

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality zemědělských produktů**



**Vady sýrů a možné příčiny jejich vzniku**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Marek Mazal**

**Vedoucí práce: Ing. Veronika Legarová, Ph.D.**

© 2016 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Vady sýrů a možné příčiny jejich vzniku" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. dubna 2016

---

### **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Veronice Legarové, Ph.D. za odborné vedení, cenné konzultace a podnětné rady při zpracování bakalářské práce, také bych tímto rád poděkoval svým rodičům za jejich trpělivost a podporu, a dále děkuji všem svým přátelům, kteří se mnou byli ochotni sdílet jejich cenné zkušenosti a praktické rady.

# Vady sýrů a možné příčiny jejich vzniku

## Souhrn

V této bakalářské práci je pojednáno o vadách sýrů a možných příčinách, které se podílejí na jejich vzniku. Problematika vad sýrů je zaměřena jak na technickou stránku výroby, tak na mikrobiální rizika možné kontaminace. Zde se práce soustředí především na mikrobiologickou kvalitu mléka, která je při výrobě sýrů klíčová. Vstupní mikrobiologická kvalita mléka při výrobě sýrů je velmi důležitá, ale jsou zde další fáze výroby, kdy může být mléko kontaminováno, a to nejen během jeho úpravy, ale i během jeho převozu a skladování. Z důvodu kontaminace mléka je patrné, že je nutné takové mléko tepelně upravit, aby nedošlo ke znehodnocení finálního produktu. Tepelná úprava mléka však neřeší tento problém úplně, jelikož některé mikroorganismy jsou vůči tepelné úpravě přirozeně odolné nebo ji dokážou přežít ve formě spor. Dalším způsobem kontaminace bývá také vstup mikroorganismů při výrobě, zrání, ale také špatným uskladněním. V těchto fázích však sýr nemusí být znehodnocen pouze mikroorganismy, důležitou roli zde hrají také fyzikální faktory, jako vodní aktivita, pH, obsah soli a teplota, které ovlivňují přirozenou mikroflóru, jež se ve finálním výrobku vyskytuje. Nicméně je důležité uvědomit si, že v rámci sýrů existují rozdíly v náchylnosti k tvorbě patogenů, nejméně jsou ohroženy dlouhozrající sýry a to díky nízkému pH, které zabraňuje vývoji mnoha patogenů, které by mohli ohrozit kvalitu daného sýru.

Při výrobě sýrů by měli být uváženy vhodné způsoby, jež by měli eliminovat potenciální rizika kontaminace a příslušných vad. Nejdůležitějšími operacemi by měli být řádné hygienické procedury, správné výrobní a zemědělské postupy. Samozřejmostí by měla být přítomnost systému analýzy rizika a stanovení kontrolních kritických bodů (HACCP). Pro předcházení vad je tedy nezbytná pravidelná kontrola daných parametrů v důležitých fázích výroby.

Velice důležitou otázkou v oblasti vad sýrů, je konzumace takto vadných sýrů, kde je pro člověka poměrně velkým rizikem spotřeba sýrů kontaminovaných mykotoxiny, které se nemusí dostat do sýru primárně přítomností mikroskopických hub, ale také formou derivátů toxinů, které pozřou zvířata spolu s potravou.

**Klíčová slova:** kontaminace, mléko, riziko, sýr, vady sýrů

# **Cheese defects and possible causes of their origin**

## **Summary**

This bachelor thesis is dealt with cheese defects and possible causes of their origin, which are participated in their formation. The problems of cheese defects is not focused only on technical aspects, but it is also focused on microbial risks of possible contamination, the work is directed there at microbial quality of milk, which is crucial at the cheese manufacture. Microbial quality of milk is very important for cheesemaking, but the milk can be contaminated during the manufacture and also during the transport or storage. It is obvious for the reason of milk contamination, that milk has to be heat-treated, in order not to be damaged the final product. However heat-treat is not complete solution, because some microorganisms tolerate higher temperatures or they survive by formation of spores. Another way of contamination is entering of microorganisms during the cheesemaking, maturing and due to unsuitable storage. The cheese is not damaged only by microorganisms, but there are also significant physical factors, which can influence the quality of cheese, these are water activity, pH, salt content and temperature. These factors influence the natural microflora, which is present in the final product. However it is important realize, that there are differences of susceptibility to forming pathogens among the cheeses, long aged cheeses are low risk due to its low pH, which prevents forming of pathogens so the pathogens can not endanger the cheese quality.

It should be considered suitable methods for elimination of potential risks and relevant defects during the cheesemaking. The most important methods should be regular hygienic procedures, appropriate manufacturing and agricultural processes. The system of risk analysis and Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) should be certainly present. For the prevention of cheese defect it is necessary regular control of specific parameters at important stages of manufacture.

Very important matter is consumption of cheese contaminated by mycotoxins, because consumption of mycotoxins is relatively high risk for human health. Mycotoxins are able penetrate into the cheese primarily due to presence of microscopic fungus, furthermore they can occur also as derivatives of mycotoxins, which are eaten by animals with their feed.

**Keywords:** cheese, cheese defects, contamination, milk, risk

## Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>2 Cíl práce .....</b>	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Složení mléka .....</b>	<b>10</b>
<b>3.2 Mikrobiologická kvalita mléka pro výrobu sýrů .....</b>	<b>10</b>
<b>3.3 Hlavní skupiny biologických kontaminantů v sýrech.....</b>	<b>11</b>
3.3.1 Psychrotrofní mikroorganismy .....	12
3.3.2 Mezofilní bakterie .....	12
3.3.3 Sporotvorné bakterie .....	12
3.3.4 Termofilní bakterie .....	13
3.3.5 Koliformní bakterie.....	13
3.3.6 Intestinální enterokoky .....	13
<b>3.4 Vady jednotlivých druhů sýrů .....</b>	<b>14</b>
3.4.1 Čerstvé sýry .....	14
3.4.2 Měkké sýry s mazem na povrchu .....	15
3.4.3 Měkké sýry s plísní na povrchu .....	16
3.4.4 Sýry s plísní uvnitř hmoty.....	16
3.4.5 Sýry polotvrdé a tvrdé.....	17
<b>3.5 Druhy sýrů nejvíce ohrožených patogeny .....</b>	<b>19</b>
<b>3.6 Rizikové kontaminanty sýrů .....</b>	<b>20</b>
3.6.1 <i>Bacillus cereus</i> .....	20
3.6.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	21
3.6.3 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	22
3.6.4 <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) .....	23
3.6.5 <i>Salmonella enterica</i> .....	23
3.6.6 Koliformní bakterie.....	24
3.6.7 Biogenní aminy .....	27
3.6.8 Mykotoxiny.....	29
<b>3.7 Patogeny způsobující rozvoj plynů během zrání sýrů .....</b>	<b>31</b>
3.7.1 Časné duření sýrů .....	31
3.7.2 Pozdní duření sýrů .....	32
<b>3.8 Klíčové faktory HACCP plánu při výrobě sýrů.....</b>	<b>34</b>
<b>3.9 Zdroje mikrobiální kontaminace.....</b>	<b>35</b>
3.9.1 Neošetřené mléko .....	36
3.9.2 Provoz výroby sýrů.....	37
<b>3.10 Zásahy během výroby sýrů ke snížení kontaminace.....</b>	<b>38</b>

3.11	Prevence kontaminace sýrů při výrobě.....	39
4	Závěr.....	41
5	Seznam použité literatury.....	42

# 1 Úvod

Vady sýrů jsou poměrně rozsáhlý problém, jelikož je zde celá řada faktorů a původců, jež mohou tyto vady způsobit. Nejruznější vady mohou způsobit nejen závady technické, ale především biologická kontaminace mezi jejíž časté původce můžeme zařadit mikroorganismy jako jsou *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* a *E. coli*. Mnoho defektů sýrů se pak projeví především po fázi zrání, jež ukáže, jak kvalitní suroviny byly použity a zdali byl správný technologický postup výroby (Johnson et al., 1990).

Rozličné defekty sýrů mohou způsobit sýrárně velké ztráty, které mohou být pro podnik z ekonomického hlediska i likvidační, proto je nutné případné nedostatky včas detekovat, aby mohly být vzápětí odstraněny. Mnohdy je však výrobek nutno prodat, i v případě že obsahuje případné nedostatky, v takovém případě musí produkt splňovat zákonná nařízení a hygienické požadavky, aby mohl být takový výrobek uveden do prodeje. Z tohoto důvodu je jasné, že problematika vad sýrů má velký ekonomický význam.

Vady sýrů lze rozdělit na vady: vnějšího vzhledu, vnitřního vzhledu, chuti a vůně a složení. K vadám sýrů může docházet v různých fázích výroby, je tedy důležitá přítomnost kontrolních opatření ve výrobě, které by případným vadám dokázali včas zabránit a minimalizovat tak případné ztráty, jež mohou poškodit nejen podniky produkující sýr, ale také konzumenty, k nimž se takto vadné výrobky mohou dostat (Kopáček, 2011).

Některé vady však nejsou viditelné a jejich detekce je obtížná. Takovým příkladem jsou mykotoxiny, které mohou při vyšší konzumaci neblaze ovlivnit zdraví člověka. Pro eliminaci podobných vad je tedy klíčová pravidelná kontrola vstupních surovin a jejich náležité ošetření.



## **2 Cíl práce**

Cílem kompilační práce je vypracování přehledné a kvalitní literární rešerše se zaměřením na vady sýrů a možné příčiny jejich vzniku. Posoudit mikrobiologickou kvalitu mléka používaného pro výrobu sýrů. Zmapovat rizika kontaminace během jednotlivých fází technologického postupu při výrobě vybraných sýrů. Navrhnout možné způsoby eliminace potenciálních rizik kontaminace a vad sýrů.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Složení mléka

Mléko je kapalina, kterou vylučují samice všech savců z oblasti mléčných žláz a jeho hlavní funkcí je kompletní výživa mláďat. Jeho hlavními součástmi (Tabulka č. 1) jsou voda, laktosa, proteiny, tuk a minerály, tudíž obsahuje všechny výživově cenné látky (Fox et al. 1998).

McSweeney (2007) uvádí, že nejdůležitějšími složkami mléka pro výrobu sýrů jsou kasein, tuk, laktosa a vápník. Kasein je během výroby vysrážen z mléka syřidlem a je základním strukturním elementem sýra, ovlivňujícím jeho texturu a aroma díky probíhající proteolýze během zrání. Tuk přispívá k textuře sýru a jeho chuti prostřednictvím lipolýzy. Laktosa je fermentačním substrátem pro bakterie mléčného kvašení a produkty fermentace laktosy pak přispívají také na vůni, která vzniká během zrání sýra. Vápník je důležitý pro formování syřidlového gelu v počátečních fázích výroby sýrů, kdy obsah vápníku ve vysráženém mléce ovlivňuje texturu.

Tabulka č. 1: Složení mléka (%) různých druhů zvířat

Druh	Tuk %	Bílkoviny %	Laktosa %	Minerální látky %
Velbloud	4,9	3,7	5,1	0,7
Buvol	10,4	5,9	4,3	0,8
Kráva (Holstein)	3,5	3,1	4,9	0,7
Kráva (Guernsey)	5,0	3,8	4,9	0,7
Kráva (Jersey)	5,5	3,9	4,9	0,7
Koza	3,5	3,1	4,6	0,79
Ovce	5,3	5,5	4,6	0,9

(Huppertz et al., 2006), upraveno autorem

### 3.2 Mikrobiologická kvalita mléka pro výrobu sýrů

Bezpečnost potravin je v oblasti mlékárenských výrobků velmi důležitá, jedná se především o mléko a výrobky z mléka zpracované, tedy především sýr. Mikrobiální populace přítomná v neošetřeném mléce může ovlivnit kvalitu sýrů závislou na mikrobiálním profilu mléka. Mléčná mikroflóra má schopnost přežít pasteraci a jiné hygienické metody a vybudovat novou mikroflóru uvnitř sýru (Sheehan, 2013).

Cilliers et al. (2014) uvádějí, že nezávadné kravské mléko obsahuje relativně málo bakterií ( $10^2 - 10^3 \text{ CFU.ml}^{-1}$ ), nicméně mléko je směsí živin, které mohou být snadno kontaminovány

po dojení. Neupravené mléko se vyznačuje bohatou populací mikroflóry, jež vzniká z několika zdrojů. Samotná kontaminace po dojení může být způsobena různorodými faktory, jako jsou vnější povrchy zvířat a povrchy zařízení pro manipulaci s mlékem (např. dojící zařízení, trubice a kontejnery) (Cilliers et al., 2014).

Ve výsledku je mléko náchylné ke kontaminaci mnoha patogenními mikroorganismy s dodatečným rizikem přenosu nemocí ze zvířat na lidi (např. tuberkulóza, listerióza, tyfová horečka, brucelóza) (Fox et al., 2004).

Kvalita syrového mléka je důležitá pro produkci všech sýrů, zvláště pro ty vyrobené z mléka tepelně neošetřeného. Nízký počet bakterií a nízký počet somatických buněk jsou klíčovými indikátory kvality mléka, jak jejich hodnoty stoupají, zvyšuje se také riziko kontaminace mléka a sýrů patogeny (Fox et al., 2004).

Patogeny mléka jsou především *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* a enteropatogenní *E. coli*, tyto mikroorganismy představují největší riziko pro bezpečnost sýrů. Pokud je přidána aktivní startovací kultura bakterií mléčného kvašení, *Staphylococcus aureus* je považován za nízkorizikový patogen. Nicméně v tradičních sýrech, kde aktivní startovací kultura není použita, představuje *Staphylococcus aureus* významné riziko pro produkci toxinu v sýru, pokud jsou hodnoty počtu *Staphylococcus aureus* vyšší než 106 CFU.g<sup>-1</sup> (Johnson et al., 1990). Toxiny nezpůsobí otravu, pokud nedosáhne počet bakterií hodnoty 105-106 CFU.g<sup>-1</sup> (Akineden et al., 2009).

Pitt et al. (2000) uvádí, že v mléce jsou obsaženy tepelně labilní směsi (např. lactoferin, lysozym a laktoperoxidáza) což jsou inhibitory některých patogenů. V jedné ze svých studií demonstrovali, že nárůst *Staphylococcus aureus*, *S. enteritidis* a *L. monocytogenes* byl pomalejší v tepelně neošetřeném mléce uchovávaném v teplotě 37 °C po 72 h než v pasterovaném mléce uchovávaném ve stejných podmínkách. Během prvních 16 hodin inkubace se počet organismů zvýšil v neošetřeném i pasterovaném mléce, ale po dalších 16 hodinách se počet životaschopných patogenních mikroorganismů začal snižovat.

### **3.3 Hlavní skupiny biologických kontaminantů v sýrech**

Většina kontaminantů ve zpracovaném sýru zahrnuje především psychrotrofní mikroorganismy nebo mikroorganismy schopné růstu v prostředí s nízkým obsahem kyslíku. Mnoho kontaminantů ve zpracovaném sýru zahrnuje sporotvorné bakterie a mikromycety. Kromě toho mohou finální výrobek znehodnotit také sekundární kontaminanty, jimiž jsou mikroorganismy, které mohou do výrobku vstoupit i po jeho zpracování, a tudíž tyto mikroorganismy také nemohou být opomíjeny (Lazárková et al., 2010).

### 3.3.1 Psychrotrofní mikroorganismy

Psychrotrofní mikroorganismy jsou organismy, jejichž teplotní optimum růstu je v rozsahu 20-30 °C, ale jsou schopné růst také v chladnějších podmínkách, i když pomalu. Psychrotrofové jsou většinou přítomní v neošetřeném mléce a proto jsou se zájmem sledovány zpracovateli sýrů, jelikož jsou tyto mikroorganismy producenty extracelulárních enzymů a většina těchto enzymů je tepelně stabilních, tudíž mohou negativně působit na zrání sýrů, pokud se pohybuje jejich přítomnost ve vysokých hodnotách. Většina Psychrotrofních mikroorganismů jsou gramnegativní rody, mezi něž můžeme zařadit např. rod *Pseudomonas*, jehož nejběžnějším druhem je *Pseudomonas fluorescens*, který je charakteristický produkcí fluorescentního pigmentu, pokud vyrůstá ve vhodném médiu (Mcsweeney et al., 2007).

### 3.3.2 Mezofilní bakterie

Mezofilní bakterie mají teplotní růstové optimum mezi 15 °C a 45 °C a zahrnují anaerobní proteolytické a pufrovací bakterie (např. *Clostridium sporogenes*, *C. putrefaciens*), anaerobní bakterie tolerující kyselé prostředí, jimiž jsou bakterie máselného kvašení (např. *Clostridium butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. pasteurianum*), fakultativně anaerobní bakterie (např. *Bacillus circulans*, *Paenibacillus macerans*, *Brevibacillus laterosporus*) a acidofilní fakultativní anaeroby (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) (Klijn et al., 1997).

### 3.3.3 Sporotvorné bakterie

Sporotvorné bakterie mají tu schopnost, že jsou resistantní k přírodním podmínkám, které jinak mají negativní efekt na vegetativní formy těchto bakterií. Bakteriální spory jsou odolné vůči působení vyšších teplot a také dokážou přežít nepříznivé podmínky (např. nedostatek živin po dlouhou dobu). Pokud nastanou příznivé podmínky, spory vyklíčí z jejich klidové formy a mění se ve vegetativní buňky, které jsou již schopné normálního metabolismu, růstu a reprodukce (Blackburn, 2006).

Cosentino et al. (1997) získali výsledky, které dokazují přítomnost sporulujících bakterií ve zpracovaném sýru, pro jehož výrobu bylo použito mléko, které bylo tepelně ošetřeno teplotou 90-92 °C po dobu 8-10 minut za stálého míchání. Ze vzorku následně izolovali bakterie: *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. pumilus*, *Brevibacillus laterosporus*, *Clostridium sporogenes*, *C. sordellii* a *C. glycolium*.

Psychrotrofní sporotvorné bakterie způsobují znehodnocení jídla v nepříznivých teplotách pro tyto bakterie, kdy dojde k vytvoření spor. Důležitými zástupci jsou anaerobní bakterie (např.

*Clostridium estertheticum*, *C. gasigenes*, *C. putrefaciens*, *C. algidicarnis*) a fakultativně anaerobní bakterie (např. *Bacillus circulans*, *B. mycoides*, *B. sphaericus*) (Blackburn, 2006).

#### 3.3.4 Termofilní bakterie

Teplotní optimum termofilních bakterií se pohybuje od 45 °C. Negativní vliv těchto bakterií je významný především v okamžiku, kdy dojde ke zvýšení teploty mléka. Fakultativně termofilní sporotvorné bakterie (např. *Bacillus coagulans*) rostou při teplotách od 55 °C do 37 °C. Striktně termofilní bakterie rostou pouze při teplotách vyšších než 55 °C a jejich růst se zastavuje na teplotách nižších než 37 °C. Termofilní sporotvorné bakterie zahrnují aerobní bakterie rostoucí v nekyselém prostředí, které následně okyselují (např. *Bacillus coagulans*), dále termofilní bakterie rostoucí v nekyselém prostředí, do něhož neuvolňují kyseliny a tak je neokyselují (*Geobacillus stearothermophilus*). Vyskytují se ovšem také termofilní bakterie produkující síru nebo sirovodík (např. *Desulfotomaculum nigrificans*) (Hauerlandová et al., 2014).

#### 3.3.5 Koliformní bakterie

Špatná hygiena nebo používání nepasterovaného mléka může být výsledkem přítomnosti koliformních bakterií, jako jsou *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* a *Serratia*, které jsou spojeny s časným duřením sýrů a mohou produkovat také látky, které zapáchají. Přítomnost koliformních bakterií naznačuje také přítomnost kvasinek a někdy také bakterií mléčného kvašení. Tyto mikroorganismy produkují H<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub> a fermentují laktosu za aerobních podmínek (Sheehan, 2013).

#### 3.3.6 Intestinální enterokoky

Enterokoky jsou indikátory fekálního znečištění a jsou užitečné v poskytování informací o sanitační hygieně během výroby. Přítomnost enterokoků v sýrech je obvykle indikátorem špatné mikrobiální kvality a poukazují na špatnou hygienu během zpracování. Enterokoky sídlí v gastrointestinálním traktu teplokrevných savců. *Enterococcus faecalis* je dominantně vyskytujícím se druhem v lidských fekáliích, zatímco *Enterococcus faecium* je převládajícím druhem mlékařského skotu. Oba duhy *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* se objevují v sýrech. Enterokoky se řadí mezi infekční patogeny a získávají důležitost jako klinické patogeny z důvodu jejich farmaceutické odolnosti (Gelsomino et al., 2002).

Enterokoky jsou běžně přítomné v startovacích kulturách používaných při tradiční výrobě sýrů. *Enterococcus faecium* je používán jako dodatek startovací kultury při výrobě řeckého sýru Feta, kde zlepšuje chuť, aroma, barvu a strukturu zralého sýru (Sarantinopoulos et al., 2002).

### 3.4 Vady jednotlivých druhů sýrů

#### 3.4.1 Čerstvé sýry

Jedná se o skupinu sýrů, ke které se řadí např. Gervais a Lučina. Tato skupina jsou sýry nezrající a dochází zde pouze k prokysání sýřeniny s případným prosolením. Tyto sýry jsou konzumovány v čerstvém stavu, a tudíž není nutné, aby podstoupily výrazné konzervační procesy, jež by mohly změnit strukturu bílkovin. Aby bylo dosaženo patřičné kvality je nutné, aby zde byla přítomnost bakterií smetanové kultury. Působí zde především *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, které mohou za lahodnou a lehce nakyslou smetanovou chuť (Kopáček, 2011). V Tabulce č. 2 jsou uvedeny vady objevující se u čerstvých sýrů.

##### 3.4.1.1 Vady čerstvých sýrů

Tabulka č. 2: Vady čerstvých sýrů

Vada	Příčina
Nedostatečné prokysání	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Špatná smetanová kultura, málo vitální.</li> <li>• Nevhodná mikrobiologická jakost mléka.</li> <li>• Nízká teplota v sýrárně.</li> </ul>
Drobivé těsto	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Silné prokysání sýřeniny, pokud je teplota sýrárny příliš vysoká (měla by být 18-20 °C).</li> </ul>
Netypická chuť (kvasinková, zatuchlá)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Přítomnost nežádoucích kvasinek (např. z nedostatečně sanitovaného výrobního zařízení).</li> <li>• Špatná pasterace mléka.</li> <li>• Skladování sýrů ve špatně čistitelné místnosti.</li> </ul>
Nadouvání sýrů	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mikrobiální příčina – např. kontaminace kvasinkami nebo bakteriemi ze skupiny coli-aerogenes.</li> </ul>
Prázdná chuť	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nedostatečně prokysané sýry.</li> <li>• Nízký obsah aromatických látek – z důvodu nízké vitality</li> </ul>

---

použitého zákysu.

- Při vyšší teplotě sýrárny se mohou i aromatické sloučeniny rozkládat a zapříčínovat prázdnou chuť.
- 

(Kopáček, 2011), upraveno autorem

### 3.4.2 Měkké sýry s mazem na povrchu

Do této skupiny sýrů je řazen Romadúr, Limburský sýr či olomoucké tvarůžky. Pro tyto sýry je typické, že proces zrání probíhá od povrchu směrem dovnitř a to pomocí specifických mikroorganismů se silnou proteolytickou činností. Na zracím procesu se podílejí nejprve bakterie smetanové kultury (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*) v další fázi, která se vyznačuje proteolytickou aktivitou, jsou uplatňovány bakterie *Brevibacterium linens*, dále zde působí také kvasinky rodů *Candida* a *Torulopsis*. Díky enzymům těchto mikroorganismů, dochází při zrání ke štěpení tuku a bílkovin, jejichž metabolity způsobují pikantní chuť a typickou pronikavou vůni, jimiž jsou tyto sýry příznačné (Kopáček, 2011). Vady typické pro měkké sýry s mazem na povrchu jsou uvedeny v Tabulce č. 3.

#### 3.4.2.1 Vady měkkých sýrů s mazem na povrchu

Tabulka č. 3: Vady měkkých sýrů s mazem na povrchu

Vada	Příčina
Duření sýrů	<ul style="list-style-type: none"><li>• Přítomnost bakterií rodů <i>Escherichia</i> a <i>Aerobacter</i>, popř. kvasinkami vytvářejícími plyn (sekundární kontaminace pasterovaného mléka).</li></ul>
Bílá mazovitost	<ul style="list-style-type: none"><li>• Porost plísně <i>Geotrichum candidum</i> na povrchu vytvoří peptonizační činností bílý maz a sýr potom neuzraje. Tomu lze zamezit silnějším solením.</li><li>• Příliš nízká teplota během výroby, solení a zrání.</li></ul>
Roztékání těsta	<ul style="list-style-type: none"><li>• Roztékání je vadou tehdy, dojde-li k němu předčasně.</li><li>• Je způsobeno činností některých proteolytických mikroorganismů v příliš teplém zracím sklepe.</li><li>• Slabé solení.</li><li>• Špatné odkapání syrovátky.</li><li>• Vadu lze řešit i tím, že se sýr uloží do chladnějšího sklepa.</li></ul>
Povrchové plesnivění	<ul style="list-style-type: none"><li>• Špatné ošetření povrchů sýrů.</li><li>• Kontaminace zracích sklepů a jejich špatné větrání.</li></ul>

---

(Kopáček, 2011), upraveno autorem

### 3.4.3 Měkké sýry s plísní na povrchu

K těmto sýrům patří Camembert, De brie, Hermelín a Camadet. V primární fázi zrání působí bakterie smetanové kultury, v sekundární fázi se uplatňuje svou proteolytickou činností plíseň *Penicilium camemberti* a *Penicilium caseicolum* a v menší míře se na proteolýze podílejí také kvasinky rodu *Geotrichum* a *Torulopsis*. Tyto mikroorganismy se podílejí na lipolýze a proteolýze jež jsou odpovědné za požadovanou příchut' a aroma (Kopáček, 2011). U těchto sýrů nastávají potíže především v sekundární fázi zrání, kdy se může stát, že příslušné plísně nejsou schopny kolonizovat povrch sýra nebo zde dochází k rozšíření problémů od vnitřku sýru k jeho povrchu (Tabulka č. 4) (Mcsweeney, 2007).

#### 3.4.3.1 Vady sýrů s plísní na povrchu

Tabulka č. 4: Vady sýrů s mazem na povrchu

Vada	Příčina
Rychlé roztékání těsta	<ul style="list-style-type: none"><li>• Kontaminace sýrů peptonizujícími druhy bakterií, které jsou pro zrání nežádoucí.</li><li>• Také se může jednat o nedostatečně odkapané sýry, které pak rychleji zrají a mohou se roztékat.</li></ul>
Mazovitost povrchů	<ul style="list-style-type: none"><li>• Vyskytne se v případě, že je ušlechtilá plíseň potlačena mikroorganismy vytvářejícími bělošedý až bělavý maz. K tomu může dojít např. u překysaných nebo také u přesolených sýrů.</li></ul>
Černání povrchu	<ul style="list-style-type: none"><li>• Není časté. V případě, že se vyskytne, jde většinou o sekundární kontaminaci ve zracím sklepe – např. náletovými plísněmi rodu <i>Mucor</i> a <i>Rhizopus</i>.</li></ul>
Nadouvání sýrů	<ul style="list-style-type: none"><li>• Sekundární kontaminace plynotvornými bakteriemi (např. rodu <i>Escherichia</i>) nebo kvasinkami.</li></ul>

(Kopáček, 2011), upraveno autorem

### 3.4.4 Sýry s plísní uvnitř hmoty

Do této bohaté skupiny sýrů řadíme italskou Gorgonzolu, francouzský Roquefort, anglický Stilton a českou Nivu. Tyto sýry jsou charakteristické prorůstáním plísně *Penicillium roqueforti* uvnitř sýru. Těsto těchto modře žilnatých sýrů je bílé nebo žlutavé a typická doba zrání těchto sýrů trvá nejméně šest týdnů (Mcsweeney, 2007). Ušlechtilá plíseň *Penicillium roqueforti* se vyznačuje nejen proteolytickou, ale také lipolytickou činností, při které dochází k hydrolýze mléčného tuku na methylketony. Právě methylketony jsou odpovědné za typickou chuť těchto



sýrů. Na tomto procesu se však nepodílí pouze *Penicillium roqueforti*, ale v menší míře probíhá tvorba methylketonů i díky kvasinkám rodu *Torulopsis* (Kopáček, 2011). Vady sýrů s plísní uvnitř hmoty jsou uvedeny v Tabulce č. 5.

#### 3.4.4.1 Vady sýrů s plísní uvnitř hmoty

Tabulka č. 5: Vady sýrů s plísní uvnitř hmoty

Vada	Příčina
Nedostatečné prokvétání sýrů ušlechtilou plísní	<ul style="list-style-type: none"> <li>Většinou je způsobeno nedostatkem kyslíku potřebného pro růst plísně.</li> <li>-tedy nedostatečné propíchnutí (pikýrování) těsta v průběhu zrání.</li> <li>Také „slité“ těsto s nedostatečným počtem kaveren.</li> <li>Použití nevhodného kmene plísně.</li> </ul>
Příliš silný růst plísně	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nevhodné podmínky pro růst plísně.</li> <li>Přílišný růst plísně způsobuje také nečistou chuť.</li> </ul>
Bílý až šedý maz na povrchu	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kontaminace povrchu mazovitými mikroorganismy.</li> <li>Tvorbu mazu podporuje příliš nízká teplota a přesolení sýrů.</li> </ul>
Nečistá a zatuchlá chuť	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kontaminace povrchů nežádoucími „náletovými“ plísněmi.</li> </ul>
Nadouvání sýrů	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sekundární kontaminace plynotvornými bakteriemi (např. rodu <i>Escherichia</i>) nebo kvasinkami.</li> <li>K nadouvání mají sklon sýry málo prokysané a málo solené.</li> </ul>

(Kopáček, 2011), upraveno autorem

#### 3.4.5 Sýry polotvrdé a tvrdé

Tato početná skupina sýrů se vyznačuje především svou dlouhou dobou zrání. Sýry polotvrdé a tvrdé zrají po zpracování v rozmezí od několika měsíců až dva, ale i více let. Právě během zrání se zde tvoří rozmanitá škála charakteristických vůní a textur (Mcsweeney, 2007). Patří sem sýry holandského typu (Gouda, Edam), polotvrdé sýry s tvorbou ok (Maasdam), sýry s mletou sýřeninou (Tylžský sýr), sýry švýcarského typu bez výrazné tvorby ok (Comté,

Appenzeller) a sýry s výraznou tvorbou ok (Ementál). Tyto sýry jsou nejvíce ohroženy nejrůznějšími vadami z důvodu jejich dlouhé doby zrání (Kopáček, 2011). Vady této skupiny sýrů jsou uvedeny v Tabulce č. 6.

### 3.4.5.1 Vady sýrů polotvrdých a tvrdých

Tabulka č. 6: Vady sýrů polotvrdých a tvrdých

Vada	Příčina
Časné duření sýrů	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Projeví se v primární fázi zrání.</li> <li>• Kontaminace koliformními bakteriemi a kvasinkami, které zkvašují laktosu.</li> </ul>
Pozdní duření sýrů	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Původcem jsou sporotvorné bakterie rodu <i>Clostridium</i>, které kontaminují mléko nečistotami z půdy.</li> <li>• Vlivem clostridií dochází k reakci, při které z kys. mléčné vzniká kys. máselná, CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>.</li> </ul>
Slepý sýr	<ul style="list-style-type: none"> <li>• V případě sýrů s tvorbou ok jsou sýry bez ok označovány jako sýry slepé.</li> <li>• Je to způsobeno nepřítomností propionových bakterií produkujících CO<sub>2</sub> jejich nízkou aktivitou, např. z důvodu vysoké kyselosti sýrů.</li> <li>• Vadu podporuje také slabá tvorba kyseliny mléčné.</li> </ul>
Hnidovitost (síťovitost)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Při této vadě je v těstě namísto velkých dutin mnoho drobných dírek.</li> <li>• Vada se projeví též špatnou chutí a zápachem.</li> <li>• Jejím původem jsou bakterie skupiny <i>coli-aerogenes</i>.</li> </ul>
Hořknutí sýrů	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nevhodné syřidlo (např. pepsinové typy).</li> <li>• Velké množství nežádoucích peptonizačních bakterií (např. <i>Bacillus cereus</i> a <i>Bacillus subtilis</i>).</li> </ul>
Drsná kůra sýrů	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sýr nebyl dobře zalisován před vložením do solné lázně.</li> </ul>
Bílá místa v kůře sýra	<ul style="list-style-type: none"> <li>• V sýru zůstala syrovátka, když začne v kvasném sklepě kvasit, tlačí se syrovátka k povrchu sýra, nejdříve způsobí jeho změknutí, později toto místo praská. Do sýra se dostane plíseň a voda, které způsobí jeho znehodnocení.</li> </ul>

---

Suché, krátké a vlnité trhlínky na povrchu sýra	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Příliš dlouhé dosoušení a vysoká teplota dohřívání.</li> <li>• Vysoká kyselost mléka.</li> <li>• Sýr zůstal po vylisování odkryt, bez sirníků a bez soli v průvanu.</li> <li>• Povrch sýra se stal sklovitý a vytvořili se malé trhlínky.</li> </ul>
Nekysající sýry	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mléko nemá dobrou kvasnost, např. v důsledku přítomnosti reziduí inhibičních látek.</li> <li>• Vadu zpravidla doprovází nahořklá, pálivá až hnilobná chuť, vadná struktura a konzistence sýra.</li> </ul>

---

(Kopáček, 2011), upraveno autorem

### 3.5 Druhy sýrů nejvíce ohrožených patogeny

U nejrůznějších druhů sýrů je specifický potenciál pro růst a přežití mikrobiálních patogenů. Celkově jsou měkké krátce zrající sýry více náchylné pro růst a přežití patogenů než sýry tvrdé dlouhozrající, kde kombinace faktorů zahrnující pH, obsah soli, vodní aktivitu spolu interagují a zajišťují tak mikrobiální bezpečnost (McSweeney, 2007).

Měkké sýry mají vyšší pH a vyšší obsah vlhkosti, což může podporovat růst mikrobiálních patogenů. Patogeny jako *Listeria monocytogenes* mohou dosáhnout vysokých koncentrací během 60 dní zrání, proto je důležité, aby byla u sýrů této kategorie zvolena vhodná kontrolní strategie, která by zajišťovala kratší intervaly mezi jednotlivými kontrolami (Donnelly, 2001).

Vysoce rizikové jsou sýry s nízkodohřívanou sýřeninou, neutrálním pH a vysokým obsahem vlhkosti v konečném produktu. Sýry s vysokodohřívanou sýřeninou, nízkým obsahem vlhkosti a dlouhozrající, představují nižší riziko pro kontaminaci (Donnelly, 2005).

Patogeny *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* a enteropatogenní *Escherichia coli* představují největší riziko pro bezpečnost sýrů. Pokud je však při výrobě použita aktivní kysací mléčná kultura, je považován *Staphylococcus aureus* za nízkorizikový patogen. Nicméně v tradičních sýrech, kde není použita aktivní kysací mléčná kultura, může představovat *Staphylococcus aureus* významné riziko pro produkci toxinů, pokud jeho počty dostatečně vzrostou (Donnelly, 2001).

Patogeny se mohou v sýrech také objevit, pokud přežijí pasterační proces, nebo může dojít k rekontaminaci po zpracování ve zrajícím prostředí. Vysoké teploty dohřívání sýřeniny užívané u tvrdých sýrů a polotvrdých sýrů, spolu se zvětšením kyselosti během zrání, vodní aktivity a obsahem soli usnadňují kontrolu patogenů v těchto typech sýrů (McSweeney, 2007).

Ryser et Marth (1987a) získali výsledky, které ukazují osud *Listeria monocytogenes* při zpracování sýrů Cheddar a Camembert. V sýru Camembert byl objeven rychlý nárůst populací

*Listeria monocytogenes*. Vysoký obsah vlhkosti a neutrální pH sýru Camembert usnadňují růst a přežívání *Listeria monocytogenes*. Nárůst počtu *L. monocytogenes* současně provází také zvýšení pH v sýru, které je pro růst *L. monocytogenes* příznivé.

Opačná situace je u sýru Cheddar, který se vyznačuje nižší vlhkostí a sníženým pH, k čemuž dochází během zrání a vede tak ke snížení počtu *L. monocytogenes* (Ryser a Marth, 1987b).

Sýry, které jsou závislé na zrání od povrchu (sýry mazovité a sýry s plísní na povrchu), podporují růst patogenů díky zvyšujícímu se pH během rání (pH 6.0 a více). Dochází k nárůstu několika patogenů zahrnující *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter aerogenes* a *Escherichia coli* 0157:H7, která byla pozorována v sýru Camembert. Naopak počty *Escherichia coli* 0157:H7 klesají během zrání sýru Cheddar. U sýru Camembert dochází k růstu *Escherichia coli* 0157:H7 ve chvíli, kdy dojde ke změně pH z kyselého na zásadité, v době při níž dochází k nárůstu kůry (Schlesser et al., 2006).

### **3.6 Rizikové kontaminanty sýrů**

#### **3.6.1 *Bacillus cereus***

*Bacillus cereus* je jedním z nejvíce spory tvořících organismů a vytváří specifické problémy v mléčném průmyslu, protože přežívá pasteraci, roste za nízkých teplot a produkuje nežádoucí enzymy a toxiny (Giffel, 2003).

*Bacillus cereus* produkuje dva typy toxinů: emetický a diarhoeální. Toxiny zodpovědné za diarhoeální reakce jsou především hemolysin a cereolysin. Hemolysin označovaný jako hemolysin BL má tu schopnost, že dokáže rozkládat červené krvinky. Cereolysin je multikomponentem cytotoxického komplexu, skládajícího se z: Cereolysin A pro fosfolipázu C a cereolysin B pro sfingomyelinázu. Fosfolipáza C a sfingomyelináza pak působí synergeticky rozkladem červených krvinek (Perchat et al., 2005).

*Bacillus cereus* je schopen produkovat lipázy a proteázy, které způsobují v sýrařství problémy z důvodu hydrolýzy mléčných bílkovin a tuku. Lipáza zapříčiňuje zatuchlou a ovocnou pachutí, zatímco proteáza je spojována se zkaženou a hořkou pachutí, defekty těsta a textury sýru (Molva et al. 2009).

Chaves-Lopez et al. (2009) udávají, že spory *Bacillus cereus* jsou vysoce rezistentní vůči homogenizaci. Tudíž k inaktivaci bakteriálních spor je nutné použít tlaku vyššího než 150 MPa kombinovaného s mírným záhřevem.

Moradi-Khatoonabadi et al. (2014) zjistili, že ke kontaminaci dochází během plnicího procesu, jelikož počty *Bacillus cereus* u vzorků odebraných po plnění byly vyšší než ve vzorcích

odebraných před plněním. A tak plnicí přístroje mohou přispívat k postpasterační rekontaminaci mléka (Svensson et al. 2004).

### 3.6.2 *Listeria monocytogenes*

Listerie jsou gram-pozitivní, bičíkové bakterie, schopné množení v širokém rozmezí teplot (0 až 42 °C), při pH od 4-9 a vysokých koncentracích soli (10 %) (Cole et al., 1990).

*Listeria monocytogenes* je patogen napadající potraviny, který při infekci způsobuje listeriózy. Může vést také k meningitidě, encefalitidě, sepsi a gastroenteritidě, které mohou způsobovat úmrtnost a to až v míře 20-25 %, především u nenarozených dětí, kojenců, starších jedinců a u lidí se zhoršenou imunitou (Vázquez-Boland et al. 2001).

*Listeria monocytogenes* může být přítomna v neošetřeném mléce, také je často přenášena z nečištěných nástrojů během dojení, kdy dochází k exkreci *Listeria monocytogenes* při infekci struků. Často dochází ke kontaminaci během skladování ve velkých nádržích nebo při transportu mléka, či jeho zpracování, pokud kvalita hygieny není adekvátní (Bemrah et al., 1998). Incidence *Listeria monocytogenes* v neošetřeném mléce a jeho výrobcích je 0,4-12,6 % a je maximální v zimních měsících z důvodu zkrmování siláží (El-Gazzar et Marth, 1991).

Pokud je neošetřené mléko kontaminováno, je koncentrace *Listeria monocytogenes* na nízkých úrovních (< 1 CFU.ml<sup>-1</sup>), ale může být i mnohem vyšší (104–106 CFU.ml<sup>-1</sup>) a to v případě kdy dojnice onemocní mastitidou (Bemrah et al., 1998).

Dlouhá doba skladování neošetřeného mléka (mléko skladované až 6 dnů) může umožnit *Listeria monocytogenes* nárůst při skladovacích podmínkách ve 4 °C (Meyer-Broseta, 2003). Tudíž přítomnost *Listeria monocytogenes* v měkkých sýrech může být výsledkem její přítomnosti v mléce určeného ke zpracování nebo díky kontaminaci po zpracování (Carminati et al., 2004).

Přežití *Listeria monocytogenes* v sýrech závisí především na pH a tepelných podmínkách během zpracování a skladování. Tato bakterie se vyznačuje schopností růstu při teplotách 4 °C, spojená se schopností přežít v prostředí o pH 3,5 a obsahu soli 4,5 % při teplotě 5 °C (Gay et Cerf, 1997). Díky své odolnosti může *Listeria monocytogenes* přežít zpracování sýrů, jako jsou Camembert, Cottage a Cheddar (Villani et al. 1996).

*Listeria monocytogenes* hojně pokrývá podlahy, drenáže, vybavení a je schopna kolonizovat po mnoho let nejrůznější povrchy ve zpracovatelském prostředí (Unnerstad et al., 1996), navzdory neustálému pravidelnému čištění a dezinfekci je nutné předpokládat kontaminaci čistých prostor (Carpentier et Cerf, 2011). Testování *Listeria* spp. představuje podstatnou část efektivního programu monitorování čistoty prostředí výroby. K největší

kontaminaci dochází především v prostředí zpracování, v oblastech kde výrobek podstupuje manipulace jako je mytí, solení a zrání sýrů ve zracích místnostech. Je také dobře známo, že navzdory důkladnému ošetřování je velké potenciální riziko vstupu *Listeria monocytogenes* do produktů po konečném zpracování (Tompkin et al., 1999). Dle výsledků studie Spanu et al. (2015) představují místa s nejvyšší kontaminací (přes 40 %) podlahy a drenáže.

Aby bylo možné odhalit nedostatky v čistotě prostředí, je vhodné provádět sběr vzorků v průběhu nebo na konci výrobních cyklů, protože mikroorganismy mohou být uvolněny ze svých útočišť během pracovního postupu (Tompkin, 2004).

### 3.6.3 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* je jedním z nejběžnějších zástupců bakterií, které způsobují otravu jídla (Loncarevic et al. 2005). *Staphylococcus aureus* produkuje různé extracelulární toxické proteiny a virulentní faktory, které zvyšují jejich patogenitu jako jejich enterotoxiny (Akineden et al., 2008). Vyskytuje se několik typů stafylokokových enterotoxinů (SE), jimiž jsou (A,B,C,D,E,G,H,I,J,K,L,M,N,O,P,Q R) (Loncarevic et al., 2005).

Zvláště zodpovědné za otravu potravin jsou enterotoxiny A a D (Pellisser et al., 2009). Stafylokokové enterotoxiny jsou termostabilní, což znamená, že jejich toxická schopnost zůstává nezměněna i po tepelném zpracování výrobku a jsou také resistantní vůči gastrointestinálním proteázám, jako je pepsin (Pellisser et al., 2009).

Je zde mnoho faktorů, které ovlivňují produkci enterotoxinů v potravinách, jako je počet buněk, koncentrace soli, pH, teplota a přítomnost kompetitivní mikroflóry (Balaban et Rasooly, 2000; Pellisser et al., 2009). Přestože mléko a mléčné výrobky jsou často kontaminovány *Staphylococcus aureus*, mléčné produkty jsou zřídka kontaminovány v míře, kdy dochází ke stafylokokové otravě jídla. Toxiny nezpůsobí otravu, pokud nedosáhne počet bakterií hodnoty  $10^5$ - $10^6$  CFU.g<sup>-1</sup> (Akineden et al., 2008).

Přestože pasteurace zabíjí buňky *Staphylococcus aureus*, stafylokokovým enterotoxinům zůstává jejich biologická aktivita, což znamená, že by těmto toxinům měla být vzhledem k veřejnému zdraví a potravinovému sektoru brána náležitá pozornost (Asao et al., 2003; Le Loir et al., 2003). Symptomy intoxikace stafylokokovými enterotoxiny se vyznačuje pocitem na zvracení až zvracením, křečemi v abdominální oblasti a diarreálním syndromem (Jørgensen et al., 2005).

Detekce *Staphylococcus aureus* a stafylokokových toxinů je složitá (Monday et Bohach, 1999). V současnosti jsou pro detekci stafylokokových toxinů využívány imunologické metody na detekci protilátek (ELISA), polymerázová řetězcová reakce (PCR) (Loncarevic et al., 2005).

Hunt et al. (2014) zjistili, že startovací kultura inokulována do mléka 24 hodin před výrobou sýra s chlazením na 4 °C ukázala snížení růstu *Staphylococcus aureus* v porovnání s mlékem, které bylo ihned inokulováno startovací kulturou před zahájením výroby sýra a s mlékem, jež nebylo inokulováno startovací kulturou. Le Marc et al. (2009) předpokládali, že startovací kultury inhibují produkci stafylokokových enterotoxinů v sýrech.

Efekt inhibice startovací kulturou *Lactococcus lactis* na *Staphylococcus aureus* je částečně založen na snížení pH mléka (Alomar et al., 2008). Již dříve bylo prokázáno, že *Lactococcus lactis* a jiné bakterie mléčného kvašení mohou ovlivnit chování *Staphylococcus aureus* v různých podmínkách (Nouaille et al. 2014). Hunt et al. (2014) uvádí, že hlavní regulační systém virulenních faktorů jako jsou enterotoxiny *Staphylococcus aureus*, jsou ovlivněny bakteriemi mléčného kvašení (Cretenet et al., 2011).

#### **3.6.4 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)**

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) způsobuje paratuberkulózu nebo Johnovu nemoc, zánětlivé onemocnění vnitřností postihující přežvýkavce. Toto onemocnění je nakažlivé a chronického charakteru a může vést ke smrti nakažených zvířat. Tento patogen má za následek Crohnovu nemoc u lidí.

Švýcarská studie zkoumala osud MAP v neošetřeném mléce během výroby tvrdých a polotvrdých švýcarských sýrů. Počty patogenů pomalu plynule klesaly během zrací doby 120 dnů, kdy dosáhli 3-4 log inaktivace MAP (Mcsweeney, 2007).

Hlavními faktory, které mohou sloužit jako prevence růstu MAP v sýrech, se ukázaly: pH sýru, koncentrace soli a teplota během zrání. Sung et Collins (2000) dokázali, že tepelný záhřev neošetřeného mléka spolu s 60 denním zráním během výroby měkkých sýrů způsobí inaktivaci  $10^3$  buněk MAP.

Sýry mohou být nejlépe chráněny používáním mléka od zvířat, která byla testována na přítomnost MAP s negativním výsledkem. Prevence MAP je složitá u mlékařského stáda, ale může jí být dosaženo skrze dobrou bioochranu, spolu s testováním a znalostí skotu, zvláště v případech kdy jsou vnesena nová zvířata do mlékařského stáda (Mcsweeney, 2007).

#### **3.6.5 *Salmonella enterica***

*Salmonella enterica* je jedním z významných patogenů potravin, neboť je ve světě odpovědný za onemocnění lidí salmonelózou (Majowicz et al., 2010). D'Aoust et al. (1985) zjistili, že výskyt salmonel v sýru je výsledkem nedostatečné pasterace mléka použitého

pro výrobu sýrů. Pro *Salmonella* spp. obecně platí, že může růst i za nepříznivých podmínek jako jsou nízká teplota, nízká vlhkost a vysoký obsah soli (El- Gazzar et al., 1992, Modi et al., 2001). Tudíž *Salmonella enterica* může setrvávat i v relativně drsných podmínkách, jako je tomu u sýru Cheddar, vyrobeného z neošetřeného mléka (Modi et al., 2001). Dle Ratnam et al., (1986) může dokonce i nízký výskyt bakterií *Salmonella enterica* v tvrdých sýrech způsobit salmonelózy.

Infekce *Salmonella enterica* i druhou nejčastější gastrointestinální infekcí u lidí v Evropské unii, s celkovým počtem případů 99,020 za rok 2010, ačkoli v předchozích letech byl počet infikovaných nižší. Nejčastějšími sérotypy jsou *Salmonella enteritidis* a *Salmonella typhimurium*, které byly u vzorků v tomto pořadí zastoupeny z 45 % a 22,4 % (EFSA, 2012).

Etiologická šetření objevila, že mnoho propuknutí salmonelóz mají na svědomí nejrůznější sérotypy *Salmonella enterica* jimiž jsou: *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella dublin*, *Salmonella montevideo*, které jsou spojovány s konzumací měkkých a tvrdých sýrů vyrobených z nepasterizovaného mléka (Yoon et al., 2016).

### 3.6.6 Koliformní bakterie

Koliformové představují širokou skupinu aerobních, fakultativně anaerobních, gram-negativních, nesporulujících, tyčinkovitých bakterií, které fermentují laktosu. Význam koliformních bakterií v sýrech mají především rody *Serratia* a *Aeromonas*, spolu s rody *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia* a *Enterobacter*. Někteří koliformové jsou ukazateli fekálního znečištění a pokud jsou jejich počty vysoké, mohou indikovat potenciální riziko přítomnosti bakteriálních patogenů (McSweeney, 2007).

Metody pro detekci koliformů v sýrech jsou relativně jednoduché, rychlé a mohou poskytovat hodnotné informace, neboť koliformní bakterie jsou užitečné k indikaci adekvátní sanitace vybavení, jelikož je tato skupina bakterií vysoce citlivá k chemickým sanitacím prostředkům. Koliformní bakterie jsou citlivé na zvýšení teploty, tudíž jejich přítomnost může indikovat postpasterační rekontaminaci. Tepelně neošetřené mléko, které má vysokou mikrobiální kvalitu, by mělo obsahovat počty koliformních bakterií  $<10 \text{ CFU.ml}^{-1}$ . Vyšší hodnoty koliformů mohou vést k defektům během zrání sýrů (Sheehan, 2011), které zahrnují nadměrné formování plynu, jež vede ke strukturálním vadám a negativně působí na senzorickou kvalitu sýrů. Koliformní bakterie jsou známy jako většinou původci časněho duření sýrů (Obrázek č. 1), vyrobených z tepelně neošetřeného mléka. U zrajícího sýru Cheddar, mohou koliformové způsobit časně duření, obzvláště pokud dojde k úpadku startovací kultury. Velice problematickým v souvislosti s duřením sýrů se ukázal být *Enterobacter aerogenes*, z důvodu jeho přítomnosti v tepelně neotřeném mléce. Koliformní bakterie jsou citlivé na kyselé prostředí



a tato citlivost je ještě zvýšena spolu se zvýšenou koncentrací soli spolu se sníženou vodní aktivitou (McSweeney, 2007).

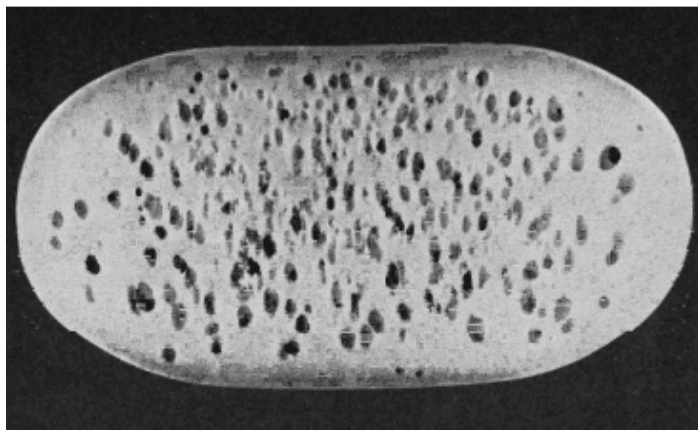
Ve studii syrového mléka z oblasti Normandie ve Francii Desmaures et al. (1997) objevili, že u 84 % analyzovaných vzorků byly koncentrace koliformních bakterií nižší než 100 CFU.ml<sup>-1</sup>. Většinou jsou vyšší koncentrace koliformních bakterií nalezeny u měkkých sýrů v porovnání s tvrdými a polotvrdými sýry (McSweeney, 2007).

Melilli et al. (2004) došli k závěru, že solením sýřeniny z tepelně neošetřeného mléka u sýru Pasta-filata, je jednoduchým a efektivním řešením pro snížení počtu koliformních bakterií a také účinnou prevencí před časným duřením u sýru Ragusano. Hodnoty koliformních bakterií jsou závislé pro příznačné druhy sýrů např. nízké hodnoty koliformů byly zjištěny u sýrů, jež zrají ve slaných nálevech. V těchto sýrech se mohou objevit *Citrobacter intermedium*, *Enterobacter aerogenes* a *Escherichia coli* (Aleksieva, 1980).

Reu et al. (2002) udávají, že vyšší hodnoty koliformních bakterií jsou u sýrů měkkých v porovnání se sýry s plísni uvnitř hmoty, sýry tvrdými, polotvrdými a čerstvými. Měkké sýry mají často vyšší pH, kratší zrající období, vyšší vodní aktivitu a nižší koncentraci soli v porovnání se sýry tvrdými, polotvrdými, čerstvými a se sýry s plísni uvnitř hmoty (Donnelly, 2005).

Araújo et al. (2002) zjistili, že střední hodnota koliformních bakterií je 10<sup>6</sup>/g v sýrech vyrobených z tepelně neošetřeného mléka. Protože se populace koliformů zvyšují během manufakturního zpracování měkkých sýrů z tepelně neošetřeného mléka, je důležité kontrolovat hodnoty koliformních bakterií již v neošetřeném mléce. Regulace evropské unie nespécifikují počty koliformních bakterií pro výrobu sýrů z tepelně neošetřeného mléka, ale celkově by hodnoty neměly překročit koncentraci koliformních bakterií 100 CFU.ml<sup>-1</sup> tepelně neošetřeného mléka (McSweeney, 2007).

Obrázek č. 1: Sýr poškozený časným duřením, způsobeným koliformními bakteriemi *Enterobacter aerogenes*.



(Babel et al. 1939)

### 3.6.6.1 *Escherichia coli* produkující Shiga toxin

*E. coli* jsou heterogenní skupinou typicky neškodných bakterií. Nicméně, během celého evolučního vývoje se některé sérotypy *E. coli* staly člověku patogenními díky získání specifických virulenčních genů (Nataro et Kaper, 1998).

Patogenní *E. coli* jsou schopny způsobit intestinální a extraintestinální infekce (Kaper et al. 2004). Kmeny spojované s intestinálními infekcemi jsou označovány jako diarheagenní *E. coli*. Na základě jejich virulence a epidemiologických znaků jsou diarheagenní *E. coli* rozděleny do šesti kategorií: enteropatogenní *E. coli* (EPEC), enteroinvazivní *E. coli* (EIEC), enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), enteroagregativní *E. coli* (EAEC), difúzně adherentní *E. coli* (DAEC) a Shiga toxin produkující *E. coli* (STEC) (Croxen et al., 2013).

I když jsou *E. coli* většinou neškodné, na kmeny STEC je nahlíženo jako jedny z důležitých patogenů potravin, které jsou schopny způsobit řadu onemocnění v rozsahu od nekomplikovaných akutních diarheálních syndromů k hemorhagickým kolitidám a hemoliticko- uremickému syndromu, což je onemocnění způsobující hemolytickou anémii, trombocytopenii (nedostatečná tvorba trombocytů) a akutnímu selhání ledvin (Nataro et Kaper 1998).

Shiga toxin jsou schopny produkovat pouze některé sérotypy jejichž hlavními zástupci jsou *E. coli* 0157:H7 a *E. coli* 026:H11 tyto sérotypy mohou růst a přežívat v proměnlivých teplotách během výroby sýrů a jejich zrání (D'Amico et al., 2010).

Infekční množství STEC je méně než 10 bakterií v případě vnímavých jedinců (Schmid-Hempel et Frank, 2007), k zajištění bezpečnosti, nesmí být v sýrech přítomny žádné STEC. Tudíž je velmi důležité kontrolovat přítomnost STEC nejenom během dojení, ale také po celou

dobu výroby sýrů. Za tímto účelem jsou používány vybrané kmeny bakterií mléčného kvašení, které slouží jako bioochrana a kontrola rozvoje nežádoucích patogenních mikroorganismů se současným zlepšením kvality a nezávadnosti sýrů (Grattepanche et al., 2008). V současnosti je známo pouze několik druhů bakterií, které jsou schopny inhibice STEC v sýrech. Kmen *Hafnia alvei* byl schopný snížit počty kmenu *E. coli* 026:H11 o 0.8-1.4 log CFU.g<sup>-1</sup> v pasterovaném mléce, (Delbes-Paus et al. 2013). In vitro, byly STEC inhibovány bakteriociny jako jsou nisin (Murdock et al., 2006), colicin (Lyon et Olson, 1997) či antagonisticky působící sloučeninou reuterin, která má původ u *Lactobacillus reuteri* (El-Ziney et Debevere, 1998).

### 3.6.7 Biogenní aminy

Biogenní aminy jsou stálé, nízkomolekulární alifatické, alicyklické nebo heterocyklické organické báze. Obecně v potravinách vznikají dekarboxylací specifických aminokyselin. K samotné dekarboxylaci může dojít v důsledku přítomnosti přirozených dekarboxyláz, které se mohou v potravinách vyskytovat nebo mohou být produkovány mikroorganismy. Biogenní aminy jsou nalézány v nejrůznějších potravinách nejčastěji však v rybách čeledi *Scombridae* a *Scombereoscidae*, ale vyskytují se také v sýrech. V sýrech biogenní aminy vznikají dekarboxylací aminokyselin během zrání sýrů (McSweeney, 2007).

Vysoké hodnoty biogenních aminů lze nalézt v sýrech, které jsou těžce kontaminovány potravinou znehodnocujícími mikroorganismy a mohou tak dosáhnout hodnot 17.9 mg/kg (Flasarová et al. 2016). Hlavními v sýrech detekovanými biogenními aminy jsou: histamin, tyramin, tryptamin, putrescin, kadaverin a fenylethylamin. Pozřením potravin obsahujících biogenní aminy může způsobit nepříznivé toxické reakce. Některé z biogenních aminů mají vazomotorní vlastnosti (např. histamin, tyramin, fenylethylamin, tryptamin), zatímco ostatní působí primárně na inhibici histamin detoxikujících enzymů (např. putrefaktivní aminy, putrescin a kadaverin (McSweeney, 2007).

Ukazuje se, že bakterie odpovědné za formování biogenních aminů, jsou přítomné v mléce před zpracováním více než v mléce již zpracovaném. Tudíž dodržování vysokých standardů čistoty během produkce mléka může hrát roli ve snižování tvorby biogenních aminů v sýrech. Skladovací teplota hraje roli v tvorbě histaminu v sýrech z důvodu efektu, kdy dochází k růstu nestartovních kultur mléčného kvašení. Zvyšující se skladovací teplota zvyšuje potenciál pro tvorbu histaminu v sýrech, zejména pokud dojde k namnožení bakterií s dekarboxylační aktivitou (Sagues et al., 1998).

### 3.6.7.1 Histamin

Z Tabulky č. 7 vyplývá, že jedním z nejrozšířenějších biogenních aminů je histamin, který má navíc široký rozsah fyziologických účinků. Toxicita histaminu může být výsledkem mnoha symptomů, jakými jsou: vyrážka, kopřivka, záněty, zvracení, průjem, nízký krevní tlak, bušení srdce, a bolesti hlavy (Fox, 2004). Většinou však mají tyto toxické symptomy pouze mírný průběh a postižení tak nemusejí podstoupit návštěvu lékaře (McSweeney, 2007).

Marino et al. (2000) uvádějí, že histamin se do sýrů dostává díky histamin produkujícím bakteriím. Hlavní skupinou těchto bakterií jsou *Enterobacteriaceae*, nicméně bylo zjištěno, že rody *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Morganella* a *Hafnia* jsou rovněž schopny dekarboxylace histidinu na histamin.

V mléce se přirozeně vykytuje nízká koncentrace volného histidinu, avšak během proteolytického štěpení během zrání sýrů dochází k uvolňování většího množství histidinu, který následně může podléhat dekarboxylaci a dát tak vznik histaminu (Hinz et al., 1956).

Nestartovací kultury mléčného kvašení jakými jsou například laktobacily, hrají důležitou roli při formování histaminu v sýru Gouda a pravděpodobně i v jiných sýrech. Zvýšením proteolýzy během zrání sýrů přidávkem proteolytických enzymových preparátů vede ke zvýšené koncentraci biogenních aminů v sýrech. Vysoké pH a vysoká koncentrace soli pozitivně ovlivní schopnost některých mikroorganismů (např. *Lactobacillus*) produkovat histamin v sýrech (Sagues et al., 1998).

Tabulka č. 7: Koncentrace (mg/kg) biogenních aminů v odlišných sýrech.

Sýr	Histamine mg/kg	Tyramin mg/kg	Tryptamin mg/kg	Cadaverin mg/kg	Putrescin mg/kg
Ementál	69-650	0-917	nd	16	<0.5
Roquefort	3-910	40-1100	nd-1100	42	44
Camembert	nd-480	10-210	nd-60	nd	nd
Gouda	nd-450	0,1-670	nd-200	17-48	7-20
Cheddar	nd-2120	nd-1530	nd-300	nd	nd
Parmesan	nd-293	85-280	nd	nd	nd

(Roig Sagues et al., 1998)

nd- nedekováno

### 3.6.8 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou sekundárními metabolity, jež produkují mikroskopické houby za vhodných podmínek: teploty vzduchu a vlhkosti (Kinetine a Mánes, 2009). Mezi nejběžnější plísně produkující mykotoxiny patří *Fusarium*, *Aspergillus* a *Penicillium* (Binder, 2007). Tyto mikroorganismy produkují mykotoxiny, jako jsou ochratoxin A (OTA), deoxynivalenol (DON), aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), zearalenon (ZEA) či kyselinu cyklopiazonovou. Zvíře pozře tyto mykotoxiny spolu s potravou a ty jsou následně v bachoru metabolizovány mikroflórou na deriváty těchto toxinů (Lizarraga et al., 2015).

Přítomnost mykotoxinů v sýrech je v zásadě kvůli třem hlavním důvodům: (1) přítomnost aflatoxinu M<sub>1</sub> v čerstvém nebo sušeném mléce, jež bylo následně použito k výrobě sýrů, které pochází od dojníc, jejichž krmivo bylo kontaminováno aflatoxinem B<sub>1</sub> (Lund et al., 1995), (2) syntéza mykotoxinů houbami, jimiž jsou především rody *Penicillium* a *Aspergillus*, které mohou na sýrech růst a jsou označovány jako přímé kontaminanty mykotoxiny, (3) produkce mykotoxinů plísněmi, které jsou v sýraštví používány k výrobě plísňových zrajících sýrů (Fox et al., 2004).

Sýry jsou velmi náchylné k růstu plísní a z toho důvodu je důležité skladovat sýry v chladných podmínkách, navíc mají některá balení vakuovou atmosféru nebo jsou obohacena o inertní plyn z důvodu, že některé plísně jsou psychrotolerantní a mohou růst za nízkého přístupu kyslíku. Plísně mohou způsobit znehodnocení i vakuově baleného sýru Cheddar během zrání (Hocking et Faedo, 1992). Tento defekt se může občas objevit u bloků Sýru Cheddar, který zrál po 9-12 měsících v teplotách 8-12 °C a je způsoben nárůstem mikroskopických hub v ohybech a záhybech plastových folií, do kterých je Cheddar balen. Bylo objeveno, že *Penicillium commune* a *Penicillium labrum* jsou v těchto sýrech dominantně zastoupeny a mohou produkovat kyselinu cyklopiazonovou (Hocking et Faedo, 1992).

Kultury *Penicillium roqueforti* a *Penicillium camemberti*, jsou používány po dlouhou dobu při výrobě nejrůznějších sýrů s plísní uvnitř hmoty a sýrů s plísní na povrchu. Některé kmeny *Penicillium roqueforti* mohou produkovat toxiny jako je patulin, kyselina mykofenolová, kyselina penicilinová, roquefortin, kyselina cyklopiazonová, isofumiclavin A a B, festuclavin. *Penicillium camemberti* se ukázal jako hlavní producent kyseliny cyklopiazonové (McSweeney, 2007).

Chronická konzumace mykotoxinů je spojena s mnoha onemocněními, z důvodu toxických efektů na člověka, jimiž jsou: genotoxicita, karcinogenita, hepatotoxicita, nefrotoxicita nebo estrogenicita (Anfossi et al., 2010).

### 3.6.8.1 Aflatoxiny

Aflatoxiny jsou celosvětově nejlépe známou a nejintenzivněji zkoumanou skupinou mykotoxinů. Aflatoxiny jsou produkovány plísněmi: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus*, *A. nomius* a *A. pseudotamari* (Bennet et Klich, 2003).

Běžně se vyskytují čtyři typy aflatoxinů, jimiž jsou B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub>. Mezi nimiž je aflatoxin B<sub>1</sub> nejběžněji produkováným mykotoxinem a je označován jako nejsilnější přírodní karcinogen u savců (Creppy, 2002). Aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) je hydroxylovaný metabolit toxinu AFB<sub>1</sub>, který se vyskytuje v mléce dojených zvířat, která toxin AFB<sub>1</sub> zkonzumovala spolu s potravou (Kamkar, 2008).

Množství vytvořeného AFM<sub>1</sub> závisí na individualitě dojnice. Vylučování AFM<sub>1</sub> do mléka zřetelně klesá již po jednom dni od posledního přijetí aflatoxinu B<sub>1</sub>. Nicméně nepatrné hodnoty jsou zjistitelné i po 2-3 dnech od poslední dávky aflatoxinu B<sub>1</sub>. Poměr konverze AFB<sub>1</sub> na AFM<sub>1</sub> kolísá od 1:300 až do 1:100 (Panariti, 2001). Aflatoxin M<sub>1</sub> je relativně stabilní v syrovém i tepelně ošetřeném mléce a není ovlivněn ani pasterací (dokonce i za použití UHT ošetření) (Fox, 2004).

Mnoho studií ukázalo, že Aflatoxin M<sub>1</sub> je stabilní během výroby sýrů a 40-57 % celkového množství aflatoxinu M<sub>1</sub> v mléce se dostane během výroby do sýřeniny. Studie také poukazují na velkou stabilitu aflatoxinu M<sub>1</sub> během zrání a skladování (McSweeney, 2007).

Nejlepší způsob kontroly přítomnosti aflatoxinu M<sub>1</sub> v mléce a sýrech je omezit přítomnost AFB<sub>1</sub> v krmné dávce zvířatům. S touto myšlenkou již přišla Evropská unie, která stanovila maximální akceptovatelný limit AFB<sub>1</sub> v krmné na 10 µg/kg (Fox, 2004). I když je Aflatoxin M<sub>1</sub> mnohem méně toxický, mutagenní a karcinogenní než aflatoxin B<sub>1</sub>, přesto je klasifikován jako možný lidský karcinogen a tak jeho přítomnosti v mléčných výrobcích způsobuje značné znepokojení (Frisvad et al., 2006).

### 3.6.8.2 Kyselina cyklopiazonová

Za určitých okolností může *Penicillium camemberti*, který se využívá k výrobě plísňových sýrů, produkovat mykotoxin kyselinu cyklopiazonovou. Tento mykotoxin je podezříván z karcinogenních efektů a z experimentů též vyplývá nepříznivý vliv na vývoj plodu, poškození jater a ovlivnění funkcí svalů, včetně myokardu. Kyselina cyklopiazonová má navíc neurotoxický a imunosupresivní účinek (Abbas et Dobson, 2011).

Kyselina cyklopiazonová byla přítomna u komerčních sýrů s plísní uvnitř hmoty v hodnotách od 0,05 do 1,5 µg/g (Le Bars et Le Bars, 1979). Bylo objeveno, že se kyselina

cyklopiazonová nejčastěji objevuje v kůře sýrů, ale ukázalo se, že je schopna migrovat i do středu sýra Taleggio (Finoli et al., 1999). Kyselina cyklopiazonová je produkována plísní *Penicillium camemberti* obvykle po 5 dnech při teplotě 25 °C, ale není produkována během skladování za běžných chladicích teplot (Still et al., 1978).

### 3.7 Patogeny způsobující rozvoj plynů během zrání sýrů

Rozvoj plynů během zrání sýra je zřejmé z přítomnosti ok, prasklin, skulinek, puklin, děr nebo plynů uvnitř balení. Plyny, jež jsou produkovány během zrání, se mohou objevit již během prvních několika dní, přičemž je tento jev označován jako časné duření sýrů nebo se mohou objevit v pozdějších stádiích zrání a pak se jedná o pozdní duření sýrů (Sheehan, 2011).

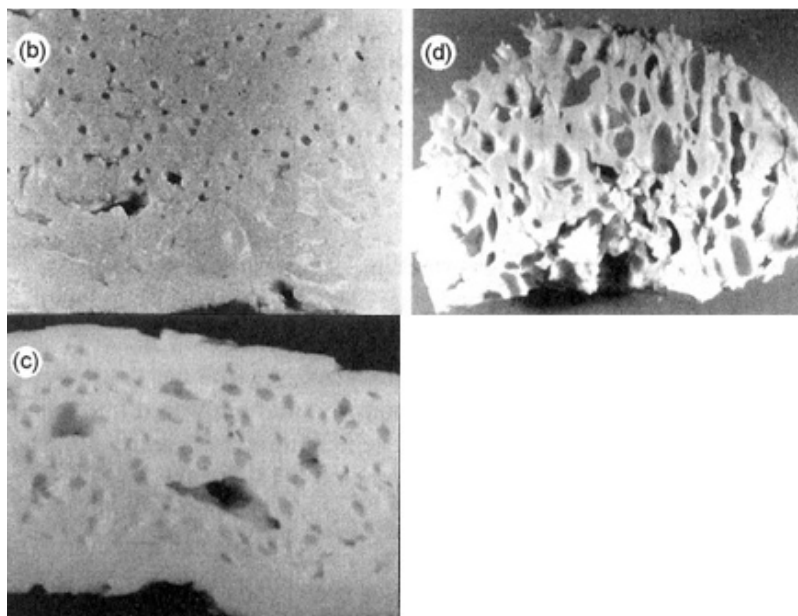
#### 3.7.1 Časné duření sýrů

V tomto případě plyny způsobují tvorbu spousty menších děr a jsou produkovány nárůstem koliformních bakterií a kvasinek (Obrázek č. 2) k čemuž dochází většinou krátce po manufakturním zpracování. Tento defekt je častější u sýrů měkkých a poloměkkých z důvodu jejich vyšší vodní aktivity než u jiných skupin sýrů. Plyn produkováný koliformními bakteriemi je  $H_2$  a je výsledkem metabolismu molekul kyseliny mravenčí, což je produkt laktátového metabolismu. Plyn produkováný kvasinkami je  $CO_2$  a pochází z metabolismu laktátu nebo laktosy. Hlavními zdroji kontaminace bakteriemi způsobujícími časné duření jsou: špatná hygiena prostředí a vybavení, postpasterační kontaminace mléka či kontaminace startovacích kultur a to v případě, že je jejich pH příliš vysoké nebo příliš nízké, což může zapříčinit růst nežádoucích mikroorganismů (Sheehan, 2011).

Časné duření mohou způsobit také některé podruhy bakterií *Lactococcus lactis*, *Streptococcus* a *Leuconostoc*. Rody *Lactococcus* a *Leuconostoc* jsou schopny fermentovat laktosu a citrát za vzniku  $CO_2$  (Mullan, 2000).

Problémy se vznikem  $H_2$  mohou být kontrolovány přidávkem  $KNO_3$  nebo  $NaNO_3$  do mléka v nízkých koncentracích (0,2 %). Anionty  $NO_3^-$  podporují rozklad laktosy na  $CO_2$  a  $H_2O$  více než fermentaci kyseliny mravenčí na  $H_2$  (McSweeney, 2007).

Obrázek č. 2: Časné duření sýrů zrajících v nálevu: (b) sýr infikovaný koliformními bakteriemi, (c) a (d) sýry infikované koliformními bakteriemi a kvasinkami



(McSweeney, 2007)

### 3.7.2 Pozdní duření sýrů

Produkce plynů během zrání u sýrů typu Cheddar může být výsledkem kontaminace mléka heterofermentativními organismy jako jsou lactobacily. Nestartovací kultury mléčného kvašení rostou během zrání a heterofermentativní lactobacily jako je *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus fermentum* jsou schopny produkce plynů v sýrech cheddarového typu. K produkci plynu dochází, právě když jsou fermentovány zbytky laktosy a galaktosy na CO<sub>2</sub>. Podíl obsahu soli a vlhkosti v sýru ovlivňuje aktivitu startovacích kultur v sýrech typu Cheddar. Pomalá aktivita startovacích kultur může vést k vysokým hodnotám residuální laktosy. Navíc podíl soli a vlhkosti v sýru ovlivňuje využití laktosy a produkci laktátu nestartovacími kulturami mléčného kvašení (Sheehan, 2011). Nárůst *Clostridium tyrobutyricum* může také vést k pozdnímu duření, ale u sýrů typu Cheddar je to poměrně vzácné z důvodu rychlého zvýšení podílu soli a vlhkosti v tomto typu sýrů (McSweeney, 2007).

V mnoha případech však k pozdnímu duření sýrů dochází kvůli aktivitě bakterií propionového kvašení, které fermentují laktosu nebo laktát na kyselinu propionovou. Kyselina propionová způsobuje u sýrů charakteristickou oříškovou chuť a vytváří charakteristická oka, která jsou spojována se sýry švýcarského typu (Sheehan et al., 2008). V takovýchto případech jsou vybrané kmeny bakterií propionového kvašení záměrně přidávány ke startovacím kulturám k dosažení produkce různých profilů vůně. Nicméně v sýrech z neošetřeného mléka (např.



Beaufort), přítomnost bakterií propionového kvašení vede ke spontánním a nekontrolovatelným fermentacím (Obrázek č. 3) (McSweeney, 2007).

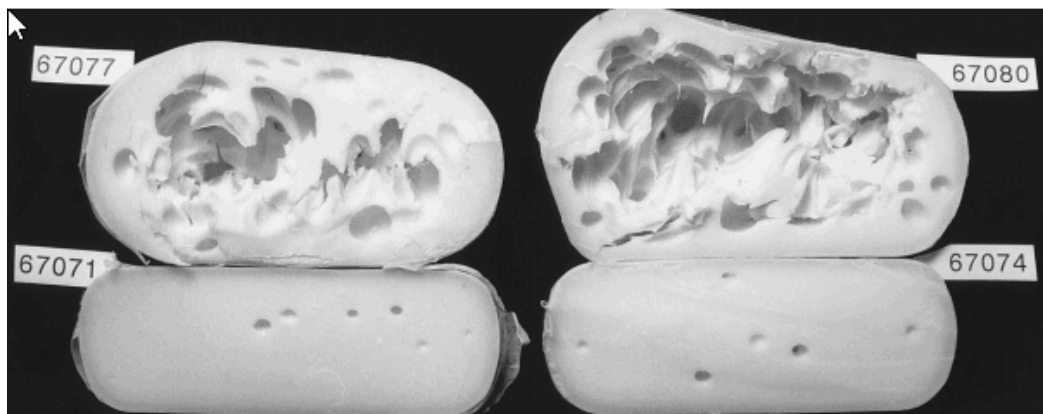
Obrázek č. 3: Neřízené propionové kvašení (pravděpodobně způsobené vysokou teplotou – a výsledkem jsou malá očka a těsto se trhá – trhliny napříč řezem sýra). Takovéto sýry mívají krátké těsto a jsou i dost tuhé.



(Kopáček, 2011).

Produkce plynů u sýrů v solném nálevu dochází během zrání, kvůli klíčení bakteriálních spor *Clostridium tyrobutyricum* nebo *Clostridium butyricum*. Tyto organismy fermentují laktát na acetát, butyrát,  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2$ . Pozdní duření sýrů (Obrázek č. 4) je specifickým problémem u sýrů švýcarského typu, kde ke klíčení spor clostridií může dojít během zrání v teplé místnosti. Faktory, které tento proces ovlivňují: použití mléka ze stád krmených siláží, špatnou kvalitou mléka, špatná hygiena vybavení, startovací kultury s nízkou aktivitou, nedostatečným lisováním sýřeniny, což vede ke slabým místům ve hmotě sýřeniny nebo nevyločením syrovátkových kaps, jež mohou založit podmínky pro formování děr. Těmto problémům lze zabránit užíváním mléka pouze od dojníc, které nebyly krmeny siláží, baktofugací mléka, přidavkem lysozemu nebo  $\text{NO}_3^-$  do mléka (Sheehan, 2011). Spory klostridií mohou být odstraněny také pomocí mikrofiltrace, obecně však platí, že užití baktofugace, zvýšená koncentrace NaCl v sýru a nižší teplota zrání sýru, jsou efektivní kroky ke snížení produkce plynu klostridii (Su et al., 2000).

Obrázek č. 4: Sýry 67077 a 67080 byly kontaminovány spory *Clostridium tyrobutyricum* a je u nich patrné máselné kvašení, sýry 67071 a 67074 jsou bez kontaminace.



(Klijn et al., 1995)

### 3.8 Klíčové faktory HACCP plánu při výrobě sýrů

Kromě nezbytných předpokladů plánů, jež zahrnují standardní sanitaci provozních procedur, vhodné výrobní postupy a správné zemědělské postupy, je nezbytný systém analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů (HACCP), jež může identifikovat a kontrolovat potenciální rizika k zajištění bezpečnosti potravin. HACCP tvoří sedm principů: analýza rizika, identifikace kritických kontrolních bodů, stanovení kritických limitů pro kritické kontrolní body, identifikace a sledování kritických kontrolních bodů, uchovávání záznamů, nápravné kroky a kontrola postupů. Těchto sedm principů musí být součástí efektivního HACCP plánu (Pritchard, 2005).

Kvalita neošetřeného mléka je důležitá u produkce všech druhů sýrů, zvláště však u sýrů vyráběných z tepelně neošetřeného mléka. Nízký počet bakterií a nízký počet somatických buněk jsou klíčové indikátory kvality mléka, a jakmile dojde ke zvýšení hodnot těchto ukazatelů, pak je zde větší riziko kontaminace mléka a sýrů patogeny. Sledování a regulace celkového počtu bakterií a počtu somatických buněk mléce by mělo být součástí programu HACCP k zajištění bezpečnosti produktů. Jako rychlé, cenově dostupné metody jsou v současnosti k dispozici pro detekci bakteriálních patogenů v neošetřeném mléce testy pro specifické patogeny, které jsou rovněž vhodné pro zařazení do HACCP programu. Obecně platí, pokud je vysoký celkový počet bakterií a počet somatických buněk v neošetřeném mléce, pak se může objevit více negativních vlivů na kvalitě sýru, která může snižovat přijatelnost konzumenty a celkový výnos (Pritchard, 2005).

Při výrobě sýrů na farmách, je většinou čas mezi dojením a samotnou výrobou velice krátký a v některých případech je z mléka vyráběn na farmě sýr ihned po nadojení bez předešlého chlazení. Minimalizace času mezi dojením a počátkem výroby sýru, snižuje možnost

růstu nežádoucích bakterií v neošetřeném mléce. Naopak, když je mléko chlazeno a skladováno k následnému transportu, příležitost pro růst patogenů se zvyšuje, obzvláště je zvýšen nárůst psychrotrofních patogenů (Donnelly, 2001).

Směrnice Evropské unie 92/46 a 92/47 obsahuje nařízení pro hygienu produkce a marketing neošetřeného mléka, tepelně ošetřeného mléka a mléčných produktů. Tato nařízení stanovují hygienické standardy pro neošetřené mléko jeho uchovávání, přepravu a jsou zaměřeny na problémové faktory, jako jsou teplota, sanitace a mikrobiologické standardy, jež umožňují produkci neošetřeného mléka v nejvyšší možné kvalitě. Neošetřené mléko musí splňovat standardy kvality např. celkový počet mikroorganismů při 30 °C < 100 000 CFU.ml<sup>-1</sup> a počet somatických buněk ≤ 400 000 na 1ml mléka. Ke splnění těchto a jiných standardů, státy EU uplatňují použití HACCP zásad v produkci tekutých mléčných výrobků. Státy EU vyžadují jak identifikaci producentů ke kontrole a jejich vyhodnocení k zaručení, že jsou produkty produkovány ve vyhovujících podmínkách, tak i osvojení kritických limitů zavedených platnými a ověřitelnými parametry. V případě tekutých mléčných výrobků mnoho výrobců poznalo, že zde je kritickým limitem délka údržnosti výrobku. Údržnost je ovlivněna množstvím faktorů zahrnující čištění a sanitaci potrubí a dojícího zařízení, stav neošetřeného mléka použitého k výrobě daného produktu a skladovací teploty (Donnelly, 2001).

Pasterace eliminuje částečně původní mikroflóru neošetřeného mléka zahrnující také patogenní bakterie, nicméně teplovzdušné organismy pasteraci přežijí. Postpasterační kontaminace mléka je problematická pokud prostředí zpracování či balení není dostatečně udržováno. Kromě toho mnoho kontaminantů, zahrnující např. *Listeria* spp., jsou schopny formovat biofilmy, které je chrání před čisticími a sanitačními opatřeními. Některé regulace, jakými jsou např. regulace EU, stanovují mikrobiologické limity pro doporučená data prodeje u výrobků, jakými jsou sýry. S ohledem k nařízením, jež upravují použití neošetřeného mléka pro výrobu sýrů, byly stanoveny limity pro *Staphylococcus aureus* v neošetřeném mléce na 500 CFU.ml<sup>-1</sup>. Hotové sýry musí splňovat specifické hygienické standardy, pokud je však ve výrobě nedostatečná hygiena může se ve výrobcích objevit *Staphylococcus aureus* nebo *Escherichia coli*, kteří indikují nízkou úroveň hygieny (McSwiney, 2007).

### 3.9 Zdroje mikrobiální kontaminace

Mikrobiální kontaminace sýrů může pocházet z různých zdrojů. Takovými zdroji během produkce sýrů mohou být: startovací kultury, solný nálev, podlahy, balicí materiály, nádrže se sýřeninou, syrovátka, řezací nůž, chladicí místnost a místnosti sloužící k odvětrávání vzduchu (Temelli et al., 2006). Chladicí skladiště se ukázaly být zdrojem kontaminace *Listeria monocytogenes* u sýrů vyrobených z pasterovaného mléka (Brito et al., 2008). Kromě toho bylo

zjištěno, že lidé slouží jako kontaminační zdroj patogenní bakterie *Staphylococcus aureus* u sýrů (Callon et al., 2008)

Jednotlivé druhy kontaminace sýrů patogenními bakteriemi lze rozdělit na dvě hlavní skupiny a to prostřednictvím kontaminovaného neošetřeného mléka a kontaminace umožněné cestami ve zpracovatelských podnicích (Kousta et al., 2010).

### 3.9.1 Neošetřené mléko

André et al. (2008) detekovali ve své studii patogeny potravin v neošetřeném mléce z mléčných tanků a mléčných sil a bylo dokázáno, že neošetřené mléko je potenciálním zdrojem kontaminantů sýrů.

Tondo et al. (2000) studovali zpracování mlékařských produktů a zkoumali potenciální zdroje kontaminace *Staphylococcus aureus*. V této studii bylo deset z celkových 3200 mléčných produktů pozitivní na přítomnost *Staphylococcus aureus*, u neošetřeného mléka bylo pozitivní na přítomnost *Staphylococcus aureus* 90,4 % (19/21) vzorků a u manipulátorů s potravinami, kteří jsou asymptomatictí, byl prokázán *Staphylococcus aureus* ve 35,2 % (19/51) případech, naproti tomu nebyla prokázána přítomnost *Staphylococcus aureus* u strojních zařízení.

*Staphylococcus aureus* se může do mléčných tanků dostat přímo exkrecí ze struků z postižených zvířat se subklinickou či klinickou mastitidou, nebo prostřednictvím fekální kontaminace (Callon et al., 2008). *Staphylococcus aureus* je považován za nejrozšířenější patogen způsobující vnitřní infekce mléčných žláz u dojnic (Nickerson, 2002) a může být vylučován v mléce až k hodnotám  $8 \log_{10} \text{CFU.ml}^{-1}$ . (Sanaa et al., 1993).

V některých případech, i když poměrně vzácně se mohou objevit mastitidy způsobené přítomností *Listeria monocytogenes*, jež jsou spojovány s dlouhodobou infekcí a jsou zde udávány hodnoty koncentrací těchto patogenů od 3 do  $6 \log_{10} \text{CFU.ml}^{-1}$  mléka (Sanaa et al., 1996).

Kessel et al. (2004) uvádějí, že výskyt mastitid zapříčiněných *Escherichia coli* 0157:H7 jež by způsobily vnitřní infekce mléčné žlázy je nízký.

Patogeny jsou šířeny z dojnice na dojnici nejen prostřednictvím dojících zařízení, aplikovanými mléčnými metodami (Bergonier et al., 2003), ale také prostřednictvím rukou, jež byly označeny za jeden z přenašečů *Staphylococcus aureus* v mléčných stádech (Vautor et al., 2003).

Neošetřené mléko může být také velmi často kontaminováno z prostředí farmy (Callon et al., 2008). Konkrétně z faremního prostředí vstupují do mléka rody *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, jež mají původ ve fekáliích (Van Kessel et al., 2004).

Další z nebezpečných kontaminantů je *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) jež způsobuje Johnovo onemocnění a infikované dojnice mohou tyto bakterie vylučovat do mléka v hodnotách mezi 1.4 – 0.8 log<sub>10</sub> CFU.ml<sup>-1</sup> životaschopných buněk MAP (Sweeney et al., 1992), nicméně obsah těchto bakterií ve fekáliích zvířat infikovaných MAP mohou hodnoty dosáhnout 8 log<sub>10</sub> CFU.g<sup>-1</sup> (Cocito et al., 1994).

Výskyt patogenů potravin v neošetřeném mléce je ovlivněn řadou faktorů, jimiž jsou: Velikost farmy, počet dojnic na farmě, hygiena, management praktik farmy, geografická lokace, sezóna a také typy hodnocených vzorků, odlišnosti v detekčních metodách, odchylky na odebíraných vzorcích (Oliver et al., 2005).

### 3.9.2 Provoz výroby sýrů

Klausner et Donnelly (1991) tvrdí, že nejčastěji jsou kontaminovány výrobky rodem *Listeria* skrze prostředí podniků produkující tekuté mléčné výrobky, následovány jsou mraženými nebo zrajícími výrobky a konečně podniky produkující sýry.

Pritchard et al. (1995) získali výsledky o četnosti výskytu rodu *Listeria* na vybavení podniku oproti jeho pracovnímu prostředí a to z testovaných 21 mlékařských podniků, které byly v rozmezí od hospodářství skládající se z jediné budovy až po velké závody. U vzorků z vybavení podniků byl pozitivní výskyt *Listeria monocytogenes* u 6 z celkových 21 podniků, zatímco u pracovního prostředí bylo pozitivních vzorků 19 z celkových 21. U jedenácti z 215 vzorků ze sýrů zpracovávacího vybavení byla prokázána *Listeria monocytogenes* (5,1 %). Pozitivní byly skladovací tanky, transportní systém, horní strany stolů, plnicí zařízení mléka, zařízení na filtraci solného roztoku. U pracovního prostředí bylo pozitivních 24 vzorků z celkových 163 (14,7 %), pracovní prostředí zahrnují: chladičí/mrazicí boxy, zóny pro uchovávání neošetřeného mléka a ventilační systém. Jev kdy je kontaminace vyšší u povrchů, které nejsou v přímém kontaktu s výrobkem než u povrchů, jež jsou s výrobkem v přímém kontaktu, studovali Jacquet et al. (1993) při pozorování podniku, kde byla kontaminace *Listeria monocytogenes* u pracovního prostředí mnohem vyšší než u vybavení podniku. Získali výsledky, které ukazují, že podstatně více jsou kontaminovány povrchy, jež nejsou v přímém kontaktu s výrobkem (podlahy a odtoky vody) oproti povrchům s přímým kontaktem (police určené ke zrání sýrů, mycí vybavení a roztoky určené pro měkké sýry).

Přítomnost *Listeria monocytogenes* v prostředí mlékařského podniku může být potenciálním zdrojem kontaminace finálních produktů, a následkem vytvoření biofilmů, zvláště pokud jsou mikroorganismy chráněny v mléčné sušině a mohou být následně šířeny z výrobního prostředí do konečného produktu ventilačním systémem, když jsou k čištění použity vysokotlaké

hadice, pomocí kterých dojde odšťikování z čištěných prostor do okolního prostředí, nebo také může dojít k přenosu prostřednictvím pracovníků (Kells et Gilmour, 2004, Reij et Den Aantrekker, 2004).

### 3.10 Zásahy během výroby sýrů ke snížení kontaminace

Pasterizace je navržena ke zničení všech bakteriálních patogenů obvyklých v tepelně neošetřeném mléce, vyjma sporotvorných bakterií. Rozsáhlé studie zaměřené na přežití *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* a *E. coli* 0157:H7 v tekutém pasterizovaném mléce ukázaly proměnlivé schopnosti těchto patogenů přežít při teplotách od 60-74 °C po minimálním vystavení teplot po 16 vteřin (D'Aoust et al., 1987, Farber et al., 1988). Tyto studie ukázaly, že životaschopné buňky *E. coli* 0157:H7 již nemohly být znovu obnoveny pokud byly pro pasteraci použity teploty vyšší než 63 °C, kdežto *Salmonella* a *Listeria* spp. byly izolovány z mléka i po zahřátí v rozsahu od 60-67,5 °C.

Doyle et al., (1987) získali výsledky, které poukazují, že *Listeria monocytogenes* přežívá vysokoteplotní krátkodobé pasterace. Tyto výsledky se liší od jiných studií, ve kterých záhřev na 72 °C na 15 vteřin byl dostačující ke zničení *Listeria monocytogenes* v mléce (Bradshaw et al., 1985). Tyto odlišnosti lze odůvodnit rozdílností v experimentálních přístupech použitých v těchto studiích (Doyle et al., 1987). Takovými odlišnostmi byly metody použité k detekci listerií jež zůstaly naživu, ale také pozice patogenu uvnitř leukocytů v mléce. Kromě toho pozice patogenu uvnitř leukocytů může být důležitým faktorem ovlivňující přežití během pasterace, přestože její protektivní mechanismus nebyl dosud rozpoznán. Pravděpodobně je tak zapříčiněno odlišným fyziologickým stavem buněk *Listeria monocytogenes* uvnitř leukocytů od listerií volně rozptýlených v mléce (Doyle et al., 1987).

Při produkci fermentovaných mléčných produktů je používána kombinace startovací kultury, nízké vodní aktivity, a nízké pH, které vytváří podmínky, jež zabraňují přežití a růst *Listeria monocytogenes* (Morgan et al., 2001).

Při špatné teplotě neošetřeného mléka na farmě během jeho transportu nebo delším skladování, může docházet k rozvoji psychotrofních patogenních bakterií jako je *Listeria monocytogenes* až k neakceptovatelným hodnotám, kdy nejsou zcela eliminovány nízkým záhřevem (60-63 °C), jež se je běžně používán při výrobě sýrů (D'Aoust, 1989).

Pasterizace zabíjí buňky *Staphylococcus aureus*, zatímco v sýrech z nepasterovaného mléka je předcházeno výskytu *Staphylococcus aureus* fermentací nebo zráním (Akineden et al., 2008). Aby byly produkovány stafylokokové enterotoxiny, je třeba, aby v mléce byla přítomná hustá populace *Staphylococcus aureus* ( $>5 \log_{10}$  CFU.g<sup>-1</sup>) (Jablonski et al., 1997). Takže i když vlivem pasterizace, fermentace nebo zrání dojde k eliminaci buněk *Staphylococcus aureus*, jsou

zde pořád přítomné již vyprodukované stafylokokové enterotoxiny (Jørgensen et al., 2005), což znamená, že by mělo být u sýrů poctivě hlídáno množství nejen *Staphylococcus aureus*, ale i množství enterotoxinů. (Vernozy-Rozand et al., 1998).

Cirone et al. (2006) získali výsledky, že zrání sýrů snižuje počty *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) u sýrů z mléka bez tepelného ošetření, a tepelné ošetření při 65 °C navíc se zracím procesem může být velmi účinné pro eliminaci MAP v těchto produktech. Dvě další studie objevily, že přežití MAP v různých typech sýrů produkovaných v laboratorních podmínkách se ukázalo být ovlivněné fyzikálně-chemickými změnami, ke kterým dochází během zrání (Sung et Collins, 2000, Spahr et Schafroth, 2001). Sung et Collins (2000) vyrobili měkký bílý sýr v laboratorních podmínkách a zjistili, že sýr vyrobený z pasterovaného mléka a 60 denní zrací doba inaktivují 3 log<sub>10</sub> CFU.ml<sup>-1</sup> MAP v mléce.

Spahr et Schafroth (2001) sledovali přežití MAP během zrání trvající 120 dní u tvrdých a polotvrdých sýrů, které byly vyrobeny z nepasterizovaného mléka a jež bylo uměle kontaminováno buňkami MAP v koncentraci 4-5 log<sub>10</sub> CFU.ml<sup>-1</sup>. Výsledky ukázaly, že kombinace teploty použité během zpracování a snížené pH v časných stádiích zrání sýru, vedly k inaktivaci MAP.

### 3.11 Prevence kontaminace sýrů při výrobě

Neošetřené mléko kontaminované patogeny a použité v mléčném zpracování, představuje riziko pro lidské zdraví, když je použito nepasterizované mléko pro výrobu některých druhů sýrů, nebo v případě křížové kontaminace patogeny. Infikované mléčné žlázy klinickou nebo subklinickou stafylokokální mastitidou jsou hlavním zdrojem kontaminace *Staphylococcus aureus*, kdežto *Salmonella*, *E. coli* 0157:H7 a *Listeria monocytogenes* kontaminují neošetřené mléko z okolního prostředí, například prostřednictvím výkalů. A tak k vyhnutí se kontaminace neošetřeného mléka ještě na farmě, jsou nezbytné správné faremní úkony (např. nakládání se zvířaty a jejich biologickým odpadem, ošetření vody, vhodné hygienické podmínky během dojení a kontrola mastitid) k prevenci nárůstu, přežití a přenosu patogenů (Fox, 1999). Hasonova et Pavlik (2006) ve své studii navrhují prevenci na faremní úrovni před *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) namísto kontroly onemocnění, možnost prevence však zabere několik let a je velmi nákladná. Slana et al. (2008) navrhují užití certifikačních programů, jež by celosvětově limitovaly rozšíření infikovaných zvířat.

Výrobní nástroje mají často komplikovanou konstrukci, u které je velmi obtížné vyčistit a desinfikovat důkladně celý povrch, čehož využívá *Listeria monocytogenes*, pro niž je charakteristická schopnost kolonizovat povrchy, které jsou v přímém kontaktu výrobkem a na nichž často vytváří biofilmy (Møretrø et Lanqsrud, 2004). Za účelem prevence před

kolonizací výrobního prostředí *Listeria monocytogenes*, by měl být podnik a jeho vybavení designováno více hygienicky, tak aby zde nebyly přítomny žádné hrany, pukliny a mrtvé prostory, což slouží k ulehčení správných pracovních postupů a zajištění efektivního sanitačního procesu (Bryers, 2000).

Modifikace designu vybavení, čisticích a desinfekčních prostředků způsobila snížení výskytu *Listeria* spp. v továrnách na výrobu sýru (Menendez et al., 1997). Užití nerezové oceli je vhodnější pro jednodušší čištění a desinfekci než u polymerních povrchů (Krysinski et al., 1992) a navíc u nerezové oceli nedochází tolik k narušení povrchu po dlouhodobém používání čisticích a desinfekčních prostředků (Boulangue-Petermann, 1996).

Meyer (2003) tvrdí, že mechanická síla působící k povrchu kombinovaná spolu s detergenty, které nevytvářejí aerosoly, jako jsou vysokotlaké postřiky kombinované s pěnou nebo sanitačním prostředkem, vede k významnému odstranění biofilmů. Menendez et al. (1997) uvádějí, že se žádné listerie neobnovily v prostředí mlékařského podniku a jeho vybavení, když byla použita pěna na bázi chlóru a dlouhotrvající aplikační čas, které demonstrovali, že čisticí a desinfekční procedury mohou ovlivnit postpasterační kontaminaci sýrů.

Skupinou EHEDG byl vyvinut standardní test procedur, za účelem k indikaci oblastí se špatným hygienickým designem vybavení, ve kterém jsou produkt nebo mikroorganismy chráněny před čisticími procesy, ale také porovnává místa čistitelnosti u dvou zařízení odlišného designu (European Hygienic Engineering and Design Group, 2007)

V současnosti stále zůstává testování prostředí výroby jako užitečný nástroj k ověření efektivnosti preventivních hygienických měřítek (Tompkin, 2004).



## 4 Závěr

Cílem v předložené bakalářské práci bylo vytvoření přehledné kvalitní literární rešerše, jež je zaměřena na vady sýrů a jejich možné příčiny vzniku. Tudíž bylo v této práci klíčové především posoudit mikrobiologickou kvalitu mléka a zjistit rizika kontaminace během technologického postupu výroby sýrů, aby tak poté mohla být navržena vhodná opatření, která by eliminovala možnosti kontaminace a vad sýrů.

Z předešlého mapování bylo zjištěno, že nejvíce jsou mikrobiální kontaminací a vadami ohroženy sýry s nízkodohřívanou sýřeninou a to z důvodu jejich neutrálního pH a vysoké vlhkosti v těchto sýrech což zajišťuje patogenům vhodné podmínky pro jejich růst a přežití.

Výzkumy poukazují na fakt, že jedním z nejproblematictějších defektů sýrů je vada označovaná jako duření, které může být buďto časně či pozdní a u sýrů způsobují tvorbu trhlinek, prasklin, ok a puklin, jejichž původci jsou bakterie rodu *Clostridium*, koliformní bakterie (*E. coli*). Navíc bylo zjištěno, že produkce plynů způsobujících tuto vadu, jsou schopny také rody *Lactococcus* a *Leuconostoc*. Při výrobě sýrů se tudíž proti této vadě osvědčilo používat dusičnanové soli ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ), které brání rozvoji plynů způsobující duření sýrů.

Mnohé studie uvádějí, že největší riziko pro bezpečnost sýrů jsou patogeny: *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Saphylococcus aureus* a enteropatogenní *Escherichia coli* jež se mohou v sýrech objevovat, pokud mléko nebylo dostatečně pasterizováno, došlo k postpasterační rekontaminaci, nebo nebyla použita kysací mléčná kultura. Z hlediska rizika kontaminace sýrů se ukázaly být nebezpečné také sporulující patogeny (např. *Bacillus cereus*, *Clostridium* spp.), které formují spory, jež přežijí pasteraci a proto je nutno provést další ošetření mléka jako je mikrofitrace či baktofugace.

Pro předcházení vad sýrů a jejich kontaminaci zdraví ohrožujícími patogeny se běžné metody ošetření mléka pro výrobu sýrů ukázaly být ne zcela efektivní a tudíž by měla nabývat na důležitosti především prevence, která nezahrnuje jen čištění a sanitaci výrobního prostředí a povrchů výroby, ale měl by být brán zřetel také na kontrolu mastitid, jež jsou spolehlivým indikátorem patogenů v mléce. Rovněž se ukázalo, že k eliminaci vad a kontaminací je důležité zajistit při výrobě nízké pH, nízkou vlhkost, vyšší obsah soli, použití vhodné aktivní kultury, nízké teploty zrání a skladování, delší dobu zrání. Tyto faktory jsou schopny omezit rozvoj mikroflóry způsobující problémy při výrobě sýrů. Současné studie také prokázaly velký potenciál hygienického designu, který se může výrazně podílet na zlepšené hygieně výrobního prostředí z důvodu efektivnějšího čištění a sanitace. Podniky by tedy měly zvážit a využívat výše uvedené možnosti minimalizace vad a kontaminace sýrů nejen z důvodu ekonomických ztrát, ale především pro veřejné zdraví konzumentů jejich výrobků.

## 5 Seznam použité literatury:

- Abbas, A., Dobson, A.D.W. 2011. Yeasts and Molds | *Penicillium camemberti*. Encyclopedia of Dairy Sciences. Elsevier. P. 776. ISBN: 9780123744074.
- Akineden, O., Hassan, A. A., Schneider, E., Usleber E. 2008. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats milk cheese. International Journal of Food Microbiology. 124. 211–216.
- Aleksieva, V. 1980. Enterococcal and coliform content in white brine cheese. Veterinarno-medicenski nauki. 17 (2). 85-91.
- Alomar, J., Loubiere, P., Delbes, C., Nouaille, S., Montel, M.C. 2008. Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. Food Microbiology. 25 (3). 502-508.
- André, M.C.D.P.B., Campos, M.R.H., Borges, L.J., Kipnis, A., Pimenta, F.C., Serafini, A.I.B. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion. Food Control. 19. 200–207.
- Anfossi, L., Baggiani, C., Giovannoli, C., Giraudi, G. 2010. Mycotoxins in food and feed: extraction, analysis and emerging technologies for rapid and on-field detection. Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture. 2. 140–153.
- Araújo, V. S., Pahliares, V.A., Queiroz, M.L.P, Freitas-Almeida, A.C. 2002. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Journal of Applied Microbiology. 92 (6). 1172-1177.
- Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H., Kozaki, S. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan. Estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. Epidemiology and Infection. 130. 33–40.
- Babel, F. J., Hammer, B. W. 1939. Factors Affecting the Ripening of Swiss Type Cheese Made From Pasteurized Milk. Research Bulletin. 264. 204-252.
- Bemrah, N., Sanaa, M., Cassin, M.H., Griffiths, M.W., Cerf, O. 1998. Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. Preventative Veterinary Medicine. 37. 29–145.
- Bennet, J. W., Klich, M. 2003. Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews: 16. 497–516.
- Bergonier, D. De Cremoux, R., Rupp, R., Lagriffoul, G., Berthelot X. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. Veterinary Research. 34. 689–716.

- Binder, E.M. 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*. 133. 149–166.
- Blackburn, C. W. 2006. Food spoilage microorganisms. CRC Press, Boca Raton. 401-413.
- Boulangue-Petermann, L. 1996. Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability. A review with special reference to the food industry. *Biofouling*. 10. 275–300.
- Bradshaw, J.G., Peeler, J.T., Corwin, J.J., Hunt, J.M., Tierney, J.T., Larkin, E.P. 1985. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk. *Journal of Food Protection*. 48. 743–745.
- Brito, J.R.F., Santos, E.M.P., Arcuri, E.F., Lange, C.C., Brito, M.A.V.P., Souza, G.N. 2008. Retail survey of Brazilian milk and Minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 74. 4954–4961.
- Bryers, J. D. 2000. *Biofilms II: process analysis and applications*. New York: Wiley. p. 440. ISBN: 0471296562.
- Callon, C., Gilbert, F.B., Cremoux, R.D., Monte, M.C. 2008. Application of variable number of tandem repeat analysis to determine the origin of *S. aureus* contamination from milk to cheese in goat cheese farms. *Food Control*. 19. 143–150.
- Carpentier, B., Cerf, O. 2011. Review — Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*. 145 (1). 1-8.
- Cirone, K.M., Morsella, C.G., Colombo, D., Paolicchi, F.A. 2006. Viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in elaborated goat and bovine milk cheese maturity. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 40. 507–513.
- Cocito, C., Gilot, P., Coene, M., De Kesel, M., Poupart, P., Vannuffel, P. 1994. Paratuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 7. 328–345.
- Cole, M., Jones, M., Holyoak, C., 1990. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*. 69. 63–72.
- Creepy E.E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*. 127. 19–28.
- Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M. Finlay, B.B. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 26 (4). 822–880.
- Carminati, D., Gatti, M., Bonvini, B., Neviani, E., Mucchetti, G. High pressure processing of gorgonzola cheese: Influence on *Listeria monocytogenes* inactivation and on sensory characteristics. *Journal of Food Protection* 67. 1671–1675.

- Cosentino, S., Mulargia, A.F., Pisano, B., Tuveri, P., Palmas, F. 1997. Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products. *International Journal of Food Microbiolog.* 38 (2-3). 235-238.
- D'Aoust, J.Y. 1989. Manufacture of dairy products from unpasteurized milk: A safety assessment. *Journal of Food Protection.* 52. 906–914.
- D'Aoust, J.Y., Emmons, D.B., McKellar, R., Timbers, G.E., Todd, E.C.D., Sewell, A.M. 1987. Thermal inactivation of *Salmonella* species in fluid milk. *Journal of Food Protection.* 50. 494–501.
- D'Amico, D.J., Druart, M.J., Donnelly, C.W. 2010. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and aging of Gouda and stirred curd cheddar cheeses manufactured from raw milk. *Journal of Food Protection.* 73. 2217–2224.
- De Reu, K., Debeuckelaere, W., Botteldoorn, N., De Block, J., Herman, L. 2002. Hygienic parameters, toxins and pathogen occurrence in raw milk cheeses. *Journal of Food Safety.* 22. 183-196.
- Delbès-Paus, C., Miszczycha, S., Ganet, S., Helinck, S., Veisseire, P., Pochet, S., Thévenot, D., Montel, M.C. 2013. Behavior of *Escherichia coli* O26:H11 in the presence of *Hafnia alvei* in a model cheese ecosystem. *International Journal of Food Microbiology.* 160. 212–218.
- Desmaures, N., Bazin, F., Guegen, M. 1997. Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *Journal of Applied Microbiology.* 83. 311-316.
- Donnelly, C. W. 2001 Factors associated with hygienic control and quality of cheeses prepared from raw milk: a review. *Bull. International Dairy Federation.* 369. 16-27.
- Donnelly, C. W. 2005. The pasteuration dilemma, in american Farmstead cheese. Chelsea Green publishing. White river Jct. 173-195.
- Doyle, M.P., Glass, K.A., Beery, J.T., Garcia, G.A., Pollard, D.J, Schultz, R.D. 1987. Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. *Applied and Environmental Microbiology.* 53. 1433–1438.
- Edmond E Creppy. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters.* Volume 127. Issues 1–3. 28. 19-28.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2012. Technical specifications for the analysis and reporting of data on antimicrobial resistance in the European Union Summary Report. *EFSA Journal,* 10 (2). 53.

- El-Gazzar, F.E., Marth, E.H. 1991. *Listeria monocytogenes* and listeriosis related to milk, milk products and dairy ingredients: A review II. *Listeria monocytogenes* and dairy technology. *Milchwissenschaft*. 46. 82–86.
- El-Ziney, M.G., Debevere, J.M. 1998. The effect of reuterin on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk and cottage cheese. *Journal of Food Protection*. 61. 1275–1280.
- European Hygienic Engineering and Design Group (EHEDG). 2007. A method for assessing the in-place cleanability of food-processing equipment. *Trends in Food Science and Technology*. 18. 52–63.
- Farber, J.M., Sanders, G.W., Speirs, J.I., D'Aoust, J.Y., Emmons, D.B., R. McKellar, R. 1988. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in inoculated and naturally contaminated raw milk. *International Journal of Food Microbiology*. 7. 277–286
- Finoli, C., Vecchio, A., Franzetti, L. 1999. Production of cyclopiazonic acid by molds isolated from Taleggio cheese. *Journal of Food Protection*. 62. 198-1202.
- Flasarová, R., Pachlová, V., Buňková, L., Menšíková, A., Georgová, N., Dráb, V., Buňka, F. 2016. Biogenic amine production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains in the model system of Dutch-type cheese. *Food Chemistry*. 194. 68-75.
- Flores-Flores, M.E., Lizarraga, E., López de Cerain, A., González-Peñas, E. 2015. Presence of mycotoxins in animal milk: a review. *Food Control*. 53. 163–176.
- Fox, P.F., McSweeney P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. Cheese: chemistry, physics, and microbiology. 3rd ed. London. Elsevier. 2004. p. 617. ISBN: 012263652X.
- Fox, P.F. 1999. Cheese: Chemistry, physics and mikrobiology: Volume 2 Major Cheese Groups. Aspen Publications, Inc. Gaithersburg. Maryland. USA p. 577. ISBN: 978-1-4613-6137-4.
- Frisvad, J.C., Thrane, U., Samson, R.A., Pitt, J.I. 2006. Important mycotoxins and the fungi which produce them. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 571. 3-31.
- Gay, M., Cerf, O. 1997. Significance of temperature and preincubation temperature on survival of *Listeria monocytogenes* at pH 4.8. *Letters in Applied Microbiology* 25. 257–260.
- Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Cogan, T.M., Condos, S., Swings, J. 2002. Source of enterococci in farmhouse raw-milk cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. 68. 3560-3565.
- Grattepanche, F., Miescher-Schwenninger, S., Meile, L., Lacroix, C. 2008. Recent developments in cheese cultures with protective and probiotic functionalities. *Dairy Science and Technology*. 88. 421–444.
- Guinebretiere, M.H., Girardin, H., Dargaignaratz, C., Carlin, F., Nguyen-The, C. 2003. Contamination flows of *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked,

- pasteurized and chilled zucchini pure'e processing line. *International Journal of Food Microbiology*. 82. 223–232.
- Hauerlandová, I., Lorencová E., Buňka, F., Navrátil, J., Janečková, K., Buňková, L. 2014 The influence of fat and monoacylglycerols on growth of spore-forming bacteria in processed cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 182-183.
- Hinz, P.C., Slatter, W.L., Harper, W.J. 1956. A survey of variol free amino acid and fatty acids in domestic Swiss cheese. *Journal of Dairy Science*. 39. 235-244.
- Hocking, A.D., Faedo, M. 1992. Fungi causing thread mould spoilage of vacuum packed Cheddar during maturation. *International Journal of Food Microbiology*. 16, 123-130.
- Hunt, K., Butler, F., and Jordan, K. 2014. Factors affecting Staphylococcal Enterotoxin C bovine production in milk. *International Dairy Journal*. 39. 41-46.
- Chaves-Lopez, C., Lanciotti, R., Serio, A., Paparella, A., Guerzoni, E., Suzzi, G. 2009. Effect of high pressure homogenization applied individually or in combination with other mild physical or chemical stresses on *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* spore viability. *Food Control*. 20. 691–695.
- Jablonski, L.M., Bohach, G., 1997. *Staphylococcus aureus*. ASM Press. Washington DC. USA. 353–357.
- Jacquet, C.H., Rocourt, J., Reynaud, A. 1993. Study of *Listeria monocytogenes* contamination in dairy plant and characterization of the strains isolated. *International Journal of Food Microbiology*. 20. 13–22.
- Jenness, R. 1974. The composition of milk. In: Lactation. Larson, B. L., Smith, V. R. Academic Press. New York. Vol. 111. 3-107.
- Johnson, E.A., Nelson, J.H, Johnson, M. 1990. Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk. Part 1. Executive Summary. introduction and history. *Journal of Food Protection*. 53. 441-452.
- Jørgensen, H.J., Mørk, T., Høgåsen, H.R., Rørvik, L.M. 2005. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. *Journal of Applied Microbiology*. 99. 158–166.
- Kamkar, A. 2008. The study of aflatoxin M1 in UHT milk samples by ELISA. *Journal of Veterinary Research*. 63. 2008. 7–12.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2 (2). 123–140.
- Kells, J., Gilmour, A. 2004. Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation. *International Journal of Food Microbiology*. 91. 167–174.

- Klausner, R.B., Donnelly, C.W. 1991. Environmental sources of *Listeria* and *Yersinia* in Vermont dairy plant. *Journal of Food Protection*. 54. 607–611.
- Klijn, N., Herman, L., Langeveld, L., Vaerewijck, M., Wagendorp, A.A., Huemer, I., Weerkamp, A.H. 1997. Genotypical and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans* strains, surviving UHT sterilisation. *International Dairy Journal*. 7. 421–428.
- Klijn, N., Nieuwenhof, F. J. F., Hoolwerf, J. D., Van Der Waals, C. B., Weerkamp, A. H. 1995. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the Causative Agent of Late Blowing in Cheese by Species-Specific PCR Amplification. *Applied and environmental mikrobiology*. 61 (8). 2919–2924 .
- Krysinski, E.P., Brown, L.J., Marchisello, T.J. 1992. Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. *Journal of Food Protection*. 55. 246–251.
- Hasonova, L., Pavlik, I. 2006. Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: A review. *Veterinarni Medicina*. 51. 193–211.
- Huppertz, T., Upadhyay, V.K., Kelly, A.L., Tamime, A.Y. 2006. Constituents and properties of milk from different species, in *Brined Cheeses*, A.Y. Tamime (ed.). Blackwell Publishing. 1-42.
- Lazárková, Z., Buňka, F., Buňková, L., Holáň, F., Kráčmar, S., Hrabě, J. 2011. Effect of different heat sterilization regimes on the quality of canned processed cheese. *Journal of Food Process Engineering*. 34. 1860-1878.
- Le Bars, J., Le Bars, P. 1979. Cyclopiazonic acid bioproduction by *Penicillium camemberti* the effect of temperature on individual strains. *Annales de Recherches Vétérinaires*. 601-602.
- Le Loi, Y., Baron, F., Gautier, M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*. 2 (1). 63–76.
- Le Marc, Y., Valík, L., Medvedová, A. 2009. Modelling the effect of the starter culture on the growth of *Staphylococcus aureus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*. 129. 306–311.
- Loncarevic, S., Jørgensen, H. J., Løvseth, A., Mathisen, T., Rørvik, L. M. 2005. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. *Journal of Applied Microbiology*. 98. 344-350.
- Lund, D.E., Filtenborg, O., Frisvad, J.C. 1995. Associated microflora of cheese. *Food Microbiology*. 12. 173-180.
- Lyon, W.J., Olson, D.G. 1997. Isolation and purification of colicin ECL 12, a bacteriocin that inhibits strains of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*. 60. 1520–1528.

- Majowicz, SE., Musto, J., Scallan, E., 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Disease*. Vol. 50. No. 6. 882-889.
- Maria Kousta, Marios Mataragas, Panagiotis Skandamis, Eleftherios H. Drosinos. 2010. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*. Volume 21. Issue 6. 805-815.
- Marino, M., Maifreni, Moret, S., Rondinini, G. 2000. The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. *Letters in Applied Microbiology*. 31. 169-173.
- McSweeney, P.L.H. 2007. *Cheese problems solved*. 1. publ. Cambridge: Woodhead publ. ISBN: 9781845690601.
- Melilli, C., Barbamo, D.M., Caccamo, M., Calvo, M.A., Schembari, G., Licitra, G. 2004. Influence of brine concentration, brine temperature, and presalting on early gas defects in raw milk pasta filata cheese. *Journal of Dairy Science*. 87. 3648-3657.
- Menendez, S., Godinez, M.R., Rodriguez-Otero, J.L., Centeno, J.A. 1997. Removal of *Listeria* spp. In a cheese factory. *Journal of Food Safety*. 17. 133-139.
- Menendez, S., Godinez, M.R., Rodriguez-Otero, J.L., Centeno, J.A. 1997. Removal of *Listeria* spp. In a cheese factory. *Journal of Food Safety*. 17. 133-139.
- Meyer, B., 2003. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 51. 249-253.
- Modi, R., Hirvi, Y., Hill, A., Griffiths, M.W. 2001. Effect of phage on survival of *Salmonella* enteritidis during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *Journal of Food Protection*. 64. 927-933.
- Molva, C., Sudagian, M., Okuklu B. 2009. Extracellular enzyme production and enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains isolated from cheese in Turkey. *Food Control*. 20. 829-834.
- Monday, S. R., Bohach, G. A. 1999. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 37. 3411-3414.
- Moradi-Khatoonabadi Zhila, Ezzatpanah Hamid, Maghsoudlou Yahya, Khomeiri Morteza, Aminafshar Mehdi. 2014. Tracking *Bacillus cereus* in UF-feta cheese processing line. *International Dairy Journal*. Volume 39. Issue 1. November 2014. 47-52.
- Møretrø, T., Langsrud, S. 2004. *Listeria monocytogenes*: Biofilm formation and persistence in food processing environments. *Biofilms*. 1. 107-121.
- Morgan, F., Bonnin, V., Mallereau, M.P., Perrin, G. 2001. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. *International Journal of Food Microbiology*. 64. 217-221.



- Mullan W. M. A. 2000. Causes and control of early gas production in cheddar cheese. *International Journal of Dairy Technology*. 53. 63–68.
- Murdock, C.A., Cleveland, J., Matthews, K.R., Chikindas, M.L. 2006. The synergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*. 44. 255–261.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11 (1). 142–201.
- Nickerson, S.C. 2002. In: Contagious pathogens. H. Roginski, J.W. Fuquay, P.F. Fox (Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences*, Academic Press, London, UK (2002), pp. 1723–1728.
- Nouaille, S., Rault, L., Jeanson, S., Loubiere, P., Le Loir, Y., Even, S. 2014. Contribution of *Lactococcus lactis* reducing properties to the downregulation of a major virulence regulator in *Staphylococcus aureus*, the agr system. *Applied and Environmental Microbiology*. 80. 7028–7035.
- Oliver, S.P., Jayarao, B.M., Almeida, R.A. 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2. 115–129.
- Panariti, E. 2001. Seasonal variations of Aflatoxin M<sub>1</sub> in the farm milk of Albania. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 52. 37-41.
- Pellisser, M. R., Klein, C. S., Ascoli, K. R., Zotti, T. R., Arisil, A. C. M. 2009. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40. 145-148.
- Perchat, S., Buisson, C., Chaufaux, J., Sanchis, V., Lereclus, D., Gohar, M. 2005. *Bacillus cereus* produces several nonproteinaceous insecticidal exotoxin. *Journal of Invertebrate Pathology*. 90. 131–133.
- Pitt, W.M., Harden, T.J. and Hull, R.R. 2000. Investigation of the antimicrobial activities of the raw milk against several foodborne pathogens. *Milchswissenschaft*. 55. 249-252.
- Pritchard, T.G., Flanders, K.J., Donnelly, C.W. 1995. Comparison of the incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. *International Journal of Food Microbiology*. 26. 375–384.
- Pritchard, T.J. 2005. Ensuring safety and quality I: Hazard analysis and critical control points and the cheesemaking process. Chelsea Green Publishing, White River Jct., VT. 139-151.
- Ratnam, S., March, S.B., Buttler, R.W. 1984. A major outbreak of salmonellosis in Newfoundland traced to contaminated cheese: Laboratory Aspects. Abstract. Conjoint Meeting on Infectious Diseases PE. 13. p. 126.

- Reij, M.W., Den Aantrekker, E.D. 2004. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*. 91. 1–11.
- Roig Sagues, A.X., Henandez Herrero, M. M., Rodriguez Jerez, J.J., Quinto Fernandez, E.J., Mora Ventura, M. 1998. Biogenic amines in cheese: toxicological risk and factors influencing their formation. *Alimentaria* 294. 59-66.
- Ryser, E. T. and Marth, E.H. (1987b). Behavior of *listeria monocytogenes* during the manufaktur and ripening of cheddar cheese. *Journal of Food Protection* 50. 7-13.
- Ryser, E. T., Marth, E.H. (1987a). Fate of *L. monocytogenes* during manufacture and ripening of camembert cheese. *Journal of Food Protection*. 50. 372-378.
- Sanaa, M., Audurier, A., Poutrel, B., Menard, J.L., Serieys, F. 1996. Origin of bovine milk contamination by *Listeria monocytogenes*. *International Dairy Federation*. 25. 136–137.
- Sanaa, M., Poutrel, B., Menard, J.L., Serieys, F. 1993. Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. *Journal of Dairy Science*. 76. 2891–2898.
- Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., 2002. Effect of *enterococcus decim* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 76. 93-105.
- Sheehan, J. J., Wilkinson, M. G., McSweeney, P. L. H. 2008. Influence of processing and ripening parameters on starter, non-starter and propionic acid bacteria and on the ripening characteristics of semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*. 18. 905–917.
- Sheehan, J.J. 2011 Cheese: Avoidance of Gas Blowing. *Encyclopedia of Dairy Sciences Elsevier*. 2011. p. 661. ISBN: 9780123744074.
- Sheehan, J.J. 2013. Milk quality and cheese diversification. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. 52. 243–253.
- Schlesser, J.E., Gerdes, R., Ravishankar, S., Madsen, K., Mowbray, J. and Teo, A.Y.I. 2006. Survival of five-strain cocktail of *Escherichia coli* 0157:H7 during the 60-day aging period of cheddar cheese made from unpasteurised milk. *Journal of Food Protection*. 69. 990-998.
- Schmid-Hempel, P., Frank, S.A. 2007. Pathogenesis, virulence, and infective dose. *PLoS Pathogens*. 3 (10). 1372-1373.
- Slana, I., Paolicchi, F., Janstova, B., Navratilova, P., Pavlik, I. 2008. Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products. A review. *Veterinari Medicina*. 53. 283–306.
- Spahr, U., Schafroth, K. 2001. Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in swiss hard and semihard cheese manufactured from raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 67. 4199–4205.

- Still, P., Eckardt, C., Leistner, L. 1978. Bildung von Cyclopaconsäure durch *Penicillium camemberti*-isolate von Käse. *Fleischwirtschaft*. 58. 876-878.
- Su, Y.C., Ingham, S.C. 2000. Influence of milk centrifugation, brining and ripening condition in preventing gas formation by *Clostridium* spp. In Gouda cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 54. 147-154.
- Sung, N., Collins, M.T. 2000. Effect of three factors in cheese production (pH, salt, and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. *Applied and Environmental Microbiology*. 66. 1334–1339.
- Svensson, B., Ekelund, K., Ogura, H., Christiansson, A. 2004. Characterisation of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. *International Dairy Journal* 14. 17–27.
- Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Rosenberger, A.E. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cow. *Journal of Clinical Microbiology*. 30. 166–171.
- Te Giffel, M.C. 2003. Good hygienic practice in milk processing. *Dairy Processing*. Elsevier. 60-68.
- Temelli, S., Anar, S., Sen, C., Akyuva, P. 2006. Determination of microbiological contamination sources during Turkish white cheese production. *Food Control* 17. 856–861.
- Tompkin, R.B. 2004. Environmental sampling – A tool to verify the effectiveness of preventative hygiene measures. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*. 95. 45–51.
- Tompkin, R.B., Scott, V.N., Bernard, D. T., Sveum, W.H., Gombas, K.S. 1999. Guidelines to prevent post-processing contamination from *Listeria monocytogenes*. *Dairy, food, and environmental sanitation*. 19. 551-562.
- Tondo, E.C., Guimaraes, M.C., Henriques, J.A., Ayub, M.A. 2000. Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. *Canadian Journal of Microbiology*. 46. 1108–1114.
- Unnerstad, H., Bannerman, E., Bille, J., Danielsson-Tham, M. L., Waak, E., & Tham, W. 1996. Prolonged contamination of a dairy with *Listeria monocytogenes*. *Netherlands Milk Dairy Journal*. 50. 493-499.
- Van Kessel, J.S., Karns, J.S., Gorski, L., McCluskey, B.J., Perdue, M.L. 2004. Prevalence of *Salmonellae*, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies. *Journal of Dairy Science*. 87. 2822–2830.

- Vautor, E., Abadie, G., Guibert, J.M., Huard, C., Pepin, M. 2003. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*. 96. 69–79.
- Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Moradi Clinical Microbiological Reviews*. 14. 584–640.
- Vernozy-Rozand, C., Meyrand, A., Mazuy, C., Delignette-Muller, M.L., Jaubert, G., Perrin, G. 1998. Behavior and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goats milk lactic cheeses. *Journal of Dairy Research*. 65. 273–281.
- Villani, F., Pepe, O., Moschetti, G., Sannino, G. L., Coppola, S. 1996. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the traditional manufacture of water-buffalo mozzarella cheese. *Letters in Applied Microbiology* 22. 357–360.
- Yohan Yoon, Soomin Lee, Kyoung-Hee Choi. 2016. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control*. Volume 63. 201-215.