKOVÁ, 2006).

Bakteriociny jsou v podstatě antimikrobiální proteiny nebo peptidy, které jsou produkovány pouze bakteriemi a které jsou schopny zabíjet a inhibovat růst blízké příbuzných druhů a některých patogenů. Tyto sloučeniny jsou však výrazně odlišné od antibiotik. Tyto látky jsou vyráběny jak z prokaryotických, tak i eukaryotických mikroorganismů, a jsou inhibiční při nízkých koncentracích do jiných organismů (tj. jak prokaryot a eukaryot). Bakteriociny z BMK byly studovány v průběhu posledních 10 let a nyní jsou považovány za důležitý nástroj pro konzervaci potravin a pro kontrolu bakteriálních infekcí u lidí a zvířat (TAMIME, 2006).

3.5 Charakteristika bakterií mléčného kysání s protektivními účinky

K druhům bakterií mléčného kysání vykazující protektivní účinky řadíme především *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus paracasei*, *Propionibacterium freundenreichii* subsp. *shermanii*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Streptococcus thermophilus* a *Enterococcus faecium*. Tyto bakterie jsou schopné produkovat bakteriociny, díky nimž je zajištěna ochrana fermentovaných výrobků proti růstu patogenních nebo toxikogenních mikroorganismů. Do této skupiny spadá *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* a *Staphylococcus aureus*. Mezi další funkce patří kontrola růstu kvasinek a plísní ve fermentovaných výrobcích. Pomáhají tak zvyšovat trvanlivost a zlepšují organoleptické vlastnosti potravin (MEŠKOVÁ, 2015).

3.5.1 Charakteristika *Lactobacillus plantarum*

Jde o grampozitivní bakterii, která patří do tzv. homofermentativních mléčných bakterií. Je to dáno tím, že při fermentaci laktózy produkuje prakticky pouze kyselinu mléčnou. Díky tomu, že mléčná kyselina zastavuje rozmnožování hnilobných bakterií a stafylokoků, využívá se tato činnost pro konzervaci zeleniny i některých krmiv (kysání zelí a okurek, silážování jetelovin a vyslazených řepných řízků apod.) (ANONYM, 2017; ŠILHÁNKOVÁ, 2002; ŠALÁKOVÁ et al., 2015).

Lactobacillus plantarum (Obr. 1) řadíme mezi prospěšné bakterie, které se využívají pro zlepšení zdravotního stavu. Poprvé byl izolován v lidských slinách. Nejvíce se vyskytuje v gastrointestinálním traktu zvířat i lidí a v rostlinném materiálu. Má osvědčenou schopnost přežít žaludeční tranzit a může kolonizovat střevní trakt lidí a jiných savců. Je také součástí keřirových zrn a najdeme ho i v pekařském kvásku spolu s heterofermentativními druhy *L. brevis* a *L. fermentum* (ŠILHÁNKOVÁ, 2002; DE VRIES et al., 2006).

Tato bakterie tvoří bakteriocin ST16Pa o velikosti 6,5 kDa, který inhibuje růst nežádoucích bakterií (*Enterobacter*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* a *Staphylococcus*). Dále také může ničit patogeny a zároveň zachovat důležité vitamíny a antioxidanty. Využití nachází také při konzervaci potravin. Bylo prokázáno, že *Lactobacillus plantarum* je účinný při léčbě Crohnovy choroby, kolitidě a dráždivého tračníku (ŠALÁKOVÁ et al., 2015; MOLIN, 2001).

Dále je schopný produkovat antimikrobiální peptidy a exopolysacharidy, čímž je schopen udržovat pH gradient uvnitř buněk v přítomnosti velkého množství acetátu nebo laktátu. Je velice adaptabilní v různých prostředích. Jeho výskyt roste v rozmezí teplot 15 – 45°C a při pH 3,2 a vyšším (ANONYM, 2017).



Obr. 1 *Lactobacillus plantarum* (sciencedirect.com)

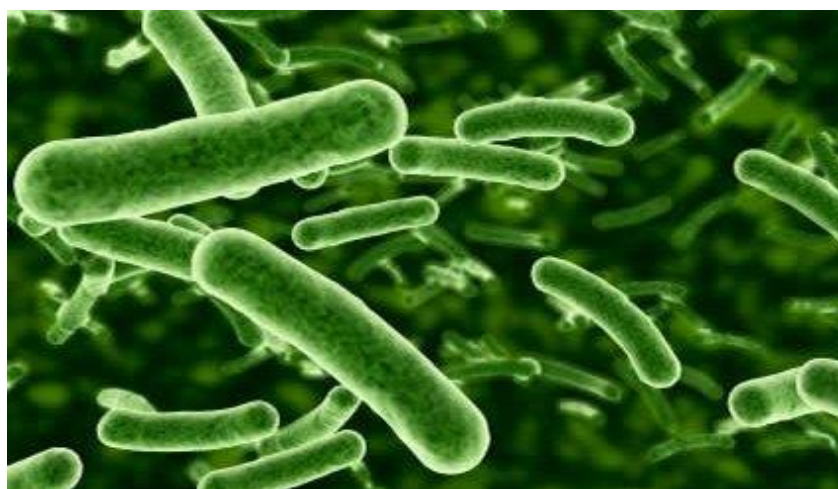
3.5.2 Charakteristika *Lactobacillus rhamnosus*

Jde o grampozitivní, fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní, nepohyblivé, nespórotvorné tyčinky. Buňky rostou samostatně nebo v krátkých řetězcích. Dobře roste v slaběkyselých médiích s počínající hodnotou pH 6,4 – 4,5. *Lactobacillus rhamnosus* je často izolován z lidské sliznice gastrointestinálního traktu. Nalezneme ho v ústech zdravých jedinců. Můžeme ho také najít v pohlavním ústrojí žen a v močových cestách. Jednou z největších zdravotních výhod je především jeho silný protizánětlivý účinek (MEDVEĎOVÁ et al., 2007; PANYKO, 2012).

Některé druhy *Lactobacillus rhamnosus* (Obr. 2) mají uplatnění jako probiotika. Díky jejich odolnosti proti působení kyselin a žluči ve střevech napomáhají udržet správnou střevní mikroflóru. Byla prokázána jejich prospěšnost při prevenci proti rotavirovému průjmu u dětí. Pozitivní účinky byly sledovány také u dermatitid, infekcí dýchacích cest, při zánětech močových cest a u syndromu dráždivého tračníku (SALMINEN et al., 2004).

Dle Tomášky et al. (2010) byla studována aktivita *Lactobacillus rhamnosus* v polotvrdých sýrech. Na základě předchozích výsledků byly vybrány dva druhy laktobacilů: *Lactobacillus rhamnosus* 65 a 123, které byly jako doplňkové kultury

kombinované s 2 druhy laktokokových startovacích kultur – ZS25 a Delvotec MT-53. Tato komerčně dostupná kultura byla použita pro porovnávací účely. Celkově bylo uskutečněno 10 poloprovozních výrob. Sušina se pohybovala v intervalu $50,59 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ – $56,27 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ($52,87 \pm 1,35$) $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$. Aktivní kyselost se měnila od 5,02 do 5,28 ($5,14 \pm 0,07$) a titrační kyselost od $86 \text{ }^\circ\text{SH}$ do $106 \text{ }^\circ\text{SH}$ ($98,40 \pm 4,11$) $^\circ\text{SH}$. Vliv použité kultury byl minimální na dané měření vlastností sýrů. Sýry s přídavkem *Lactobacillus rhamnosus* byly sensoricky lépe hodnocené. Během studie se zjistilo, že přídavek doplňkové kultury ke kultuře startovací nemá vliv na analytické vlastnosti sýrů (sušina, pH a titrační kyselost) v průběhu zrání. Tato kultura má ovšem vliv na sensorické vlastnosti.



Obr. 2 *Lactobacillus rhamnosus* (www.linkedin.com)

3.5.3 Charakteristika *Lactobacillus sakei*

Lactobacillus sakei (Obr. 3) je grampozitivní anaerobní bakterie, kterou nejčastěji nalezneme v čerstvém masu a v rybách. Tato bakterie se používá hlavně při fermentaci a to jak masných, tak i mléčných výrobků. Její vlastnosti jsou schopny zlepšit konzervaci a skladování. *Lactobacillus sakei* ke svému růstu potřebuje velké množství sacharidů. Při nedostatku sacharidů dokáže jako zdroj energie využít inosin a adenosin (PALLERA, 2011).

Tato bakterie má inhibiční účinek proti bakteriím, které kazí potraviny a potravinovým patogenům, včetně *Listeria monocytogenes*, grampozitivním, a patogenním bakteriím, zejména *Escherichia coli*, které jsou pro člověka velmi nebezpečné. Další činností je ochrana potravin před kažením, které způsobují zejména bakterie *Pseudomonas fragi* a *Brochothrix termostricta*. *Lactobacillus sakei* produkuje

bakteriocin, který najdeme pod označením sakacin P a který inhibuje růst patogenních mikroorganismů. Tento druh bakterie je pro její účinky hojně využíván (TASHAKOR et al., 2017; PALLERA, 2011).



Obr. 3 *Lactobacillus sakei* (www.gettyimages.ca)

Lactobacillus paracasei (Obr. 4) řadíme do grampozitivních, nesporulujících, homofermentativních bakterií. Běžně se vyskytuje v lidském a zvířecím zažívacím traktu. Kmeny tohoto druhu byly izolovány v různých kvašených výrobcích, jako jsou kysané mléko, sýry, kynuté pečivo, fermentovaná zelenina. Ve velké míře je používán v potravinářském průmyslu ve startovacích kulturách pro mléčné výrobky a také jako bakterie s probiotickou funkcí. Vybrané kmeny tohoto druhu jsou obsaženy také v probiotických potravinách a potravinových doplncích (PAINEAU et al., 2008; SMOKVINA et al., 2013).

Optimální teplota růstu pro *Lactobacillus paracasei* je v rozmezí od 10 °C – 37 °C. Je to velmi odolná bakterie, především vůči nízkým hodnotám pH a vykazuje střední odolnost vůči žlučovým kyselinám (PAINEAU et al., 2008).

Lactobacillus paracasei je hojně využíván při léčbě průjmů, vyskytujících se u kojenců. Patří také k součásti kojenecké výživy. Byla prokázána účinnost při léčbě pylových alergií a únavového syndromu. Pacienti, kteří užívali probiotika obsahující *Lactobacillus paracasei*, pociťovali úlevu od alergie a únavového syndromu (GREY, 2015).

Dle Havlíkové et al. (2013) byla ověřována inhibiční aktivita kmene *Lactobacillus paracasei/casei* ML4DP vůči dekarboxylázapozitivním laktobacilům (*Lactobacillus curvatus*) v sýrech vyrobených v poloprovozních podmínkách. Technologický postup byl zvolen tak, aby zachovával principy klasické výroby, ale byl přítom i jednoduchý

a opakovatelný. Vyrobené sýry byly po celou dobu výroby a zrání sledovány kvůli tomu, aby se zachytily všechny změny ve složení a zastoupení jednotlivých skupin mikroorganismů (laktokoky, halotolerantní, termorezistentní aerobní, termorezistentní anaerobní, fakultativně heterofermentativní laktobacily). Prováděny byly tyto fyzikálně-chemické rozborů: pH, SH, sušina, a_w , obsah nižších mastných kyselin. Pokusné výroby byly provedeny celkem s 8 indikátorovými kmeny *Lactobacillus curvatus*. V jedné sérii byla pokaždé jedna kontrolní výroba, která byla bez přídavku laktobacilů, jedna výroba, kde byl přídavek kmene *Lactobacillus paracasei/casei*, jedna s přídavkem indikátorového kmene *Lactobacillus curvatus* společně s *Lactobacillus paracasei/casei* a jedna, kde byl pouze kmen *Lactobacillus curvatus*. Vzorky byly odebírány následně v 1., 30., 60. a 90. dnu po výrobě. Na základě dosažených výsledků byla potvrzena antimikrobiální aktivita živých buněk testovaného kmene *Lactobacillus paracasei/casei* ML4DP. Přídavek kmene *Lactobacillus paracasei/casei* ML4DP vedl v poloprovozních podmínkách výroby sýrů ke snížení počtů KTJ/ml biogenní aminy tvořících kmenů *Lactobacillus curvatus* přibližně o 1 řád. Nebyly ovlivněny fyzikálně chemické vlastnosti vyrobených sýrů.

Dle Tůmy et al. (2006) byla testována antimikrobiální aktivita *Lactobacillus paracasei* izolovaných z polotvrdých sýrů. Tyto laktobacily ze sýrů byly izolovány v průběhu zrání. Bylo zjištěno, že největší antifungální aktivitu vykázaly *Lactobacillus paracasei* ST490 a *Lactobacillus paracasei* ST491 proti kmenům *Fusarium* a *Penicillium*. Oba kmeny inhibovaly růst mycelia více jak z 85 %. *Lactobacillus paracasei* ST68 a *Lactobacillus rhamnosus* VT1 inhibovaly plíseň *Aspergillus niger* ze všech zkoušených laktobacilových kmenů nejlépe. Kmen *Lactobacillus paracasei* ST68 projevil také antiklostridiální aktivitu proti 5 z celkových 11 testovaných kmenů *Clostridium tyrobutyricum*. V tomto výzkumu se vyskytly 4 kmeny, které měly inhibiční účinek proti klostridiím způsobeným látkou bílkovinné povahy (bakteriocinem). Předpokládá se, že antifungální a antiklostridiální aktivita kmenů *Lactobacillus paracasei* vyskytující se v sýru by mohla být použita k otlacení nežádoucích plísní a *Clostridium* v průběhu zrání. Ze závěru vyplývá, že použití tohoto kmene jako doplňkové kultury nebo jako součást multi-kmenových kultur by mohlo mít přínos při výrobě polotvrdých sýrů.



Obr. 4 *Lactobacillus paracasei* (www.utraingredients.com)

3.5.4 Charakteristika *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermani*

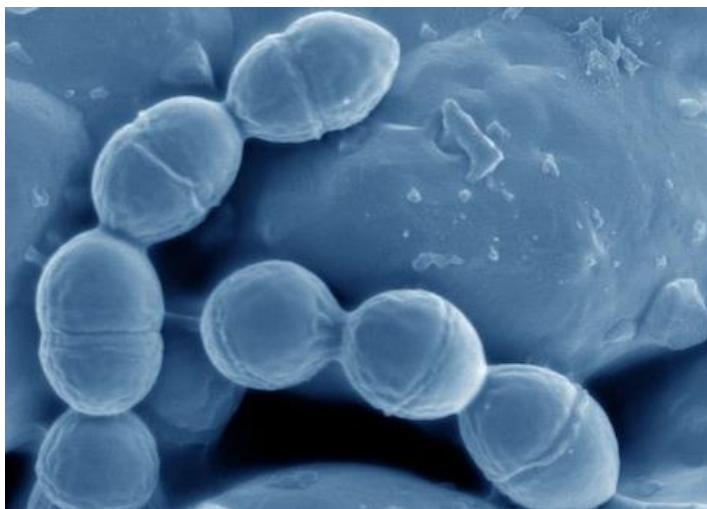
Propionibacterium freudenreichii subsp. *Shermani* patří mezi grampozitivní, nesporulující, anaerobní a aerotolerantní tyčinky. Nejlépe tento kmen roste při teplotě 30 °C a za 5 – 6 dní vytváří na médiu kolonie. Nejlepším prostředím pro jeho růst je agarová půda (GAUTIER et al., 1996).

Propionibacterium freudenreichii je velice potřebný při výrobě sýru Ementál. *Propionibacterium* roste v průběhu zrání při teplotě 24 °C a přeměňuje laktát na acetát, propionát a CO₂. Propionát a acetát způsobují ořechovou a sladkou chuť sýra, přičemž CO₂ zajistí vznik charakteristických ok v sýru. *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermani* zodpovídá za tvorbu chuťových látek. Především díky výrobě vitamínu B12 a inhibici nežádoucí mikroflóry fermentovaných potravin se prostřednictvím uvolňování organických kyselin a bakteriocinů ukázaly jako vhodný způsob modulace mikroflóry tlustého střeva jak u lidí, tak i u zvířat (LEVERRIER et al, 2003).

3.5.5 Charakteristika *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Lactococcus lactis subsp. *lactis* (Obr. 5) vytváří ovoidní buňky o průměru 0,5 - 1,0 μm. Jedná se o grampozitivní nepohyblivé koky, které netvoří spory a mohou se vyskytovat v párech nebo v řetězcích. Tento druh patří mezi jeden z nejrozšířenějších mikroorganismů a produkuje velmi známý bakteriocin nisin. Tento bakteriocin se používá jako přírodní antimikrobiální činidlo s aktivitou proti širokému spektru grampozitivních bakterií včetně potravinových patogenů. Jedná se především o tyto patogeny: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* a *Clostridium botulinum*. Používá se také jako konzervační látka pro tepelně zpracované potraviny s nízkým pH. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* se běžně používá jako startovací kultura pro výrobu sýrů

a dalších mléčných výrobků. Metabolická aktivita *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* určuje pH, texturu, chuť i další organoleptické vlastnosti sýrů. Laktózu fermentuje homofermentativně na kyselinu mléčnou. Pro tento druh je typické, že neprobíhá fermentace sacharózy, a pokud probíhá, tak jen v malé míře. V mléce tvoří okolo 0,8 až 0,9 % kyseliny mléčné (GÖRNER, VALÍK, 2004; LARSEN et al., 2016; TODAR, 2008; ŠALÁKOVÁ et al., 2015).

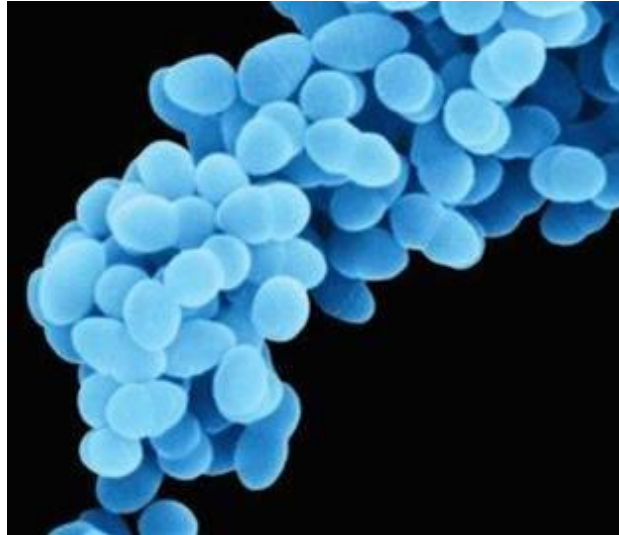


Obr. 5 *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (textbookofbacteriology.net)

3.5.6 Charakteristika *Pediococcus acidilactici*

Pediococcus acidilactici (Obr. 6) jsou grampozitivní, stejnoměrné nesporelující koky, které jsou nepohyblivé. Vyskytují se buď samostatně, v párech nebo ve dvou rovinách s pravými úhly vytvářející tetrády. Z hlediska vztahu ke kyslíku se řadí mezi fakultativně anaerobní. Optimální kultivační teplota je 41 °C a roste při pH 4,2 – 8,0 (PORTO et al., 2017, ANONYM 3, 2017).

Tento druh najdeme zejména v rostlinném materiálu. Setkat se s ním můžeme také v mléku, mase, rybách. Hojně používán je při fermentaci zeleniny, masa a ryb. Najít ho můžeme u některých sýrů především jako cizí kulturu a občas je používán i při fermentaci mléka. Některé kmeny se vyznačují antimikrobiální aktivitou, a proto je využíván ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu. Vyznačuje se hlavně produkcí bakteriocinů, které chrání fermentované produkty proti kažení nebo proti napadení patogenními bakteriemi. Bakteriocin produkovaný tímto druhem je označován jako pediocin (HOLLAND, et al., 2011; PORTO et al., 2017).

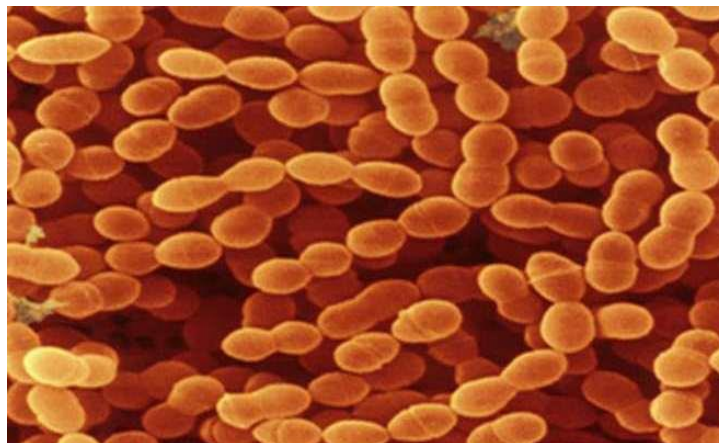


Obr. 6 *Pediococcus acidilactici* (probioticsdb.com)

3.5.7 Charakteristika *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus thermophilus (Obr. 7) se řadí do skupiny termofilních, homofermentativních bakterií mléčného kysání. Bývá používán při výrobě sýrů s vysokými teplotami vaření. Tradičně bývá používán společně s rodem *Lactobacillus* (*Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*) do startovacích kultur, nejčastěji při výrobě jogurtů a při výrobě švýcarských a italských sýrů. Patří dále do skupiny grampozitivních bakterií. Optimálního růstu dosahuje při teplotách v rozmezí 40 až 45 °C (RANDAZZO , 2013).

Výrobky, ve kterých byl ke kysání použit *Streptococcus thermophilus*, se vyznačují tím, že jsou náchylnější k infekci bakteriofágy, čímž může dojít ke zpomalení produkce kyseliny mléčné a následně až ke ztrátě výrobku (HARNETT, et al., 2011).

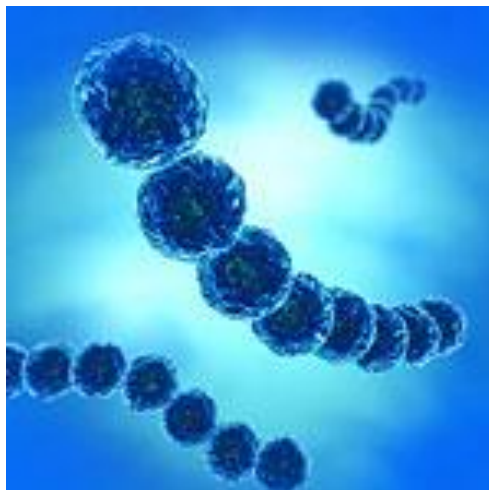


Obr. 7 *Streptococcus thermophilus* (probioticsamerica.com)

3.5.8 Charakteristika *Enterococcus faecium*

Rod *Enterococcus* jsou všudypřítomné mikroby. Najdeme ho v gastrointestinálním traktu celé řady živočichů, dále se také nachází v dutině ústní a vaginálním traktu. Enterokoky se obecně používají k prodloužení doby skladovatelnosti a zlepšení hygienické bezpečnosti potravin. Hrají významnou roli při rozvoji sensorických charakteristik v průběhu zrání sýrů a byly také použity jako složky startovacích kultur při výrobě sýrů. Tyto bakterie účinkují proti celé řadě grampozitivních patogenů včetně *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus*. Vzhledem k jejich schopnosti vydržet teplo a další nepřátelské prostředí je najdeme v různých potravinách, jako jsou mléko, sýr, fermentované klobásy a olivy (KARIMAEI et al., 2016; GIRAFFA, 2003).

Enterococcus faecium (Obr. 8) je grampozitivní bakterie, která tvoří páry, ale mohou se vyskytovat i v řetězcích. Jedná se o lidský patogen, který způsobuje infekci močových cest, endokarditidu a infekce pooperačních ran. Po dlouhou dobu může přežívat v půdě, odpadech a také na různých pracovních plochách. Přežívá v kyselém či zásaditém prostředí (mezi 4,0 – 9,6). Mají široký rozsah teplot, které mohou přežít od 10 do 45 °C. Tato bakterie snáší obsah soli do 6,5 % NaCl. *E. faecium* vytváří antibakteriální peptidy, které označujeme jako bakteriociny. Může se přidávat i do kultur, které pomáhají inhibovat růst nežádoucích mikroorganismů (FEORI, 2012; GIRAFFA, 2003).



Obr. 8 *Enterococcus faecium* (<http://www.bode-science-center.com>)

3.6 Rozdělení a působení bakteriocinů

Podle účinků, mechanismů a vlastností byly bakteriociny rozděleny do několika tříd. Postupně byl objeven velký počet bakteriocinů různé rozmanitosti a díky některým společným rysům je tak bylo možno zařadit do několika tříd a podskupin (TAMIME, 2006).

V minulých dvou dekadách bylo demonstrováno několik studií o potenciálu bakteriocinů, které jsou schopny kontrolovat růst patogenních mikroorganismů v potravinách. Bakteriociny jsou peptidy s antimikrobiotickou aktivitou tvořeny širokou škálou bakterií. Bakterie mléčného kysání známé jako bakterie užívané při mléčné fermentaci produkují mnoho identifikovaných bakteriocinů. Kromě toho mohou být bakteriociny rychle degradovány proteázami v gastrointestinálním traktu, a proto nemohou interferovat s lidskou střevní mikroflórou. Výzkumy týkající se výskytu bakteriocinů v sýrech byl zaměřen především na kontrolu růstu *L. monocytogenes* či sporotvorných organismů (GRATTEPANCHE et al., 2008).

3.6.1 Rozdělení bakteriocinů

Bakteriociny, které jsou vyráběny bakteriemi mléčného kysání, tvoří různorodou skupinu peptidů s ohledem na velikost, strukturu, způsob účinku, antimikrobiální účinnost a imunitní mechanismus. Bakteriociny jsou řazeny do několika tříd. Metody klasifikace bakteriocinů zahrnují: genetiku, molekulární hmotnost, chemické složení. Jedna z metod klasifikace je řazení bakteriocinů do tříd, a to na bakteriociny třídy I., II., III. (Tab. 1) (DOBSON et al., 2012).

Tab. 1 *Produkce bakteriocinů bakteriemi mléčného kysání* (TAMINE, 2006).

Kategorie	Podskupina	Příklady
Třída I (termostabilní lantibiotika)	Typ A	Nisin, lacticin 481 a 3147, cytolysin, lactocin S
	Typ B	Mersacidin, actagardine, cinnamycin, ancovenin, duramycin B a C
Třída II (termostabilní peptidické bakteriociny)	Podskupina (a) (Bakteriociny s dvěma peptidy)	Lactococcin G, plantaricin S, lactacin F, plantaricin EF, plantaricin JK
	Podskupina (b) (silná antilisteriální aktivita)	Pediocin PA-1, sakacin A a P, enterocin A, leucocin A-UAL 187
	Podskupina (c) (závislé na hlavním peptidu)	Divergicin A, acidicin B, enterocin P, Enterocin L50
	Podskupina (d) (bez hlavního peptidu)	Lactococcin A, lactococcin B, enterocin B
	Podskupina (e) smíšené bakteriociny	
Třída III (velké, termolabilní proteiny)		Helveticin J, acidophilucin A, caseicin 80, lacticin A

3.6.1.1 *Bakteriociny I. Třídy - Lantibiotika*

Jedná se o malé tepelně stabilní peptidy. Jsou složeny z jednoho nebo dvou peptidů (< 5kDa), které působí na membránové struktury a prošly posttranslační modifikací. To má za následek tvorbu charakteristických thioetherových aminokyselin lanthionin a methyllanthionin (ROSS et al., 2002; DEEGAN et al., 2006). Lantibiotika inhibují cílové buňky díky tvorbě pórů v membráně, vyčerpáním transmembránového potenciálu nebo pH gradientu, což vede k úniku buněčných materiálů. V tomto jevu jde o to, že se pozitivně nabité bakteriocinové molekuly s hydrofobním koncem vážou na negativně nabitou fosfátovou skupinu cílových buněčných membrán elektrostatickými interakcemi. Proto se hydrofobní části bakteriocinů vážou do membrány. Díky tomu způsobují vznik pórů a následně buněčnou smrt (BALCIUNAS et al., 2013).

Velmi dobře známý a důležitý příklad této skupiny je nisin. Oproti jiným bakteriocinům má nisin široké spektrum působnosti. Působí především proti sporulujícím mikroorganismům a proti *L. monocytogenes*. Vzhledem k jeho schopnosti zabránit růstu bakteriálních endospor vedlo jeho použití k prevenci proti pozdní tvorbě plynu u tvrdých sýrů a dále je používán jako inhibitor *C. botulinum*. Aktivita nisinu je největší v mírně kyselých podmínkách. Jeho místem působení je stejně jako u ostatních bakteriocinů cytoplazmatická membrána (ARQUÉS, 2015; MARTH, 1998).

Na základě strukturální podobnosti byla lantibiotika rozdělena nejprve do dvou podtříd. Podtřída Ia (Tab. 2) zahrnuje relativně prodloužené, flexibilní a pozitivně nabitě

peptidy, které obecně působí na cytoplazmatické membrány citlivých bakterií. Podtřída Ib (Tab. 3) je tvořena peptidy, které jsou kulovitěho tvaru, mají tužší strukturu a jsou záporně nabitě. Jejich funkce je založena na tom, že napadají enzymatický systém citlivých bakterií (PARADA et al., 2007).

Lantibiotika jsou obvykle dělena na dva typy, a to typ A a B. Typ A rozumíme protáhlé flexibilní molekuly, které mají kladný náboj a působí přes membránové depolarizace. Tato lantibiotika produkují grampozitivní bakterie mléčného kysání. Řadíme zde například nisin. Lantibiotika typu B mají globulární strukturu a zasahují do buněčných enzymatických reakcí. Častěji o nich mluvíme jako o inhibitech enzymů. Jako příklad se uvádí mersacidin a actagardin. (ROSS et al., 2002; TAMIME, 2006).

U různých bakterií je citlivost na lantibiotika značně odlišná. Proti širokému spektru grampozitivních bakterií, včetně několika kažení potravin a patogenních mikroorganismů, se používají lantibiotika, jako je nisin nebo lakticin 3174. Zatímco laktocin S má úzké spektrum aktivity a je účinný především proti jiným bakteriím mléčného kysání, nisin je aktivní jak proti bakteriím, tak i proti vegetativním sporám (TAMIME, 2006).

Tab. 2 Příklady bakteriocinů třídy Ia a jejich producenti (LUQUET, CORRIEU, 2005)

Bakteriocin	Producent
Nisin A	<i>Lactococcus lactis</i> NIZO5
Nisin Z	<i>Lactococcus lactis</i> NIZO22186
Subtilin	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633
Pep5	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5
Epidermin	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Tu3298
Gallidermin	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Tu3298
Mutacin III	<i>Streptococcus mutans</i> JH100
Lactocin S	<i>Lactobacillus sakei</i> L45
Lacticin 481	<i>Lactococcus lactis</i> ADRIA85LO30
Bacteriocin J46	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>Cremoris</i> J46
Streptococcin A-FF22	<i>Streptococcus pyogenes</i> FF22
Salivaricin A	<i>Streptococcus salivarius</i> 20P3
Streptin	<i>Streptococcus pyogenes</i> BL
Plantaricin	<i>Lactobacillus plantarum</i> C

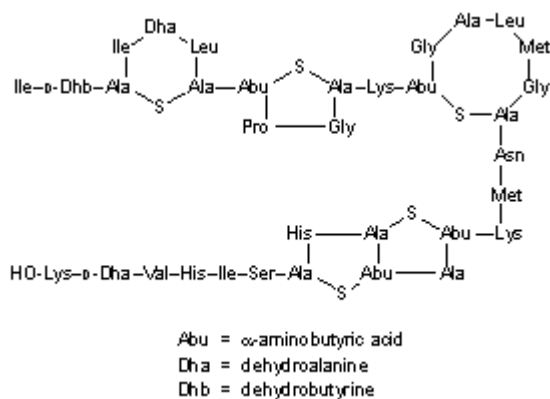
Tab. 3 Příklady bakteriocinů třídy Ib a jejich producentů (LUQUET, CORRIEU, 2005)

Bakteriocin	Producent
Mersacidin	<i>Bacillus subtilis</i> HIL Y85
Actagardin	<i>Actinoplanes</i>
Ancovenin	<i>Streptomyces</i> ssp.
Duramycin C	<i>Streptomyces griseoluteus</i>
Mutacin II	<i>Streptococcus mutans</i>

V současné době je v potravinářství využíváno dvou lantibiotik. Pro použití v některých potravinářských výrobcích byl v rámci EU a v USA schválen nisin. Mimo to je nisin používán také ve veterinářství, zejména pro prevenci bakteriálních infekcí, které způsobují kravám mastitidy. Lakticin 3147 byl licencován pro použití proti bakteriálním infekcím u kravského vemene (TAMIME, 2006).

Nisin

Jedná se o nejznámější bakteriocin. Nisin (Obr. 9) je složen z velmi podobných polypeptidů tvořených 34 aminokyselinami. Jeho struktura obsahuje tři neobvyklé aminokyseliny (dehydroalanine, lanthionin a β -methyl-lanthionin) a pět vnitřních disulfidických můstků. Je produkován některými kmeny *Lactococcus lactis subsp. lactis*. Byl jako první považován za antibakteriální peptid a popsán v bakteriích mléčného kysání. Tento bakteriocin je účinným baktericidním činidlem proti několika příbuzným a nepříbuzným bakteriím a vyskytuje se přirozeně v mnoha mléčných výrobcích. Byl přijat do evropského seznamu potravinářských přídatných látek, kde mu bylo přiděleno číslo E234 (SUGANTHI, 2012; ROSS, 2002; SOBRINO-LÓPEZ, MARTÍN-BELLOSO, 2008; ARQUÉS, 2015).



Obr. 9 Nisin (www.drugfuture.com)

Nisin má široké spektrum aktivit inhibující vegetativní buňky a spory grampozitivních bakterií. Za bakterie citlivé na nisin se považují: ostatní mléčné bakterie, *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria* a *Streptococcus*. Nisin neinhibuje gramnegativní bakterie, kvasinky a plísně, pokud není použita další konzervační metoda. Je to proto, že gramnegativní bakterie mají buněčné stěny mnohem méně propustné než grampozitivní bakterie. Proto nisin využíváme ve spojení s jinými synergicky působícími konzervačními metodami (jedná se o tzv. technologii překážek), například vysokou koncentrací soli a nízkým pH (REUNANEN, 2007; KVASNIČKOVÁ, 2006).

Je známo 5 kompozičních variant nisinu. Ty jsou označeny písmeny A – E. Nisaplin je sůl zředěného nisinu A a jde o komerčně dostupný přípravek, který je nejvíce biologicky aktivní (SUGANTHI, 2012; LEDERBERG, 2000).

První aplikace nisinu v mléčných výrobcích byla provedena jako prevence proti kažení *Clostridium tyrobutyricum* odpovědné za pozdní duření sýrů. Nisin byl baktericidní proti různým kmenům *L. monocytogenes* a jeho účinek byl rozšířen přidáním NaCl nebo snížením pH. Poskytuje taky ochranu před kontaminací mléka nebo tvarohu před *S. aureus*. Nisin můžeme využít u výrobků s vysokou vlhkostí a s nízkým obsahem solí a u výrobků uložených mimo chladicí zařízení bez rizika znehodnocení. Množství nisinu je závislé na složení potraviny, požadované době trvanlivosti a předpokládané teplotě skladování. Nisin se používá k prodloužení trvanlivosti mléka a mléčných výrobků, které nemohou být plně sterilizovány, aniž by došlo k poškození vzhledu, chuti a textury. Nisin je vysoce povrchově aktivní molekula, která se může vázat na různé sloučeniny. Toho se může využít v rozvoji aktivního balení, kde je klasická ochranná funkce obalu podporovaná antimikrobiálními účinky nisinu (ARQUÉS, 2015; KVASNIČKOVÁ, 2006; SOBRINO-LÓPEZ, MARTÍN-BELLOSO, 2008).

Lakticin 3147

Bakteriocin se skládá ze dvou stejně velkých posttranslačně modifikovaných peptidů. Je hydrofobní. Lakticin 3147 je produkován kmenem *Lactococcus lactis*. Zájem o tento bakteriocin vzrostl vzhledem k jeho aktivitě proti širokému spektru organismů, které zahrnují všechny grampozitivní bakterie (*Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Clostridium tyrobutyricum*). Tento bakteriocin byl izolován z irského keřirového zrna, které se používá pro výrobu podmásli. Jeho vlastnosti jsou závislé na pH. Zvýšená aktivita je vykazována v kyselém pH, a to i stabilita na tepelné ošetření. Lakticin 3147 byl inaktivován při teplotě 121 °C po dobu 10 minut a při pH 9,0, zatímco při pH 5,0 ztratil

pouze 50 % své aktivity. Použitím tohoto bakteriocinu dosáhneme lepších sensorických vlastností polotvrdých sýrů, jako je chuť, po 27 dnů zrání (ROSS, 2002; SOBRINO-LÓPEZ, MARTÍN-BELLOSO, 2008).

3.6.1.2 *Bakteriociny II. třídy*

Bakteriociny II. třídy jsou malé tepelně stabilní peptidy (< 10kDa). Tato třída se rozděluje dále na několik podtříd. Podtřída IIa (Tab. 4) je tvořena peptidy s konvenční sekvencí na N-konec Tyr-Gly-Asn-Gly-Val, které působí především proti *Listeria monocytogenes*. Obsahuje bakteriocin, který je označován jako pediocin a který produkuje zejména *Pediococcus acidilactici*. Tohoto bakteriocinu se hojně využívá při přípravě potravin v konzervářenském průmyslu a také v medicínské oblasti. V této podtřídě dále najdeme sakacin. Podtřída IIb je tvořena komplexem dvou odlišných peptidů, které pracují synergicky. Jednotlivě tyto peptidy ovšem mají malou nebo žádnou aktivitu. Jedná se o bakteriocin s názvem lactococcin G, který produkuje bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* a plantaricin EF. Do podtřídy IIc spadají malé, ale za to tepelně stabilní peptidy. V této podtřídě najdeme divergicin A a B acidocin (ABEE et al., 1995; DEEGAN et al., 2006, PARADA et al., 2007). Do podtřídy IIc řadíme také enterocin, který je produkován bakterií *Enterococcus faecium* a *Enterococcus faecalis*. V podtřídě IID se nachází bakteriocin s názvem aureocin. Jedná se o vysoce stabilní bakteriocin, který přežívá v zásaditém prostředí, je termorezistentní a není ovlivnitelný proteázami. V podtřídě IIE najdeme bakteriocin, který se nazývá aureocin A70 a je vysoce stabilní. Je složen ze čtyř peptidů. Dále je známý tím, že vykazuje vysokou aktivitu při inhibici *L. monocytogenes* a je používán především v biotechnologiích (DOBSON et al., 2012).

Do třídy II bylo v posledních letech zařazeno více jak 50 bakteriocinů produkovaných mléčnými bakteriemi. Tyto bakteriociny se skládají z 30 až 60 aminokyselinových zbytků. Jsou větší jak bakteriociny ze třídy I. typu A. Jedná se o kationtové bakteriociny, které jsou buď amfifilní nebo hydrofobní (TAMIME, 2006).

Tab. 4 Příklady bakteriocinů třídy II a jejich producenti (LUQUET, CORRIEU, 2005)

Bakteriocin	Producent
Lactococcin G	<i>Lactococcus lactis</i> LMG2081
Lactococcin MN	<i>Lactococcus lactis</i> 9B4
Lactacin F	<i>Lactococcus johnsonii</i> VP111088
Thermophilin 13	<i>Streptococcus thermophilus</i> Sfi13
Plantaricin EF	<i>Lactobacillus plantarum</i> LCP010
Plantaricin JK	<i>Lactobacillus plantarum</i> C11
Leucocin H	<i>Leuconostoc</i> ssp. MF215B
Carnocin H	<i>Carnobacterium</i> ssp.
Lactocin 705	<i>Lactobacillus casei</i> CRL 705
Acidocin J1132	<i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM 1132
ABP - 118	<i>Lactobacillus salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i>
Enterocin 1071	<i>Enterococcus faecalis</i> BFE 1071
Mutacin IV	<i>Streptococcus mutans</i> UA 140
Enterocin L50	<i>Streptococcus faecium</i> L50

Enterocin A a B

Enterococcus faecium produkuje enterocin, přičemž se ukázalo jeho široké inhibiční spektrum proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím, jako je *Listeria monocytogens* a *Salmonella paratyphi*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*. Při kultivačních podmínkách pH 6,0 a teploty 35 °C bylo dosaženo optimální produkce bakteriocinu (2400 AU / ml) z *E. faecium* (ANNAMALAI et al., 2009; GIRAFFA, 2003).

Pediocin PA - 1

Tento bakteriocin je produkován bakterií *Pediococcus acidilactici*. Je účinný proti širokému spektru grampozitivních bakterií včetně *Listeria monocytogenes* a alimentárním patogenům, což je využíváno především v mlékárenském průmyslu. Dále se v mlékárenském průmyslu využívá vzhledem ke své stabilitě ve vodných roztocích, jeho širokému rozsahu aktivity pH a díky skutečnosti, že není ovlivněn zahříváním nebo zmrazením. Pediocin PA – 1 je vysoce hydrofobní, kladně nabitý peptid sestávající ze 44 aminokyselin. Tento bakteriocin je využíván hlavně v masné výrobě. Pozoruhodné je, že pediocin má antimikrobiální účinnost i při nanomolárním množství (ABEE, 1995; SOBRINO-LÓPEZ, MARTÍN-BELLOSO, 2008; PORTO, 2017).

3.6.1.3 Bakteriociny III. třídy

Do III. třídy řadíme peptidy s molekulovou hmotností nad 30 kDa. Bakteriociny v této třídě jsou termolabilní a nejsou více prozkoumány. V této třídě se nachází bakteriociny helveticin J, acidofilicin A a lactacin A a B. Peptidy z této skupiny jsou známé tím,

že napadají buněčné stěny, a to zejména u bakterií *Staphylococcus aureus* (ROSS, 2002; PARADA et al., 2007).

3.7 Aplikace a použití bakteriocinů

Díky moderním pokrokům v technologiích, které se vyvíjejí ze dne na den, je konzervace potravin stále více diskutovaným tématem. Kvůli nedostatečné konzervaci dochází k ekonomickým ztrátám v důsledku kažení a nežádoucím účinkům na lidské zdraví. Na tento popud bylo zaznamenáno mnoho chemických konzervačních látek, které byly použity při konzervaci potravin. Vzhledem k rostoucímu povědomí spotřebitelů a nárůstu zdravotních problémů v oblasti chemicky přídatných látek se použití přírodních konzervantů stává atraktivnější (MEŠKOVÁ, 2015).

Současné použití více než jednoho bakteriocinu nebo více kmenů produkujících bakteriociny může snížit vznik rezistence v cílových kmenech. Kombinované ošetření bakteriocinů s fyzikálními procesy nebo jinými přírodními konzervanty nabízí široký scénář budoucích praktických aplikací (ARQUÉS, 2015).

Z výzkumů se dozvídáme, že některé z probiotických kmenů mají účinky na rezistenci proti infekci střevními patogeny. Vývoj kmenů probiotických mléčných výrobků, které mají dobré technologické vlastnosti a lepší charakteristiky, než tomu bylo u jednotlivých kmenů, způsobil, že o toto téma se zvyšuje zájem, jelikož jsou tyto kmeny schopné působit nejen jako ochranné kultury v potravinách, ale také jako probiotika schopná vyvinout ochranný účinek proti infekcím (ARQUÉS a kol., 2015).

3.7.1 Bakteriociny a aplikace v potravinách a potravinářství

Startovací kultury produkují celou řadu látek včetně kyseliny mléčné a metabolitů napomáhajících zachovávat a udržovat bezpečnost fermentovaných výrobků. Při konzervaci potravin jsou bakteriociny produkující bakterie mléčného kysání považovány za bezpečné látky. Jsou tolerantní k pH a vysokým teplotám, mají poměrně široké antimikrobiální spektrum vůči patogenním mikroorganismům, které se vyskytují v potravinách a proti bakteriím způsobujícím kažení (FOX, 2004; GÁLVEZ et al., 2007)

K vyřešení problémů by mohla přispět kompatibilní kombinace mléčného startéru a kmenů produkující bakteriocin. V této oblasti je však zapotřebí dalšího výzkumu pro optimalizaci produkce bakteriocinů a činnosti v mléčných výrobcích (ARQUÉS, 2015).

Použití bakteriocinů z bakterií mléčného kysání nebo potravinářských fermentací při výrobě mléčných výrobků (Tab. 5), které mohou být začleněny do kysaných nebo nekysaných mléčných výrobků, znamená další výhody pro zlepšení bezpečnosti a zvýšení kvality mléčných výrobků, které poskytují dostatečnou překážku pro snížení pravděpodobnosti výskytu onemocnění pocházejících z potravin (ARQUÉS, 2015).

Tab. 5 Aplikace bakteriocinů a bakteriocinogenních kmenů v mléčných výrobcích (ARQUÉS, 2015)

Bacteriocin	Bacteriocin-producing culture	Application	Pathogen	Product
Lacticin 3147	<i>Lc. lactis</i> DPC 3147	Spray-dried powder	<i>L. monocytogenes</i>	Cottage cheese
Pediocin	<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	Dry powder	<i>L. monocytogenes</i>	Cottage cheese and yogurt
Piscicolin 126	<i>C. piscicola</i> JG 126	Concentrated supernatant	<i>L. monocytogenes</i>	Camembert cheese
Enterocin CRL35	<i>E. faecium</i> CRL 35	Concentrated supernatant	<i>L. monocytogenes</i>	Goat milk cheese
Nisin	<i>Lc. lactis</i> CNRZ 150	Starter culture	<i>L. monocytogenes</i>	Camembert cheese
Nisin	<i>Lc. lactis</i> TAB 50	Starter culture	<i>L. monocytogenes</i>	Semihard cheese
Lacticin 481	<i>Lc. lactis</i> TAB 24	Starter culture	<i>L. monocytogenes</i>	Semihard cheese
Lacticin 3147	<i>Lc. lactis</i> DPC 4275	Starter culture	<i>L. monocytogenes</i>	Cottage cheese
Enterocin AS-48	<i>E. faecalis</i> TAB 28	Starter culture	<i>L. monocytogenes</i>	Semihard cheese
Enterocin AS-48	<i>E. faecalis</i> INIA 4	Starter or adjunct culture	<i>L. monocytogenes</i>	Manchego cheese
Pediocin	<i>Lc. lactis</i> MM 217	Starter culture	<i>L. monocytogenes</i>	Cheddar cheese
Pediocin	<i>Lb. plantarum</i> WHE 92	Surface sprayed cell suspension	<i>L. monocytogenes</i>	Munster cheese
Pediocin	<i>Lc. lactis</i> CLI	Adjunct culture	<i>L. monocytogenes</i>	Semihard cheese
Pediocin	<i>Lc. lactis</i> CLI	Adjunct culture	<i>S. aureus</i>	Semihard cheese
Nisin	<i>Lc. lactis</i> ESI 515	Adjunct culture	<i>S. aureus</i>	Semihard cheese

Gálvez et al., (2007) přezkoumali limitující faktory bakteriocinů při aplikaci v potravinách (Tab. 6) a prezentovali je v roce 2007. Při zpracování potravin jsou bakteriociny přidávány jako přípravky produkované ex situ nebo inokulací bakteriocinogenních kmenů. Poté bakteriociny vykazují v potravině antimikrobiální aktivitu. Takováto potravina, její zpracování a přirozená mikroflóra pak má v mnoha případech poměrně složitou a nestabilní podstatu. Bakteriociny musí projít přes všechny limitující faktory, aby vykazovaly antimikrobiální aktivitu.

Tab. 6 Účinnost bakteriocinů v potravinách – limitující faktory (GÁLVEZ et al., 2007)

Skupiny	Limitující faktory
Faktory související s potravinou	<ul style="list-style-type: none">- podmínky zpracování potravin- skladovací teploty- pH potravin- inaktivace enzymů v potravinách- interakce s aditivy
Mikroflóra potravin	<ul style="list-style-type: none">- počet MO, obsah MO v potravine- mikrobiální diverzita- citlivost na bakteriociny
Cílové bakterie	<ul style="list-style-type: none">- obsah, počet MO v potravine- citlivost na bakteriociny- fyziologické stádium- fyzikálně – chemické bariéry- vytvoření odolnosti/adaptace

3.7.2 Bakteriociny a aplikace v lékařství

Bakteriociny by mohly přispět na probiotické funkci jako kolonizující peptidy, které usnadňují zavedení nebo převahu kmene produkujícího bakteriocin do GIT výklenku. Bakteriociny mohou inhibovat invazi konkurenčních nebo patogenních kmenů v komunitě nebo modulovat složení mikroflóry a imunitního systému hostitele (ARQUÉS, 2015).

Další oblastí, která si zaslouží zkoumání, je vznik rezistentních patogenů. Aplikace bakteriocinů v souvislosti s lidským zdravím závisí na znalosti mechanismu účinku. Mechanismus účinku v profylaxi gastrointestinálních poruch je však stále špatně pochopen. Většina probiotik používaných v potravinářských výrobcích jsou bakterie mléčného kysání, zejména *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (ARQUÉS, 2015).

K vytvoření nových alternativních metod vedly nežádoucí účinky nové generace antibiotik s vysoce toxickými prvky. Díky tomu mají v dnešní době bakteriociny velký potenciál v aplikacích pro lidské zdraví (RILEY, WERTZ, 2002).

3.8 Ochranné a zrací materiály

Hlavní funkcí obalových a zracích materiálů je obklopit a posílit konkrétní výrobek a chránit jeho obsah proti různým druhům nebezpečí, která by mohla mít nepříznivý vliv v průběhu skladování, distribuce (LAW, TAMIME, 2010).

Sýry, které zrají v celé hmotě, jsou po solení ihned baleny do fólií, ošetřeny ochranným plastovým nátěrem a v malé míře je jejich povrch při zrání ošetřován solným

roztokem (2 – 3 %) nebo lněným olejem. Zrací fólie a nátěry slouží jako bariéra, která nepropustí kyslík ani vodu, ale propustí oxid uhličitý (KADLEC et al., 2012).

Chuť i kvalita sýra je velmi významně ovlivňována způsobem balení. Proto má každý druh sýra specifické požadavky na jejich uchování. Správně zvolený obal pro daný druh sýra musí respektovat jeho přirozený charakter a zároveň zachovat jeho senzorycké vlastnosti. Obal by měl tento jev během zrání podporovat, a to za účelem dosažení maximální kompatibility produktu s obalem. Tím se rozumí dosažení žádoucích vlastností. Zvolením vhodného obalu se zabráňuje znehodnocení výrobku během přepravy, manipulace a skladování (ČEJNA, 2012).

Volba materiálů pro obal sýrů vyžaduje znalosti následujících aspektů: vlastnosti výrobku, které se vztahují k procesu balení (např. počet, tvar a velikost), vliv přirozeného procesu, kterým je v případě sýra zrání, vliv vnějších faktorů na vlastnosti sýra, které v případě světla může způsobit změnu chuti nebo barvy. Významný vliv na požadované vlastnosti, a tím i výběr obalových materiálů, má, zda je určen k ochraně sýra ve fázi zrání nebo ošetřuje produkt ke spokojenosti koncového uživatele (LAW, TAMIME, 2010).

3.8.1 Sýrařské vosky

Sýrařské vosky se používají z důvodu vyloučení nadměrných ztrát při zrání a úspory práce při ošetřování sýrů ve zracích sklepech. Dále chrání sýr proti mechanickému poškození, před růstem plísní a poskytuje i výrazný atraktivní vzhled sýrů. Existuje velká barevná škála odstínů žluté, oranžové, černé, bílé, hnědé, červené, růžové a zelené, aby se sýry mohly odlišovat. Tato barviva a pigmenty mají vysokou kvalitu z hlediska využití potravin. Vzhledem k tomu, že většina tvrdých sýrů má anaerobní popřípadě fakultativně anaerobní mikroflóru, napomáhá parafinování (voskování) k zamezení přístupu kyslíku ze vzduchu a tím částečně urychlí průběh zrání. Dochází také k omezení aerobního zrání (ŠPUNAROVÁ, 2012).

Mezi požadavky, které jsou kladené na sýrařské vosky z hlediska jejich účinnosti, patří potažení celého povrchu sýra souvislou vrstvou vosku bez jakýchkoli otvorů, zamezení jeho vysychání a znečištění povrchu sýra. Je nutné docílit úplného přilnutí vosku k povrchu sýra a to tak, aby mezi vrstvou vosku a povrchem sýra nezůstaly žádné vzduchové mezery. Dalším důležitým požadavkem je ohebnost a pružnost voskového obalu, jenž zajišťuje jeho odolnost vůči mechanickému namáhání při ošetřování, manipulaci a skladování sýrů. S menší měrou jsou kladeny požadavky také na zajištění stability barviv a snadné krájení. Mezi činitele, kteří ovlivňují účinnost voskování, řadíme

nízkou vlhkost povrchu sýra, celistvost povrchu, tuhost povrchu, čistotu povrchu, teplotu voskové lázně a teplotu voskovaného sýra (KAČENÁK, 2007; TEPLÝ et al., 1957)

Na jakostní sýrařské vosky jsou kladeny požadavky mající technologické, ochranné, ekonomické a estetické funkce, které vyplývají z hlediska jejich účinnosti. Dobrymi vlastnostmi vosků, zejména z hlediska jejich viskozity, se docílí toho, aby se při potažení celého povrchu sýra souvislou vrstvou sýrařského vosku bez jakýchkoliv otvorů, trhlin a mezer zabránilo znečištění povrchu sýra a jeho vysychání. (ŠPUNAROVÁ, 2012).

U sýrařských vosků používaných k voskování nezralých sýrů, tj. ještě během výrobního procesu, je udržování souvislé vrstvy důležité nejen proto, aby se vytvořily podmínky pro anaerobní zrání sýrů, ale také kvůli plynům vznikajícím během zrání a unikajícím z hmoty sýra tak, aby neporušovaly celistvost jeho voskového obalu. Vytvoření správně fungující vrstvy sýrařského vosku na povrchu sýra vyžaduje, aby vosk měl předepsané fyzikální a chemické vlastnosti, především potřebnou přilnavost k povrchu sýra a pružnost (ŠPUNAROVÁ, 2012).

3.8.2 Plastické nátěry

Tento způsob ošetření poskytuje výhody klasického zrání s podstatně menšími ztrátami. Používá se především potravinářská PVAC disperzní barva Plasticoat nebo Delvocoat v odstínu sýrové žluti, která je na sýry nanášena štětcem. Aplikace se provádí po vysolení sýrů na lehce oschlý nebo otřený povrch. Po natření jedné poloviny sýra je nutné nechat tuto vrstvu zaschnout (do druhého dne) a teprve po jejím zaschnutí aplikovat nátěr na druhou polovinu sýra. Vlhkosti zracího prostoru při tomto způsobu ošetření musí dosahovat kolem 80 - 90% relativní vlhkosti, aby si nátěr udržel pružnost a neztvrdnul. Povrch se v průběhu zrání doporučuje 3x až 4x natírat slabší vrstvou. Mezi nátěry je důležité dbát na to, aby byl sýr pravidelně obrácen. Je to z toho důvodu, aby se spodní strana sýra nepřilepila na zrací desku a předešlo se růstu plísní. Frekvence nátěrů závisí na typu sýra (jeho sušíně) a dalších parametrech zracího sklepa. Například pro goutu se sušinou cca 58 % po 2 týdnech zrání platí relativní vlhkost mezi 85 – 88 % a zrací teplota 13 °C +/-1 °C. Při relativní vlhkosti 90 % a vyšší je těžké udržet nátěr zaschlý. Je to možné pouze tehdy, když má povrch sýra vysokou sušinu. Při dodržení podmínek aplikace a zrání se dá dosáhnout poměrně jednoduchým způsobem vysoké kvality sýra blížící se tradičnímu zrání (ANONYM 1, 2017).

Plasticoat je v současnosti nejpoužívanějším nátěrem z polymerních hmot pro povrchové ošetření sýrů. Jedná se o vodní kopolymerovanou disperzi s obsahem

natamycinu pro povrchové ošetření polotvrdých a tvrdých sýrů. Zajišťuje vynikající bariérové vlastnosti, a to proti nárůstu plísní, pro zlepšení vzhledu sýra a lepší ochranu proti mechanickému poškození. Z chemického hlediska mluvíme o Poly-Vinyl-Acétátu (PVA) – tzv. emulzi kopolymeru ve vodě. Kopolymerová emulze je složena ze dvou monomerů, přičemž jeden monomer je zodpovědný za tvrdost filmu, druhý monomer zajišťuje měkký film. Díky správnosti poměru těchto dvou monomerů je docíleno požadované pružnosti filmu (LANTANO et al., 2014).

Plasticoat pro ošetření povrchu sýrů se používá neředěný. Nanáší se pomocí štětce nebo houbou či strojně stříkáním na oschlý povrch. Podle potřeby je možno ředit pitnou vodou. K dosažení plného účinku je potřeba na sýr nanášet min. 3 vrstvy, vždy po zaschnutí vrstvy předchozí. Pro vytvoření filmu je potřeba minimální teplota 6 – 7 °C, optimální relativní vlhkost pro zaschnutí i zrání je 85 - 88%. Produkt, který není zaschlý, je možno odstranit teplou vodou (ANONYM 2, 2017).

3.8.3 Smršťovací obaly – vakuové balení

Při vakuovém balení dochází k odstraňování vzduchu před uzavřením obalu. Tímto způsobem balíme do pružných nebo pevných obalů. Vždy je důležité dosáhnout odstranění kyslíku z obalu, a to z toho důvodu, aby se prodloužila doba skladování potravin (YAM, 2009).

Pro vakuové balení je typické, že se používají polymerní obalové materiály, které patří mezi nejrychleji se rozvíjející skupinu obalových materiálů v této oblasti. Jejich škála používaná při balení potravin je velmi rozsáhlá. Zahrnuje materiály, které se diametrálně liší co do užitných vlastností. Nejvýznamnější vlastností je plasticita při vysoké teplotě. Polymerní materiály s nižší teplotou měknutí mají tu schopnost, že jsou snadno tepelně svařovatelné (KADLEC, 2002).

Obaly na bázi jednoho polymeru se vyskytují u potravin, u kterých systém balení zajišťuje hermetičnost a brání změnám vlhkosti. Nároky na ochranu při balení polotvrdých a tvrdých sýrů jsou větší. Velmi důležitá je nepropustnost pro permanentní plyny a aromatické látky, větší tepelná vodivost atd. Je nezbytné, aby se vlastnosti jednotlivých polymerů dobře kombinovaly. Mezi tyto materiály řadíme i koextrudované fólie (KADLEC, 2002).

4 MATERIÁL A METODIKA

Měření k diplomové práci bylo uskutečněno na Mendelově univerzitě v Brně na Ústavu technologie potravin. Na výrobu polotvrdých zrajících sýrů bylo použito mléko, které bylo v době výroby sýrů pasterizováno a následně kromě mezofilní kultury obohaceno o tři speciální druhy protektivních kultur. Po vyrobení byly sýry ošetřeny povrchovým nátěrem Plasticoat.

4.1 Použitý materiál

4.1.1 Mléko

Polotvrdé zrající sýry byly vyrobeny z mléka, které poskytlo zemědělské družstvo ZEPO Bořitov. Mléko bylo před každou výrobou analyzováno na základní parametry (Tab. 7).

Tab. 7 Parametry mléka v den výroby

	1. výroba (16. 6. 2016)	2. výroba (21. 6. 2016)	3. výroba (23. 6. 2016)
tuk [%]	4,08	3,6	3,65
bílkoviny [g]	2,96	3,04	3,02
pH	6,70	6,65	6,62
°SH	6,87	7,08	6,97
N-test	II- III	II	II

4.1.2 Syřidlo

K výrobě polotvrdých zrajících sýrů bylo použito tekuté syřidlo Fromase 220 TL. Jedná se o mikrobiální syřidlo určené k syření všech druhů mléka na výrobu všech druhů sýrů s krátkou i dlouhou dobou zrání. Syřidlo je vhodné i pro použití v produktech určených pro vegetariány. Před samotným použitím byly provedeny výpočty síly a dávkování syřidla. Je to z toho důvodu, abychom vypočetli, jaké množství syřidla potřebujeme na dané množství mléka, abychom zajistili odpovídající koagulační účinky.

Vzorec pro výpočet síly syřidla:

$$\text{Síla syřidla (x)} = \frac{\text{objem mléka (ml)} \times 2400 \text{ (40 minut)} \times 10}{\text{čas koagulace (s)}}$$

Vzorec pro výpočet dávky syřidla:

$$D = \frac{M}{S} \times \frac{35}{t} \times \frac{40}{T}$$

kde je: D – množství syřidla (ml)

S – síla syřidla

M – množství sýřeného mléka (ml)

t – teplota sýření (°C)

T – doba srážení (min.)

4.1.3 Chlorid vápenatý

Zpravidla se používá množství 10 – 20 g chloridu vápenatého na 100 l mléka nebo 20 – 40 ml nasyceného roztoku chloridu vápenatého na 100 l mléka. V našem případě byl použit 36% chlorid vápenatý. Podle množství mléka bylo vypočítáno, kolik chloridu je potřeba přidat k danému množství mléka, aby bylo dosaženo požadovaného výsledku. Roztok chloridu vápenatého se před přidáním do mléka použitého na výrobu sýra rozmíchá ve vlažné vodě proto, aby se lépe vmíchal do celého objemu.

4.1.4 Zákysové kultury

Pomocí odborné literatury byly vybrány jednotlivé druhy bakterií mléčného kysání, které vykazují protektivní účinky a tím prodlužují trvanlivost sýrů. Takto zvolené protektivní kultury by neměly vykazovat negativní vliv na smetanovou kulturu. Naopak měly by mít pozitivní účinek na zvýšení trvanlivosti a také by měly nutričně a senzoricky odpovídat požadavkům kladeným na polotvrdé zrající sýry. Mezi tyto zákysové a protektivní kultury byly zahrnuty:

1. Mezofilní kultura (Ferlac Mesófilo tipo II) od španělského dodavatele ABIASA
2. Protektivní kultura v tekuté formě (Ferlac MX) od španělského dodavatele ABIASA
3. Protektivní kultura (CCDM 731 druhu *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) od španělského dodavatele ABIASA
4. Protektivní kultura v sušené formě (*E. feacium*) z Prahy od Milcom a.s. Laktoflora.

4.1.5 Ochranný nátěr

K ochrannému nátěru byl použit Plasticoat. Jedná se o nátěr z polymerních hmot používaný pro povrchové ošetření sýrů. Tento nátěr byl nanášen ve třech vrstvách pomocí štětce. Po zaschnutí má nátěr světle žlutou barvu.

4.1.6 Sůl

Polotvrdé zrající sýry byly soleny částečně do sýřeniny, tzv. do těsta. Bylo použito 105 g soli.

4.2 Pomůcky

Laboratorní pomůcky, které byly použity k výrobě sýrů (Tab. 8). Pomůcky využívané k chemickým rozborům sýrů (Tab. 9) byly dle potřeby a následně mezi každým ze vzorků důsledně vymývány a opláchnuty destilovanou vodou, aby nedošlo ke zkreslení výsledků zkoušek. Chemikálie potřebné k chemickým rozborům (Tab. 10) byly použity podle dané metody.

Tab. 8 Pomůcky pro výrobu sýrů

Pastér	Pasterace mléka při 72 °C/20 s
Kádinka a pipeta	Odměření dávky syřidla a CaCl ₂ a jejich nalití do mléka
Erlenmayerova baňka	Zkouška syřitelnosti
Teploměr	Kontrola teploty
Naběračka	Promíchání mléka
Krájecí nůž	Krájení sýřeniny
Lisovací formy	Formování sýřeniny
Sýrařská plachta	Formování sýřeniny
Nádoba na syrovátku	Odtok syrovátky
Barely na vodu	Doplnění vody po odtoku syrovátky, zatížení forem
Štětceček	Nátěr sýrů

Tab. 9 Pomůcky pro stanovení základních parametrů sýrů

Pomůcky používané při chemických rozbořech sýrů	
Odměrné baňky (250 ml)	Stanovení obsahu chloridu sodného
Titrační baňky	Stanovení obsahu chloridu sodného
Třecí miska s tloučkem	Stanovení obsahu chloridu sodného, stanovení titrační kyselosti
Byrety	Stanovení obsahu chloridu sodného, stanovení titrační kyselosti
Automatické pipety s pipetníkem (1 ml)	Stanovení obsahu chloridu sodného, stanovení titrační kyselosti
Pipety skleněné (25 ml)	Stanovení obsahu chloridů
pH metr s příslušenstvím	Stanovení aktivní kyselosti
Pufrační roztoky pH 4 až 7	Stanovení aktivní kyselosti
Kádinky (25 ml)	Stanovení aktivní kyselosti
Váženky na sušinu	Stanovení sušiny
Sušárna	Stanovení sušiny
Exikátor	Stanovení sušiny
Analytické váhy	Stanovení sušiny
Předvážky	Při navažování vzorků na všechny analýzy
Struhadlo	Při navažování vzorků na všechny analýzy
Nůž	Při přípravě vzorků na všechny analýzy

Tab. 10 Použité chemikálie potřebné k chemickým rozborům

Chemikálie použité při chemickém rozboru sýrů	
0,1 M dusičnan stříbrný	Stanovení obsahu chloridu sodného
5% chroman draselný	Stanovení obsahu chloridu sodného
0,25 M hydroxid sodný	Stanovení titrační kyselosti
2% fenolftalein	Stanovení titrační kyselosti

4.3 Metodika

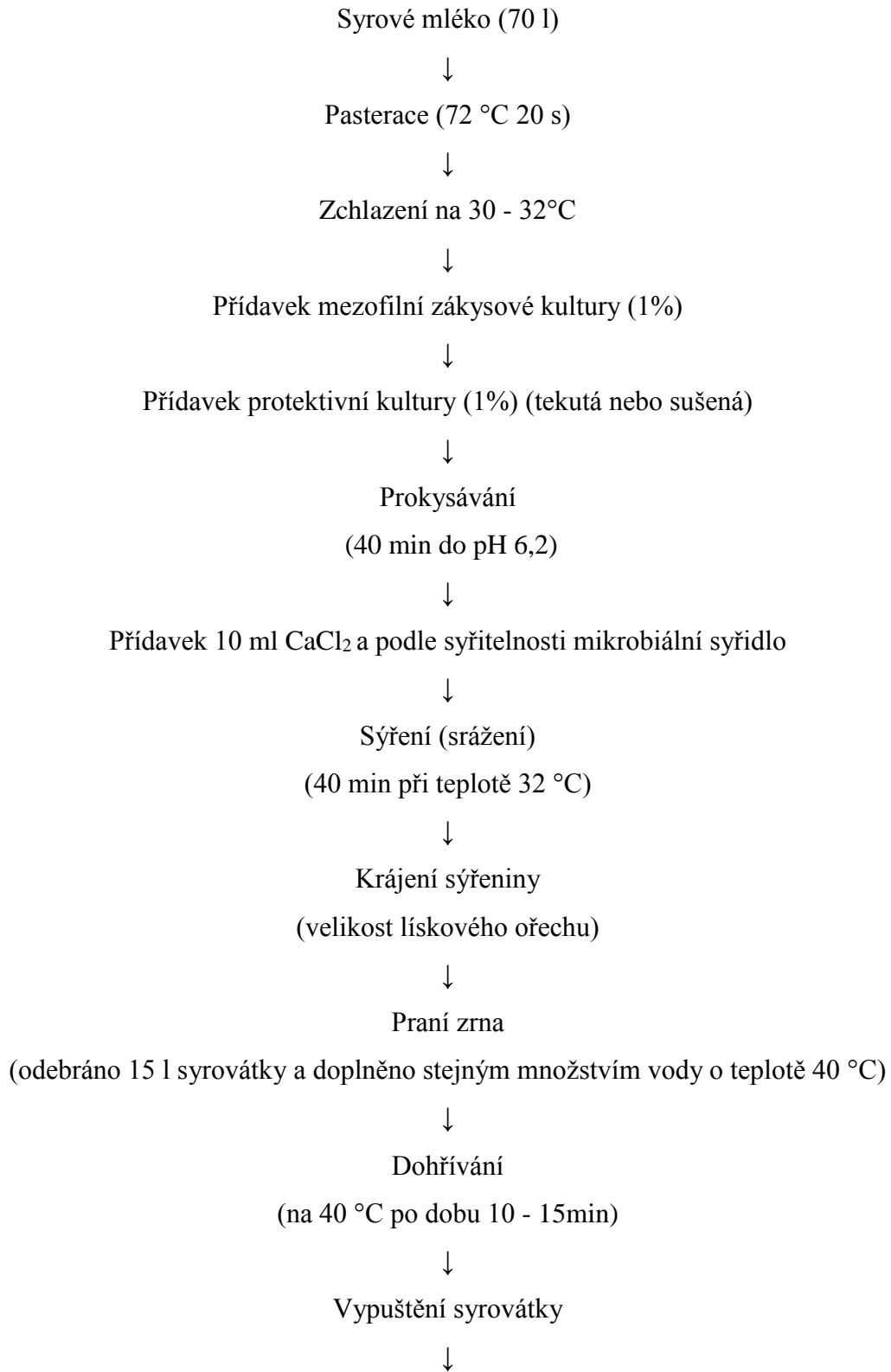
V den, kdy bylo dodáno čerstvé nepasterované mléko a tedy i v den, kdy proběhla výroba polotvrdých zrajících sýrů, byly uskutečněny rozborů tohoto mléka a úprava mléka pasterací. Polotvrdé sýry byly analyzovány pro chemickou analýzu po dobu pěti měsíců a pro sensorickou analýzu po dobu čtyř měsíců (poté už sýry podléhaly mikrobiální zkáze). Po celou dobu byly vyrobené sýry uchovávány pod ochranným nátěrem.

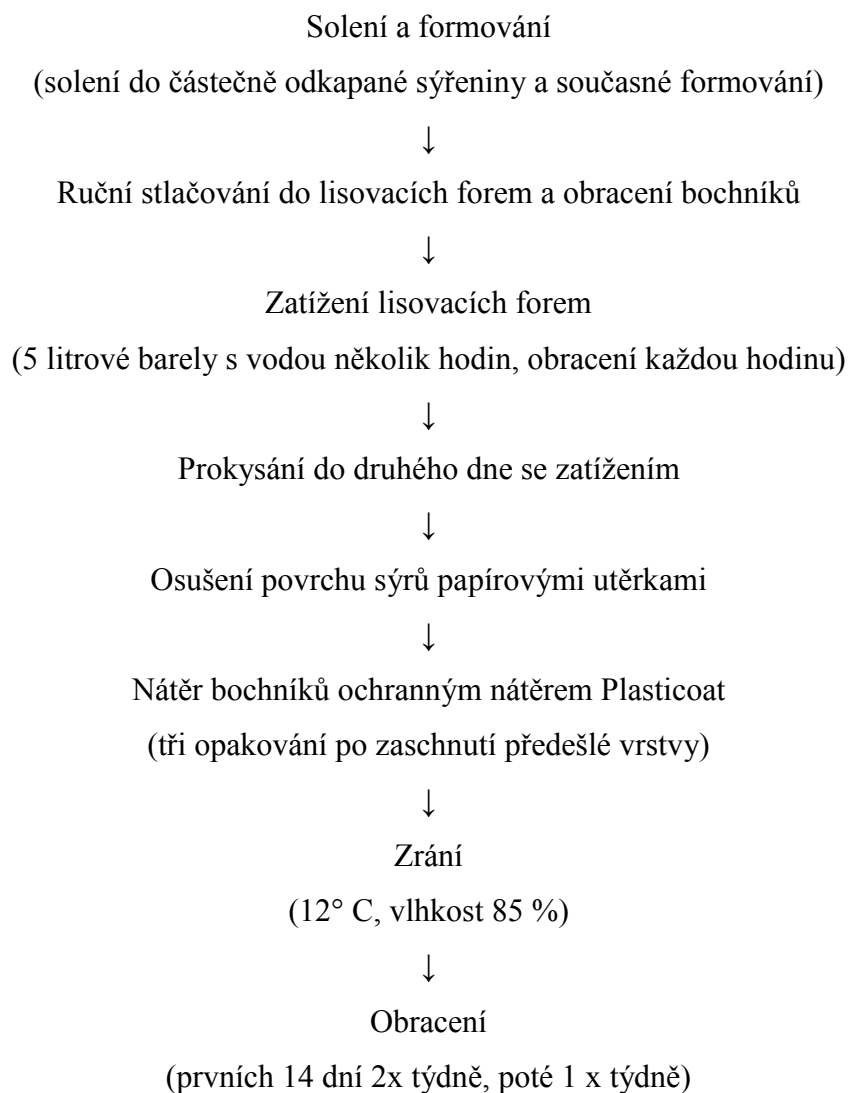
U vzorků se nejdříve provedla analýza chemická a následně na to se provedla analýza sensorická. V mém případě bylo účelem zjistit, zda se chemické ukazatele sýrů, které jsou obohaceny o protektivní kultury, během doby zrání mění. Hodnotila se tato kritéria: sušina, pH - výluh, pH – vpich, SH a NaCl. Dané hodnoty kritérií se zaznamenávaly, abychom mohli z těchto výsledků pomocí statistického hodnocení určit, jak protektivní kultury ovlivňují jednotlivá kritéria.

4.3.1 Postup výroby polotvrdého zrajícího sýra

V kotlovém pastéru, kde se napustilo 70 l syrového kravského mléka byla provedena šetrná pasterace, kde bylo zapotřebí dosažení teploty 72 °C s výdrží 20 sekund. Pak následovalo zchlazení mléka na 30 – 32 °C. Mléko bylo zaočkováno 1% mezofilní zákysovou kulturou (která byla použita u kontroly) či 1% protektivní kulturou (Ferlac MX v tekuté formě, CCDM 731 a *E. faecium* v sušené formě). Následovalo prokysávání mléka po dobu 40 minut (dosažení pH 6,2). Dále bylo přidáno 10 ml CaCl₂ a zároveň mikrobiální syřidlo (podle syřitelnosti). Poté probíhalo syření po dobu 40 minut při teplotě 32 °C. Vzniklá sraženina byla následně pokrájena krájecím nožem na sýrové zrno velikosti lískového ořechu a bylo odebráno 15 litrů syrovátky. Toto množství syrovátky bylo doplněno stejným množstvím vody, která musela mít teplotu 40 °C. Následovalo dohřívání při teplotě 40 °C po dobu 10 – 15 minut. Poté byla vypuštěna syrovátka. Sýřenina byla přesunuta do obdélníkové formy, která byla vyložena sýrařskou plachtou. Do částečně odkapané sýřeniny (do těsta) proběhlo solení a současně formování do menších kulatých lisovacích forem. Po formování přišlo na řadu ruční stáčení lisovacích forem a bochníky se musely pravidelně obracet. Při dalším kroku se lisovací formy musely na několik hodin zatížit pomocí pěti litrových barelů naplněných vodou. Bochníky se musely obracet co hodinu. Takto zatížené sýry se nechaly do druhého dne prokysat. Druhý den se povrchy sýrů osušily papírovými utěrkami a následně byl na bochníky v několika vrstvách aplikován ochranný nátěr Plasticoat ve třech

opakováních. Vždy bylo třeba počkat na zaschnutí předešlé vrstvy. Sýry byly přesunuty do zrací komory, kde byla teplota 12 °C a vlhkost 85 %. Prvních 14 dní byly sýry obraceny každý den, dalších 14 dní se sýry obracely 2 x týdně a pak 1 x týdně. Výrobní diagram (viz níže) ukazuje postup výroby sýrů s protektivní kulturou.





4.3.2 Laboratorní výroba sýrů

Ve třech dnech proběhla výroba šesti vzorků. Každý den bylo vyrobeno vždy po jedné kontrole a jednom pokusu. První výroba byla uskutečněna 16. 6. 2016. V této výrobě vznikla jedna kontrola (vzorek 1) a jeden pokus obsahující mezofilní kulturu a zároveň protektivní kulturu Ferlac MX (vzorek 2). Druhá výroba proběhla o 5 dní později tj. 21. 6. 2016. Zde byla vyrobena opět kontrola (vzorek 3) a další pokus tentokrát za použití mezofilní kultury společně s protektivní kulturou CCDM 731 (vzorek 4). Třetí výroba se konala 23. 6. 2016. Opětovně byla vyrobena kontrola (vzorek 5) a pro další pokus byla použita mezofilní kultura zároveň s protektivní kulturou *E. faecium* (vzorek 6).

4.3.3 Chemická analýza

Chemická analýza byla prováděna na Ústavu technologie potravin Mendelovy univerzity v Brně.

Hodnocení probíhalo v pravidelných intervalech, aby mohlo být ověřeno, jak protektivní kultury ovlivňují kvalitu a trvanlivost polotvrdých sýrů. U všech sýrů probíhalo hodnocení stejným způsobem. Vždy se z daného vzorku odebralo požadované množství, které bylo potřeba na chemické analýzy. Muselo se dbát na sterilitu nožů, aby se dané vzorky mezi sebou nemíchaly. Celkem proběhlo chemické hodnocení pětkrát, vždy po jednom měsíci (19. července., 23. srpna, 20. září, 18. října a 22. listopadu).

4.3.3.1 Stanovení sušiny

Stanovení dle ČSN 57 0107: Metody zkoušení sýrů, tvarohů, krémů a pomazánek.

Na předem zváženou váženku na sušení sýra byla rozprostřena po celém dnu navážka 3 g homogenizovaného vzorku. Vzorek byl zvážen na analytických vahách a jeho hodnota byla zaznamenána jako výchozí. Vzorek se sušil v sušárně při teplotě $102\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, a to do konstantní hmotnosti. Díky rozdílu hodnot pak bylo možné usuzovat množství sušiny v daném vzorku.

Pracovní postup:

Vzorek byl nastrouhán a nastrouhaná hmota se rychle promíchala a zabalila do alobalu, aby se získal reprezentativní vzorek bez ztrát vlhkosti. Miska byla zvážena společně s víčkem s přesností na 0,0001 g. Pro stanovení bylo naváženo 3,00 g vzorku, který byl sušen při 102 °C tři hodiny. Miska byla uzavřena víčkem, vložena do eksikátoru, nechala se vychladnout na pokojovou teplotu a zvážíla se. Sušení bylo opakováno vždy po dobu 1,5 hodiny tak dlouho, dokud byl pokles hmotnosti dvou po sobě následujících měření větší než 0,0005 g. Pro výpočet byla použita nejnižší zaznamenaná hmotnost.

4.3.3.2 Stanovení aktivní kyselosti

Toto stanovení bylo prováděno za pomoci vpichové sondy pH metru přímo do sýrů při měření aktivní kyselosti vpichem. Této sondy bylo za potřebí i při měření aktivní kyselosti výluhem.

Pracovní postup:

- **Pomocí vpichové sondy**

K této metodě byly využity vzorky sýrů, které musely být dostatečně velké, aby do nich mohla být zavedena vpichová elektroda se skleněným hrotem. Pomocí vpichu do vzorku bylo pomocí pH metru změřeno pH. Před každou analýzou byl přístroj kalibrován a mezi jednotlivými měřeními byla sonda umývána destilovanou vodou.

- **Ve vodném výluhu**

10 g nastrouhaného vzorku polotvrdého sýru bylo převedeno do kádinky. Následně bylo po částech přidáváno 20 ml destilované vody pokojové teploty. Vzorek byl důkladně promíchán. Po promíchání se vzorek nechal 30 minut v klidu stát. Po uplynuté době bylo ve výluhu změřeno pH na kalibrovaném pH metru.

4.3.3.3 Stanovení titrační kyselosti

Titrační kyselost se vyjadřuje počtem spotřebovaných ml odměrného roztoku hydroxidu sodného o koncentraci $0,25 \text{ mol.l}^{-1}$, který je potřebný k neutralizaci 100 g sýru na fenolftalein. Pro stanovení titrační kyselosti bylo naváženo 10 g nastrouhaného polotvrdého sýra do třecí misky. Do takto připraveného vzorku byl přidán 1 ml fenolftaleinu a důkladně rozetřen. Během dalšího roztírání ve středu třecí misky byl vzorek titrován odměrným roztokem hydroxidu sodného do trvale slabě růžového zbarvení. Titrační kyselost v SH na 100 g (x) byla vypočtena dle vzorce:

$$x = a \times f \times 10$$

kde je: a – spotřeba odměrného roztoku NaOH v ml

f – faktor odměrného roztoku NaOH

Pracovní postup:

Do porcelánové třecí misky bylo odváženo s přesností 0,01 g zhruba 10 g testovaného sýra. Do takto připraveného vzorku byl přidán 1 ml fenolftaleinu a za stálého míchání tloučkem bylo titrováno roztokem NaOH o koncentraci $0,25 \text{ mol.l}^{-1}$ do růžového zbarvení, stálého 30 sekund.

4.3.3.4 Stanovení obsahu soli

Toto stanovení obsahu chloridů bylo stanovováno přímou titrací vodného výluhu sýra dusičnanem stříbrným o známé koncentraci za použití chromanu draselného jako indikátoru. Podle vzorce vypočteme obsah NaCl v hmotn. % takto:

$$x = \frac{a \times f \times 5,85}{10}$$

kde je: a – spotřeba 0,1 mol.l⁻¹ dusičnanu stříbrného při titraci v ml

f – faktor roztoku dusičnanu stříbrného

Pracovní postup:

Na stanovení obsahu chloridu sodného bylo použito 10 g nastrohaného polotvrdého sýra. Vzorek byl roztírán v třecí misce s přidavkem trochy teplé destilované vody. Vzniklý výluh byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 250 ml a doplněn studenou destilovanou vodou po značku. Takto doplněná baňka byla ponechána asi jednu minutu v klidu. 25 ml zředěného výluhu bylo poté odměřeno do titrační baňky. Do titrační baňky byl přidán 1 ml 5% chromanu draselného. Vzorek byl titrován z byrety odměrným roztokem dusičnanu stříbrného do cihlového zbarvení.

4.3.3.5 Statistické zpracování dat

Výsledky byly zpracovány a vyhodnoceny na počítači v programu Microsoft Excel 2013 a ve statistickém programu STATISTICA 10. Konkrétně byl použit dvouvýběrový párový t-teste na střední hodnotu. Mezi sebou byly porovnávány vzorky sýrů bez a s protektivní kulturou v průběhu pětíměsíčního skladování. U každého chemického parametru byl proveden dvouvýběrový párový t-test na střední hodnotu. Důležitou hodnotou byla tzv. dvoustranná pravděpodobnost (p-hodnota), která říká, zda byla rozdílnost mezi vzorky prokázána. Vzorky byly testovány na hladině pravděpodobnosti $\alpha = 0,05$ a $\alpha = 0,01$.

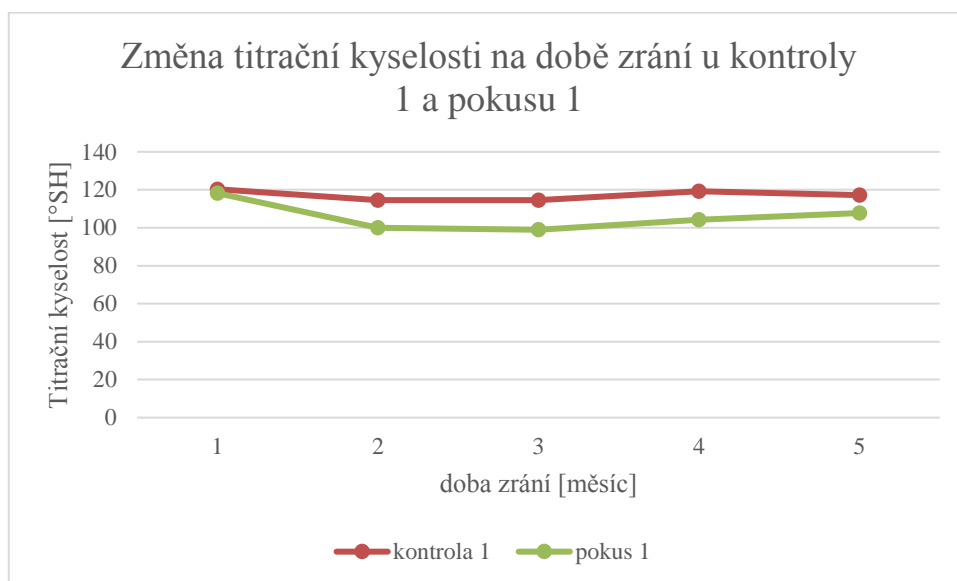
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem práce bylo porovnat vliv protektivních kultur na zrání sýrů pomocí chemické analýzy. Polotvrdé zrající sýry byly vyrobeny v poloprovozu na Mendelově univerzitě v Brně.

Celkem bylo hodnoceno 6 vzorků, a to po dobu pěti měsíců. Jednalo se vždy o 3 kontroly a 3 pokusy. Kontroly byly vyrobeny pouze s mezofilní kulturou, kdežto pokusy byly obohaceny o protektivní kulturu. U každého vzorku byla provedena chemická analýza, která byla zaměřena na tyto parametry: sušinu, titrační kyselost, obsah soli a pH.

Změna titrační kyselosti v závislosti na době zrání u kontroly 1 a pokusu 1

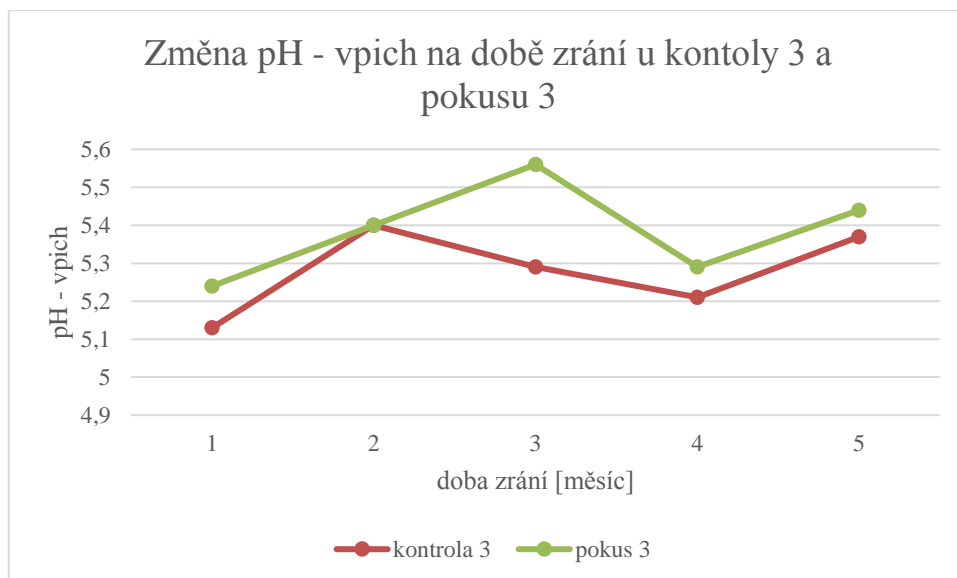
Na Obr. 10 můžeme vidět, že při prvním měsíci měření nevykazují polotvrdé zrající sýry bez přídavku protektivních kultur, ale ani sýry s protektivní kulturou nějakou změnu v titrační kyselosti. Během zrání, ale můžeme sledovat, že protektivní kultura Ferlac MX obsažená v pokusu 1 snižuje titrační kyselost už při druhém měsíci zrání.



Obr. 10 Změna titrační kyselosti na době zrání u kontroly 1 a pokusu 1

Změna pH (pomocí vpichu) v závislosti na době zrání u kontroly 3 a pokusu 3

Na Obr. 11 můžeme vidět, že při použití protektivní kultury *E. faecium* dochází v době zrání od prvního měsíce k nárůstu hodnoty pH – vpich, kdežto u kontroly je tomu tak pouze do druhého měsíce. Lze také vyčíst, že nejvyšší hodnoty pH – vpich je dosaženo v již zmiňovaném třetím měsíci zrání.



Obr. 11 Změna pH – vpich na době zrání u kontoly 3 a pokusu 3

Statistické vyhodnocení výsledků chemického hodnocení u polotvrdých zrajících sýrů s protektivní kulturou Ferlac MX proti kontrole

Tab. 11 Výsledky t-testu pro polotvrdý zrající sýr s protektivní kulturou Ferlac MX oproti kontrole pro hladinu významnosti $p \geq 0,05$ a $p \geq 0,01$

k1 x p1	Sušina (%)	pH vpich	pH výluh	°SH	NaCl (%)
n	10	10	10	10	10
Ø kontrola	74,736	5,166	5,034	117,176	0,676
Ø vzorek	71,076	5,214	5,184	105,824	0,508
SD	1,255	0,040	0,484	2,432	0,414
T _(stat)	3,991	-2,058	-6,228	4,410	2,389
T _{(krit)1}	2,132	2,132	2,132	2,132	2,132
T _{(krit)2}	2,776	2,776	2,776	2,776	2,776
P	*	-	**	*	-

k1 – kontrola s použitím mezofilní kultury, p1 – pokus s protektivní kulturou Ferlac MX, n – počet vzorků v souboru, Ø kontrola – průměr z kontoly 1, Ø vzorek – průměr z pokusu 1, SD – směrodatná odchylka difference, T_(stat) – hodnota t-testu, T_{(krit)1} – tabulková hodnota při hladině významnosti $\alpha = 0,05$, T_{(krit)2} – tabulková hodnota při hladině významnosti $\alpha = 0,01$, P – pravděpodobnost (- není statisticky významný rozdíl $P > 0,05$; * je statisticky významný rozdíl $p < 0,05$; ** je statisticky velmi významný rozdíl $P < 0,01$)

Při hodnocení K1 (kontroly 1 s mezofilní kulturou) a p1 (pokusu 1 s protektivní kulturou Ferlac MX) dvouvýběrovým párovým t-testem na střední hodnotu při hladině pravděpodobnosti $\alpha = 0,05$ (Tab. 11), byly prokázány statistické rozdíly při hodnocení obsahu sušiny a při měření titrační kyselosti. Při hodnocení pH ve výluhu sýra byl prokázán dokonce statisticky velmi významný rozdíl ($p < 0,01$).

Statistické vyhodnocení výsledků chemického hodnocení u polotvrdých zrajících sýrů s protektivní kulturou CCDM 731 proti kontrole

Tab. 12 Výsledky t-testu pro polotvrdý zrající sýr s protektivní kulturou CCDM 731 oproti kontrole pro hladinu významnosti $p \geq 0,05$ a $p \geq 0,01$

K2 x p2	Sušina (%)	pH vpich	pH výluh	°SH	NaCl (%)
n	10	10	10	10	10
Ø kontrola	69,475	5,352	5,294	96,136	0,758
Ø vzorek	71,574	5,272	5,278	98,322	0,700
SD	1,226	0,033	0,041	2,087	0,043
T_(stat)	-1,263	2,712	1,064	-0,654	1,542
T_{(krit)1}	2,131	2,131	2,131	2,131	2,131
T_{(krit)2}	2,776	2,776	2,776	2,776	2,776
P	-	-	-	-	-

k2 – kontrola s použitím mezofilní kultury, p2 – pokus s protektivní kulturou CCDM 731, n – počet vzorků v souboru, Ø kontrola – průměr z kontroly 1, Ø vzorek – průměr z pokusu 1, SD – směrodatná odchylka difference, T_(stat) – hodnota t-testu, T_{(krit)1} – tabulková hodnota při hladině významnosti $\alpha = 0,05$, T_{(krit)2} – tabulková hodnota při hladině významnosti $\alpha = 0,01$, P – pravděpodobnost (- není statisticky významný rozdíl $P > 0,05$; * je statisticky významný rozdíl $p < 0,05$; ** je statisticky velmi významný rozdíl $P < 0,01$)

Při hodnocení K2 (kontroly 2 s mezofilní kulturou) a p2 (pokusu 2 s protektivní kulturou CCDM 731) dvouvýběrovým párovým t-testem, při hladině pravděpodobnosti $\alpha = 0,05$ a $\alpha = 0,01$ (Tab. 12) nebyl prokázán statistický rozdíl při hodnocení chemických parametrů. Z toho jde vyvodit, že během zrání se neměnily dané parametry.

V našich měřeních používáme *L. lactis subsp. lactis*. Podobný výzkum, ale na jinou kulturu prováděl Tomáška et al. (2010). Dle něho proběhl výzkum, kde byla studována aktivita *Lactobacillus rhamnosus* v polotvrdých sýrech. *Lactobacillus*

rhamnosus 65 a 123 byly jako doplňkové kultury kombinované s 2 druhy laktokokových startovacích kultur – ZS25 a Delvotec MT-53. Celkově proběhlo 10 poloprovozních výrob. Sušina se pohybovala v intervalu 50,59 g.100g⁻¹ – 56,27 g.100g⁻¹ (52,87 ± 1,35) g.100g⁻¹. Aktivní kyselost se měnila v intervalu od 5,02 do 5,28 (5,14 ± 0,07) a titrační kyselost byla měřena v intervalu od 86 °SH do 106 °SH (98,40 ± 4,11) °SH. Použitá kultura měla minimální vliv na měřené vlastnosti sýrů. Sýry s přidavkem *Lactobacillus rhamnosus* hodnotili hodnotitelé jako sensoricky lepší. Během studie se zjistilo, že přidavek doplňkové kultury ke kultuře startovací nemá vliv na analytické vlastnosti sýrů (sušina, pH a titrační kyselost) v průběhu zrání. Tato kultura má ovšem vliv na sensorické vlastnosti.

Statistické vyhodnocení výsledků chemického hodnocení u polotvrdých zrajících sýrů s protektivní kulturou *E. faecium* proti kontrole

Tab. 13 Výsledky t-testu pro polotvrdý zrající sýr s protektivní kulturou *E. faecium* oproti kontrole pro hladinu významnosti $p \geq 0,05$ a $p \geq 0,01$

K3 x p3	Sušina (%)	pH vpich	pH výluh	°SH	NaCl (%)
n	10	10	10	10	10
Ø kontrola	70,415	5,280	5,204	103,634	0,764
Ø vzorek	69,304	5,386	5,314	93,114	0,930
SD	0,873	0,038	0,038	3,063	0,060
T_(stat)	0,953	-2,367	-5,719	6,875	-2,594
T_{(krit)1}	2,131	2,131	2,131	2,131	2,131
T_{(krit)2}	2,776	2,776	2,776	2,776	2,766
P	-	-	**	**	-

k3 – kontrola s použitím mezofilní kultury, p3 – pokus s protektivní kulturou *E. faecium*, n – počet vzorků v souboru, Ø kontrola – průměr z kontroly 1, Ø vzorek – průměr z pokusu 1, SD – směrodatná odchylka difference, T_(stat) – hodnota t-testu, T_{(krit)1} – tabulková hodnota při hladině významnosti $\alpha = 0,05$, T_{(krit)2} – tabulková hodnota při hladině významnosti $\alpha = 0,01$, P – pravděpodobnost (- není statisticky významný rozdíl $P > 0,05$; * je statisticky významný rozdíl $p < 0,05$; ** je statisticky velmi významný rozdíl $P < 0,01$)

Při hodnocení K3 (kontroly 3 s mezofilní kulturou) a p3 (pokusu 3 s protektivní kulturou *E. faecium*) dvouvýběrovým párovým t-testem na střední hodnotu, při hladině pravděpodobnosti $\alpha = 0,01$ (Tab. 13), byly prokázány statisticky velmi významné rozdíly

při hodnocení pH ve výluhu a při měření titrační kyselosti. U ostatních sledovaných charakteristik se statistický rozdíl naměřených hodnot prokázat nepodařilo.

Statistické vyhodnocení výsledků chemického hodnocení u polotvrdých zrajících sýrů s protektivní kulturou Ferlac MX proti protektivní kultuře *E. faecium*

Tab. 14 Výsledky t-testu pro polotvrdý zrající sýr s protektivní kulturou Ferlac MX oproti protektivní kultuře *E. faecium* pro hladinu významnosti $p \geq 0,05$ a $p \geq 0,01$

Protektivní p1 x p3	Sušina (%)	pH vpich	pH výluh	°SH	NaCl (%)
n	10	10	10	10	10
Ø kontrola	71,076	5,214	5,184	105,824	0,508
Ø vzorek	69,304	5,386	5,314	93,114	0,930
SD	1,226	0,045	0,044	3,091	0,087
T_(stat)	1,564	-3,833	-3,438	2,031	-4,673
T_{(krit)1}	2,131	2,131	2,131	2,131	2,131
T_{(krit)2}	2,776	2,776	2,776	2,776	2,776
P	-	*	*	-	**

p1 – pokus s protektivní kulturou Ferlac MX, p3 – pokus s protektivní kulturou *E. faecium*, n – počet vzorků v souboru, Ø kontrola – průměr z kontroly 1, Ø vzorek – průměr z pokusu 1, SD – směrodatná odchylka difference, T_(stat) – hodnota t-testu, T_{(krit)1} – tabulková hodnota při hladině významnosti $\alpha = 0,05$, T_{(krit)2} – tabulková hodnota při hladině významnosti $\alpha = 0,01$, P – pravděpodobnost (- není statisticky významný rozdíl $P > 0,05$; * je statisticky významný rozdíl $p < 0,05$; ** je statisticky velmi významný rozdíl $P < 0,01$)

Při hodnocení p1 (pokusu 1 s protektivní kulturou Ferlac MX) a p3 (pokusu 3 s protektivní kulturou *E. faecium*) dvouvýběrovým párovým t-testem na střední hodnotu, při hladině pravděpodobnosti $\alpha = 0,05$ (Tab. 14), byly prokázány statisticky významné rozdíly při hodnocení pH ve výluhu a pH při vpichu. Dále se při hladině pravděpodobnosti $\alpha = 0,01$ (Tab. 14) prokázal velmi významný statistický rozdíl při měření obsahu soli. U ostatních sledovaných charakteristik se statistický rozdíl naměřených hodnot prokázat nepodařilo.

Vyhodnocení výsledků chemického hodnocení u polotvrdých zrajících sýrů s protektivní kulturou Ferlac MX oproti kontrole.

Tab. 15 Porovnání kontroly s mezofilní kulturou a pokusem s protektivní kulturou Ferlac MX

Doba zrání [dny]	Srovnání vzorků	Průměr hodnot (k1+p1)/2	Rozdíl hodnot (k1 – p1)	% rozdílnosti vzorků
°SH				
34	K1xp1	119,26	2,08	1,744
69	K1xp1	107,28	14,58	13,591
87	K1xp1	106,76	15,62	14,631
115	K1xp1	111,71	15,1	13,517
149	K1xp1	112,49	9,38	8,339

k1 – kontrola s použitím mezofilní kultury, p1 – pokus s protektivní kulturou Ferlac MX, červeně označeny rozdíly vyšší jak 5 %

Pro hodnocení rozdílu v hodnotách měřených veličin u kontrolních sýrů a k nim náležících vzorků s protektivní kulturou byl jako hodnotící znak zvolen podíl rozdílu naměřených hodnot a průměru naměřených hodnot pro jednotlivý ukazatel. Pro hodnocení pozitivního rozdílu byla stanovena hodnota $\geq 5\%$ (Tab. 15). Při hodnocení K1 a p1 na základě tohoto ukazatele je možné usoudit, že protektivní kultura měla vliv na zvýšení kyselosti sýrů v čase 69, 87, 115, 149 dnů zrání.

Dle Havlíkové et al. (2013) proběhla studie, kde byla ověřována inhibiční aktivita kmene *Lactobacillus paracasei/casei* ML4DP vůči dekarboxylázapozitivním laktobacilům (*Lactobacillus curvatus*) v sýrech vyrobených v poloprovozních podmínkách. Prováděny byly tyto fyzikálně-chemické rozborů: pH, SH, sušina, a_w , obsah nižších mastných kyselin. Vzorky byly odebírány následně v 1., 30., 60. a 90. dnu po výrobě. Na základě dosažených výsledků byla potvrzena antimikrobiální aktivita živých buněk testovaného kmene *Lactobacillus paracasei/casei* ML4DP.

Přídavek kmene *Lactobacillus paracasei/casei* ML4DP vedl v poloprovozních podmínkách výroby sýrů ke snížení počtů KTJ/ml biogenní aminy tvořících kmenů *Lactobacillus curvatus* přibližně o 1 řád. Nebyly ovlivněny fyzikálně chemické vlastnosti vyrobených sýrů.

Vyhodnocení výsledků chemického hodnocení u polotvrdých zrajících sýrů s protektivní kulturou CCDM 731 proti kontrole

Tab. 16 Porovnání kontroly s mezofilní kulturou a pokusem s protektivní kulturou CCDM 731

Doba zrání [dny]	Srovnání vzorků	Průměr hodnot $(k_2+p_2)/2$	Rozdíl hodnot $(k_2 - p_2)$	% rozdílnosti vzorků
°SH				
29	K2xp2	91,915	8,85	9,628
64	K2xp2	95,305	7,29	7,649
82	K2xp2	95,04	0,52	0,547
110	K2xp2	108,06	9,9	9,162
144	K2xp2	95,825	4,17	4,352

k₂ – kontrola s použitím mezofilní kultury, p₂ – pokus s protektivní kulturou CCDM 731, červeně označeny rozdíly vyšší jak 5 %

Pro hodnocení rozdílu v hodnotách měřených veličin u kontrolních sýrů a k nim náležících vzorků s protektivní kulturou byl jako hodnotící znak zvolen podíl rozdílu naměřených hodnot a průměru naměřených hodnot pro jednotlivý ukazatel. Pro hodnocení pozitivního rozdílu byla stanovena hodnota $\geq 5\%$ (Tab. 16). Při hodnocení K₂ a p₂ na základě tohoto ukazatele je možné usoudit, že protektivní kultura měla vliv na zvýšení kyselosti sýrů v čase 29, 64 a 110 dnů zrání.

Pokus probíhal s kulturou *L. lactis subsp. lactis*. Dle Tůmy et al. (2006) byla testována antimikrobiální aktivita *Lactobacillus paracasei* izolovaných z polotvrdých sýrů. Ve výzkumu se vyskytly 4 kmeny, které prokazovaly inhibiční účinek proti klostridiím způsobený látkou bílkovinné povahy (s největší pravděpodobností bakteriocinem). Podle toho se usuzuje, že antifungální a antiklostridiální aktivita kmenů *Lactobacillus paracasei*, vyskytující se v sýru, by mohla být použita k otlacení nežádoucích plísní a *Clostridium* v průběhu zrání. Ze závěru vyplývá, že použití tohoto kmene jako doplňkové kultury nebo jako součástí multi-kmenových kultur, by mohlo mít přínos při výrobě polotvrdých sýrů.

Vyhodnocení výsledků chemického hodnocení u polotvrdých zrajících sýrů s protektivní kulturou *E. faecium* proti kontrole

Tab. 17 Porovnání kontroly s mezofilní kulturou a pokusem s protektivní kulturou *E. faecium*

Doba zrání [dny]	Srovnání vzorků	Průměr hodnot (k3+p3)/2	Rozdíl hodnot (k3 – p3)	% rozdílnosti vzorků
°SH				
27	K3xp3	89,57	10,42	11,633
62	K3xp3	97,905	8,33	8,508
80	K3xp3	107,02	16,14	15,081
108	K3xp3	89,57	10,42	11,633
142	K3xp3	107,805	7,29	6,762

k3 – kontrola s použitím mezofilní kultury, p3 – pokus s protektivní kulturou *E. faecium*, červeně označeny rozdíly vyšší jak 5 %

Pro hodnocení rozdílu v hodnotách měřených veličin u kontrolních sýrů a k nim náležících vzorků s protektivní kulturou byl zvolen jako hodnotící znak podíl rozdílu naměřených hodnot a průměru naměřených hodnot pro jednotlivý ukazatel. Pro hodnocení pozitivního rozdílu byla stanovena hodnota $\geq 5\%$ (Tab. 17). Při hodnocení K3 a p3 na základě tohoto ukazatele je možné usoudit, že protektivní kultura měla vliv na zvýšení kyselosti sýrů v celém průběhu zrání.

6 ZÁVĚR

Cílem práce bylo zhodnotit používání protektivních kultur při výrobě polotvrdých zrajících sýrů a jejich vliv na chemické parametry, kvalitu a trvanlivost.

Mezi ochranné neboli protektivní kultury jsou řazeny i bakterie mléčného kysání. Tyto kultury jsou využívány především pro jejich schopnost prodloužit skladovatelnost fermentovaných produktů, kontrolovat v těchto potravinách růst patogenních mikroorganismů. Hlavní funkcí je kontrola růstu grampozitivních patogenů. Mezi patogeny v sýrech nejčastěji patří *Listeria monocytogenes*, *Clostridium tyrobutiricum*. Dále tyto kultury kontrolují ve fermentovaných výrobcích růst plísní a kvasinek. Využíváním těchto kultur přispíváme ke zvýšení trvanlivosti a také se zlepšují organoleptické vlastnosti potravin.

Protektivní kultury jsou využívány zejména kvůli produkci inhibičních metabolitů. Jedná se o organické kyseliny, peroxid vodíku, diacetyl a bakteriociny. Bakteriociny se liší ve spektru účinnosti, mechanismu účinku, molekulové hmotnosti, genetickém původu a v biochemických vlastnostech. Těchto vlastností se může využít ke zvýšení mikrobiologické bezpečnosti sýrů a také k urychlení zrání sýrů.

Výroba polotvrdých zrajících sýrů obohacených o tři rozdílné protektivní kultury probíhala na Mendelově univerzitě v Brně v sýrařském poloprovozu. Nejdříve došlo k šetrné pasteraci mléka, které se nechalo vychladit. Poté došlo k naočkování mléka, a to mezofilní zákysovou kulturou nebo kulturou protektivní. Jako protektivní kultury byly voleny Ferlac MX, CCDM 731 a *E. faecium*. Po prokysání byl přidán chlorid vápenatý a vypočítaná dávka mikrobiálního syřidla. Po přidání syřidla došlo ke srážení. Vzniklá sýřenina byla pokrájena na kostky o velikosti lískového ořechu. Následně docházelo k praní zrna, dohřívání a vypouštění syrovátky. Po těchto krocích následovalo solení (do částečně odkapané sýřeniny) a formování, které probíhalo ručním stlačováním do lisovacích forem a k obrácení bočnicků. Lisovací formy byly poté zatíženy. Nechalo se zatížené prokysávat do druhého dne. Povrch sýrů byl pak osušen a následně proveden ochranný nátěr. Bočnický se nechaly zrát při dané teplotě a vlhkosti a pravidelně se obracely.

Sýry byly skladovány ve zracích boxech při teplotě 12 °C a vlhkosti 85 % a každý měsíc pomocí chemické analýzy hodnoceny po dobu 5 měsíců. Stanovovala se sušina, aktivní kyselost (výluhem a vpichem), titrační kyselost a obsah soli.

Pomocí statistického vyhodnocení jsme zjistili, že sýry s protektivní kulturou nemají zásadní vliv na chemické parametry. Parametry se lišily pouze v menším množství. Nejde tedy podle naměřených výsledků určit, která protektivní kultura je vhodnější při výrobě sýrů. S jistotou, ale můžeme říci, že díky použití protektivní kultury došlo k prodloužení trvanlivosti. V 6. měsíci už nemohlo dojít k měření u sýru, který neobsahoval protektivní kulturu a sloužil jako kontrola, protože začal být napadán mikroorganismy na povrchu a tím došlo k následnému kažení sýra. Tím pádem nebylo možné v měření pokračovat, protože nebylo nadále s čím srovnávat.

Naše výsledky ukazují, že protektivní kultury významně neovlivnily kvalitu sýrů s nízko dohřívanou sýřeninou, ale měly vliv na jejich dobu trvanlivosti. Využití těchto kultur umožní potlačení růstu nežádoucích mikroorganismů v sýrech a zvýší jejich bezpečnost a trvanlivost.

7 LITERATURA

ABEE, T., KROCKEL, L., HILL, C., 1995: Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **28**(2), 169-185 s. [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00055-0. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168160595000550>

ANNAMALAI, N., MANIVASAGAN, P., BALASUBRAMANIAN, T., VIJAYALAKSHMI, S., 2009: Enterocin from *Enterococcus faecium* isolated from mangrove environment. *African Journal of Biotechnology*. Svazek 8 (22), 6311-6316 s. ISSN 1684-5315. Databáze online [cit. 2017-03-14]. Dostupné z: http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.ajol.info%2Findex.php%2Fajb%2Farticle%2Fdownload%2F66144%2F53854&ei=XBVZU92RMofItQa_oYCwBA&usg=AFQjCNHhoLX0o1wbbZL1Y6gdDkoKDAih3Q&sig2=FuOe3frcZXV-ExO4NDQHcg&bvm=bv.65397613,d.Yms

ANONYM, 2017: *Lactobacillus plantarum*. online [cit. 2017-04-06]. Dostupné z: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Lactobacillus_plantarum

ANONYM 1, 2017: Ochranné a zrací přípravky. *BioPro o.k. servis* Praha. online [cit. 2017-03-12]. Dostupné z: <http://eshop.biopro.cz/ochranne-a-zraci-pripravky#!/ochranne-a-zraci-pripravky>

ANONYM 2, 2017: Delvocoat (Plasticoat) White 07081 (1kg). *BioPro o.k. servis* Praha. online [cit. 2017-03-12]. Dostupné z: [http://eshop.biopro.cz/delvocoat-plasticoat-white-07081-1kg\[1\]](http://eshop.biopro.cz/delvocoat-plasticoat-white-07081-1kg[1])

ANONYM 3, 2017: *Pediococcus acidilactici*. online [cit. 2017-01-10]. Dostupné z: [www: <http://www.old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/ped.htm>](http://www.old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/ped.htm)

ARQUÉS, J. L., RODRÍGUEZ, E., LANGA, S., LANDETE, J. M., MEDINA, M., 2015: Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria in Dairy Products and Gut: Effect on

Pathogens. *BioMed Research International* online [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1155/2015/584183. ISSN 2314-6133. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/584183/>

BALCIUNAS, E. M., CASTILLO MARTINEZ, F. A., TODOROV, S. D., FRANCO, B. D. G. de Melo, CONVERTI, A., OLIVEIRA, R. P. de Souza., 2013: Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control* [online]. 32(1), 134-142 [cit. 2017-03-27]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.11.025. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713512006275>

BERESFORD, T. P., FITZSIMONS, N. A., BRENNAN, N. L., COGAN, T. M., 2001: Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*. 11(4-7), 259-274 s. DOI: 10.1016/S0958-6946(01)00056-5. ISSN 09586946. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694601000565>

CARROLL, R., 2002: *Home cheese making: recipes for 75 homemade cheeses*. 3rd ed. North Adams, MA: Storey Books, ix, 278 p. ISBN 15-801-7464-7.

COELHO, M. C., SILVA, C. C. G., RIBEIRO, S. C., DAPKEVICIUS, M. L. N. E., ROSA, H. J. D., 2014: Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 191, 53-59 s. Databáze online [cit. 2017-02-10]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160514004334>

ČEJNA, V., 2012: Možnosti balení farmářských sýrů, Farmářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků IX. (*Sborník referátů ze semináře s mezinárodní účastí*, Mendelova univerzita, Brno, 117 s.

DEEGAN, L. H., COTTER, P. D., HILL, C., ROSS, P., 2006: Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* [online]. 16(9), 1058-1071 s [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1016/j.idairyj.2005.10.026. ISSN 09586946. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694605002827>

DE VRIES, M. C., VAUGHAN, E. E., KLEEREBEZEM, M., DE VOS, W. M., 2006: Lactobacillus plantarum-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal* [online]. **16**(9), 1018-1028 s [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1016/j.idairyj.2005.09.003. ISSN 09586946. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694605001809>

DOBSON, A., COTTER, P. D., ROSS, R. P., HILL, C., 2012: „Bacteriocin Production: a Probiotic Trait?“ *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 78, no. 1, p. 1–6. DOI: 10.1128/AEM.05576-11.

FEORI, M., 2012. Enterococcus faecium. *Microbewiki*. online [cit. 2017-01-16]. Dostupné z [www: <http://www.microbewiki.kenyon.edu/index.php/Enterococcus_faecium>](http://www.microbewiki.kenyon.edu/index.php/Enterococcus_faecium)

FOX, P., 2004: *Cheese: chemistry, physics, and microbiology* /. 3rd ed. Amsterdam:Elsevier, 617 s. ISBN 0-12-263652-x1.

GAJDŮŠEK, S., 2002: *Mlékařství II*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 135 s. ISBN 80-7157-342-6.

GÁLVEZ, A., ABRIOUEL, H., OMAR, N. B., LÓPEZ, R. L., 2007: Bacteriocin-based strategies for food biopreservation, *International Journal of Food Microbiology*, [online]. 120(1-2), 51-70 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160507003066>

GAUTIER, M., DE CARVALHO, A., ROUAULT, A., 1996: DNA fingerprinting of dairy propionibacteria strains by pulsed-field electrophoresis. *Current Microbiology* [online]. 32(1), 17-24 [cit. 2017-04-07]. DOI: 10.1007/s002849900004. ISSN 0343-8651. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002849900004>

GHANBARI, M., JAMI, M., DOMIG, K. J., KNEIFEL, W., STILES, M. S., MANIVASAGAN, P., VENKATESAN, J., KIM, Se-K., BELAL, J., HASSAN, Z.,

SAARI, N., 2013: Seafood biopreservation by lactic acid bacteria – A review. *LWT - Food Science and Technology*., vol. 54, issue 2, s. 341-360. DOI: 10.5772/51026.

GIRAFFA, G., 2003: Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* [online] **88**(2-3), 215-222 [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00183-1. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160503001831>

GÖRNER, F., VALÍK, L., 2004: Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami. 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum. 528 s. ISBN 80-967064-9-7

GRATTEPANCHE, F., MIESCHER-SCHWENNINGER, S., MEILE, L., LACROIX, C., 2008: Recent developments in cheese cultures with protective and probiotic functionalities, *Dairy science & technology*, EDP sciences/Springer, 88 (4-5), pp. 421–444.,

GREY, CH., 2015. *What Is Lactobacillus paracasei*. *Livestrong*. online [cit. 2017-01-03] Dostupné z [www: <http://www.livestrong.com/article/395836-what-is-lactobacillusparacasei/>](http://www.livestrong.com/article/395836-what-is-lactobacillusparacasei/)

HARNETT, J., DAVEY, G., PATRICK, A., CADDICK, C., PEARCE, L., 2011: Lactic Acid Bacteria - *Streptococcus thermophilus*. *Encyklopedia of Dairy Sciences*. [online]. Elsevier, s. 143 [cit. 2017-04-05]. DOI: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00268-5. ISBN 9780123744074. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123744074002685>

HATI, S., MANDAL, S., PRAJAPATI, J., 2013: Novel Starters for Value Added Fermented Dairy Products. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal* [online]. 1(1), 83-91 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.12944/CRNFSJ.1.1.09. ISSN 23220007. Dostupné z:

<http://www.foodandnutritionjournal.org/volume1number1/novel-starters-for-value-added-fermented-dairy-products/>

HAVLÍKOVÁ, Š., KVASNIČKOVÁ, E., BUŇKA, F., 2013: Testování vlivu bakteriálního izolátu potlačujícího růst producentů biogenních aminů při poloprovozních výrobcích sýrů, *Mlékařské listy*, **2013**(137), I – V.

HOLLAND, R., CROW, V., CURRY, B., 2011: Lactic Acid Bacteria, *Pediococcus* spp. *Encyklopedia of Dairy Sciences* [online]. s. 149 [cit. 2017-04-07]. DOI: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00269-7. ISBN 9780123744074. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123744074002697>

CHRISTIANSEN P., PATERSEN M. H., KASK S., MØLLER P. L., PETERSEN M., NIELSEN E. W., VOGENSEN F. K. a ARDÖ Y., 2005: Anticlostridial activity of *Lactobacillus* isolated from semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*, 15 (6-9): 901–909 s., ISSN: 09586946.

JAY, J. M., 2005: *Modern food microbiology*. 7th ed. New York: Springer, 790 s. ISBN 03-872-3180-3.

KAČENÁK, I., 2007: *Základy balenia tovaru*, Ekonóm, Bratislava, 382 s.

KADLEC, P., 2002: *Technologie potravin I*. 1.vyd. Praha: VŠCHT, s. 79-86. ISBN 80-7080-509-9.

KADLEC, P., MELZUCH, K., VOLDŘICH, M., 2012: *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 569 s. ISBN 978-80-7418-145-0.

KALHOTKA, L., 2014: Biogenní aminy v sýrech – skrytá hrozba, Farmářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků XI. (*Sborník referátů ze semináře s mezinárodní účastí*, Mendelova univerzita, Brno, 68 s.

KARIMAEI, S., SADEGHI, J., ASADIAN, M., 2016: Antibacterial potential and genetic profile of *Enterococcus faecium* strains isolated from human normal flora: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Microbial Pathogenesis*. **96**(3), 67-71. DOI: 10.1016/j.micpath.2016.05.004. ISSN 08824010. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401016301656>

KVASNIČKOVÁ, A., 2006: Použití nisinu (E 234) jako potravinářského aditiva. *Agronavigátor*. Databáze online [cit. 2017-03-02]. Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/service.asp?act=email&val=46256>

LACROIX, 2011: Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation. *Oxford: Woodhead Publishing*, Edited by Christophe, ISBN 9780857090522.

LANTANO, C., ALFIERI, I., CAVAZZA, A., CORRADINI, C., LORENZI, A., ZUCHETTO, N., MONTENERO, A., 2014: Natamycin based sol-gel antimicrobial coatings on polylactic acid films for food packaging, *Food Chemistry* [online]. 165, 342-347 [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.05.066. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614007729>

LARSEN, N., MOSLEHI-JENABIAN, S., WERNER, B. B., 2016: Transcriptome analysis of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* during milk acidification as affected by dissolved oxygen and the redox potential: Towards Species Pan-Genome Definition and Exploitation of Diversity. *International Journal of Food Microbiology*. **226**(7), 5-12. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.002. ISSN 01681605.

LAW, B. A., TAMINE, A. Y., 2010: *Technology of Cheesemaking*, 2. vydání, Blackwell Publishing Ltd, Chichester, 482 s., ISBN 978-1-4051-8298-0

LEDERBERG, J., 2000: *Encyclopedia of microbiology*. 2. vyd., San Diego: Academic Press, 929 s. ISBN 0-12-226801-61.

LEVERRIER, P., DIMOVA, D., PICHEREAU, V., AUFRAY, Y., BOYAVAL, P., JAN, G., 2003: Susceptibility and adaptive response to bile salts in *Propionibacterium*

freudenreichii: physiological and proteomic analysis. *Applied Environmental Microbiology* [online]. 69(7), 3809-3818 [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1128/AEM.69.7.3809-3818.2003. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.69.7.3809-3818.2003>

LÓPEZ, P., QUINTANS, N. G., BLANCATO, V., REPIZO, G., MAGNI, CH., 2008: Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria. *Molecular Aspects of Lactic Acid Bacteria for Traditional and New Applications*. Kerala, India: Research Signpost, s. 1-24. ISBN 978-81-308-0250-3.

LUQUET, F. M., CORRIEU, G., 2005: Bactéries lactiques et probiotiques. *Technology & Document*, Lavoisier. Paris: 3-37.

MARTH, E. H., 1998: Applied Dairy Microbiology. *New York: Marcel Dekker*. 744 s. ISBN 0-8247-0116-X

MCSWEENEY, P. L. H., 2007: *Cheese problems solved*. Boca Raton: CRC Press. ISBN 1-4200-4394-3.

MCSWEENEY, P. L. H., 2013: SOUHRN PŘEDNÁŠKY O ZRÁNÍ PŘÍRODNÍCH SÝRŮ přednesený dne 5. září 2013 na Fakultě technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, *Mlékařské listy*, **2013**(141), 6-9.

MEDVEĐOVÁ, A., VALÍK, L., LIPTÁKOVÁ, D., BAJÚSOVÁ, B., 2007: Charakterizácia rastu *Lactobacillus rhamnosus* GC v mlieku, s. 81-85. In: ŠTĚTINA, J., ČURDA, L. (eds): *Celostátní přehledky sýrů 2007: Výsledky přehledů a sborník přednášek semináře: Mléko a sýry* [online]. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 282 s. ISBN 978-80-7080-661-6. [cit. 2017-04-8]. Dostupné z: https://old.vscht.cz/tmt/prehledky/2007/Sbornik_CPS2007.pdf

MERAZ-TORR, L. S., HERNANDEZ, H., 2012: Conjugated Linoleic Acid in Dairy Products: A Review. *American Journal of Food Technology*. 2012-4-1, **7**(4), 176-179.

DOI: 10.3923/ajft.2012.176.179. ISSN 15574571. Dostupné také z:
<http://www.scialert.net/abstract/?doi=ajft.2012.176.179>

MESSENS, W., VUYST, L. De, 2002: Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs—a review. *International Journal of Food Microbiology.*, vol. 72, 1-2, s. 31-43. DOI: 10.1016/s0168-1605(01)00611-0. Dostupné z: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro.

MOLIN, G., 2001: Probiotics in food not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum*, *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 73, p. 380–385.

PAINEAU, D., CARCANO, D., LEYER, G., 2008: Effects of seven potential probiotic strains on specific immune responses in healthy adults. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* [online]. 53(1), 107-113 [cit. 2017-03-27]. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2008.00413.x. ISSN 09288244. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2008.00413.x>

PALLERA, J., 2011. *Lactobacillus sakei*: *Microbewiki*. online [cit. 2017-03-02]
Dostupné z [www:<http://www.microbewiki.kenyon.edu/index.php/Lactobacillus sakei>](http://www.microbewiki.kenyon.edu/index.php/Lactobacillus_sakei)

PANYKO, J., 2012. *Lactobacillus rhamnosus*: Probiotic Bacteria with Impressive Health Benefits. *Power of Probiotics: The Nutrition Authority on How To Be Healthy, Yet Save Money, With Probiotics*. online [cit. 2017-02-21] Dostupné z [www:
http://www.powerofprobiotics.com/Lactobacillus-rhamnosus.html](http://www.powerofprobiotics.com/Lactobacillus-rhamnosus.html)

PARADA, J. L., CARON C. R., MEDEIROS, A. B. P., SOCCOL, C. R., 2007: Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology An International Journal*, vol. 50, p. 521–542.

PLOCKOVÁ, M., HORÁČKOVÁ, Š., 2010: Co nového v mikrobiologii sýrů, s. 32 – 37. In: ŠTĚTINA, J., ČURDA, L. (eds): *Celostátní přehledky sýrů 2010: Výsledky přehledek*

a sborník přednášek konference: *Mléko a sýry* [online]. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 282 s. ISBN 978-80-7080-760-6. [cit. 2017-04-14]. Dostupné z: https://vscht.cz/tmt/prehličky/2010/Sbornik_CPS2010www.pdf

PORTO, M. C. W., KUNIYOSHI, T. M., AZEVEDO, P. O. S., 2017: *Pediococcus* spp: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnology Advances*. **35**(3), 361-374. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.03.004. ISSN 07349750. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975017300228>

RANDAZZO, C. L., CAGGIA, C., NEVIANI, E., 2013: *Cheese ripening: quality, safety and health aspects*. New York: Nova Publishers. Advances in food safety and food microbiology. ISBN 978-1-62417-032-4.

RILEY, M. A., WERTZ, J. E., 2002: Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annual Reviews in Microbiology* [online]. 56(1), 117-137 [cit. 2017-03-27]. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.161024. ISSN 0066-4227. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>

ROSS, P. R., MORGAN, S., HILL, C., 2002: Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **79**(1-2), 3-16 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1016/S0168-1605(02)00174-5. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160502001745>

SALMINEN, M. K., RAUTELIN, H., TYNKKYNNEN, S., POUSSA, T., SAXELIN, M., VALTONEN, V., JÄRVINEN, A., 2004: Lactobacillus bacteremia, clinical significance, and patient outcome with, special focus on probiotic L. rhamnosus GG". *Oxford Journal: Clinical Infection Diseases* [online]. 38(1), 62-69 [cit. 2017-04-04]. DOI: 10.1086/380455. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/380455>

SETTANNI, L., MOSCHETTI, G., 2010: Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology* [online]. **27**(6),

691-697 [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1016/j.fm.2010.05.023. ISSN 07400020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002010001292>

SCHNÜRER, J., MAGNUSSON, J., 2005: Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science.*, vol. 16, 1-3, s. 70-78. DOI: 10.1016/j.tifs.2004.02.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224404001943>.

SMOKVINA, T., WELS, M., POLKA, J., 2013: Lactobacillus paracasei Comparative Genomics: Towards Species Pan-Genome Definition and Exploitation of Diversity. *PLoS ONE*. [online] 2013-7-19, 8(7), [cit. 2017-02-19]. DOI: 10.1371/journal.pone.0068731. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0068731>

SOBRINO-LÓPEZ, A., MARTÍN-BELLOSO, O., 2008: Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal* [online]. 18(4), 329-343 [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1016/j.idairyj.2007.11.009. ISSN 09586946. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694607002361>)

SUGANTHI, V., SELVARAJAN, E., SUBATHRADEVI, C., MOHANASRINIVASAN, V., 2012: lantibiotikum nisin: přírodní konzervační z *Lactococcus lactis*, *Int.J. Pharm.Pharm.Sci.*3(1),13-19.

ŠALAKOVÁ, A., PECHAČOVÁ, M., DRÁB, V., DRBOHLAV, J., PEŠEK, E., 2015: Antimikrobiální účinky vybraných bakterií mléčného kvašení. *Mlékařské listy*. 2015(148), I-VII.

ŠILHÁNKOVÁ, L. 2002: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha: Academia, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.

ŠPUNAROVÁ, M., 2012: *Hmotnostní ztráty sýrů holandského typu během zrání*, Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati, Zlín, 62 s.

ŠUSTOVÁ, K., KUČTÍK, J., 2014: Zrání sýrů, Farmářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků XI. (*Sborník referátů ze semináře s mezinárodní účastí*, Mendelova univerzita, Brno, 68 s.

ŠUSTOVÁ, K., SÝKORA, V., 2013: *Mlékárenské technologie*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova univerzita, 223 s. ISBN 978-80-7375-704-5.

TAMIME, A., 2006: *Fermented milks*. Oxford: Blackwell Science/SDT, 262 s. ISBN 0-63206458-7.

TASHAKOR, A., HOSSEINZADEHDEHKORDI, M., EMRUZI, Z., GHOLAMI, D., 2017: Isolation and identification of a novel bacterium, *Lactobacillus sakei* subsp. dgh strain 5, and optimization of growth condition for highest antagonistic activity. *Microbial Pathogenesis* [online]. [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.02.008. ISSN 08824010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401016301152>

TODAR, K., 2008: *Lactococcus lactis*: nominated as the Wisconsin State Microbe, *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. online [cit. 2017-01-05], Dostupné z [www: <http://www.textbookofbacteriology.net/featuredmicrobe.html>](http://www.textbookofbacteriology.net/featuredmicrobe.html)

TOMÁŠKA, M., KONTOVÁ, M., DRONČOVSKÝ, M., SLOTTOVÁ, A., GREIFOVÁ, M., GREIF, G., 2010: Aktivita *Lactobacillus rhamnosus* študovaná v modelových polotvrdých sýroch, s. 88-93. In: ŠTĚTINA, J., ČURDA, L. (eds): *Celostátní přehledky sýrů 2010: Výsledky přehledů a sborník přednášek konference: Mléko a sýry* [online]. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 282 s. ISBN 978-80-7080-760-6. [cit. 2017-04-14]. Dostupné z: https://vscht.cz/tmt/prehledky/2010/Sbornik_CPS2010www.pdf

TŮMA, Š., PLOCKOVÁ, M., 2007: Protektivní kultury pro výrobu polotvrdých sýrů, s. 31-36. In: ŠTĚTINA, J., ČURDA, L. (eds): *Celostátní přehledky sýrů 2007: Výsledky přehledů a sborník přednášek semináře: Mléko a sýry* [online]. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 282 s. ISBN 978-80-7080-661-6. [cit. 2017-01-29]. Dostupné z: https://old.vscht.cz/tmt/prehledky/2007/Sbornik_CPS2007.pdf

TŮMA, Š., VOGENSEN, K. F., ARDÖ, Y., PLOCKOVÁ, M., CHUMCHALOVÁ, J., 2006: Antimikrobiální aktivita *Lactobacillus paracasei* izolovaných z polotvrdých sýrů, s. 39-46. In: ŠTĚTINA, J., ČURDA, L. (eds): *Celostátní přehledky sýrů 2006: Výsledky přehledek a sborník přednášek semináře: Mléko a sýry* [online]. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 282 s. ISBN 80-7080-620-6. [cit. 2017-04-15]. Dostupné z: https://old.vscht.cz/tmt/prehledky/2006/Sbornik_CPS2006.pdf

WALLACE, J. M., FOX, P. F., 1998: *Rapid spectrophotometric and fluorimetric methods for monitoring nitrogenous (proteinaceous) compounds in cheese and cheese fractions: a review*, *Food Chemistry*, 62, s. 224

WALSTRA, P., WOUTERS, J. T. M., GEURTS, T. J., 2006: *Diary Science and technology*, 2. Vydání, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 761 s., ISBN 0-8247-2763-0

YADAV, H., JAIN, S., SINHA, P. R., 2008: Novel Starters for Value Added Fermented Dairy Products. *Journal of Dairy Research*, vol. 75. p. 189 – 195

YAM, K. L., 2009: *Encyclopedia of Packaging Technology*, John Wiley & Sons, ISBN 978-0-470-08704-6

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 Lactobacillus plantarum (sciencedirect.com)</i>	21
<i>Obr. 2 Lactobacillus rhamnosus (www.linkedin.com)</i>	22
<i>Obr. 3 Lactobacillus sakei (www.gettyimages.ca)</i>	23
<i>Obr. 4 Lactobacillus paracasei (www.utraingredients.com)</i>	25
<i>Obr. 5 Lactococcus lactis subsp lactis (textbookofbacteriology.net)</i>	26
<i>Obr. 6 Pediococcus acidilactici (probioticsdb.com)</i>	27
<i>Obr. 7 Streptococcus thermophilus (probioticsamerica.com)</i>	27
<i>Obr. 8 Enterococcus faecium (http://www.bode-science-center.com)</i>	28
<i>Obr. 9 Nisin (www.drugfuture.com)</i>	32
<i>Obr. 10 Změna titrační kyselosti na době zrání u kontroly 1 a pokusu 1</i>	52
<i>Obr. 11 Změna pH – vpich na době zrání u kontroly 3 a pokusu 3</i>	53

9 SEZNAM TABULEK

Tab. 1 <i>Produkce bakteriocinů bakteriemi mléčného kysání (TAMINE, 2006)</i>	30
Tab. 2 <i>Příklady bakteriocinů třídy Ia a jejich producenti (LUQUET, CORRIEU, 2005)</i>	31
Tab. 3 <i>Příklady bakteriocinů třídy Ib a jejich producentů (LUQUET, CORRIEU, 2005)</i>	32
Tab. 4 <i>Příklady bakteriocinů třídy II a jejich producenti (LUQUET, CORRIEU, 2005)</i>	35
Tab. 5 <i>Aplikace bakteriocinů a bakteriocinogenních kmenů v mléčných výrobcích (ARQUÉS, 2015)</i>	37
Tab. 6 <i>Účinnost bakteriocinů v potravinách – limitující faktory (GÁLVEZ et al., 2007)</i>	38
Tab. 7 <i>Parametry mléka v den výroby</i>	42
Tab. 8 <i>Pomůcky pro výrobu sýrů</i>	44
Tab. 9 <i>Pomůcky pro stanovení základních parametrů sýrů</i>	45
Tab. 10 <i>Použité chemikálie potřebné k chemickým rozborům</i>	45
Tab. 11 <i>Výsledky t-testu pro polotvrdý zrající sýr s protektivní kulturou Ferlac MX oproti kontrole pro hladinu významnosti $p \geq 0,05$ a $p \geq 0,01$</i>	53
Tab. 12 <i>Výsledky t-testu pro polotvrdý zrající sýr s protektivní kulturou CCDM 731 oproti kontrole pro hladinu významnosti $p \geq 0,05$ a $p \geq 0,01$</i>	54
Tab. 13 <i>Výsledky t-testu pro polotvrdý zrající sýr s protektivní kulturou E. faecium oproti kontrole pro hladinu významnosti $p \geq 0,05$ a $p \geq 0,01$</i>	55
Tab. 14 <i>Výsledky t-testu pro polotvrdý zrající sýr s protektivní kulturou Ferlac MX oproti protektivní kultuře E. faecium pro hladinu významnosti $p \geq 0,05$ a $p \geq 0,01$</i>	56
Tab. 15 <i>Porovnání kontroly s mezofilní kulturou a pokusem s protektivní kulturou Ferlac MX</i>	57
Tab. 16 <i>Porovnání kontroly s mezofilní kulturou a pokusem s protektivní kulturou CCDM 731</i>	58
Tab. 17 <i>Porovnání kontroly s mezofilní kulturou a pokusem s protektivní kulturou E. faecium</i>	59

10 PŘÍLOHY

Příloha č. 1 Tabulka ke statistickému zpracování

VZ	výroba	odběr	tuk	bílkoviny	pH	SH	N-test	sušina	pH - vpič	pH – výluh	SH	NaCl	délka zrání ve dnech
1 k1	1	1	4,08	2,96	6,7	6,87	\$2-3	69,7082	4,92	4,82	120,3	0,69	34
1 k1	1	1	4,08	2,96	6,7	6,87	\$2-3	73,4554	5,17	5,02	114,57	0,63	69
1 k1	1	1	4,08	2,96	6,7	6,87	\$2-3	76,8724	5,24	5,06	114,57	0,63	87
1 k1	1	1	4,08	2,96	6,7	6,87	\$2-3	76,6434	5,19	5,12	119,26	0,63	115
1 k1	1	1	4,08	2,96	6,7	6,87	\$2-3	77,0008	5,31	5,15	117,18	0,8	149
2 p1	1	1	4,08	2,96	6,7	6,87	\$2-3	65,8309	4,99	4,89	118,22	0,34	34
2 p1	1	1	4,08	2,96	6,7	6,87	\$2-3	66,8107	5,28	5,22	99,99	0,4	69
2 p1	1	1	4,08	2,96	6,7	6,87	\$2-3	74,068	5,27	5,26	98,95	0,69	87
2 p1	1	1	4,08	2,96	6,7	6,87	\$2-3	72,6764	5,25	5,26	104,16	0,54	115
2 p1	1	1	4,08	2,96	6,7	6,87	\$2-3	75,9934	5,28	5,29	107,8	0,57	149

VZ	výroba	odběr	tuk	bílkoviny	pH	SH	N-test	sušina	pH - vpič	pH – výluh	SH	NaCl	délka zrání ve dnech
3 k2	2	1	3,6	3,04	6,65	7,08	2	62,8257	5,15	5,09	87,49	0,66	29
3 k2	2	2	3,6	3,04	6,65	7,08	2	65,3093	5,41	5,29	91,66	0,69	64
3 k2	2	3	3,6	3,04	6,65	7,08	2	69,9782	5,44	5,29	94,78	1,06	82
3 k2	2	4	3,6	3,04	6,65	7,08	2	74,7826	5,38	5,36	113,01	0,69	110
4 p2	2	1	3,6	3,04	6,65	7,08	2	74,4784	5,38	5,44	93,74	0,69	144
4 p2	2	2	3,6	3,04	6,65	7,08	2	70,9035	5,12	5,05	96,34	0,63	29
4 p2	2	3	3,6	3,04	6,65	7,08	2	68,2794	5,23	5,26	98,95	0,72	64
4 p2	2	4	3,6	3,04	6,65	7,08	2	70,9084	5,33	5,25	95,3	0,89	82
4 p2	2	5	3,6	3,04	6,65	7,08	2	74,8216	5,32	5,35	103,11	0,69	110
4 p2	2	5	3,6	3,04	6,65	7,08	2	72,9591	5,36	5,48	97,91	0,57	144

VZ	výroba	odběr	tuk	bílkoviny	pH	SH	N-test	sušina	pH - vpič	pH – výluh	SH	NaCl	délka zrání ve dnech
5 k3	3	1	3,65	3,02	6,62	6,97	2	68,7034	5,13	4,98	94,78	0,66	27
5 k3	3	2	3,65	3,02	6,62	6,97	2	68,7655	5,4	5,19	102,07	0,69	62
5 k3	3	3	3,65	3,02	6,62	6,97	2	70,6812	5,29	5,27	115,09	0,69	80
5 k3	3	4	3,65	3,02	6,62	6,97	2	71,0769	5,21	5,24	94,78	0,83	108
5 k3	3	5	3,65	3,02	6,62	6,97	2	72,8486	5,37	5,34	111,45	0,95	142
6 p3	3	1	3,65	3,02	6,62	6,97	2	63,1772	5,24	5,16	84,36	0,66	27
6 p3	3	2	3,65	3,02	6,62	6,97	2	68,8515	5,4	5,3	93,74	0,77	62
6 p3	3	3	3,65	3,02	6,62	6,97	2	69,2763	5,56	5,38	98,95	0,86	80

VZ	výroba	odběr	tuk	bílkoviny	ph	SH	N-test	sušina	pH - vpich	pH – vyluh	SH	NaCl	délka zrání ve dnech
6 p3	3	4	3,65	3,02	6,62	6,97	2	71,7356	5,29	5,31	84,36	1,21	108
6 p3	3	5	3,65	3,02	6,62	6,97	2	73,4788	5,44	5,42	104,16	1,15	142
VZ	výroba	odběr	tuk	bílkoviny	ph	SH	N-test	sušina	pH - vpich	pH – vyluh	SH	NaCl	délka zrání ve dnech
2 p1	1	1	4,08	2,96	6,7	6,87	\$2-3	65,8309	4,99	4,89	118,22	0,34	34
2 p1	1	2	4,08	2,96	6,7	6,87	\$2-3	66,8107	5,28	5,22	99,99	0,4	69
2 p1	1	3	4,08	2,96	6,7	6,87	\$2-3	74,068	5,27	5,26	98,95	0,69	87
2 p1	1	4	4,08	2,96	6,7	6,87	\$2-3	72,6764	5,25	5,26	104,16	0,54	115
2 p1	1	5	4,08	2,96	6,7	6,87	\$2-3	75,9934	5,28	5,29	107,8	0,57	149
4 p2	2	1	3,6	3,04	6,65	7,08	2	70,9035	5,12	5,05	96,34	0,63	29
4 p2	2	2	3,6	3,04	6,65	7,08	2	68,2794	5,23	5,26	98,95	0,72	64
4 p2	2	3	3,6	3,04	6,65	7,08	2	70,9084	5,33	5,25	95,3	0,89	82
4 p2	2	4	3,6	3,04	6,65	7,08	2	74,8216	5,32	5,35	103,11	0,69	110
4 p2	2	5	3,6	3,04	6,65	7,08	2	72,9591	5,36	5,48	97,91	0,57	144
6 p3	3	1	3,65	3,02	6,62	6,97	2	63,1772	5,24	5,16	84,36	0,66	27
6 p3	3	2	3,65	3,02	6,62	6,97	2	68,8515	5,4	5,3	93,74	0,77	62
6 p3	3	3	3,65	3,02	6,62	6,97	2	69,2763	5,56	5,38	98,95	0,86	80
6 p3	3	4	3,65	3,02	6,62	6,97	2	71,7356	5,29	5,31	84,36	1,21	108
6 p3	3	5	3,65	3,02	6,62	6,97	2	73,4788	5,44	5,42	104,16	1,15	142