

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

METABOLICKÁ AKTIVITA MEZOFILNÍCH ZÁKYSŮ PŘI VÝROBĚ SÝRŮ
S BÍLOU PLÍSNÍ

DIPLOMOVÁ PRÁCE
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

JANA ŠTĚPNIČKOVÁ

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

METABOLICKÁ AKTIVITA MEZOFILNÍCH ZÁKYSŮ PŘI VÝROBĚ SÝRŮ S BÍLOU PLÍSNÍ

METABOLIC ACTIVITY OF MEZOPHILIC MILK SOURING IN PRODUCTION OF CHEESES
WITH WHITE FUNGUS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

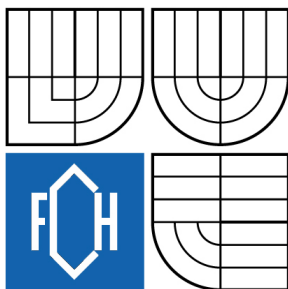
JANA ŠTĚPNIČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. LIBOR BABÁK, Ph.D.

BRNO 2008



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce	FCH-DIP0183/2007	Akademický rok: 2007/2008
Ústav	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka)	Štěpničková Jana	
Studijní program	Chemie a technologie potravin (M2901)	
Studijní obor	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí diplomové práce	Ing. Libor Babák, Ph.D.	
Konzultanti diplomové práce		

Název diplomové práce:

Metabolická aktivita mezofilních zákysů při výrobě sýrů s bílou plísní

Zadání diplomové práce:

- 1) stanovit kysací křivky používaných mléčných bakterií (příprava zákysu)
- 2) popis kysací aktivity fermentů ve výrobním procesu
- 3) ověření správnosti používané metody pro stanovení životaschopnosti fermentů
- 4) určit možné příčiny postacidifikace a navrhnout nápravné opatření

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Jana Štěpničková
student(ka)

Ing. Libor Babák, Ph.D.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce byla prováděna ve společnosti Pribina s.r.o. a byla zaměřena na sýry s bílou plísní na povrchu. Práce se zabývala sledováním průběhu kysacích křivek u používaných zákysů a to na základě měření teploty, titrační kyselosti a pH v určitých časových intervalech. Kysací křivka byla vyhodnocena jako nepřímé stanovení změny kyselosti zákysu za jednotku času. Dále byla měřena aktivita jednotlivých zákysů a to na základě měření změny pH za jednotku času. Byl sledován vliv kultivačních podmínek na změny chování bakteriálních kultur, kdy sledované zákysy byly složeny z mezofilních a termofilních bakteriálních kmenů.

ABSTRACT

The thesis was processed in cooperation with Pribina s.r.o. The aim of the thesis was the monitoring of the starters of cheeses with the white fungus on the surface. The thesis was engaged in the monitoring process of a souring curve of used starters. This monitoring was based on temperature, titrating acidity and pH measured in the time interval. The souring curve was evaluated as the indirect measurement change of acidity of the starter in the time period. Further, the activity of detached starters was measured. The measurement was based on the change of pH measured in the time period. The influence of the culture medium was monitored by changes in behaviour of the bacterial cultures. The monitored starters were compounded of mesophilic and termophilic bacterial strains.

KLÍČOVÁ SLOVA- zákys, kysací křivka, aktivita
KEYWORDS- starter, souring curve, activity

ŠTĚPNIČKOVÁ, J. Metabolická aktivita mezofilních zákysů při výrobě sýrů s bílou plísní. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 62 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Libor Babák, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že diplomová práce byla vypracována samostatně a že všechny použité literární zdroje jsou správně a úplně citovány. Tato práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis diplomanta

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala Ing. Šárce Bezděkové za odbornou pomoc, vedení diplomové práce a připomínky při řešení práce. Tím bych chtěla poděkovat i společnosti Pribina s.r.o., Hesov, oddělení vývoje a výzkumu a vedení sýrárny, kde jsem práci vykonávala a všem, kteří se jakýmkoliv způsobem přičinili na vzniku této diplomové práce.

OBSAH

1. ÚVOD.....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Obecná charakteristika plísňových sýrů.....	8
2.2 Vlastnosti mléka.....	8
2.2.1 Složení mléka.....	8
2.2.1.1 Bílkoviny.....	8
2.2.1.2 Lipidy.....	10
2.2.1.3 Sacharidy.....	10
2.2.1.4 Minerální látky.....	11
2.2.1.5 Biokatalyzátory.....	11
2.2.1.6 Plyny v mléce.....	13
2.2.2 Biochemické změny základních součástí mléka způsobené mikroorganismy.....	13
2.2.2.1 Rozklad laktózy.....	14
2.2.2.2 Rozklad mléčného tuku a látek tuku podobných.....	18
2.2.2.3 Rozklad bílkovinných látek.....	18
2.2.3 Požadavky na mléko pro výrobu sýrů.....	18
2.3 Rozdělení sýrů.....	19
2.3.1 Měkké sýry.....	19
2.3.1.1 Měkké sýry nezrající.....	19
2.3.1.1.1 Tvarohové sýry.....	19
2.3.1.1.2 Sýry s obsahem 55-65 % tuku v sušině.....	19
2.3.1.1.3 Nezrající sýry s pařeným těstem.....	19
2.3.1.1.4 Bílé sýry v solném nálevu.....	19
2.3.1.2 Měkké sýry zrající.....	20
2.3.1.2.1 Měkké sýry zrající pod mazem.....	20
2.3.1.2.2 Sýry zrající pod plísní.....	20
2.3.1.2.3 Sýry zrající s plísní ve hmotě.....	20
2.3.2 Tvrdé sýry.....	20
2.3.2.1 Sýry s nízkodohřívanou sýřeninou.....	21
2.3.2.1.1 Sýry eidamského typu.....	21
2.3.2.1.2 Sýry typu Čedar.....	21
2.3.2.2 Sýry s vysokodohřívanou sýřeninou.....	21
2.3.2.2.1 Sýry ementálského typu.....	21
2.3.2.2.2 Sýry typu moravského bochníku.....	21
2.4 Technologie výroby sýrů s bílou plísní na povrchu.....	21
2.4.1 Svoz mléka.....	21
2.4.2 Příjem, třídění a čištění mléka.....	21
2.4.3 Tepelné ošetření mléka.....	22
2.4.4 Standardizace mléka.....	22
2.4.5 Vlastní výroba sýrů.....	22
2.4.6 Sýření.....	23
2.4.7 Krájení sýřeniny.....	24
2.4.8 Formování a odkap sýrů.....	24
2.4.9 Solení sýrů.....	24

2.4.10	Zrání sýrů.....	25
2.4.11	Balení a expedice sýrů.....	25
2.5	Růstová křivka bakterií.....	26
2.6	Struktura mikrobiálních buněk mléčného kvašení.....	27
2.7	Význam a funkce mléčných bakterií.....	28
2.8	Používané kultury u sýrů s bílou plísní.....	29
2.9	Izolace mlékařských kultur.....	31
2.10	Způsoby přidávání a dávky zákysů.....	32
2.11	Příprava, vedení a formy bakteriálních kultur.....	32
2.12	Vady mlékařských kultur.....	33
2.13	Stanovení kyselosti mléka.....	34
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	36
3.1	Složení bakteriálních kultur.....	36
3.2	Metody použité pro stanovení metabolické aktivity zákysů.....	36
3.3	Sledování kysací aktivity zákysů ve výrobním procesu.....	37
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	38
4.1	Kysací křivky používaných mléčných bakterií.....	38
4.2	Porovnání čerstvého zákysu a po 30-ti hodinách skladování.....	42
4.3	Změny zákysu po 10-ti hod. skladování.....	46
4.4	Metabolická aktivita čerstvého zákysu.....	49
4.5	Metabolická aktivita mezofilního zákysu.....	50
4.6	Metabolická aktivita termofilního zákysu.....	52
4.7	Metabolická aktivita zákysů během výroby.....	53
5.	ZÁVĚR.....	57
6.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	59
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	62

1. ÚVOD

Plísňové sýry jsou mléčné výrobky, které patří mezi velmi oblíbené produkty jak u nás tak i v zahraničí. Mezi nejznámější sýry s bílou plísní na povrchu se řadí sýr Hermelín. Tento sýr je svými vlastnostmi podobný francouzskému sýru Camembert.

Ve zrajících sýrech se nachází velké množství chemických sloučenin, které vytvářejí typickou výraznou a nezaměnitelnou chuť a aroma.

Tyto vlastnosti jsou způsobené přítomnými mléčnými bakteriemi, které fermentují laktosu na kyselinu mléčnou. Jejich vyvážený poměr a metabolická aktivita zajišťuje charakteristické vlastnosti sýra.

Mléčné bakterie jsou do mléka přidávány ve formě zákysů, u kterých se zjišťuje jejich kysací křivka a metabolická aktivita. Tyto vlastnosti jsou sledovány u třech používaných směsných mezofilních kultur a jedné termofilní monokultury. Sleduje se fermentace laktosy v mléce a vznik zákysů, u kterých se provádí v časových intervalech test aktivity zákysů a sleduje se jejich chování během výrobního procesu.

Cílem práce tedy je sledovat kysací křivky používaných mléčných bakterií, které vytvářejí zákys pro výrobu sýrů s bílou plísní na povrchu. Dále je sledována kysací aktivita fermentů ve výrobním procesu a její závislost na podmínkách během skladování a použití. Sleduje se správná životaschopnost fermentů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Obecná charakteristika plísňových sýrů

Sýr je jeden z nejnámějších výrobků mlékárenského průmyslu. Podle standardu FAO/WHO z roku 1963 se sýrem rozumí čerstvý nebo prozrálý výrobek vyrobený odvodněním syrovátky, smetany, odtučněného, částečně odtučněného mléka, nebo směsi některých příp. všech těchto surovin[18].

2.2 Vlastnosti mléka

Jedním z důvodů, proč se mléko začalo zpracovávat na sýry, je jejich delší trvanlivost. Prodloužení trvanlivosti je založeno na fermentaci laktosy především na kyselinu mléčnou, snížení vodní aktivity a pH, přispívá též nízký redox potenciál a přídavek soli. Další výhodou zpracování mléka na sýry je to, že jsou v nich koncentrovány nutričně nejcennější složky mléka[19].

Mléko je u člověka a u savců v prvním období života jedinou potravou. Má bílou nebo mírně nažloutlou barvu a nasládlou, čistě mléčnou chuť.

Obsahuje v dostatečném množství a optimálně vyváženém poměru všechny výživné a esenciální látky, který mladý organismus potřebuje pro stavbu a výživu těla.

Z nutričního hlediska jsou nejdůležitější mléčné bílkoviny. Kravské mléko jich obsahuje 3-3,5 %. Obsah tuku se obvykle upravuje na 3,5 %. Na příjmu sacharidů se mléko a mléčné výrobky podílí pouze 5-6 %. Energetický podíl laktózy činí asi 30 %. Mléko obsahuje důležité minerální látky a vitaminy. Majoritní zastoupení minerálních látek tvoří vápník, fosfor, draslík, hořčík, síra, sodík a chlor, a minoritní zastoupení železo, měď, kobalt, mangan, jod, zinek a fluor. Přítomné vitaminy jsou vitamin A, B₂ – riboflavin a malé množství vitaminu C.

Jakost mléka je závislá na chemickém složení mléka, které se mění působením celé řady faktorů např. krmení, plemena, zdravotní stav a individuální vlastnosti dojníc. Se složením krmiva dojníc souvisí i sezónní změny ve složení a vlastnostech mléka. Během roku se mění obsah a složení mléčného tuku a tyto změny se mohou projevit i ve složení sýrů[1].

2.2.1 Složení mléka

2.2.1.1 Bílkoviny

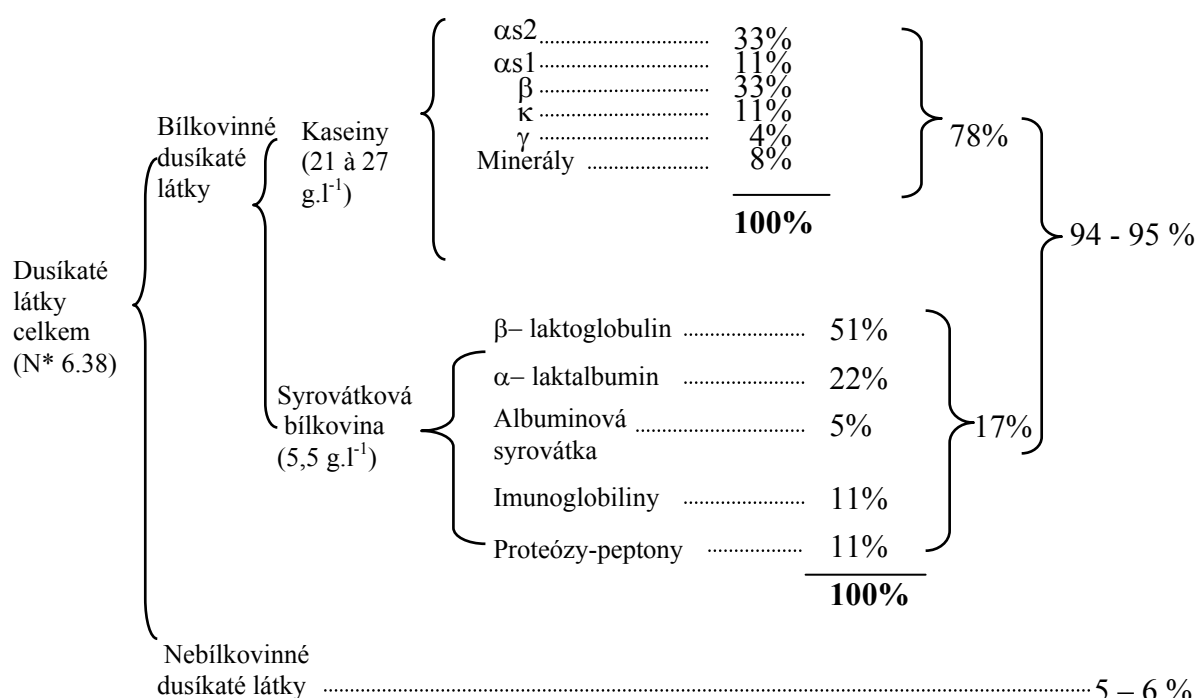
Bílkoviny jsou složité organické dusíkaté látky, které se skládají z aminokyselin spojených do dlouhých řetězců pomocí peptidové vazby a mají vysokou molekulovou hmotnost. Dusíkaté látky mléka tvoří nejkomplexnější složku mléka. Některé z nich mají kromě nutriční hodnoty vysoce významnou biologickou hodnotu (imunoglobuliny, enzymy apod.).

Mezi nejvýznamnější bílkoviny patří kaseinové a syrovátkové bílkoviny. Kasein zahrnuje asi 30 různých frakcí fosfoproteinů, které tvoří hlavní složku disperzní fáze mléka. Jednotlivé frakce kaseinu spolu vytváří komplexy a tyto komplexy jsou uspořádány do micel.

α -kasein se v mléce nachází jako α_{S1} a α_{S2} a sráží se roztokem CaCl_2 . α -kasein existuje ve 4 genetických variantách – A, B, C, D a tvoří největší podíl z frakcí kaseinu. β -kasein se vyskytuje v osmi genetických variantách a je citlivý vůči vysrážení vápníkem při teplotě 35 °C. Jen malou část z bílkovin mléka tvoří γ -kasein, který vzniká rozkladem β -kaseinu pomocí proteolytických enzymů. Významnou úlohu při stavbě kaseinových micel má κ -kasein, který může vázat jednotlivé frakce kaseinů do trojrozměrné sítě. Je také jedinou frakcí,

kteřá obsahuje sirmé aminokyseliny cystein a methionin. Byly zjištěny dvě genetické varianty A a B.

Druhou frakci dusíkatých látek v mléce jsou syrovátkové bílkoviny, které zůstávají v mléčném séru po vysrážení kaseinu. Tyto bílkoviny mají vyšší nutriční hodnotu než frakce kaseinu pro svůj vysoký obsah cystinu. Mezi významné syrovátkové bílkoviny patří: sérum albumin, α -laktoglobulin, β -laktoglobulin, imunoglobuliny Ig G₁, G₂ a A a proteózo-peptony. Malý podíl z celkového množství dusíkatých látek vytvářejí nebílkovinné dusíkaté látky. Tyto látky zůstávají v roztocích po vysrážení bílkovin. Vedle volných aminokyselin se v mléce vyskytuje kyselina močová, kreatin, nukleotidy, kyselina orotová, vitaminy skupiny B, amoniak, sulfokyanid apod. Zastoupení uvedených látek v mléce od zdravých dojnic je stálé, ve fyziologicky abnormálních druzích mlék však dochází ke kolísání [1]



Obr 2.1: Složení dusíkatých látek v mléce(20)

Nejvýznamnějším faktorem, který ovlivňuje množství a složení bílkovin mléka je laktace, kdy v jejím průběhu byly zaznamenány negativní vlivy na produkci mléka a obsah bílkovin. Zdravotní stav dojnic je dalším výrazným faktorem. I lehká onemocnění mají negativní dopad a stejně tak i nervový stav dojnic. Většinou dochází ke snížení obsahu kaseinu a zvýšení obsahu sérových bílkovin, především imunoglobulinů. Také dochází ke změnám poměru vápníku a fosforu a tím i ke zhoršení syřitelnosti mléka. Jakost mléka je ovlivňována také plemenem dojnic. Rozdíly jsou nejen v celkovém obsahu bílkovin, ale i v některých frakci dané genetickými variantami. Tyto změny se projeví i při technologickém zpracování. Další faktory např. denní doba, počet a interval dojení se projevují velmi málo. Výraznější rozdíly jsou dány roční dobou a s tím související krmení, kdy maxima obsahu bílkovin bylo dosaženo v měsících červnu a červenci. Vliv říje je výrazný a projeví se zhoršením dojnosti [1].

2.2.1.2 Lipidy

Lipidy jsou jednoduché nebo složité estery mastných kyselin s alkoholy. Sloučeniny této skupiny jsou nerozpustné nebo velmi těžko rozpustné ve vodě i ve vodných prostředcích. Jsou však rozpustné v organických rozpouštědlech, chloroformu a benzenu. Mléčné lipidy mají velmi komplikované složení a strukturu. Základními složkami jsou tri-, di- a monoacylglyceroly, volné mastné kyseliny, fosfolipidy, steroly, estery sterolů, uhlovodíky a v tucích rozpustné vitaminy. Převážná většina lipidů se v mléce vyskytuje ve formě tukových kuliček o průměrné velikosti 0,7-2,9 μm . Malá část je vázána na kaseinových micelách a při kyselém srážení odchází spolu s kaseinem. Tukové kuličky nejsou v mléce volné, ale jsou obalené fosfolipidy a bílkovinami. Tyto membrány chrání tuk před splynutím do větších útvarů, proto při delším skladování nebo vnějším zásahu např. třepání, mrznutí apod. je pozorován tzv. volný tuk, u kterého byla porušena membrána. Tento tuk snadněji podléhá rozkladu.

Významnou skupinou mléčných lipidů tvoří fosfolipidy, které jsou převážně tvořeny z nenasycených mastných kyselin. Všechny fosfolipidy jsou vysoce polární a povrchově aktivní. Vázáním na povrch tukových kuliček zvyšují stabilizaci tukové emulze v polydisperzním systému mléka. Další součástí mléčných lipidů jsou steroly nebo jejich estery. Nejrozšířenější je cholesterol a v menší míře ergosterol, který je prekurzorem vitamínu D₂. Z doprovodných látek jsou důležité karotenoidy, které způsobují typické zabarvení mléka. Karotenoidy jsou žlutá nebo červená barviva rozpustná v tucích, která se chemicky řadí mezi terpeny.

Množství, složení a vlastnosti mléčného tuku ovlivňuje celá řada faktorů. Mezi nejvýraznější patří výživa dojníc a jejich zdravotní stav. Přísun bílkovin a energetických živin velmi ovlivňuje produkci mléka i obsah tuku. Při podvýživě se snižuje až o 15 %. Ale při překrmování se obsah tuku také výrazně nezvyšuje. Rozdíly jsou způsobeny nejen složením krmiva ale i ročním obdobím. Obsah tuku se zvyšuje v době zeleného krmení a naopak v zimních měsících klesá. Obsah tuku klesá i při narušení fyziologické rovnováhy dojnice.

Na množství produkovaného mléčného tuku má vliv i plemeno. Liší se nejen množstvím produkovaného tuku ale i velikostí tukových kuliček [1,5].

2.2.1.3 Sacharidy

Typickým zástupcem sacharidů v mléce je laktóza. Laktóza je disacharid, který se skládá ze dvou jednoduchých hexos: D-galaktózy a D-glukózy. Laktóza se vyskytuje jen v mléce a nebyla nalezena v žádných dalších tělních tekutinách a orgánech živočišného organismu. Její tvorba probíhá v mléčné žláze. Glukóza je dodávána z krevního řečiště a galaktóza je tvořena v mléčné žláze biochemickými procesy z glukózy.

Laktóza je opticky aktivní a může tvořit dva izomery, které se liší konfigurací na poloacetálovém uhlíku a nazývají se α -laktóza a β -laktóza. Její obsah v kravském mléce je 4-5 %. Při ohřevu na 130 °C začíná žloutnout a při dalším zvyšování teploty na 170 až 180 °C vzniká hnědý laktokaramel. Tento jev se nejvíce projevuje při sterilaci a sušení mléka. V mléce může toto hnědnutí probíhat už při teplotě 70 °C a je způsobené produkty tzv. Maillardových reakcí, tj. reakcemi redukcujících cukrů s aminokyselinami. Vznikají tzv. melanoidy, což jsou tmavohnědé dusíkaté a bezdusíkaté sloučeniny, které mléku udělují světle

nahnědlou až hnědou barvu. Laktóza slouží jako zdroj energie a v průběhu procesů v mléce se rozkládá na řadu produktů. Nejvýznamnější jsou kyseliny mléčná, propionová a octová a diacetyl. Nežádoucí je vznik kyseliny máselné.

Největší vliv na hladinu laktózy v mléce je druh savce. Vysoký obsah je typický pro kobyly a ženské mléko. Výživou se obsah laktózy příliš neovlivní, avšak velkým faktorem je zdravotní stav dojnic.

Mléčný cukr chutná šestkrát méně sladce než sacharosa. Snadno krystalizuje a ve studené vodě se nesnadno rozpouští.

Kromě laktózy byla v mléce zjištěna i malá koncentrace D-glukózy a D-galaktózy a malá množství sacharidů vázaných převážně v glykoproteinech, zejména aminocukry např. glukosamin a galaktosamin a jejich N-acetylované formy. Koncentrace těchto sacharidů je ale velmi nízká a jejich význam nebyl doposud zcela objasněn [1,5, 21].

2.2.1.4 Minerální látky

Minerální látky jsou v mléce přítomny v různé formě. Jednak jsou v mléčném séru v roztoku nebo koloidní formě a jednak jsou vázány na některé organické součásti mléka. Minerální látky jsou do mléka přenášeny z krve. Z nutričního hlediska ovlivňují nabobtnání koloidů, regulují osmotický tlak a koncentraci vodíkových iontů. Vystupují ve funkci aktivátorů enzymů nebo jejich složek a mají rozhodující význam pro udržení acidobazické rovnováhy v organismu. Kravské mléko je bohaté na obsah vápníku, draslíku, fosfátů a citrátů. Důležitý faktor ovlivňující hladinu minerálů je druh savce a stadium laktace. Na množství a vzájemný poměr minerálních látek má také vliv zdravotní stav dojnic. Při nemoci se snižuje jak obsah těchto látek, tak i poměr mezi jednotlivými solemi. Tím se zhoršují i technologické vlastnosti mléka např. zhoršená syřitelnost mléka. Oproti tomu je vliv výživy zanedbatelný.

Mléko také obsahuje značný počet stopových prvků. Nacházejí se v řadě organických sloučenin. Některé z nich jako Fe, Cu, Zn a Mg jsou vázány na membrány tukových kuliček. Z vlivů, působících na složení a množství solí v mléce je významný vliv savce a také stadium laktace. Vliv výživy nemá významný vliv na množství, ani složení základních solí mléka. I při silné podvýživě se nesnižují množství vápníku a fosforu v mléce, protože dojnice má možnost uvolňovat vápník i fosfor z kostry [1, 5, 21]

2.2.1.5 Biokatalyzátory

Látky řídicí a regulující funkce v živém organismu se souhrnně nazývají biokatalyzátory. Organismus si je nedokáže sám syntetizovat a musí být v dostatečné míře přijmuty v potravě. Vitaminy jsou exogenní esenciální katalyzátory. Některé jsou syntetizovány mikroorganismy a některé vznikají až v živočišných organismech z provitaminů. Významně se liší chemickou strukturou i funkcí v těle. Uplatňují se jako prekurzory kofaktorů enzymů nebo v oxidačně redukčních systémech. Zvlášť nepostradatelný je provitamin A (retinol), který je nezbytný pro vidění a antiinfekční vlastnosti. Prekurzorem jsou karoteny. Obsah provitaminu A značně souvisí s krmivem. Pro metabolismus vápníku a fosforu v těle jsou důležité vitaminy D (kalciferoly). Protože UV zářením vzniká z ergosterolu ergokalciferol (vitamin D₂) a z 7-dehydrocholesterolu cholekalciferol (vitamin D₃), souvisí jejich obsah s pobytem dojnic na slunci. Důležitým antioxidantem obsaženým v mléce je vitamin E (tokoferol). Vitamin K (naftochinony) je důležitý při tvorbě prothrombinu v procesu srážení krve. Ze skupiny

vitaminu B jsou důležité B₁ (thiamin), B₂ (riboflavin), B₆ (pyridoxin), B₁₂ (korinoidy) a kyselina listová. Jsou významné jako kofaktory řady enzymů. B₁₂ se navíc uplatňuje i v tvorbě červených krvinek a působí při syntéze nukleových kyselin, cukrů, tuků, proteinů a při detoxikační činnosti jater. Vitaminy skupiny B jsou také významné jako růstové faktory. Mezi součásti řady koenzymů patří kyselina pantotenová, kyselina nikotinová a biotin. Jako růstové faktory jsou považovány meso-inosit a kyselina p-aminobenzoová. Vitamin C se v mléce nachází jen v malém množství. Snadno podléhá oxidaci vlivem vzdušného kyslíku po nadojení a technologickými zásahy. Při kysání může dojít ke zvýšení jeho obsahu díky mléčným bakteriím. Kyselina askorbová ovlivňuje oxidaci tuku.

Mezi biokatalyzátory patří enzymy, což jsou látky bílkovinného charakteru, které se účastní katalýzy určitého typu reakce. Enzymy jsou jednak syntetizovány v mléčné žláze, ale některé se dostávají do mléka z krve. Kromě nativních enzymů se v mléce vyskytují i mikrobiální enzymy z kontaminující mikroflóry. Některé enzymy jsou koncentrovány v povrchových vrstvách tukových kuliček a přecházejí do smetany, jiné naopak jsou vázány na bílkoviny mléka a společně s nimi se sráží. Záhřevem mléka dochází k denaturaci a inaktivaci enzymů. V dalším textu je uveden popis základních enzymů.

Laktoperoxidasa je prvním enzymem, který byl v mléce objeven a izolován. Za přítomnosti sulfokyanidu v mléce rozkládá peroxid vodíku na vodu a atomární kyslík, který působí baktericidně. Je součástí obranného systému mléčných enzymů a vykazuje rozdílnou aktivitu v závislosti na typu krmení, sezóně a pohlavním cyklu krav. Dalším důležitým enzymem je xantin oxidasa, která katalyzuje oxidaci xantinu na hypoxantin a dále na kyselinu močovou. Její aktivita stoupá v průběhu laktace. Xantin oxidasa je asociována s membránami tukových kuliček a proto přechází do smetany. Tento enzym může vyvolávat oxidovanou chuť u mléka. Enzym katalasa je přítomna ve všech tkáních a tělních tekutinách a mléko ji vždy obsahuje, i když je její aktivita malá. Rozkládá peroxid vodíku na vodík a kyslík. V mléce se hromadí na povrchu tukových kuliček a přechází s nimi do smetany. Schopnost hydrolyzovat acylglyceroly na glycerol a mastné kyseliny mají lipasy. Jsou to enzymy poměrně málo specifické a většina z nich je asociována s kaseinem. Aktivita lipas je závislá na stadiu laktace a roční době. Lipasy jsou aktivovány stopovými množstvími mědi nebo železa, zvýšená koncentrace těžkých kovů je však inaktivuje, stejně jako kyslík, světlo apod. Lipasy mají velký význam pro trvanlivost mléka. Dalšími enzymy jsou fosfatasy, které mají schopnost hydrolyzovat vazbu estericky vázané kyseliny fosforečné z různých substrátů. Přirozenou součástí mléka je alkalická a kyselá fosfatasa. Alkalická má svůj původ v epitelu mléčné žlázy, v krvi a buněčných útvech, avšak je produkována i některými mikroorganismy v mléce. Kyselá fosfatasa je téměř výhradně z leukocytů a proto se její aktivita výrazně zvyšuje při zánětech mléčné žlázy. Alkalická fosfatasa je lokalizována v membránách tukových kuliček, kyselá je převážně v mléčném séru. Podle inaktivace alkalické fosfatasy se kontroluje správnost provedení pasterace. Proteasy jsou také přirozenou součástí mléka. Mléko obsahuje alkalické i kyselé proteasy. Nativní proteasy však vykazují velmi malou aktivitu i při nízké teplotě. Enzym, vyskytující se ve frakci syrovátkových bílkovin, se nazývá amylasa. Hydrolyzuje škrob až na maltosu. Její aktivita je silně závislá na druhu savce, stadiu laktace, výživě, věku dojnice a zdravotním stavu. Pasterací je zcela inaktivována. Poslední důležitý enzym se nazývá lysozym a štěpí glykosidické vazby proteinů obsažených v buněčné vrstvě bakterií. Působí také značně baktericidně na četné druhy bakterií a brání jejich rozvoji v orgánech a tělesných tekutinách organismu a v mléce. V mléce je jeho koncentrace nízká [1, 5, 6, 21]

Tab. 2.1: Obsahy a funkce vitaminů v mléce a sýru[1]

Vitamin	Obsah vitaminů (mg.kg ⁻¹)	
	Mléko	Sýr
A	0,3-1,0	1,6-3,2
Provitamin A	0,1-0,6	0,3-0,8
Thiamin	0,3-0,7	0,20-0,60
Riboflavin	0,2-3,0	3,3-5,7
Pyridoxin	0,2-2,0	0,4-0,8
Korinoidy	0,003-0,038	0,006-0,017
Niacin	0,8-5,0	0,3-16,0
Folacin	0,03-0,28	0,08-0,82
Pantothenová kyselina	0,4-4,0	2,9-4,0
C	5-20	-
D	0,001	0,008
E	0,2-1,2	3,0-3,5
K	0,01-0,03	-
Biotin	0,01-0,09	0,02-0,05

Poslední skupina patřící do biokatalyzátorů jsou hormony. Žlázy s vnitřní sekrecí produkují chemické sloučeniny, které katalyzují metabolické procesy v organismu. Hormony mají mnoho společného s enzymy, poněvadž jsou potřebné ve velmi malém množství a nejsou během svého působení spotřebovány. Ale od enzymů se liší tím, že jsou produkovány na jiném místě než v těch, v nichž působí a jsou vylučovány do krve. Hormony se do mléka dostávají buď jako kontaminace při ovlivňování pohlavních funkcí nebo jsou přirozenou součástí mléka. Jelikož jsou hormony vylučovány do mléka, je v prvním případě jejich přítomnost nežádoucí a hrozí riziko pro spotřebitele. Pokud se v mléce vyskytují přirozeně, není jejich obsah nebezpečný [1, 21].

2.2.1.6 Plyny v mléce

Čerstvě nadojené mléko obsahuje průměrně asi 8 objemových % plynů. Nejhojněji je zastoupený CO₂ (5-7 %). Část plynů se do mléka dostává až po styku se vzduchem, ale oxid uhličitý přechází z krve. Po určité době stání klesá množství rozpuštěných plynů v důsledku ustanovení rovnováhy mezi mlékem a ovzduším. Dochází k poklesu CO₂ a ke zvýšení O₂ a N₂. Při stanovení titrační kyselosti se mléko musí nejdříve zahřát, protože by výsledné hodnoty byly vyšší o rozpuštěný oxid uhličitý [21].

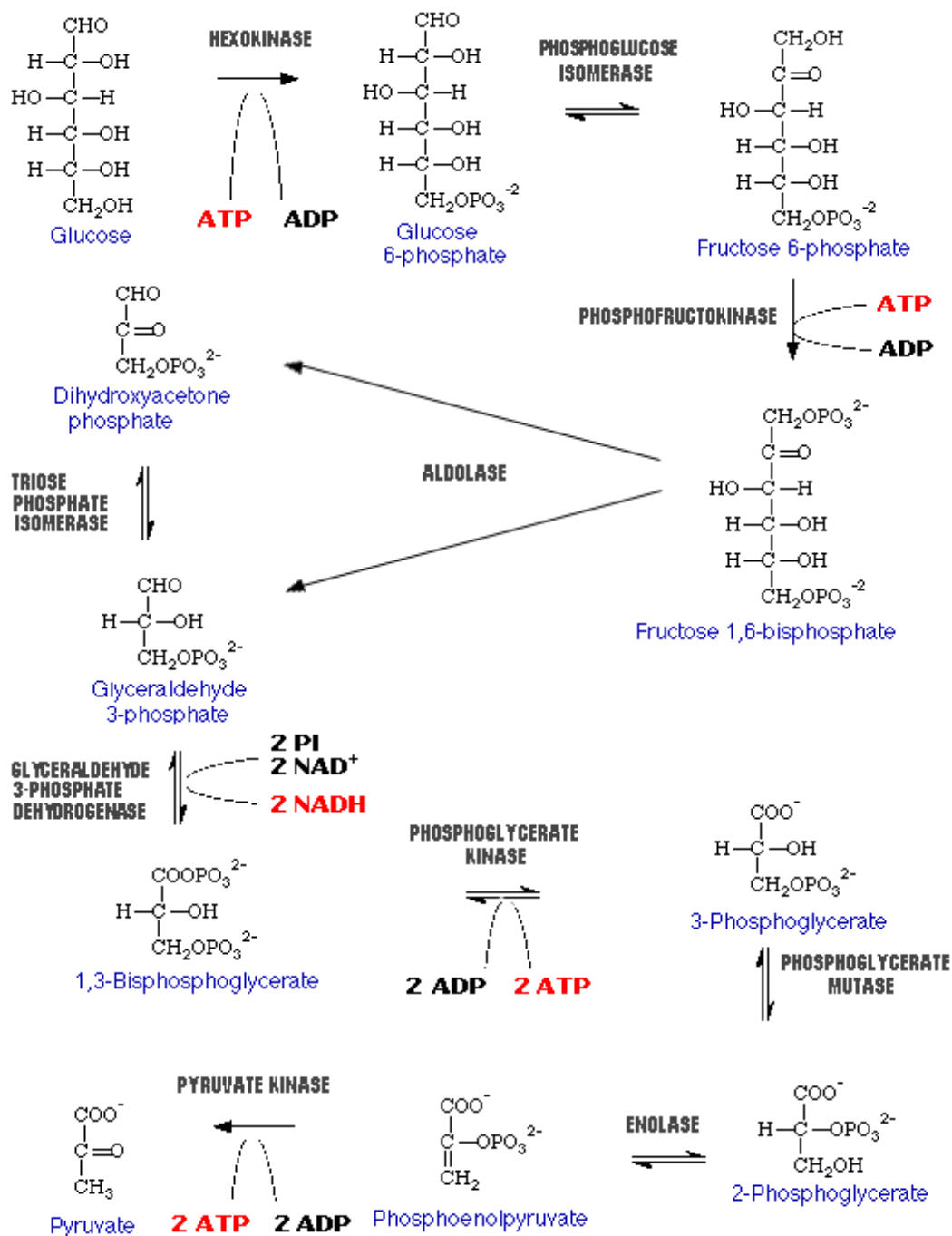
2.2.2 Biochemické změny základních součástí mléka způsobené mikroorganismy

Působením mikroorganismů a činností jejich enzymů nacházejících se v mléce mohou vzniknout různé vady mléka a mléčných výrobků. Na druhé straně však celá řada mléčných

výrobní vyžaduje tyto chemické pochody způsobené mikroorganismy. Bakteriálnímu rozkladu nejnadhěji podléhají mléčný cukr, mléčné bílkoviny a mléčný tuk.

2.2.2.1 Rozklad laktózy

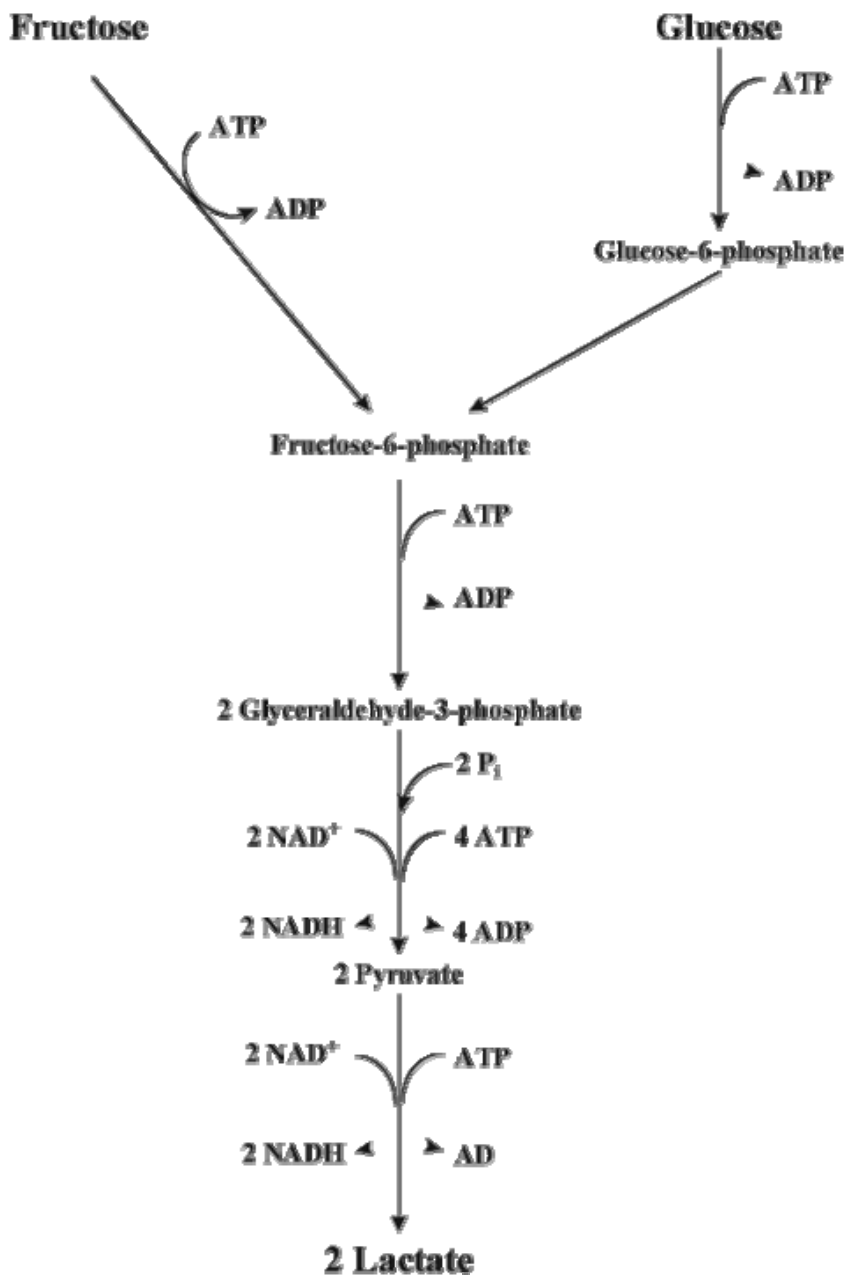
Mléčný cukr mohou zkvašovat pouze mikroorganismy, které tvoří enzym laktázu (β -galaktosidázu), který štěpí laktózu na glukózu a galaktózu. Mikroorganismy nikdy přímo nevyužívají disacharidy ani polysacharidy a vzniklé monosacharidy jsou dále rozkládány podle toho, které druhy mikroorganismů jsou přítomny. Základním anaerobním katabolickým procesem sacharolytických mikroorganismů je glykolýza neboli Embden-Meyerhofova metabolická cesta. Spočívá v přeměně hexos (glukózy, fruktózy, galaktózy) a její úsek k pyruvátu ($\text{CH}_3\text{-CO-COO}^-$), v němž je jeden dehydrogenační stupeň společný většině organismů. K hlavním reakcím glykolýzy patří postupná fosforylace hexos až ve fruktóza-1,6-bisfosfát, jeho štěpení ve dva triosafosfáty a jejich oxidace v 1,3-bisfosfoglycerát. Při této oxidaci se redukuje koenzym NAD^+ v $\text{NADH} + \text{H}^+$ a u některých mikroorganismů je jediným zdrojem energie glykolýzy. Část takto získané energie se ihned uloží v ATP a další část energie se uvolní až po následujících reakčních stupních. Čistý zisk energie při odbourání jedné molekuly hexosy je 2 ATP. Z jednoho triosafosfátu vzniknou 2 ATP tedy z celé hexosy 4 ATP, ale 2 ATP se spotřebují na fosforylaci hexos na počátku glykolýzy [1, 21]



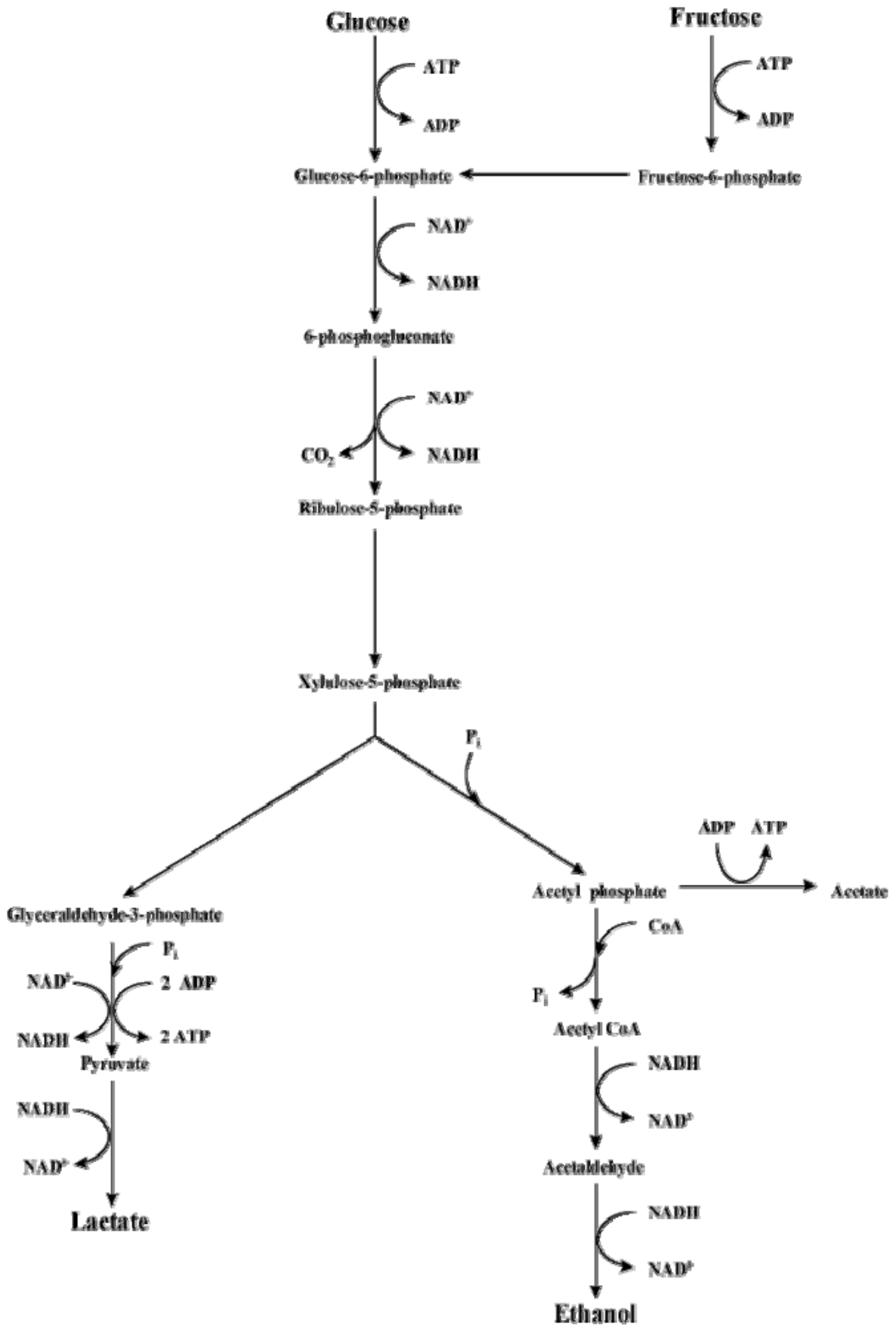
Obr.2.2: Glykolýza neboli Embden- Meyerhofova metabolická dráha [11]

U tzv. homofermentativních mléčných bakterií (rod *Streptococcus*, *Lactococcus*, některé laktobacily) je pyruvát vzniklý glykolýzou redukován v laktát, to jest anion mléčné kyseliny ($\text{CH}_3\text{-CHOH-COO}^-$). Heterofermentativní mléčné bakterie však neobsahují aldolasu, tj. glykolytický enzym, který štěpí hexosu-1,3-bisfosfát ve dva triosafosfáty. Proto převádějí hexosy oxidačním mechanismem v pentosa-5-fosfát a oxid uhličitý. Poté se pentosa-5-fosfát štěpí na acetylfosfát a glyceraldehyd-3-fosfát. Z acetylfosfátu vzniká ethanol a glyceraldehyd-3-fosfát je přeměněn v pyruvát a ten následně v laktát. Tím z hexosy vzniká ekvimolární množství oxidu uhličitého, ethanolu a laktátu [16].

Na výrobu sýrů se využívají homofermentativní mléčné bakterie, které přeměňují mléčný cukr na laktózu z 90 %. Na rozdíl od heterofermentativních bakterií, které produkují kyselinu mléčnou jen z 50 % [5, 16].



Obr. 2.3: Schéma homofermentativního kvašení [7]



Obr. 2.4.: Schéma heterofermentativního kvašení [7]

2.2.2.2 Rozklad mléčného tuku a látek tuku podobných

Lipolýza je u plísňových sýrů velmi důležitá. Je způsobena především lipolytickou aktivitou používané plísňové kultury a divokých kvasinek. Lipasy rozkládající mléčný tuk se dělí na mikrobiální a nativní. Nativní lipasy odštěpují z esterových vazeb triacylglycerolů mastné kyseliny nezávisle na molekulové hmotnosti a místu, kde jsou navázány. Oproti tomu mikrobiální lipasy štěpí tyto vazby převážně v poloze 1 a 3.

Prvním stadiem rozkladu tuku je rozštěpení na mastné kyseliny a glycerol. Uhlíkatý řetězec mastné kyseliny se při okysličování zkracuje o dva uhlíky, které se odštěpují ve formě kyseliny octové. Vzniklá kyselina octová může podléhat další přeměně a vytvářet řadu kyselin např. jantarovou, fumarovou, jablečnou, oxaloctovou, pyrohroznovou a acetaldehyd. Důležitým meziproduktem rozkladu mastných kyselin je kyselina máselná. Glycerol je mikroorganismy převeden na jednoduché alkoholy nebo až na CO₂ a vodu. Při rozkladu tuku mikroorganismy se tvoří také aldehydy a ketony. U některých sýrů však vytváří typické aroma a vůni sýra [6, 22].

2.2.2.3 Rozklad bílkovinných látek

Při výrobě sýrů dochází k rozkladu bílkovin činností enzymů syřidla. Tyto pochody jsou velmi důležité zvláště při zrání sýrů. Proteolýza se podílí na tvorbě textury sýra, peptidy ani aminokyseliny však nemají výrazné chuťové vlastnosti. Vytvořené aminokyseliny jsou dále rozkládány deaminací a dekarboxylací za tvorby sloučenin, které mají výrazný vliv na aroma sýrů. Velmi důležité jsou aminokyseliny obsahující atom síry, aminokyseliny rozvětvené a aromatické. Ty jsou prekurzory dalších aromatických látek jako jsou aldehydy, alkoholy, mastné kyseliny, estery a sloučeniny síry, které výrazně přispívají ke konečnému aroma sýrů. Mléčné bílkoviny jsou rozkládány na aminokyseliny, které mohou být dále rozloženy až na amoniak, těkavé látky a sirovodík [6, 22].

2.2.3 Požadavky na mléko pro výrobu sýrů

Požadavky na jakost kravského mléka v ČR je plně harmonizovaná s předpisy Evropské unie. Jakost mléka určeného pro mlékárenský průmysl, jeho zpracování a i mléko určené k přímé spotřebě je sledována v souladu s vyhláškou MZe č. 203/2003 Sb. o veterinárních požadavcích na mléko a mléčné výrobky a zákonem MZe č. 286/2003 Sb. o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů [22].

Kromě všeobecných požadavků obecně platných pro kvalitní mléko, musí odpovídat i speciálním požadavkům s ohledem na druh vyráběného sýra. Jedná se především o syřitelnost mléka, jeho prokysávací schopnost, mikrobiologickou čistotu a dále obsah bílkovin, tuku a minerálních látek.

Syřitelnost mléka je schopnost mléka se srážet syřidlem a tvořit sýřeninu požadovaných vlastností. Je podmíněna obsahem vápníku v mléce a zejména jeho ionizované formy, a dále obsahem kaseinu a zastoupením jeho jednotlivých frakcí. Při zánětech mléčné žlázy, špatné výživě se zhoršuje syřitelnost mléka a tvoří se málo kompaktní sýřenina, která špatně odděluje syrovátku.

Prokysávací schopnost mléka neboli kvasnost je rozhodujícím kritériem, zda v mléce bude zajištěn dobrý růst mlékařských kultur potřebných pro správný průběh mikrobiologických procesů. Mléko musí obsahovat všechny potřebné složky pro rozvoj kultur a nesmí obsahovat látky, které tento rozvoj potlačují. Významnou roli hraje i zastoupení vitaminů a minerálních látek.

Mikrobiologická čistota mléka pro výrobu sýrů by měla být co nejlepší. Důležitá je nepřítomnost bakterií máselného kvašení, hnilobných a plynotvorných bakterií. Významnou úlohu zde zaujímá jakost krmiva a hygiena ošetřování mléka. Špatná čistota mléka zhoršuje mléčné kysání, které se projeví řadou vad sýrů.

Obsah bílkovin v mléce je dalším důležitým faktorem ovlivňujícím kvalitu sýrů. Jedná se hlavně o obsah kaseinu a jeho podíl z celkového obsahu bílkovin. Jeho zastoupení je ovlivněno geneticky, zdravotním stavem a výživou dojníc. Obsah bílkovin také rozhoduje o ekonomice výroby. Čím více bílkovin v mléce, tím se sníží spotřeba mléka na výrobu sýrů [19, 22].

2.3 Rozdělení sýrů

2.3.1 Měkké sýry

2.3.1.1 Měkké sýry nezrající

2.3.1.1.1 Tvarohové sýry

Mají základ v tvarohové surovině bez soli (typ žervé) a se solí (imperál). Sýry mají minimálně 40 % tuku v sušině a jejich velkou nevýhodou je krátká trvanlivost. K prodloužení trvanlivosti slouží termizace tvarohoviny při teplotě 80 °C. Takovým typem sýru je na příklad Lučina. Do této skupiny se řadí i samotný tvaroh [21].

2.3.1.1.2. Sýry s obsahem 55-65 % tuku v sušině

Používá se kombinované srážení mléka, přičemž převládá syřidlové srážení. Sýřenina se nalévá do tvořítek, kde odkapává. Rozkrájené porce se solí, čímž se zpevní jejich povrch. Sýry jsou náročné na udržení hygienických podmínek výroby. Příkladem je kapiový sýr nebo Imperál [21].

2.3.1.1.3 Nezrající sýry s pařeným těstem

Formují se do různých tvarů. Používá se syřidlové srážení a sýřenina se upravuje na pH 5,2-5 před pařením sýrů při 70-80 °C. Pařené solné sýry se solí v solné lázni a po vychladnutí se balí [21].

2.3.1.1.4 Bílé sýry v solném nálevu

Z technologického hlediska tato skupina představuje nejméně 3 typy sýrů – nalévané, lisované a pařené. Tyto sýry mají bílou barvu a vysoký obsah soli. Uchovávají se v plechovkách v solném nálevu o koncentraci NaCl 12-16 %. Jsou vyráběny především pro export [21].

Nalévané sýry se lijí do tvořítek, kde odkapají a jedenkrát se obračejí. Prokysané sýry se poté rozkrájí, solí asi 1-2 hodiny a nakonec se vkládají do plechovek a zalijí se solným nálevem. Sýry jsou charakteristické vrstvenou sýřeninou a příkladem jsou balkánský sýr nebo istanbul.

Lisované sýry – akawi se vyrábějí podobně. Sýřenina se však vypouští do předlisovací vany, kde se krátce předlisuje s mříží, která rozdělí jednotlivá zrna sýřeniny. Lisování se provádí v plachetkách v lisu. Sýry se pak balí, solí v solné lázni, kde zároveň dokysávají. Po uložení do plechovek se zalévají nálevem. Těsto sýra je celistvé.

Surovinou pro bílé pařené sýry je sýřenina eidamského typu. U nás obdobné druhy oštěpek, parenica, kaškaval patří spíše do tvrdých sýrů [21].

2.3.1.2 Měkké sýry zrající

Představují široký sortiment, který se podle druhu zrání dělí na sýry zrající pod mazem, zrající s plísní na povrchu a zrající s plísní v těstě [21].

2.3.1.2.1 Měkké sýry zrající pod mazem

Typem je Romadur, dezertní sýr, limburgský sýr, které se liší velikostí. K formování se používají vaničky nebo koagulátor, kdy rozkrájené zrno se vypouští na odkapový pás, který dopraví zrno oddělené od syrovátky do soustavy trubic. Zrno se vlastní vahou spojí v souvislou hmotu a pomocí krájících nožů se poté odřezávají jednotlivé kousky. Pokud se použijí tvořítka, sýry odkapávají na paletách, které se několikrát obračejí. Vše probíhá v komorách s regulovanou teplotou, vlhkostí a prouděním vzduchu. Po solení v první fázi zrání se povrch sýrů ošetří kvasinkovou kulturou *Candida mycoderma*. Postup vede k rychlému zvýšení pH do neutrální oblasti, což zabraňuje nárůstu nežádoucích plísní a vytváří podmínky pro rozvoj mazové kultury. Během zrání se sýr ošetřuje solným roztokem a mazovou kulturou. Sýry zrají 10-14 dnů při 14-16 °C a relativní vlhkosti 95 % [21].

2.3.1.2.2 Sýry zrající pod plísní

Typickým představitelem je Hermelín. Vyrábí se z pasterovaného mléka, které predezrává v tancích s přídavkem smetanového zákysu. Plísňová suspenze *Penicillium camemberti* se přidává do mléka. Velmi náročné je zrání sýrů, kdy musí být udržována přísná hygiena. Po solení sýry osychají ve sklepě a Hermelín zraje při teplotě 10-16 °C 6-10 dnů. Povrch musí být rovnoměrně porostlý bílou plísní. Konzistence ve stadiu konzumní zralosti je jemná, máslovitá, bez jádra a s chutí po žampionech [21].

2.3.1.2.3 Sýry zrající s plísní ve hmotě

Takovým sýrem je sýr Niva. Charakteristické vlastnosti určuje plíseň *Penicillium roqueforti*, která se přidává do mléka před sýřením. Sýry se solí do těsta před vypuštěním syrovátky. Formované sýry prokysávají při teplotách 23-26 °C. Solení se provádí buď na sucho nebo v solné lázni. Podstatné pro růst plísní je dosažení vhodné konzistence s dutinkami a píchání sýrů. Sýry zrají při nízkých teplotách 12-14 °C a relativní vlhkosti 96-97 %. Celková doba zrání je 5 týdnů. Sýry se vyznačují typickým modrozeleným žilkováním a pikantní chutí [21].

2.3.2 Tvrdé sýry

Z technologického hlediska se dělí na sýry s nízkodohřívanou nebo s vysokodohřívanou sýřeninou [21].

2.3.2.1 Sýry s nízkodohřívanou sýřeninou

2.3.2.1.1 Sýry eidamského typu

Nejznámějšími zástupci této skupiny jsou Eidam, Gouda a Madeland. Mléko se opět sýří a podstatným parametrem výroby je praní zrna za účelem snížení obsahu laktózy. Sýřenina se s prací vodou přihřívá na 35-40 °C. Tato operace má výrazný vliv na zrání a jakost finálního výrobku. Sýry s nízkým pracím poměrem mohou být kyselejší se sklonem k trhlinám a sýry s vyšším obsahem vody mají gumovité těsto a prázdnou chuť. Sýry zrají v obalu a minimální doba zrání je 5 týdnů. Typická chuť a vůně se projevuje až po 2 měsících [21].

2.3.2.1.2 Sýry typu Čedar

Při výrobě se přidává vyšší procento smetanového zákysu a přidávají se i termofilní kultury. Po sýření se zrno dosouší tzv. čedarizuje, kdy shrnuté zrno prokysává na dně zákysníku a sýřenina se pak mele, promíchává se solí a formuje do forem vystlaných mulem. Ve formách se lisuje a poté se balí do zracích obalů, ve kterých sýry zrají po dobu 6 až 9 měsíců [21].

2.3.2.2 Sýry s vysokodohřívanou sýřeninou

2.3.2.2.1 Sýry ementálského typu

Ementál je sýr bochníkového tvaru. K zakysání se používá smetanová a termofilní kultura. Pro tvorbu ok se používá propionová kultura. Sýření probíhá při 31-33 °C a sýřenina se dohřívá při 50-53 °C. Lisování pro dokysávání sýrů probíhá většinou do druhého dne a dobře prokysaný sýr nesmí mít po 24 hodinách žádnou laktózu. Sýry dozrávají za 3-5 měsíců. Kůra je suchá, těsto pevné vláčné a s oky. Chuť je mandlově nasládlá, čistá a jemná [21].

2.3.2.2.2 Sýry typu moravského bochníku

Technologie je podobná jako u ementálu, ale zrání vyžaduje nižší teploty než klasický způsob. Teplota dohřívání je 48-50 °C. Vyrábí se ve formě bloku a zraje ve folii z plastu. Sýry jsou bez ok a chuť je málo výrazná. používají se na plátkování nebo jako tavírenská surovina [21].

2.4 Technologie výroby sýrů s bílou plísní na povrchu

2.4.1 Svoz mléka

Svoz mléka je prvním technologickým úkonem prováděným sýrárnou, na jehož kvalitě a rychlosti provedení závisí nejen kvalita mléka, ale i jakost všech vyráběných produktů. Z toho důvodu se přijímá mléko vyčištěné a vychlazené. Před odvozem se kontroluje, zda není nakyslé. Mléko se přepravuje v nerezových cisternách a poté se přečerpává do zásobních tanků [1,6, 21].

2.4.2 Příjem, třídění a čištění mléka

Příjem mléka je běžně prováděn objemově pomocí průtokoměrů a současně se provádí kontrolní testy na jakost mléka a přítomnost inhibičních látek. Jakost mléka se určuje podle vzhledu, vůně, kyselosti, teploty a obsahu tuku. Za inhibiční látky se považují antibiotika. Do mléka se dostávají buď při lécení dojníc nebo jsou vytvářena některými mikroorganismy a jsou přirozenou součástí mléka. Pokud jsou zde přítomna z důvodu lécby dojníc, je jejich výskyt nežádoucí a mohou u člověka vyvolat zvýšenou citlivost. Projevy jsou svědění

pokožky, bolest svalů a kloubů, popřípadě astmatické záchvaty. Takové mléko se nesmí použít. Další sledovanou hodnotou je kyselost mléka. Její hodnota se pohybuje kolem pH 6,4 °SH a určuje množství kyseliny mléčné v mléce [20]. Pokud splňuje veškeré požadavky, je přečerpáno do zásobních nádrží nebo tanků. Ze zásobních nádrží se plynule odebírá k dalšímu zpracování [21].

2.4.3 Tepelné ošetření mléka

Veškeré mléko určené ke konzumu musí být tepelně ošetřeno. Při pasteraci se volí teplota a doba výdrže při této teplotě tak, aby došlo k bezpečnému usmrcení veškerých choroboplodných zárodků a zároveň se co nejméně změnila fyzikální, chemické a biologické vlastnosti mléka. Tepelné ošetření se provádí pasterací. Základním prvkem pastéru jsou desky z nerezové oceli, ve kterých dochází k vzájemné výměně tepla. Nejdříve se mléko přivede na odstředivku, kde se oddělí smetana. Ta odtéká do samostatné smetanové pasterační sekce. Mléko z odstředivky je vedeno do pastéru, kde se zahřívá pomocí horké vody nebo páry a následně se zchladí na teplotu 7-10 °C [21]. Při pasteraci dochází ke ztrátám vápníku. Vápenaté ionty jsou důležité při sýření a jejich obsah zvyšuje výtěžnost sýrů. Proto se po pasteraci přidává chlorid vápenatý nebo mléčnan vápenatý. Jeho nedostatek by způsobil pomalé srážení mléka a zhoršenou pevnost sýřeniny [15].

2.4.4 Standardizace mléka

Podle norem jakosti je pro každý druh sýra předepsán určitý obsah sušiny a procento tuku v sušině. Proto se při výrobě sýrů přidává k pasterovanému mléku smetana, která zajistí požadovanou tučnost. Důležitá je i standardizace obsahu bílkovin, který zajišťuje výtěžnost sýrů. Čím vyšší je obsah bílkovin v mléce, tím menší je spotřeba mléka na kg sýra a tím vyšší musí být tučnost mléka, aby se dosáhlo požadovaného obsahu tuku v sušině sýra.

Na hospodárnost výroby a kvalitu plísňových sýrů má příznivý vliv i homogenizace mléčného tuku. Cílem je zmenšení velikosti tukových kuliček, čímž se minimalizuje vyvstávání mléčného tuku na povrchu výrobku. Tím se snižují ztráty tuku do syrovátky zajišťuje se lepší stabilita emulze při skladování mléka a zrání sýrů. Homogenizace se provádí protlačení mléka pod vysokým tlakem úzkou štěrbinou homogenizační hlavy [2].

Mléko a sýry z něho vyrobené musí obsahovat určitý počet užitečných mikroorganismů, které svými životními pochody a produkovánými enzymy přeměňují během kysání mléka a zrání v sýrech jednotlivé součásti mléka. K tomuto účelu se používají zákysy, jejichž úlohou je tzv. předzrání mléka. Mléko tolik neprokysá, ale dochází k celkovému vyrovnání mléka a stabilizaci pH. Poté se provede druhá pasterace, která zajistí zničení zákysu, který by dále stěžoval výrobu sýrů [15].

2.4.5 Vlastní výroba sýrů

Po standardizaci mléka přichází na řadu použití fermentů. Při výrobě se uplatňují především užitečné bakterie čistého mléčného kvašení, u plísňových sýrů některé ušlechtilé druhy plísní a v nepatrné míře kvasinky. Mléko musí mít určitý stupeň kyselosti a musí obsahovat určitý počet a druhy mikroorganismů podle druhu vyráběného sýra. Kyselost má značný vliv na charakter sýřeniny a rozhoduje o průběhu kysání mléka a sýřeniny během výrobního procesu.

Správného stupně kyselosti mléka se dosáhne přidáním vhodné dávky kultur. Tento proces se nazývá maturace. Maturace se provádí v zákysových tancích, kde do mléka je přidána dávka kultur a mléko se nechá určitou dobu zrát [15].

Pro výrobu zákysů se používá sušené odstředěné mléko, které se po obnovení v daném poměru steriluje zahřevem na 95 °C s výdrží 30 minut. Tím je zajištěna nejen inaktivace potenciálních bakteriofágů ale i zcela mikrobiálně čistý substrát pro pomnožení mléčných bakterií [20].

Zákysníky jsou dvouplášťové nádoby vyrobené z nerezové oceli, v nichž je uvnitř umístěn zákys a v obalu je vodní pára nebo voda, která zákys ohřívá nebo chladí. Množství přidávaného zákysu se mění dle druhu sýru, roční doby a vlastností mléka (teploty, kyselosti mléka, kysací schopnosti mléka).

Podle druhu a činnosti, kterou vyvolávají, lze sýrařské kultury pro výrobu sýrů s plísní na povrchu rozdělit na:

- a) kultury bakterií mléčného kysání nazývané zákysy, které zajišťují správný průběh kysání mléka a sýřeniny a jejich enzymy zrání sýrů
- b) zrací kultury, které zajišťují typické zrání jednotlivých druhů plísnivých sýrů

2.4.6 Sýření

Sýření čili koagulaci mléčné bílkoviny – kaseinu ve vločkovitou až pevnou formu lze vyvolat kyselinami, enzymy, solemi tzv. vysolováním, vysokou teplotou, alkoholem nebo elektrickým proudem. Při určité hodnotě pH vzniká sraženina. Podstatou tohoto jevu je bipolární charakter aminokyselin a tím i bílkovin. Při určité hodnotě pH je výsledný náboj nulový a tato hodnota se nazývá izoelektrický bod. Při tomto pH jsou bílkoviny kaseinu nerozpustné a dojde k jejich vysrážení.

Při výrobě sýrů v praxi se používají pouze kyseliny nebo enzymy. Mléko se rozdělí na pevnou hmotu obsahující převážně mléčnou bílkovinu a mléčný tuk a tekutou část syrovátku, která obsahuje větší část mléčného cukru a solí z mléka. Na rychlost srážení a jakost sýřeniny má vliv několik faktorů. Těmito faktory jsou: dávka syřidla resp. doba srážení, teplota mléka při sýření, kyselost mléka, obsah rozpustných vápenatých solí v mléce, přídavek vody do mléka a v neposlední řadě i jakost zpracovávaného mléka. Syřidlo naštěpí κ -kasein na jednotlivé frakce, které se váží s vápenatými ionty. V první fázi dojde k naštěpení, které proběhne vždy a v druhé fázi dojde k zesílení s vápenatými ionty. Druhá fáze je limitována teplotou. Studené mléko okolo 10 °C se velmi špatně sráží. Syřidla se dělí podle původu na rostlinná, živočišná a mikrobiální. Ideální syřidla jsou enzymová živočišná syřidla, která nejsou agresivní a v pozdějších fázích výroby nehořknou. Jejich nevýhodou je ale vyšší cena. Živočišná syřidla se získávají z telecích nebo drůbežích žaludků. Rostlinná syřidla, která se získávají ze šťáv fiků nebo bodláků, se v sýrařském průmyslu nevyužívají. K výrobě mikrobiálních syřidel se využívají různé skupiny mikroorganismů. Volba syřidla je odvislá od jeho ceny, druhu vyráběného sýra a požadavcích na výrobky. Dle konzistence se dělí na syřidla tekutá, prášková a tabletová. Syřidla musí být skladována v chladu a temnu v barevných nádobách. Jsou citlivá na světlo, chlor a těžké kovy. Mohou se dávkovat v koncentrované nebo zředěné formě. Ve zředěné formě je dávkování lepší, protože se lépe dosáhne stejné koncentrace syřidla v mléce a stejně rychlého srážení. Při ředění syřidla sterilovanou vodou se musí dodržovat správné podmínky sterility, aby nedošlo ke kontaminaci. Ve výrobě se však

uplatňuje neředitelná syřidla, která se přímo přikapává do mléka pomocí dávkovacího automatu. V čase srážení se začnou tvořit sráženiny bílkovin. Mléko začne houstnout a poté se vytvářejí ostře ohraničené vločky bílkovin až vznikne tuhý gel, který se nazývá sýřenina [1, 15, 21].

2.4.7 Krájení sýřeniny

Hlavním fyzikálně-chemickým jevem při zpracování sýřeniny je synereze – oddělování syrovátky ze sráženiny. Začátek synereze vyvolává krájení sýřeniny, míchání a také rozmnožování bakterií mléčného kvašení. Cílem je získání dostatečně odvodněného parakaseinu vápenatého tak, aby se v něm zachytil podle možnosti všechen mléčný tuk [22]. Pomocí sýrařské harfy se sýřenina po určitém časovém intervalu rozřeže na jednotlivé kostičky nazývané sýrařská zrna. Sýrařská harfa je složena z nerezových nožů, které se různě otáčejí a řezou sýřeninu. Okamžik krájení se stanoví tak, aby tento proces nebyl příliš brzo nebo příliš pozdě. Pokud by se sýr krájel velmi brzo, bílkovina by odcházela se syrovátkou pryč a byl by menší výtěžek sýrů. Pokud by krájení bylo příliš pozdě, byla by zrna tuhá a špatně by se formovala. Díky krájení se začne uvolňovat syrovátka, která se dalším promícháváním zrna více uvolňuje a zrno se stává tužším a menším [15].

2.4.8 Formování a odkap sýrů

Každý druh sýru má svůj standardní tvar a velikost. Sýrařské zrno se promíchává a samospádem se plní do blokových tvořitek. Materiály těchto forem musí odpovídat požadavkům výroby a zároveň splňovat požadavky pro účinnou a snadnou sanitaci. Formy jsou plněny automatickým dávkovačem a na dopravníku posunovány do odkapních sálů. Zde stále dochází k uvolňování syrovátky a to vlastní vahou sýřeniny. Aby sýry odkapávaly stejnoměrně a měly na celém povrchu jemnou a hladkou vrstvu, stejně tak i pravidelný tvar, musí se během odkapávání v určitých intervalech otáčet. Na vstupu do odkapních sálů je sýr sladký a vodnatý a na výstupu je kyselý a tvrdší. Odkapní sály musejí mít regulovanou teplotu a vlhkost prostředí. Teplota je důležitá pro správné prokysání sýru, pro zvýšení sušiny a pro odtok syrovátky. Pokud by byla teplota příliš nízká nebo vysoká, docházelo by k nedostatečnému prokysání sýru a špatnému odtoku syrovátky [15].

2.4.9 Solení sýrů

Po vyjmutí sýra z tvořitek následuje solení. Solení sýrů je velmi důležitým úsekem technologického postupu. Jeho účelem je zlepšit chuť sýra, upevnit jeho povrch vytvořením kůrky a zlepšit konzistenci sýrového těsta. Důležitá je také regulace odtoku syrovátky a tím i obsah vody v sýru. Díky solení dochází k usměrnění průběhu kysání.

Sýry se solí několika způsoby. Buď se solí přímo sýřenina tj. solení v těstě, anebo až hotové sýry po zformování. Po zformování se solení provádí v solné lázni v koncentrovaném roztoku soli nebo solením na sucho. Volba způsobu solení závisí na druhu sýra a jeho požadavku na solení. Solení v těstě se provádí tak, že již při formování se sýřenina posypává vrstvami soli, která je buď v suchém stavu nebo v koncentrovaném roztoku. Druhou možností je solení na sucho, kdy se sýr prosypává solí a ta se roztírá na povrchu. Podle velikosti bochníku sýra se solí jednou nebo vícekrát v pravidelných časových intervalech. Při prvním solení je důležité

zvolit vhodnou dávku soli tak, aby se na povrchu sýra nevytvořila tvrdá kůrka, která by bránila pronikání soli do sýra a vylučování syrovátky. Většinou se nesolí celý bochník najednou, ale nejdříve ze stran a poté z čelních stran. Při tomto způsobu solení je velmi důležité používat čisté a suché soli, které mají stejnou zrnitost [15].

Solení v solných lázních má tu výhodu, že se nemusí brát ohled na zrnitost a dá se plně mechanizovat. Sýry se vkládají do nádrží s koncentrovaným roztokem kuchyňské soli a určitou dobu se v ní ponechají. Při průběhu solení má na obsah soli v sýru největší vliv doba solení, teplota, koncentrace a kyselost solné lázně.

2.4.10 Zrání sýrů

Typickou chuť, vůni, konzistenci a vzhled získá sýr teprve zráním, jimiž se mění tři základní složky mléka: mléčný cukr, bílkovina a tuk. K rozkladným pochodům dochází už během výroby a k největším změnám dochází v době zrání. Rozeznáváme tzv. předběžné zrání. Tím se rozumí prokysávání sýřeniny, tj. přeměna mléčného cukru bakteriemi čistého mléčného kvašení na kyselinu mléčnou za částečného rozkladu bílkovin. Při vlastním zrání sýrů dochází k rozkladu bílkovin a částečné hydrolýze tuku po vysolení. Díky enzymům se z bílkovin a tuků vytvářejí typické chuťové látky s charakteristickou vůní.

Dle rozkládání bílkovin se zrání dělí do dvou skupin a to primární a sekundární zrání. Při primárním zrání, které je anaerobní, dochází k postupnému zrání v celé sýrové hmotě. Tento proces je způsoben hlavně enzymy bakterií mléčného kvašení, které působí na mléčnou bílkovinu – kasein. Je to pomalý proces, kdy konečným produktem jsou aminokyseliny. Při sekundárním zrání dochází k postupnému zrání od povrchu sýru dovnitř za přítomnosti vzduchu. Proces je poměrně rychlejší a na povrchu se vytváří maz. Původcem tohoto zrání jsou aerobní mikroorganismy, které rozkládají bílkoviny až na amoniak, oxid uhličitý a vodu.

Ve většině případů se oba druhy navzájem doplňují. Typ zrání je charakteristický pro jednotlivé druhy sýrů a je určen velikostí sýru, sušinou těsta a teplotou a vlhkostí zracích sklepů. Ve sklepech musí být po celý rok konstantní teplota i vlhkost a musí být umožněno vyměňovat vzduch dle potřeby. Optimální teplota je 12-14 °C a vlhkost 80-90 %. Ve sklepech jsou sýry umístěny do kovových stojanů, v nichž se mechanicky nebo automaticky obracejí v určitých časových intervalech. Obrácením se dosáhne stejnoměrného vysychání a i zrání sýrů. S postupným vysycháním se zvyšuje obsah sušiny sýrů a tím se zpomaluje zrání. Sýry zrají 6-10 dnů do rozvoje plísně *Penicillium candidum* a pokrývají se postupně porostem bílé plísně. Zejména na začátku zrání rostou na povrchu sýrů i některé kvasinky, které při nadměrném nárůstu mohou zpomalit až znemožnit růst kulturní plísně. U tučnějších sýrů však kvasinky *Geotrichum candidum* výrazně podporují růst plísně a mají také vliv na profil aromatických látek [15, 22].

2.4.11 Balení a expedice sýrů

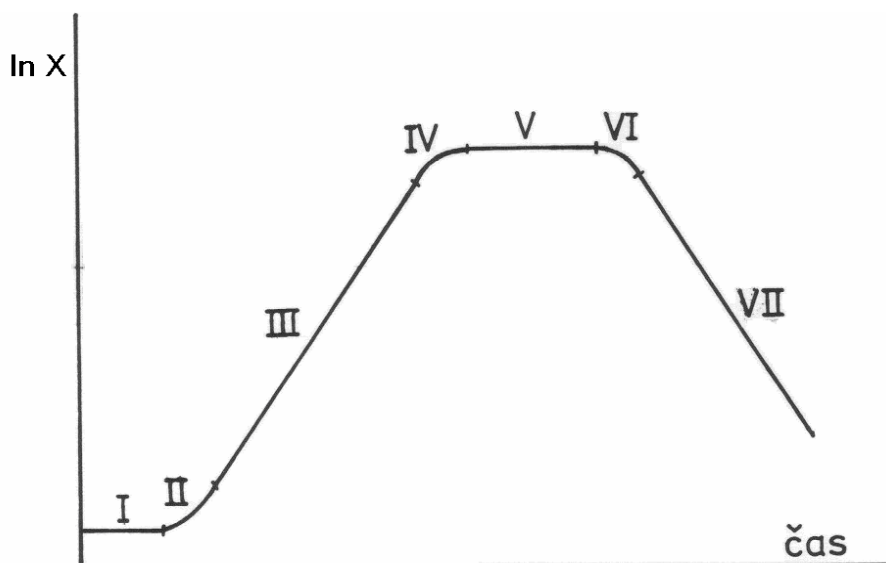
Po dosažení expediční zralosti je sýr podroben poslední kontrole, při které dochází k odstranění sýrů, které neodpovídají požadavkům pro přímý prodej. Takové sýry jsou většinou zpracovány jako suroviny pro výrobu tavených sýrů. Jelikož obal přichází do přímého styku s potravinou, musí být zdravotně nezávadný a nesmí negativně ovlivňovat sensorické vlastnosti sýru. Funkce obalu je jednak ochranná a zároveň ovlivňuje jeho vzhled.

Sýr je chráněn před mechanickým poškozením, vysycháním a kontaminací např. vzdušná kontaminace mikroorganismy.

Obaly mají co nejméně propouštět vodní páru a kyslík, popřípadě světelné paprsky a také mají dobře přilnout k povrchu sýra. Běžně používanými obaly pro balení plísňových sýrů jsou hliníkové fólie kombinované s papírem. Takto zabalené sýry jsou dále vkládány například do papírových krabiček. Velice často se také uplatňuje porcování větších formátů a následné balení do plastových folií. U některých sýrů jsou uplatňovány systémy balení sýrů vakuově, v ochranné atmosféře, či ozáření zabalených sýrů UV paprsky. Tento zákrok lze však použít pouze za určitých podmínek, neboť UV paprsky způsobují oxidaci tuků [23].

2.5 Růstová křivka bakterií

Mikroorganismy se nejvíce rozmnožují za optimálních podmínek. Jejich růst ale není konstantní. Nejlépe jej vystihuje růstová křivka, která se skládá z několika úseků. V první fázi – lag fázi se bakteriální populace adaptuje na nové prostředí. Buňky se nemnoží, vytvářejí si potřebné enzymy a zvětšují svůj objem. Délku lag fáze ovlivňuje složení prostředí, zejména velikost a stáří inokula. V průmyslových podmínkách se vytváří takové prostředí, aby tato fáze byla co nejkratší. Poté následuje fáze zrychleného růstu, kdy je buňka plně přizpůsobena podmínkám prostředí. Buňky se začínají množit s narůstající rychlostí dělení a zvyšuje se i intenzita metabolismu. V této fázi je buňka velmi citlivá na nepříznivé podmínky prostředí. V exponenciální neboli logaritmické fázi se buňky dělí konstantní rychlostí, je zde stále intenzivní množení, které roste geometrickou řadou. Dochází k rychlému využívání substrátu a je udržován aktivní metabolismus. V této fázi je odumírání buněk minimální a tvoří se v ní primární metabolity, které jsou z průmyslového hlediska klíčové. Pokud bychom v této fázi přenesli buňky do nového kultivačního média o stejném složení, pokračují v množení a to bez zřetelné lag fáze. Následující úsek je fáze zpomaleného růstu, ve kterém nastává postupné zbrždění množení mikroorganismů a to i celkového metabolismu. Nabývá hromadění metabolitů a začínají se vyčerpávat živiny, bez kterých se mikroorganismy nedokáží množit. V další fázi – stacionární se vyrovnává počet odumřelých buněk s počtem buněk přirůstajících. Ve stacionární fázi vznikají sekundární metabolity a dochází k limitaci růstu a množení díky některému z faktorů např. nedostatek laktózy v mléce. Poslední úsek se nazývá fáze odumírání, ve kterém jsou vyčerpány živiny a počet odumřelých buněk je větší než přírůstek mikroorganismů. Tato fáze může trvat týdny, někdy i měsíce a nakonec dojde k lyzi všech buněk a proto je tato fáze pro fermentační procesy nežádoucí. Na obrázku 2.5 jsou zobrazeny jednotlivé úseky růstové křivky [11, 16, 24].



Obr. 2.5: Grafické znázornění počtu živých buněk [24]

osa x.....doba (hod)

osa y.....logaritmus počtu živých buněk v 1 ml

Fáze růstové křivky: I- lag fáze

II- fáze zrychleného růstu

III- exponenciální (logaritmická) fáze

IV- fáze zpomaleného růstu

V- stacionární fáze

VI- fáze zrychleného odumírání

VII- fáze odumírání

2.6 Struktura mikrobiálních buněk mléčného kvašení

Každá mikrobiální buňka je od vnějšího prostředí oddělena silnou, pevnou strukturou, která se nazývá buněčná stěna. Buněčná stěna dává buňce tvar a chrání ji před mechanickými vlivy a před účinky osmotického tlaku vnějšího prostředí. V buněčné stěně jsou poměrně velké póry, kterými může volnou difúzí procházet většina chemických sloučenin. Pouze vysokomolekulární sloučeniny, jako jsou bílkoviny nebo polysacharidy, nemohou póry stěnou procházet. Pevnost a neohebnost buněčné stěny bakterií je výsledkem přítomnosti vrstvy peptidoglykanů, zvaných též mukopeptidy nebo mureiny. Tato vrstva se vyskytuje u všech bakterií. Tato vrstva je tvořena molekulami N-acetylglukosaminu a N-acetylmuramové kyseliny. Tyto jednotlivé řetězce jsou vzájemně spojeny peptidovou vazbou přes karboxylovou skupinu muramové kyseliny tetra- a pentapeptidy. Hlavní složkou buněčné stěny gram pozitivních bakterií je silná peptidoglykanová vrstva vyplněná tzv. teichovou kyselinou. Teichová kyselina je vázána vazbou na muramovou kyselinu a představuje až 50 % sušiny buněčné stěny gram pozitivních bakterií. Stěny gram negativních bakterií teichovou kyselinu neobsahují a tenká vrstva peptidoglykanů se skládá z tzv. vnější membrány, která

obsahuje fosfolipidy, enzymové proteiny, lipoproteiny a lipopolysacharidy. Obsah lipidů ve stěně gramnegativních bakterií je příčinou jejich zvýšené odolnosti k aniontovým povrchově aktivním látkám, jako jsou mýdla, žlučové kyseliny.

Pod buněčnou stěnou je jemná elastická membrána s malými póry tzv. cytoplazmatická membrána, která se skládá z lipidů a proteinů. Z této membrány vybíhají do cytoplazmy vychlípeniny, které jsou závislé na druhu bakterií. Zvláštním typem těchto vychlípenin jsou mesozomy, které se vyskytují hlavně v oblasti, kde dochází k vytváření přepážky při dělení buňky. Cytoplazmatická membrána tvoří osmotické rozhraní buňky a vnějšího prostředí. Jejimi póry mohou volnou difúzí procházet pouze nízkomolekulární sloučeniny bez elektrického náboje např. nedisociované molekuly vody nebo nedisociované molekuly slabých kyselin ze silně kyselého prostředí, alkoholy, alkoholické cukry. Lipidovou složkou cytoplazmatické membrány mohou do buňky pronikat látky rozpustné v tucích nebo rozpouštějící tuky. Všechny ostatní látky se do buňky dostávají pomocí transportních mechanismů. V buňkách se nacházejí kulovité útvary zvané protoplasty. Protoplasty jsou schopné syntézy buněčných složek.

Vnitřní obsah buněk tvoří cytoplazma a jaderný materiál. Cytoplazma se skládá z buněčné šťávy, což je v podstatě vodný roztok enzymů, meziproduktů metabolismu, rezervních látek a některých anorganických iontů. Cytoplazma obsahuje také ribozomy a zrníčka nerozpuštěných rezervních látek. V ribozomech probíhá syntéza bílkovin a rezervní látky jsou zastoupeny hlavně lipidy. Kromě těchto složek obsahuje cytoplazma i různá barviva, která zbarvují buňky a jejich kolonie žlutě, oranžově, růžově až červeně. Největší složkou cytoplazmy je voda, která představuje 65-90 % obsahu buňky mikroorganismů. Obsah vody závisí nejen na druhu mikroorganismů, ale i na vnějších podmínkách. Voda je nezbytná pro uskutečnění enzymových procesů v buňce a pro základní životní projevy buňky. Sníží-li se obsah vody pod určitou hladinu, metabolismus a všechny životní pochody se zastavují, avšak nemusí dojít k lyzi buňky. Snížení vody může dojít z důvodu odnímání vody v hypertonickém prostředí, vysoušením buněk nebo sublimací vody převedené do pevného skupenství. Metabolismus se může také zastavit zmrazením vnitrobuněčné vody. Nejvíce se využívá šetrného sušení tzv. lyofilizace, které slouží k dlouhodobému uchování mikroorganismů. Životaschopnost vysušených kultur je zachována po řadu let. Jaderný materiál bakterií tvoří deoxyribonukleová kyselina (DNA) umístěné přímo v cytoplazmě a doprovázená malým množstvím polyaminů. DNA bakterií tvoří chromozom, který má uzavřenou strukturu. Molekula DNA má tvar dvojité dvoušroubovice tj. šroubovice tvořená paralelními řetězci navzájem spojenými vodíkovými můstky. Je to polynukleotid obsahující dvě purinové báze (adenin a guanin) a dvě pyrimidinové báze (thymin a cytosin). Řada bakterií obsahuje v buňce kromě DNA několik samostatných molekul DNA, které jsou uzavřené struktury a nazývají se plazmidy. Jedna skupina plazmidů se uplatňuje např. při spájení nebo konjugaci buněk [16].

2.7 Význam a funkce mléčných bakterií

Pojem mléčné bakterie byl zaveden na začátku 20. století pro označení skupiny bakterií, jejichž společnou vlastností je tvorba kyseliny mléčné jako hlavního metabolitu při fermentaci cukrů. Mléčné bakterie jsou v přírodě velmi rozšířené. Vyskytují se v mléce, kde vyvolávají přirozené kysání, dále v půdě, na travinách, ve vodě, v ústech i zažívacím traktu teplo-krevných živočichů. Pro svůj pozitivní vliv v trávicím traktu člověka jsou využívány jako probiotika. Probiotika jsou bakterie, které mají schopnost překonat vliv nepříznivého prostředí

v žaludku člověka, tj. nízkou hodnotu pH, přítomnost kyseliny chlorovodíkové, proteolytických enzymů a lysozymu, který způsobuje lyzi některých jogurtových bakterií. Protože mléčná kyselina zastavuje rozmnožování hnilobných bakterií a stafylokoků, využívá lidstvo činnosti mléčných bakterií odedávna pro konzervaci zeleniny, zelí, kvašených okurek a ovoce [8].

Základní funkce mléčných bakterií, používaných při zpracování mléka, jsou technologické, sensorické, nutriční a zdravotní. Technologicky a sensoricky významné funkce jsou především v produkci kyseliny mléčné, vzniku sensoricky významných složek (diacetyl, acetaldehyd, volné mastné kyseliny apod.), rozkladu bílkovin, popřípadě i tuků a potlačování patogenních a technologicky škodlivých mikrobiálních druhů.

Tvorbou kyseliny mléčné se snižuje pH ve střevním traktu, v jehož důsledku dochází ke zvyšování retence vápníku, fosforu a železa, stabilizaci produkce vitaminů skupiny B a současně se tlumí rozvoj škodlivé hnilobné mikroflóry. Mléčné bílkoviny jsou dobře stravitelné a uvolněné mastné kyseliny příznivě ovlivňují stravitelnost tuků.

Ochranná funkce se uplatňuje především inhibicí růstu nežádoucích mikrobiálních druhů a produkcí řady antimikrobiálně aktivních metabolitů. Probiotické účinky vykazují mikroorganismy, které jsou přirozenou součástí zažívacího traktu savců, kde dokáží přežít a množit se a vykazují v zažívacím traktu pozitivní metabolickou aktivitu [8].

2.8 Používané kultury u sýrů s bílou plísní

Zákysové kultury jsou čisté kultury nebo směsi vybraných definovaných a živých mikroorganismů, které se používají jako inokulum v množství nejméně 10^6 buněk g^{-1} potraviny s cílem zahájení procesu fermentace, která má zlepšit vzhled, chuť, vůni a trvanlivost produktu [19].

a) Mezofilní kultury

Lactococcus lactis subsp. cremoris

Lactococcus lactis subsp. lactis

Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetyllactis

Lactococcus lactis subsp. diacetyllactis

Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris

b) Termofilní kultury

Používaná monokultura: *Streptococcus thermophilus*

Taxonomické zařazení

Říše: Bakteria
Oddělení: Firmicutes
Čeleď: Streptococaceae
Sekce: grampozitivní koky
rod: *Lactococcus*

Říše: Bakteria
Oddělení: Firmicutes
Čeleď: Lactobacillaceae
Sekce: grampozitivní koky
rod: *Leuconostoc*

Říše: Bakteria
Oddělení: Firmicutes
Čeleď: Streptococaceae
Sekce: grampozitivní koky
rod: *Streptococcus*

Kysací kultury se dělí na čistě kyselinotvorné tzv. O-kultury (*Lactococcus lactis subsp. lactis* a *Lactococcus lactis subsp. cremoris*), na kyselinotvorné mírně aromatické tzv. L-kultury (*Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* a *Leuconostoc mesenteroides*), dále na čistě aromatické tzv. D-kultury (*Lactococcus lactis subsp. diacetylactis*) a nakonec jejich směsi [22].

Laktokoky jsou nesporulující kokovité nebo oválné buňky, které jsou buď v párech nebo různě dlouhých řetězcích. Buňky jsou nepohyblivé a jejich optimální kultivační teplota je 30 °C. Jsou to fakultativně anaerobní mikroorganismy, které ke svému růstu potřebují přítomnost aminokyselin a vitaminů. Jejich tolerance na přítomnost chloridu sodného je asi 4 % hm. NaCl a veškerý růst ustává při 40 °C. *Lactococcus lactis subsp. lactis* štěpí laktosu v mléce enzymem laktasou na glukosu a galaktosu a z nich dalším enzymem laktacidase vytváří kyselinu mléčnou. *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis* tvoří CO₂ a kyselinu octovou. Jeho enzymové vybavení dokáže štěpit kyselinu citrónovou za vzniku acetoinu. Tato reakce probíhá pouze za světla. *Lactococcus lactis subsp. cremoris* štěpí glukosu a laktosu a tvoří acetoin a biacetyl. Spolu s *Lactococcus lactis subsp. lactis* jsou hlavními činiteli prokvašení mléčného cukru [22].

Rod *Leuconostoc* má stejné uspořádání buněk jako *Lactococcus*, tedy nesporulující kokovité nebo oválné buňky v krátkých nebo středně dlouhých řetězcích. Tvar buněk závisí na kultivačních podmínkách. Pokud jsou buňky pod stresem, na pevných médiích nebo v médiích s glukózou, dochází k prodlužování buněk. Jsou to fakultativně anaerobní bakterie, které jsou nepohyblivé. Jejich optimální kultivační teplota je 20-25 °C. Pro svůj růst vyžadují v médiu přítomnost kyseliny glutamové a valinu [25]. *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* produkuje kyselinu mléčnou v menší míře. Biacetyl se tvoří i za tmy a dále uvolňuje acetoin [22].

Rod *Lactococcus* patří mezi homofermentativní bakterie, které využívají laktózu, glukózu a maltosu. Některé kmeny fermentují i sacharosu. Rod *Leuconostoc* patří mezi heterofermentativní bakterie, které jsou charakteristické tím, že kromě kyseliny mléčné vytváří i aromatické látky, především biacetyl z kyseliny citrónové [21].

Používaný termofilní rod *Streptococcus thermophilus* má také nespořulující nebo oválné buňky, které se vyskytují v párech nebo různě dlouhých řetězcích. Jsou to nepohyblivé fakultativně anaerobní mikroorganismy, jejichž optimální teplota je 37-42 °C. *Streptococcus* přežívá záhřev na 60 °C po dobu 30 minut a pro svůj růst potřebuje přítomnost aminokyselin a vitaminů skupiny B v médiu. Tolerance na přítomnost chloridu sodného je 6,5 % hm. Růst mikroorganismů ustává při pH 9,6. Tato bakterie se vyskytuje v mléce a mléčných produktech v menším množství nativně. Fermentuje glukosu, laktosu, manosu a galaktosu. Jako první zkvašuje laktosu na kyselinu mléčnou a galaktosa zůstává většinou v médiu. Pouze v malé míře ji také zkvašuje [8, 22].

Rozdíl mezi mezofilní a termofilní kulturou je v kultivační teplotě. Termofilní kyselinotvorný *Streptococcus thermophilus* začíná svou činnost při 37-42 °C, kdežto u mezofilů je tato teplota podstatně nižší. Mezofilní mléčné kultury preferují teploty mezi 25-30 °C. Dalším rozdílem je jejich růst, kdy termofilní kultury mají větší rychlost růstu než mezofilní. Termofilní kultury mají také větší nároky na složení mléka. Při nedostatku vitaminů nebo aminokyselin v mléce je aktivita termofilu velmi nízká a laktózu převážně mění mezofil. Tím se mění i sensorické vlastnosti vzniklého sýru. Zkvašování laktosu zahajuje termofil, který ji fermentuje jen z 50 %. Zbytek zkvasí mezofilní kultura. Tím vzniká typická chuť a aroma sýru. Proto se musí dodržovat stále stejný poměr termofilu a mezofilu. Hodnota pH sýru při vyformování se musí pohybovat v rozmezí 4,95-5,10, aby bylo dosaženo vyváženého poměru přítomných bakterií. Pokud by byl termofil v nadbytku, pH by bylo vyšší než 5,10 a jelikož by laktosu přeměnil opět jen z 50 %, vznikl by sýr málo kyselý. Při nadbytku mezofilních bakterií by sýr naopak příliš prokysal, jeho pH by kleslo pod 4,9 a výsledný sýr by měl kyselejší chuť [20].

2.9 Izolace mlékařských kultur

Vlastí izolace mikroorganismů je možná několika způsoby. Nejvhodnější je metoda pomnožení v tekutém prostředí. Protože se jedná o kultury mléčného kvašení, je nejlepší použít jako médium mléko. Mléko je obohacené růstovými látkami, které umožňují rychlé pomnožení bakterií. Používá se tzv. startér, což je přípravek pro stimulaci růstu mléčných bakterií. Používá se tam, kde mikroorganismy, které mají být izolovány, tvoří jen malý podíl mikroflóry. Vytvářejí se podmínky, které jsou optimální pro daný mikroorganismus a které nejvíce podporují jejich množení. Druhou variantou je očkování na pevné živné půdě. Tato metoda není zcela přesná, protože se kromě bakterií mléčného kvašení izolují i jiné kmeny, které jsou nežádoucí. Existuje přesnější způsob, který izoluje kulturu z jedné buňky pomocí mikroskopické metody. Postupným ředěním se spolehlivě získá čistá kultura bakterií.

Identifikované kmeny jsou současně sledovány z hlediska uplatnění v sýrařském odvětví. Jednotlivé kmeny pak vytvářejí směsnou kulturu. Při sestavování směsných kultur se musí vycházet ze znalostí účinků jednotlivých kmenů a prověřují se vzájemné interakce kmenů mezi sebou ve směsné kultuře. Při hodnocení jednotlivých kmenů se zkoumá především jejich

aktivita při tvorbě kyseliny mléčné a to z hlediska časového intervalu tak i kultivačních teplot. Nejčastěji se sestavuje růstová křivka, která popisuje biochemické a fyziologické vlastnosti kmenů např. proteolytickou a lipolytickou aktivitu, tvorbu oxidu uhličitého, ethanolu, odolnost vůči NaCl. Důležité je také zjišťovat odolnost vůči antibiotikům v mléce a chování mikroorganismů v mléce jiného složení.

Po tomto individuálním hodnocení se sestaví směsná kultura bakterií určená pro sýrařský průmysl. Poté se opět sleduje aktivita tvorby kyseliny mléčné dané směsné kultury z hlediska teplot a doby kultivace. Kultury se podrobují různým nepříznivým vlivům a pokud obstojí při všech zkouškách, mohou se zařadit do používaných kultur [14].

2.10 Způsoby přidávání a dávky zákysů

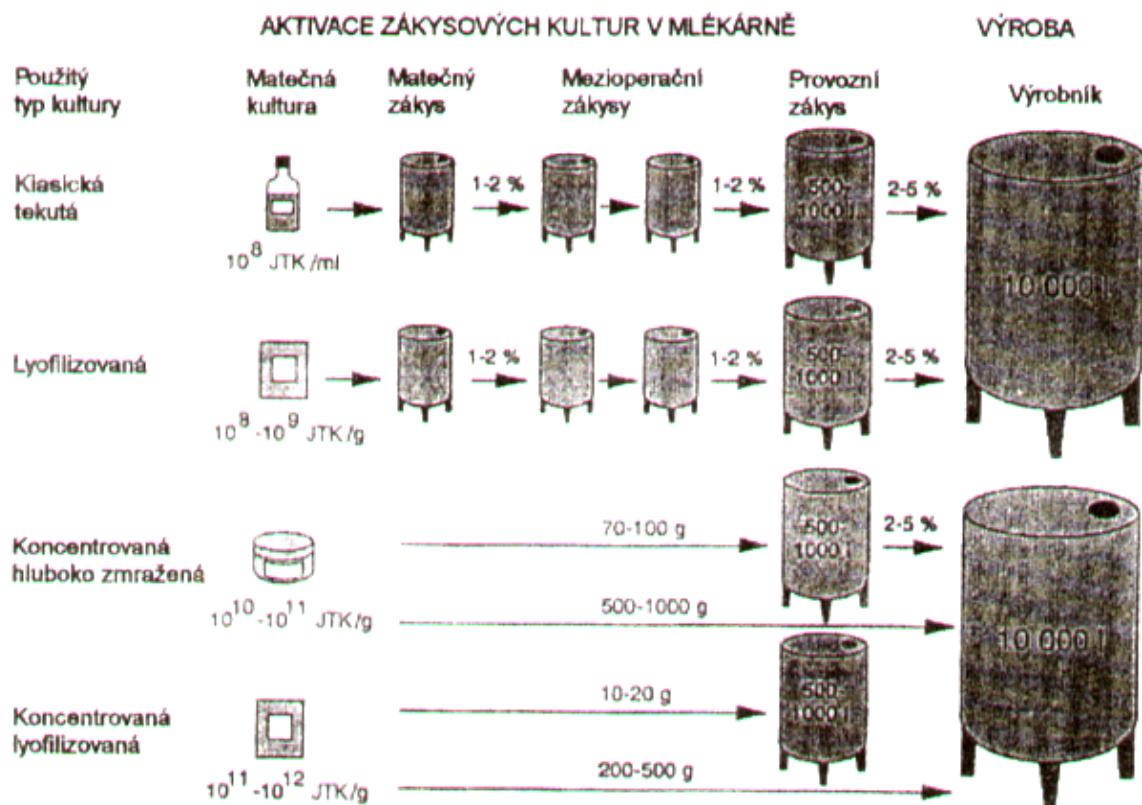
Při výrobě sýrů se používají takové fermenty, které obsahují jen žádoucí kmeny bakterií a jde-li o směsnou kulturu, musí být jednotlivé kmeny i ve správném poměru. Tyto zákysy nesmí být infikovány škodlivými mikroorganismy např. plynotvornými bakteriemi, *Coli aerogenes*, mikroorganismy máselného kvašení. Pokud je zákys infikován, nesmí se použít. Důležitá je i správná kyselost a dobrá virulence zákysů. Správného stupně kyselosti mléka se dosáhne buď přírodním nebo umělým zráním mléka. Přírodní zrání mléka se v dnešní době skoro nepoužívá pouze v některých horských oblastech, kde je zaručeno bakteriologicky nezávadné mléko z pastvin a od zdravých, dobře živěných dojnic. Neprobíhá-li přírodní zrání syrového mléka dosti rychle, používá se zrání umělé s přidavkem kultur bakterií mléčného kysání. V průmyslovém měřítku je prakticky nemožné využívat přírodní zrání mléka. Při umělém zrání mléka se směsné kultury přidávají k čerstvému pasterovanému mléku, které je vytemperované na teplotu kultivace. Kromě druhu vyráběného sýra jsou dávky zákysů závislé i na ročním období a na teplotě během technologického procesu, kyselosti a tučnosti mléka a na samotném technologickém postupu. Po přidavku kultur se nechá pasterované mléko určitou dobu zrát až do doby, kdy se dosáhne požadované kyselosti zákysu. Kyselost mléka se před přidáním kultur pohybuje kolem 6,4 a fermentace se ukončí při hodnotě 4,95-4,9. Teplota při zaočkování je 21-24 °C. Kysání trvá asi 16 až 18 hodin. Po dosažení požadovaného pH se kultura začne promíchávat a zároveň chladit. Kultura má mít jemnou, ale hustou konzistenci a chuť by měla být čistě mléčně kyselá a aromatická s výraznou smetanovou vůní [15, 20, 22].

2.11 Příprava, vedení a formy bakteriálních kultur

Příprava mlékařských kultur představuje klíčovou operaci, na jejímž provedení závisí úspěch výroby mléčných výrobků. Dříve se bakteriální kultury používaly v tekutém stavu, kdy se po obdržení kultury musela zchladit na 5 °C a tentýž den se musela přeočkovat do sterilního mléka. Vytvořený matečný zákys se poté zaočkoval do mléka v nerezových zákysnicích, kde probíhala kultivace. Ve vychlazeném stavu se ponechal do provozního použití.

Použití mlékařských kultur v tekutém stavu, kultivovaných v mléce, patří k nejstarším způsobům aplikace. Vzhledem k riziku snížení aktivity expedičních kultur se preferuje dodávání sušených kultur. Sprejově sušené nebo lyofilizované kultury se používají pro přímé zaočkování kultury do mléka. Sušené kultury se mohou dopravovat již při běžných teplotách bez snížení aktivity.

Moderně jsou tedy používány kultury DVS (Direct Vat Set) pro přímé zaočkování do mléka, které obsahují nejméně $1-5 \cdot 10^{10}$ mikroorganismů na gram a slouží pro zaočkování 1000 až 1500 l mléka. DVS kultury se dodávají buď hluboce zamražené (při teplotě $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ a garance aktivity je 12 měsíců) nebo lyofilizované (při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ a garanci aktivity 12 měsíců). Hlavní výhodou těchto kultur ve formě koncentrátů s počtem mikroorganismů $10^{10}-10^{11}$ oproti tekutým kulturám s počtem mikroorganismů 10^8 v 1 g je vyšší a standardní aktivita, zaručená hygienická jakost, rovnováha jednotlivých druhů i kmenů s deklarovanou biochemickou a technologickou aktivitou. Dalšími výhodami je také omezení rizika špatného vedení kultur a snížení nebezpečí kontaminace zejména bakteriofágy. Základní mlékařské kultury v tekuté i sušené formě dodává tuzemská firma Laktoflora v Praze. Veškeré mlékařské kultury (DVS i zákysové) dodávají zahraniční výrobci, z nichž významné jsou firmy Christian Hansen (Dánsko, USA, Francie) a Danisco (Dánsko) [19, 26].



Obr. 2.6: Použití jednotlivých typů zákysového kultur a nutný počet kroků ve výrobním procesu při jejich použití (upraveno podle Mäyra-Mäkinen a Birget, 1998)[19]

2.12 Vady mlékařských kultur

Malá kyselost kultur bývá nejčastější příčinou špatného technologického postupu např. nižší nebo vyšší kultivační teplota, kratší doba zrání nebo je kultura napadena bakteriofágem. Další důvody, které způsobují malou kyselost jsou mléka zředěná vodou, mléka s nízkým obsahem bílkovin nebo s vysokým obsahem inhibičních látek, mléka konzervovaná nebo mikrobiologicky vadná. Delší doba zrání způsobí příliš vysokou kyselost kultur a to také může být příčinou vzniku vadného produktu. Pokud se použije mléko s vyšším obsahem bílkovin více

než 4 %, mléko s příliš vysokou virulencí nebo s vyšším obsahem růstových látek, získá se rovněž příliš kyselá kultura. Když je dojnice krmena zkaženými silážemi nebo česnekem a cibulí, snadno se znehodnotí i samotné mléko. Tato vada se nazývá krmivová příchut'.

Pokud je mléko napadené bakteriofágem, napadá specifický druh bakterií a způsobuje jejich lyzi [15, 27].

Bakteriofágy jsou virové částice šířící se vzduchem, které mohou napadat bakterie mléčného kvašení tím, že se přichytí na povrch buňky a vstříknou svou DNA do buňky. Tímto mechanismem bakteriofág ovládne metabolismus buňky, který se změní a produkuje nové fágy, které se pak uvolňují do okolního mlékárenského prostředí. Bakteriofágy jsou v podstatě paraziti, kteří se mohou rozmnožovat pouze v přítomnosti rostoucích bakterií. Nezpůsobují žádné poškození lidského organismu, zvířat nebo rostlin a nejsou původci lidských nemocí [13]. Bylo zjištěno, že jeho rozvoj v mléce roste s nižší kultivační teplotou nebo s nízkým procentem zaočkování. Delší doba množení bakterií podporuje rozvoj fágu přítomného v kultuře. Vlastní působení fága se projevuje buď zpomalením kysání a tím sníženou kyselostí nebo úplným zastavením kysání následkem rozkladu všech buněk [15]. Bakteriofág se do mléka dostává sekundární kontaminací. Za zdroj sekundární infekce v mlékárenském průmyslu se považují hlavně lidé, vzduch, voda používaná k čištění a syrovátka [20]. Bakteriofág je vysoce termorezistentní a vydrží desetiminutový záhřev na 70 °C. K jeho bezpečnému zničení dochází až při patnáctiminutovém záhřevu na 70 °C. Bakteriofág nebyl poškozen ani zmrazením a při vhodném pH ani vysušením. Zákysy, které se nesrážejí nebo slabě prokysávají, jsou často napadeny bakteriofágem. Fág může být delší dobu v kultuře přítomen, aniž by se jakýmkoliv způsobem projevil. Z antiseptik se zdá být neúčinnější vůči bakteriofágům napadajícím mlékařské kultury aktivní chlór. Musí být zajištěna sterilita prostředí a pracovního zařízení. Práci s kulturami a přípravou zákysů je nutno provádět na místě odděleném od vlastního provozu, které je vysoce dezinfikované a má nejvhodnější podmínky pro zajištění výskytu před fágem. Pomocí výzkumů se dociluje získání kultur, které jsou více rezistentní vůči fágům. V praxi se ale příliš nevyužívají, protože se zhoršuje jejich kysací schopnost. Jako účinnou ochranou proti bakteriofágům je používání směsných kultur a jejich rotace. Pokud se použijí čisté kultury, které obsahují pouze jeden druh mikroorganismů, prokysávání se zastaví hned od počátku. Při použití směsných kultur složených z několika druhů mikroorganismů se infekce bakteriofágem neprojeví úplným zastavením kysání, ale během kultivace kyselost stoupá. Avšak po skončení běžné doby kysání nedosahuje zákys požadované kyselosti. Rotací se pozměňují používané kultury tím, že se střídají jednotlivé fermenty, které obsahují jiné druhy bakterií. Aby nedocházelo k napadení kultur fágem, provádí se nepřetržitá rotace 2-5 kultur, které se obměňují nejlépe každý druhý den [6, 13, 15, 27].

2.13 Stanovení kyselosti mléka

Titrační kyselost

Titrační kyselost udává spotřebu roztoku NaOH – hydroxidu sodného o koncentraci 0,2500 mol.l⁻¹ potřebného na neutralizaci kyselce reagujících látek ve 100 ml mléka za přítomnosti indikátoru fenolftaleinu. Tato kyselost se uvádí v Soxhlet- Henkelových stupních (°SH). Podle soustavy SI by se měla uvádět v jednotkách mmol.l⁻¹, ale i přesto se nadále používá její vyjádření pomocí °SH. Kromě těchto jednotek se dříve používaly stupně podle Dornica (°D), podle Thörnera (°T) , popřípadě se udává v obsahu kyseliny mléčné v pro-

centech nebo gramech. Titrační kyselost čerstvého mléka se pohybuje kolem 7 °SH. Protože čerstvé mléko ještě neobsahuje zjištěné stopy kyseliny mléčné, je tedy tato počáteční kyselost podmíněna jinými složkami a to oxidem uhličitým, citráty, fosfáty, kaseinem a albuminem. Podle ČSN se za normální mléko považuje to, které má titrační kyselost v rozmezí 6,2-7,8 °SH. Pokud je mléko s kyselostí pod 5 °SH, je vodnaté, namodralé a pochází obvykle od dojníc se zánětem vemene. Mléko nad 8 °SH pochází od dojníc po otelení a v průběhu první laktace.

Kyselost mléka ovlivňuje několik vlivů, které způsobují drobné výkyvy. Mírné kolísání nastává mezi jednotlivými nádoji a ze dne na den. Ke konci laktace nastává obvykle pokles kyselosti a naopak na začátku laktace má mléko vyšší kyselost. Složení krmiva nemá vliv na kyselost mléka [1, 12, 21].

Aktivní kyselost

Tato kyselost ovlivňuje celou řadu biologických a koloidně chemických pochodů. Aktivní kyselost u čerstvě nadojeného mléka se pohybuje v intervalu 6,4-6,8. Mléko má jako každá fyziologická tekutina pufrovací schopnost. Pokud se přidá malé množství kyseliny nebo zásady, nezmění se aktuální hodnota kyselosti. Tato schopnost se vysvětluje přítomností bílkovin, fosfátů a citrátů. Proto nejde zachytit první stadium rozkladu laktózy jako změnu pH, i když se již vytvořilo určité množství kyseliny mléčné. To má velký význam pro rozvoj a činnost těch mikroorganismů, které nesnášejí vysokou aktuální kyselost. Bez tlumivé schopnosti by většina mikroorganismů odumřela a nesplnila by tak svou technologickou funkci. U mléka je tedy lepší zjišťovat titrační kyselost než aktivní [1, 21, 26].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Složení bakteriálních kultur

a) Mezofilní kultury

Ferment I

Kultura obsahuje směs kmenů: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

Lactococcus lactis subsp. *lactis*

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*

Leuconostoc mesenteroides subsp. *cremoris*

Ferment II

Kultura obsahuje směs kmenů: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

Lactococcus lactis subsp. *lactis*

Lactococcus lactis subsp. *diacetylactis*

Leuconostoc mesenteroides subsp. *cremoris*

Ferment III

Kultura obsahuje směs kmenů: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Lactococcus lactis subsp. *cremoris*

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*

Leuconostoc mesenteroides subsp. *cremoris*

b) Termofilní kultury

Používaná monokultura: *Streptococcus thermophilus*

3.2 Metody použité pro stanovení metabolické aktivity zákysů

a) Měření pH

Pomocí pH-metru typu WTW PH 197i bylo měřeno pH. Přístroj je pravidelně kalibrován a pH je stanoveno s přesností na dvě desetinná místa. Pomocí pH-metru se měří aktivní kyselost mléka. Jednostonková vpichová elektroda byla složena ze zpevněné skleněné elektrody kombinované s chlorstříbrnou referenční elektrodou. Tato elektroda se zavedla přímo do vzorku a stanovila se hodnota pH [20].

Protože je pH velmi závislé na teplotě, provádělo se kontrolní měření kyselosti titrací. Její hodnota není závislá na teplotě, a proto je to lepší a přesnější metoda [9].

b) Měření titrační kyselosti

Stanovení kyselosti se provádí referenční metodou dle ČSN pro mléko, mléčné nápoje a syrovátku. Titrace byla provedena 0,2500 mol.l⁻¹ roztokem hydroxidu sodného NaOH za přídavku indikátoru 2 % roztoku fenolftaleinu. Do Erlenmayerovy baňky se odměřilo 50 ml mléka a 1 ml indikátoru fenolftaleinu a titrovalo se NaOH do růžového zbarvení, které bylo projevem bodu ekvivalence a jeho zbarvení vydrželo 1 min. Výsledek se vyjádří jako číslo spotřebovaných ml 0,25 mol. l⁻¹ NaOH na 100 ml vzorku, což je vyjádření dle Soxhlet/Henkela (°SH) [10].

c) Měření teploty

Teplota byla měřena pomocí digitálního vpichového teploměru typu Testo-106-T1, který měří s přesností na jedno desetinné místo. Teploměr je pravidelně kalibrován. Teplota byla měřena přímo v zákysníku pomocí tohoto přenosného teploměru [20].

3.3 Sledování kysací aktivity zákysů ve výrobním procesu

Kysací aktivita slouží k vyjádření kysací schopnosti používaných zákysů. Jednotlivé druhy používaných kultur produkují mléčnou kyselinu různou rychlostí. Kysací aktivita slouží jako nepřímé stanovení růstové křivky.

Aktivita používaných fermentů se prováděla pro zákys starý 10 a 30 hodin uchovaný při skladovací teplotě. Jako aktivita je myšlen rozdíl pH pasterovaného a sterilního mléka v čase 0 a po 6 hodinách inkubace. Testy aktivity byly prováděny pro používané mezofilní a termofilní zákysy. Principem metody je zjistit kysací schopnost používaných zákysů v časovém intervalu 6 hodin. Zákys přidáný do pasterovaného mléka zkvašuje laktosu určitou rychlostí. Čím více klesne pH po 6 hodinách kultivace, tím větší má daný zákys aktivitu a tím více vzniká kyseliny mléčné. Sledování aktivity zákysů je důležité pro správné a dostatečné prokysávání sýrů.

a) Test aktivity pro mezofilní zákys

Odebraný vzorek zákysu se umístil do malé sterilní zkumavky a uložil se do lednice. Sterilní pipetou se odpipetovalo dvakrát 20 ml pasterovaného a sterilního mléka do sterilních zkumavek. Zkumavky se vložily do vodní lázně (30 °C) a nechaly se temperovat 15 minut s častým promícháváním. Poté se všechny zkumavky vyjmuly a sterilní pipetou se do každé přidal 1 ml mezofilního zákysu. U jedné zkumavky pasterovaného mléka a jedné zkumavky sterilního mléka se ihned po promíchání změřilo pH a zapsal se čas 0. Druhá dvojice se po promíchání vložila zpět do vodní lázně a po 6 hodinách inkubace se vyjmula a po promíchání se proměřilo pH. Z rozdílu hodnot pH v čase 0 a po 6 hodinách se zjistila aktivita mezofilního fermentu v pasterovaném a ve sterilním mléce.

b) Test aktivity pro termofilní zákys

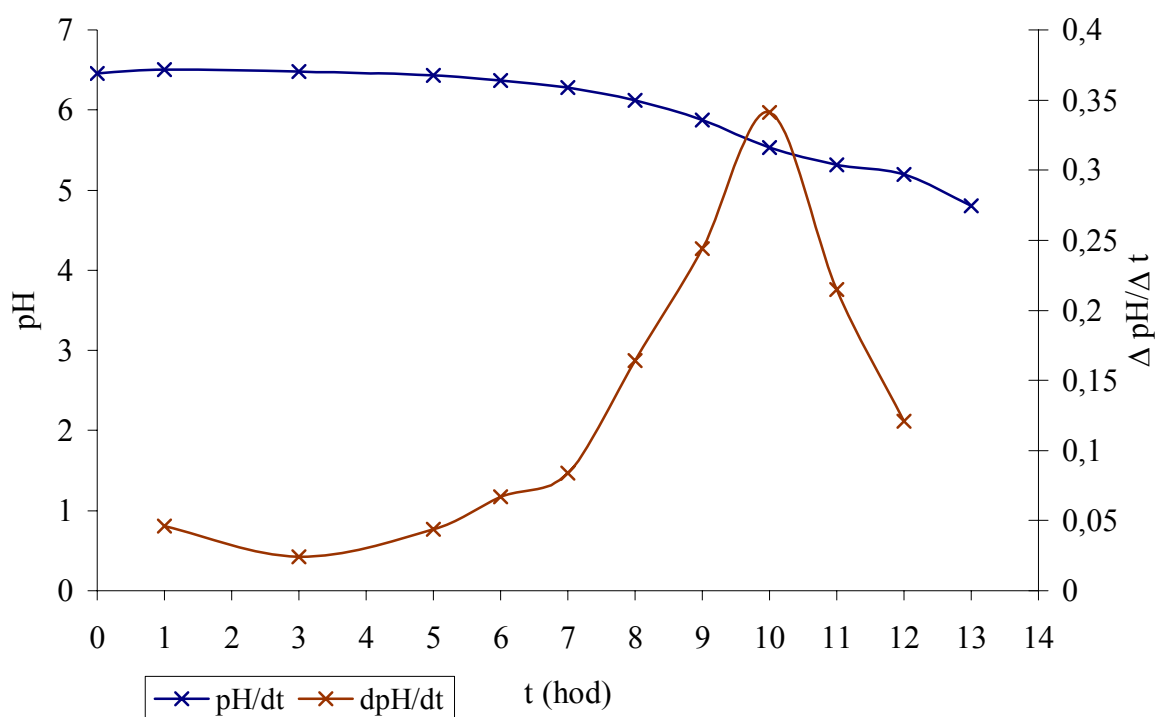
Nejdříve se odvážilo 0,5 U (garantováno výrobcem) termofilní DVS kultury a kultura se rozpustila ve 100 ml fyziologického roztoku. Sterilní pipetou se odpipetovalo dvakrát 20 ml pasterovaného a sterilního mléka do sterilní zkumavky. S častým promícháváním se vložily do vodní lázně (42 °C) a nechaly se temperovat 15 minut. Po vyjmutí z lázně se do všech zkumavek přidal dokonale rozpuštěný roztok termofilu. U první dvojice pasterovaného a sterilního mléka se opět ihned změřilo pH při teplotě 42 °C a zaznamenal čas 0. Druhá dvojice se umístila zpět do vodní lázně a po 5 hodinách se změřilo pH. Z rozdílu hodnot pH se stanovila aktivita termofilního zákysu v pasterovaném a sterilním mléce.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Kysací křivky používaných mléčných bakterií

Průběhy kysacích křivek jednotlivých bakterií byly sledovány v hodinových intervalech od doby přidání fermentu po čas, kdy se dosáhlo pH 4,9-4,95. Po dosažení požadovaného pH se daný zákys začal chladit a míchat. Při každém měření se zjišťovala teplota, titrační kyselost a pH. Růstová křivka může být sestrojena jako přímé nebo nepřímé stanovení. Za daných podmínek nelze stanovit růstovou křivku přímo, tedy sledovat vývoj celkového počtu mikroorganismů v čase, což by bylo nejpřesnější, ale používá se nepřímé stanovení sledováním metabolických produktů mikroorganismů, v tomto případě se jedná o tvorbu kyseliny mléčné, kdy rychlost její tvorby je teoreticky odrazem rychlosti růstu mikroorganismů. Tuto kyselinu lze stanovit přímou titrací nebo pomocí pH.

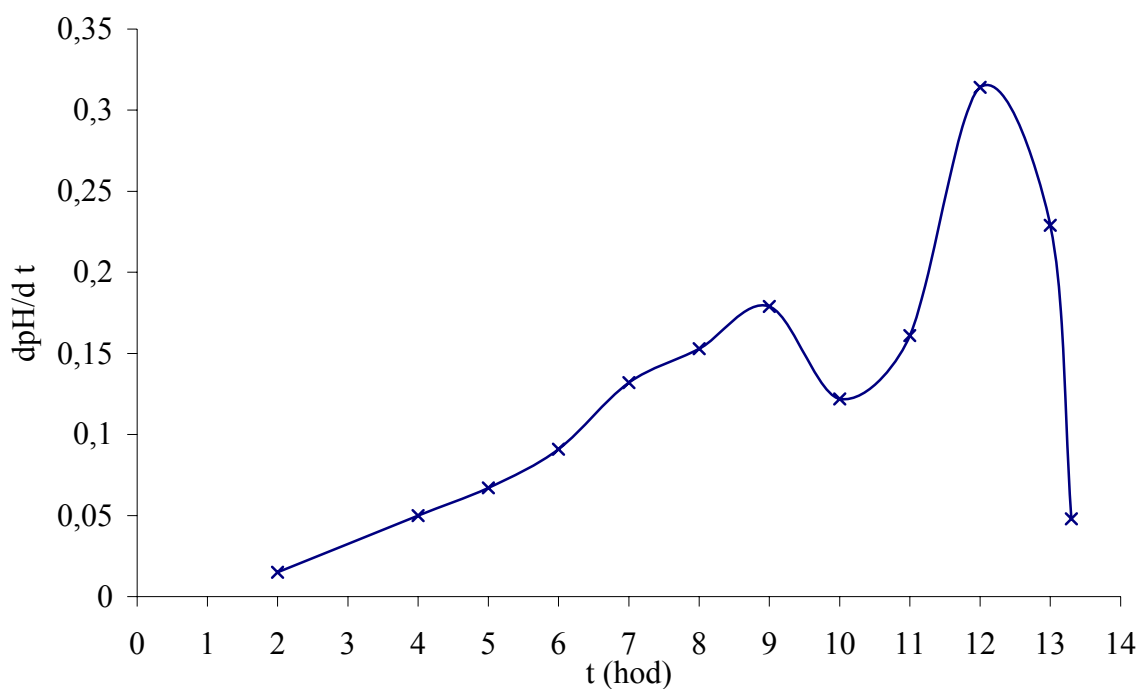
V grafu 1 jsou uvedeny dvě možnosti grafického zobrazení nepřímého stanovení růstové křivky. Kyselost lze vyjádřit jako závislost pH (nebo °SH) na čase nebo jako derivaci pH (nebo derivaci °SH) na čase. Z grafu 1 vyplývá, že vyjádření kyselosti její derivací v čase je vhodnější, protože je při něm zřetelně vidět tvar křivky, její maximum i celkový průběh růstu. Proto se dále pracuje pouze s derivacemi křivek podle času.



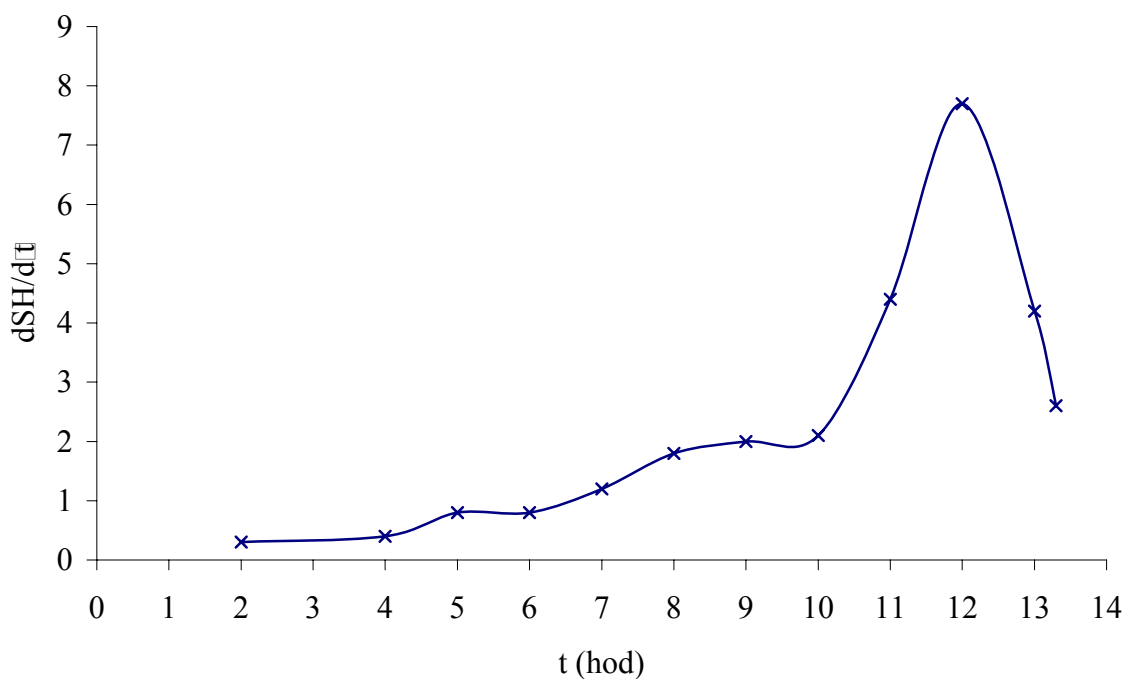
Graf 1: Nepřímé sestavení růstové křivky bakterií

Růstové křivky byly sestrojeny pro tři typy používaných mezofilních zákysů, které jsou uvedeny na grafech 2-7. Pro každý zákys je uvedena závislost $\Delta \text{pH}/\Delta t$ a $\Delta \text{°SH}/\Delta t$.

Ferment I

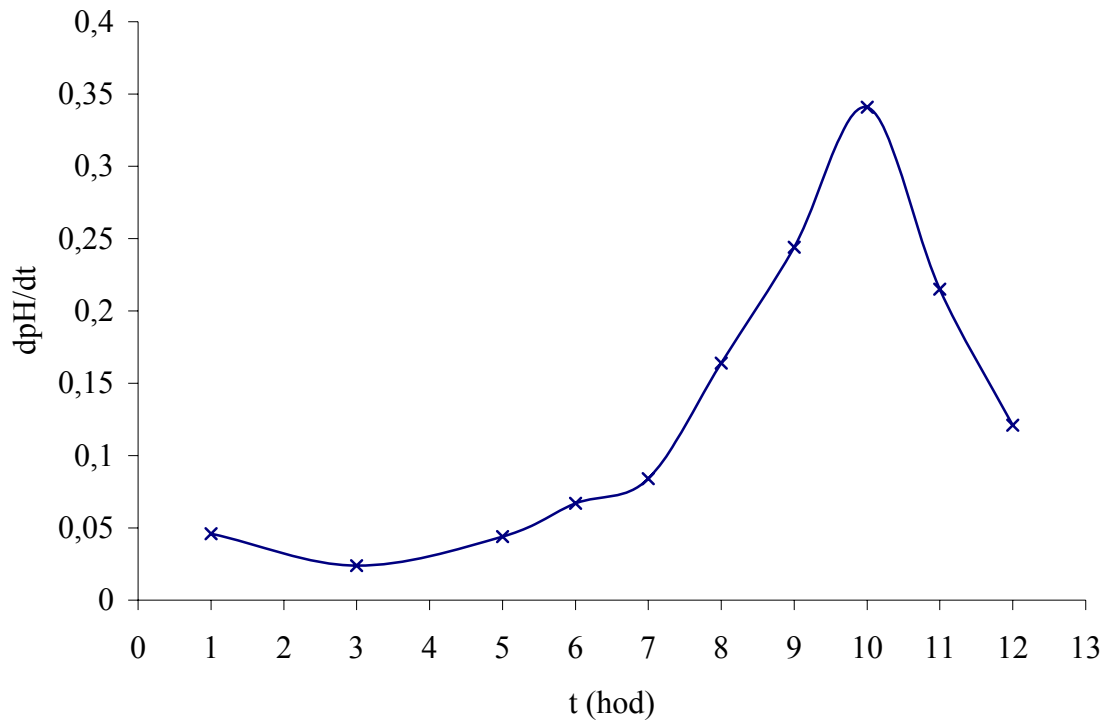


Graf 2: dpH/dt (při teplotě 24,5 °C), měření bylo provedeno 4. 9. 2007 pro ferment I

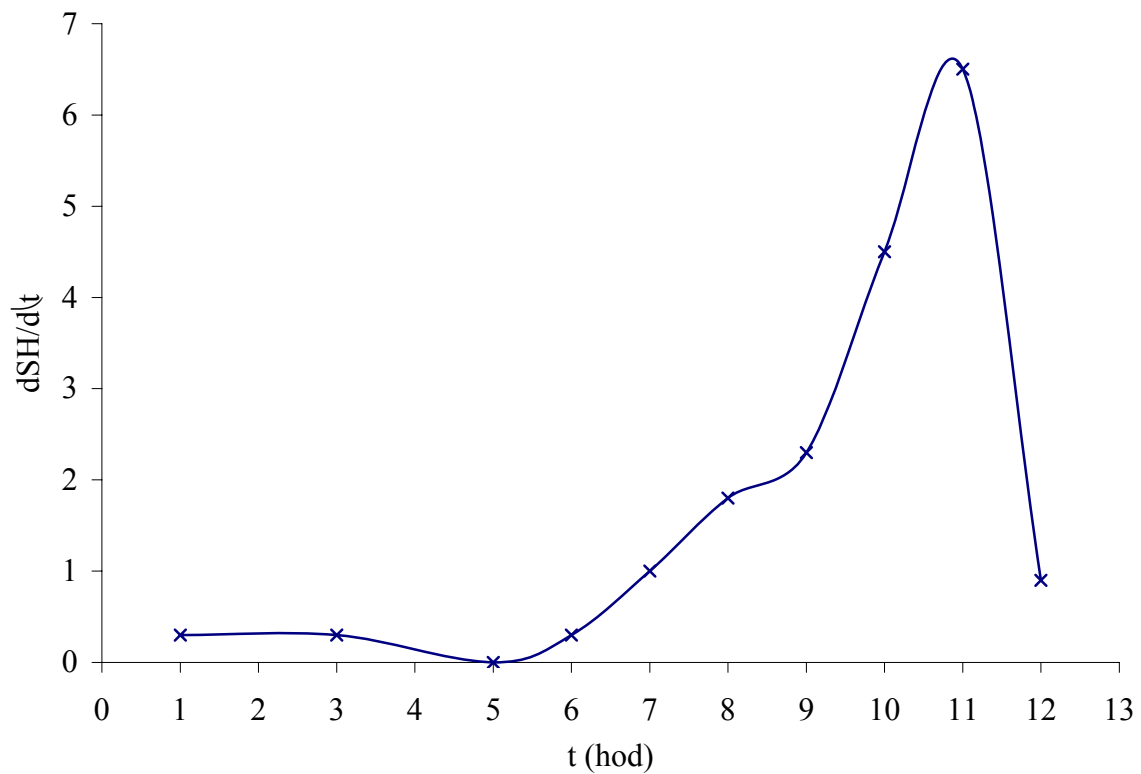


Graf 3: dSH/dt (při teplotě 24,5°C), měření bylo provedeno 4. 9. 2007 pro ferment I

Ferment II

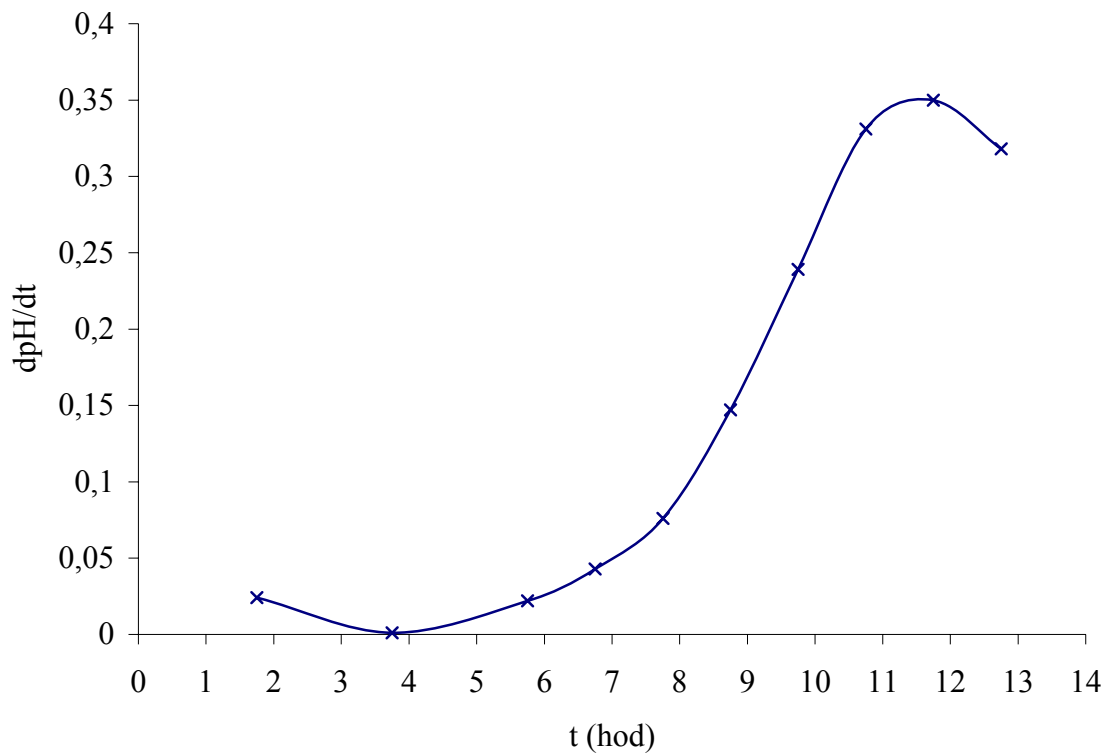


Graf 4: dpH/dt (při teplotě $24,5^{\circ}\text{C}$), měření bylo provedeno 6. 8. 2007 pro ferment II

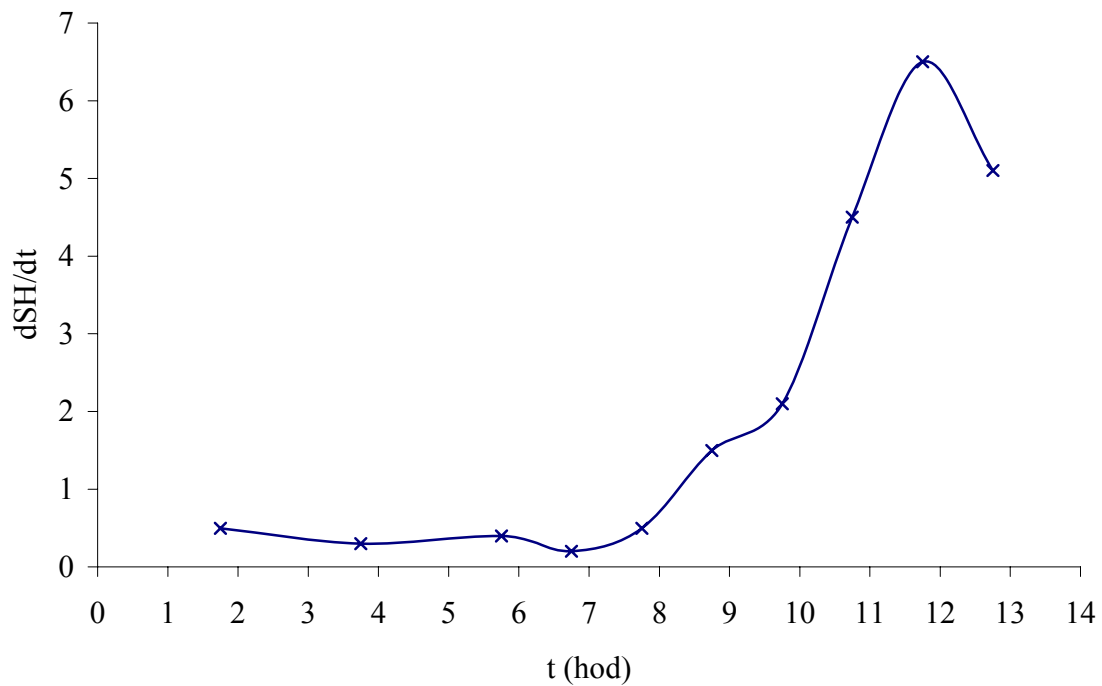


Graf 5: dSH/dt (při teplotě $24,5^{\circ}\text{C}$), měření bylo provedeno 6. 8. 2007 pro ferment II

Ferment III



Graf 6: dpH/dt (při teplotě $24,5^{\circ}C$), měření bylo provedeno 27. 8. 2007 pro ferment III



Graf 7: dSH/dt (při teplotě $24,5^{\circ}C$), měření bylo provedeno 27. 8. 2007 pro ferment III

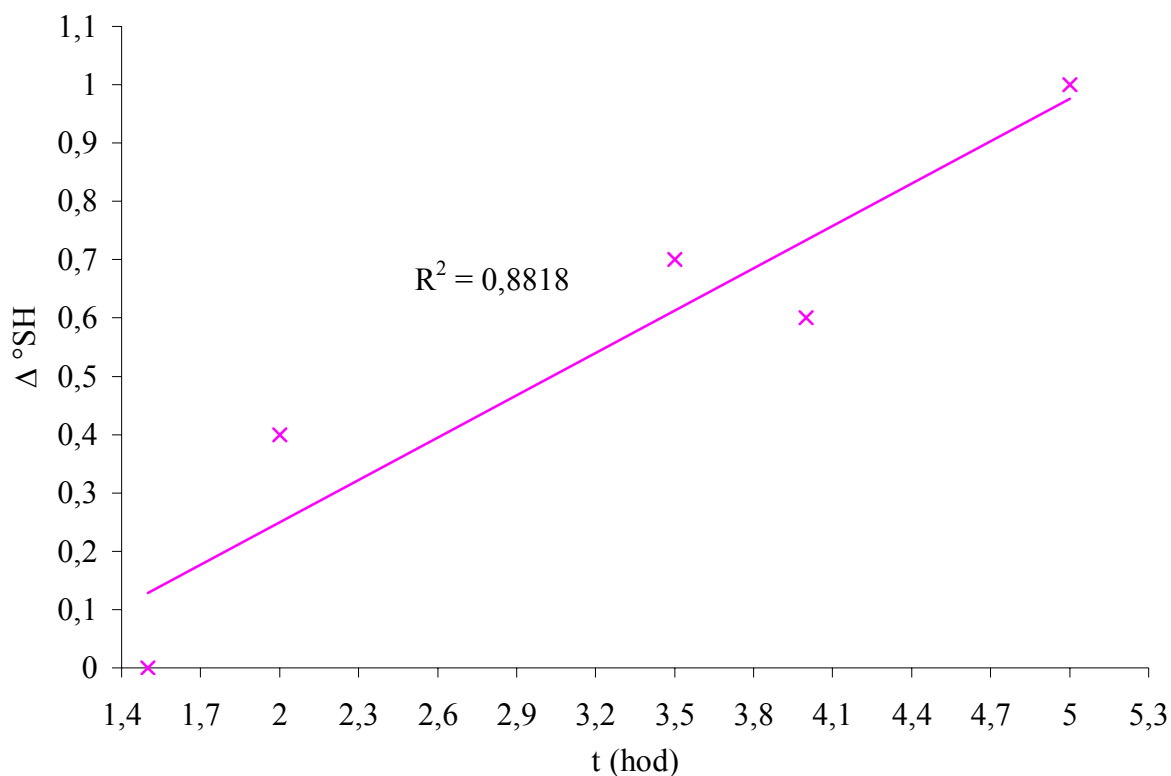
Tab. 4.1: Srovnání používaných fermentů při stejné teplotě kultivace 24,5 °C

	Ferment I	Ferment II	Ferment III
$\Delta \text{°SH}_{\text{max}}$	7,7	6,55	6,5
$\Delta \text{pH}_{\text{max}}$	0,314	0,341	0,35
t_{max} (hod) dle grafu $\Delta \text{pH}/\Delta t$	12	10	11,75
t_{max} (hod) dle grafu $\Delta \text{°SH}/\Delta t$	12	11	11,75

Používané mezofilní fermenty se mezi sebou liší jak v hodnotě kyselosti maximálního píku, tak i v čase dosažení tohoto píku. Po zaočkování mléka kulturou se kyselina mléčná tvořila pozvolně a její nárůst byl zaznamenán nejdříve u fermentu II po 6 hodinách kultivace. Ferment II dosáhl nejdříve i maximálního píku kyselosti. Směsná kultura používaná pro ferment I má pomalejší využívání laktózy a proto byla doba dosažení maximálního píku delší než u ostatních fermentů. Průběh křivky u fermentu III je obdobný jako u fermentu I. Pro srovnání obsahu kyseliny mléčné se u zákysů použila hodnota titrační kyselosti, která není závislá na teplotě jako je tomu u měření kyselosti pH-metrem. Z křivek je také možné vyčíst, kdy dochází k nejrychlejší tvorbě kyseliny mléčné ($\Delta \text{°SH}_{\text{max}}$). Tento bod je možné považovat za ideální okamžik pro začátek chlazení zákysu. Nepřímo tak poukazuje na stacionární fázi růstové křivky. Doba dosažení maximálního píku křivky je podle závislosti $\Delta \text{°SH}/\Delta t$ i $\Delta \text{pH}/\Delta t$ téměř shodná. Z toho vyplývá, že kyselost se může sledovat jen v $\Delta \text{pH}/\Delta t$ nebo v $\Delta \text{°SH}/\Delta t$.

4.2 Porovnání čerstvého zákysu a po 30-ti hodinách skladování

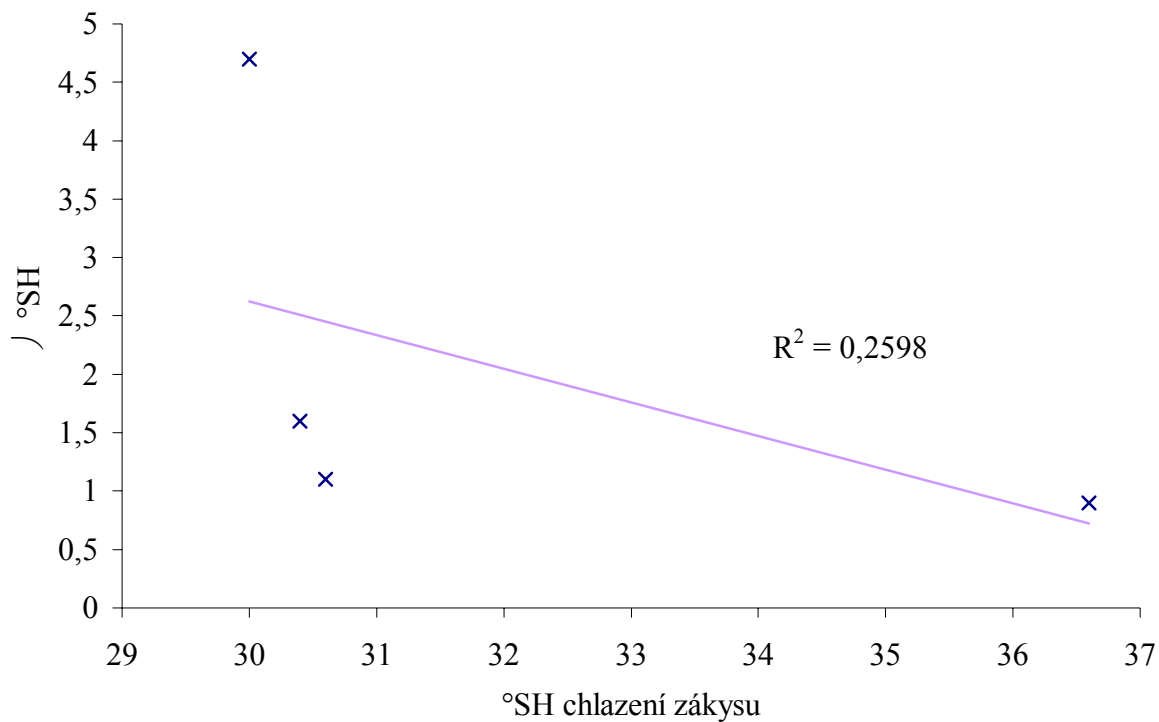
Dostatečně prokysaný zákys byl zchlazen na teplotu skladování 4-5 °C. Po 30-ti hodinách skladování byl sterilně odebrán vzorek zákysu a stanovila se jeho aktivita ve sterilním a výrobním mléce. Zákys je uchováván při tak nízké teplotě, aby nedocházelo k dalšímu prokysávání. Přesto se tvoří malé množství kyseliny mléčné a tím se snižuje aktivita zákysu. Dalším faktorem změny kyselosti po 30-ti hodinách skladování je stres buněk z důvodu nízké teploty. Dochází k jejich úhynu a tím se také snižuje aktivita zákysu. V grafu 8 je zaznamenána závislost rychlosti zchlazení na požadovanou teplotu 5 °C a změna kyselosti vychlazeného zákysu a zákysu po 30-ti hodinách skladování.



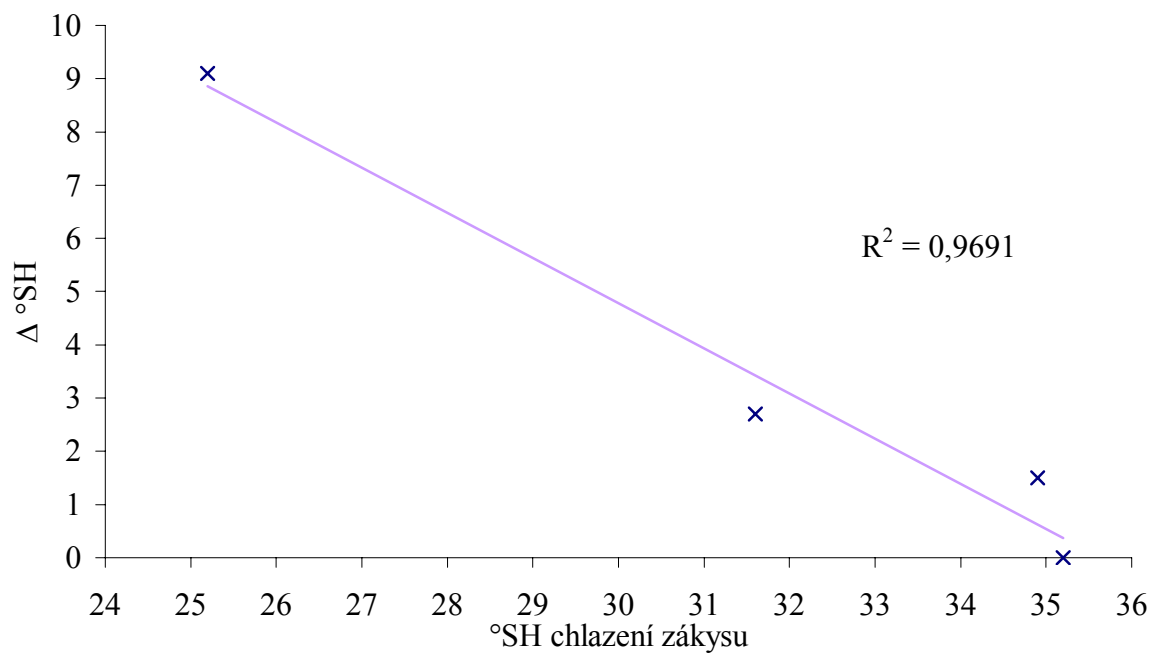
Graf 8: $\Delta^{\circ}SH$ po 30-ti hod. skladování v závislosti na délce chlazení zákysu (tj. dosažení 5 °C), uvedeno pro ferment II

Z grafu 8 vyplývá, že při zchlazení zákysu pod 5 °C do dvou hodin je rychle omezená schopnost dalšího prokysávání a nedochází tak k velkému vyčerpání bakterií. Při zchlazení zákysu pod 5 °C za 3-4 hodiny není dostatečně rychle zastavena schopnost dalšího prokysávání a bakterie tak dále fermentují laktosu. Tím dochází k jejich vyčerpávání. Následkem je snížená aktivita výsledného zákysu při jeho použití. Dalšími faktory snižující aktivitu je hromadění dalších metabolitů a působení stresových faktorů (nízká teplota).

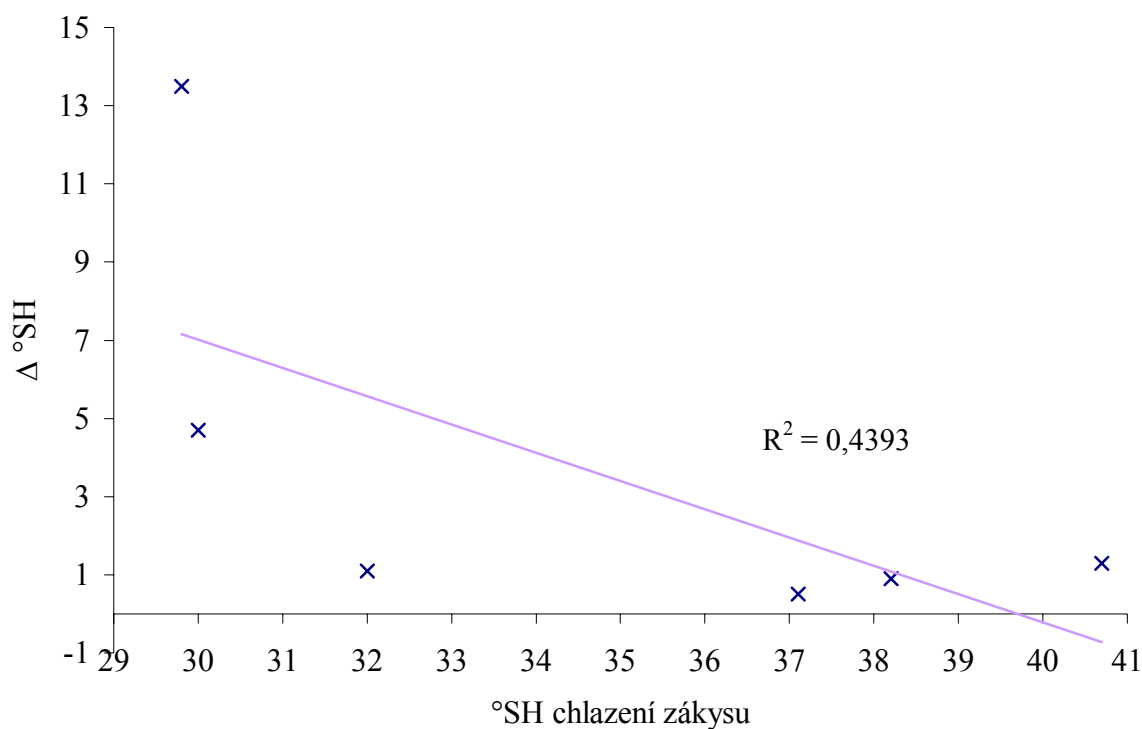
Na grafech 9, 10, 11 je znázorněna změna kyselosti čerstvého zákysu a zákysu před použitím (30 hod.) v závislosti na kyselosti zákysu na začátku chlazení pro všechny fermenty.



Graf 9: Δ °SH po 30-ti hod. skladování v závislosti na SH chlazení, pro ferment I



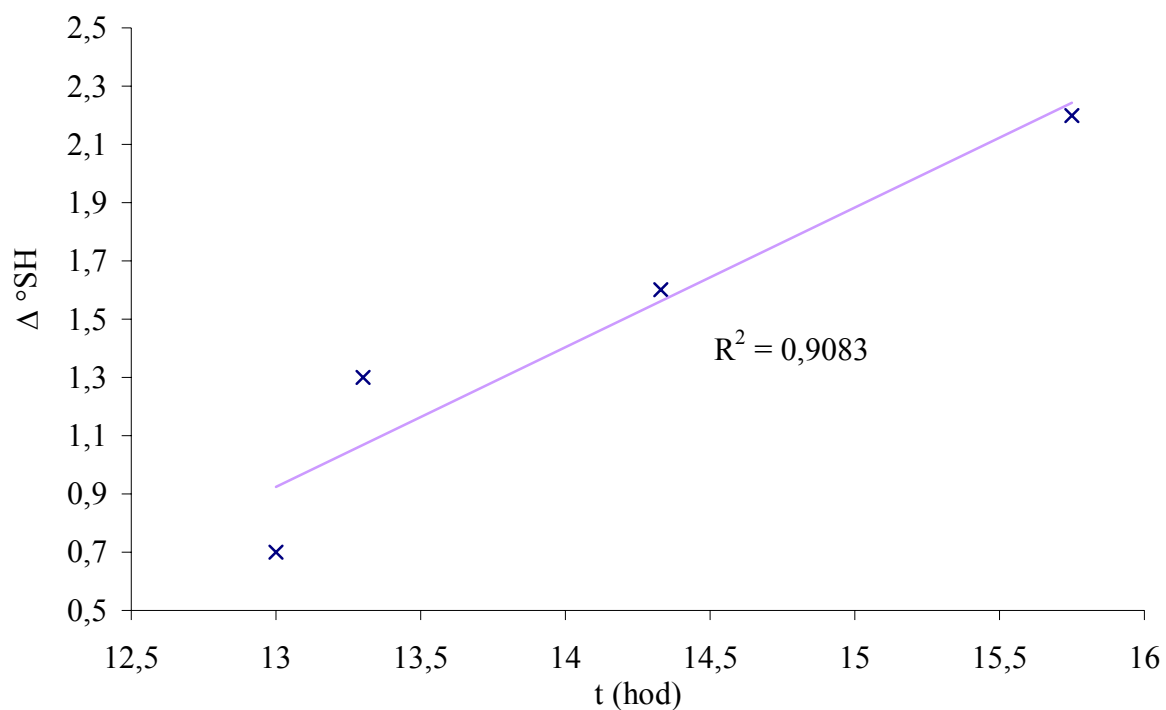
Graf 10: Δ °SH po 30-ti hod. skladování v závislosti na SH chlazení, pro ferment II



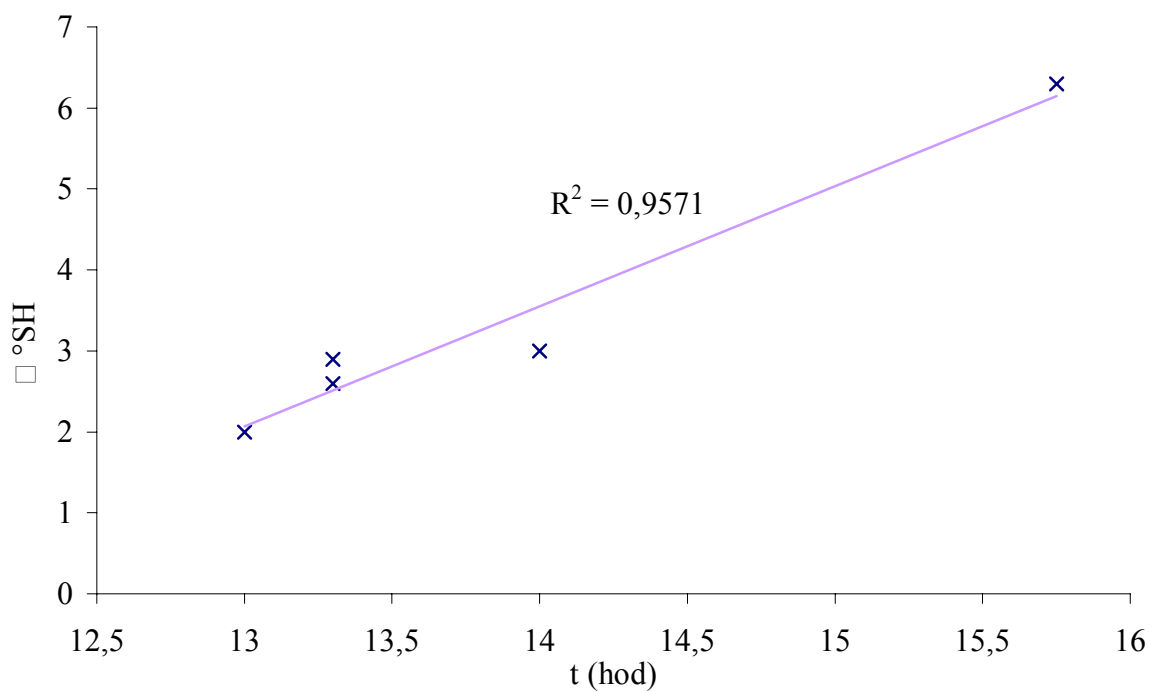
Graf 11: Δ °SH po 30-ti hod. skladování v závislosti na SH chlazení, pro ferment III

Zchlazení kultury po dosažení požadované úrovně kyselosti má zastavit bakteriální růst a tak zachovat vysoký stupeň aktivity kultury. Proto se daný zákys chladí na teplotu 4 °C, při které se uchovává až do jeho použití. Avšak i při této nízké teplotě dochází k malé tvorbě kyseliny mléčné. Změna titrační kyselosti od okamžiku chlazení do použití v závislosti na kyselosti začátku chlazení napovídá o tom, že čím více je zákys kyselejší na začátku chlazení, tím méně se jeho hodnota kyselosti změní do použití, tedy po 30-ti hodinách skladování. Tomuto chování nejvíce odpovídá ferment II. Pro fermenty I a III je změna kyselosti nejvýraznější při 30 °SH. Pro vyšší hodnoty titrační kyselosti je změna aktivity kultury téměř konstantní. Pokud by byla doba skladování zákysu příliš dlouhá, bakterie by vyčerpaly jediný zdroj energie v mléku – laktosu a další množství kyseliny mléčné by se prakticky netvořilo.

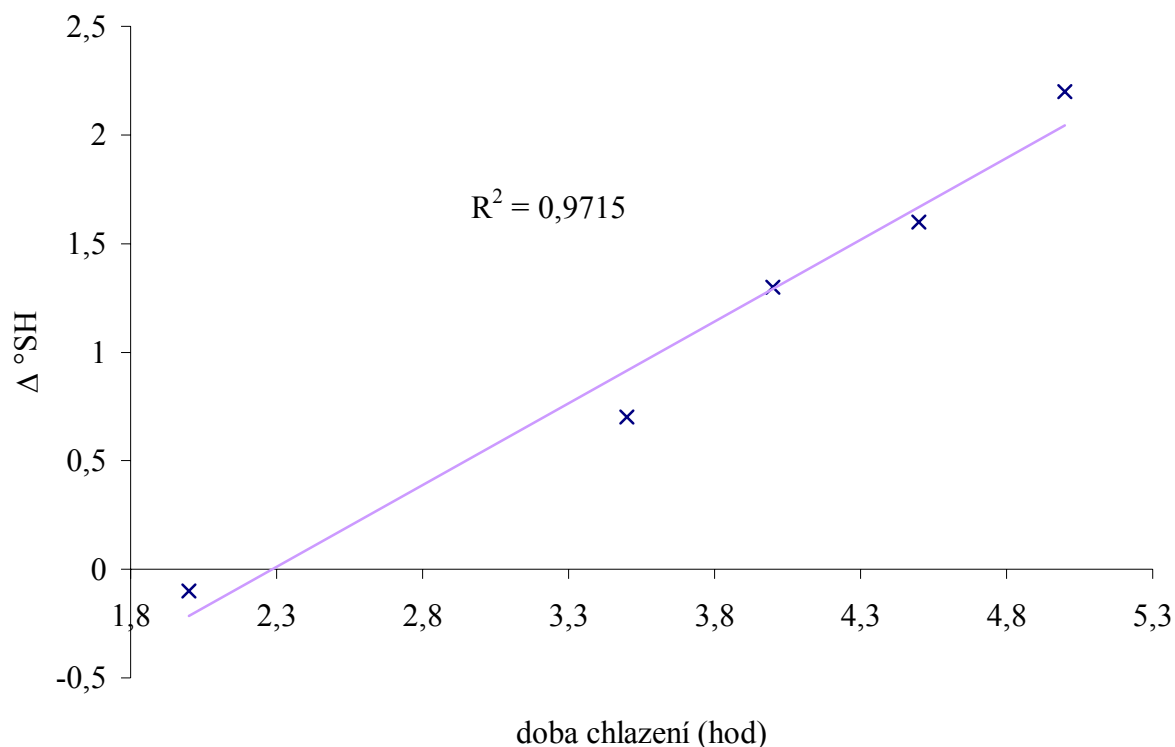
4.3 Změny zákysu po 10-ti hod. skladování



Graf 12: Závislost $\Delta \text{ }^\circ\text{SH}$ po 10-ti hod. skladování na t_{\max} růstové křivky, pro ferment I

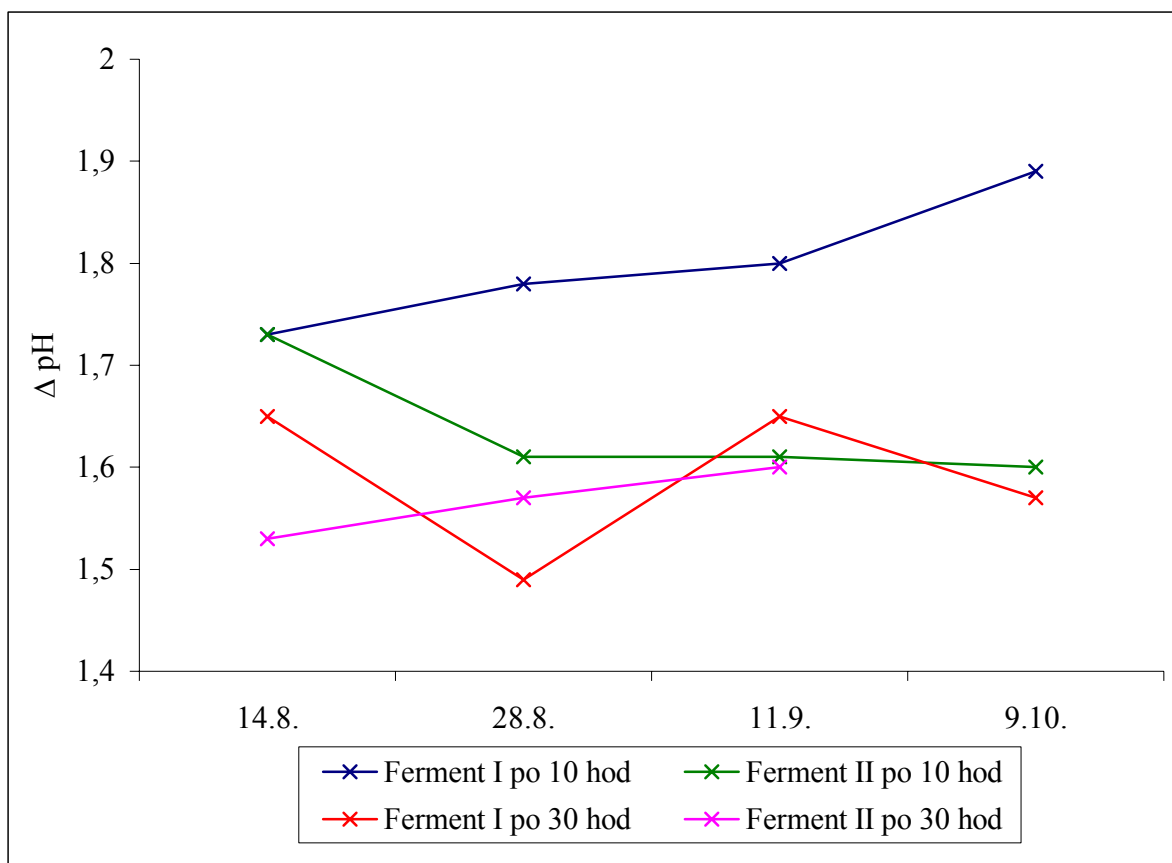


Graf 13: Závislost $\Delta \text{ }^\circ\text{SH}_{\max} / t_{\max}$, pro ferment I



Graf č. 14: Závislost Δ °SH po 10-ti hod. skladování na délce chlazení zákysu, pro ferment I

Grafy 12, 13, 14 udávají závislosti změn kyselosti čerstvého zákysu a po 10-ti hod. skladování na kultivačních podmínkách pro nejpoužívanější ferment I. Změna kyselosti zákysu je tím menší, čím kratší dobu trvá dosáhnutí maximálního píku růstové křivky. Čím delší je doba vzniku maximálního píku, tím více se mléko po 10-ti hodinách skladování okyselí a vznikne více kyseliny mléčné. Kultura nebude tolik aktivní. Při sledování změny kyselosti maximálního píku růstové křivky a době jejího vzniku je zřejmé, že čím déle trvá doba kysání zákysu, tím více vzniká kyseliny mléčné a vzniklý zákys je více kyselý. Sice vznikne kyselejší zákys, ale aktivita mléčných bakterií klesá, protože v mléku dochází laktosa, která je zdrojem jejich energie a klesá tak jejich činnost. Po fermentaci se zákys chladí na teplotu (4 °C), při které je kysací schopnost bakterií minimální. Při vyšší teplotě jejich činnost neustává v takové míře a mléko stále zkvašuje mléčný cukr. Tím se zákys stává méně aktivním. Je tedy důležité chladit zákys co nejdříve, aby docházelo k acidifikaci co nejméně. Pokles kultivační teploty na teplotu skladování musí být dostatečně rychlý, aby bakterie dál nezakvašovaly laktosu. Čím rychleji dojde ke snížení teploty, tím více zůstává zákys aktivnější.

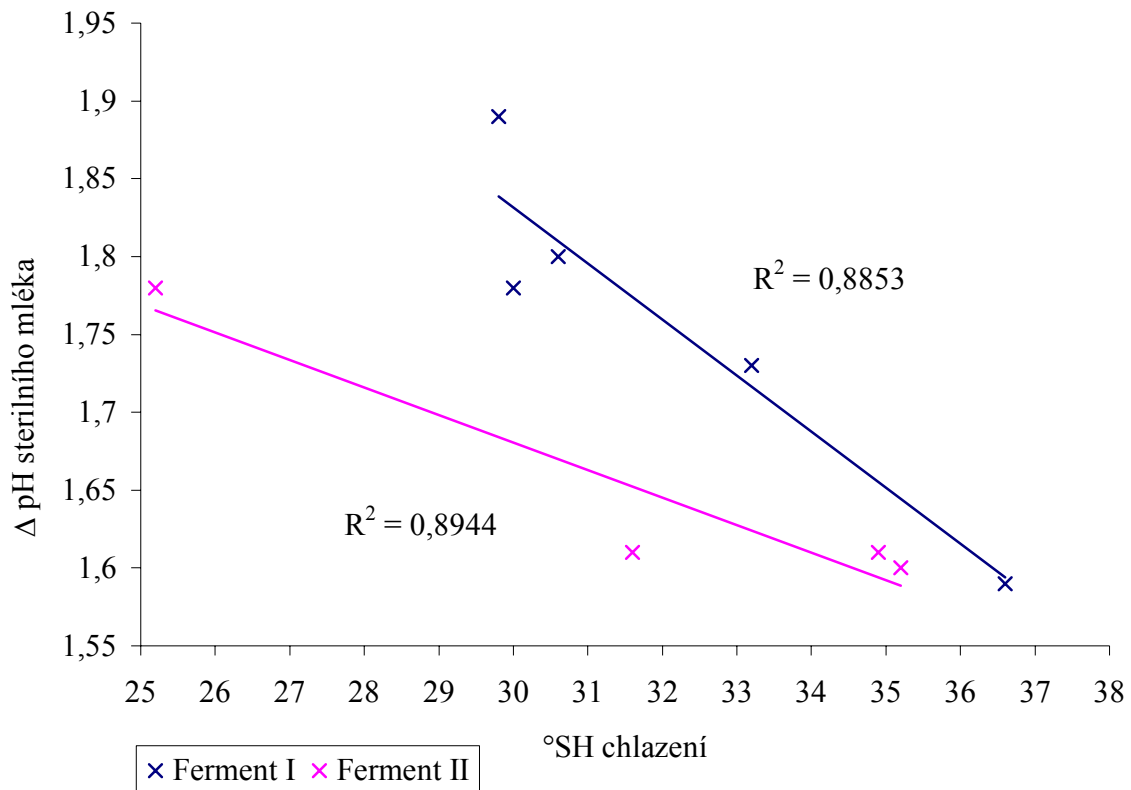


Graf 15: Srovnání aktivit ve sterilním mléce

V grafu 15 jsou znázorněny změny pH po 6-ti hodinách kultivace ve sterilním mléce. Změna pH, tedy aktivita zákysu, je po 6-ti hodinách kultivace větší pro fermenty po 10-ti hodinách skladování, protože zákys má ještě dostatek laktosy než po 30-ti hodinách skladování, kdy dochází k fermentaci méně. Bylo by tedy vhodné používat zákys již po 10-ti hodinách skladování. Složení sterilního mléka je stále stejné, proto neovlivňuje rychlost fermentace. Během skladování klesne aktivita průměrně u fermentu I o 11,5 % (rozmezí 5-17 %), u fermentu II o 5 % (rozmezí 1-12 %). Teoreticky by měla aktivita být téměř konstantní pouze s malými odchylkami. Její výkyvy jsou zřejmě způsobeny tím, že zákysy jsou po vychlazení pokaždé v jiné kondici nebo jsou skladovány při kolísající teplotě.

4.4 Metabolická aktivita čerstvého zákysu

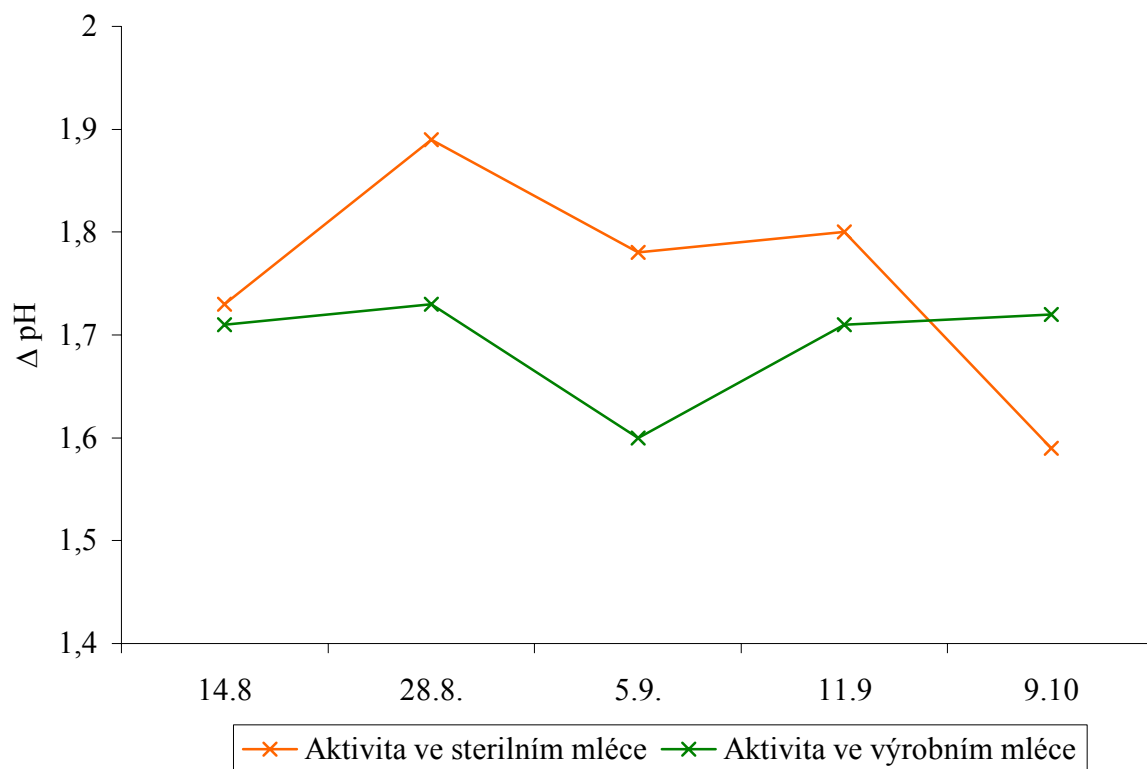
Metabolická aktivita se stanovuje jako změna pH po 6-ti hodinách kultivace ve sterilním a výrobním mléce. Změna pH poukazuje na rozdíly ve složení obou mlék, přitom sterilní mléko je svým složením nevhodnějším médiem.



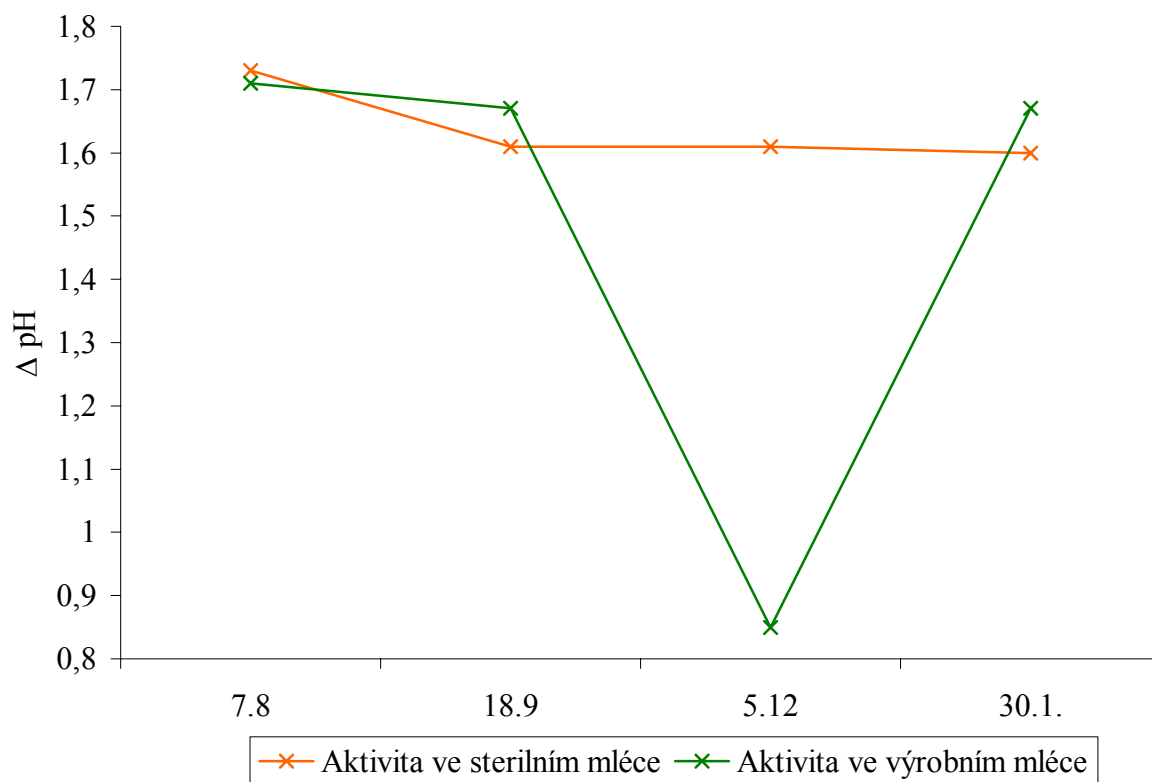
Graf 16: Závislost aktivity sterilního mléka na °SH chlazení zákysu, pro ferment I a II

Aktivita zákysů ve sterilním mléce je tím větší, čím menší je kyselost chlazeného zákysu. Z toho vyplývá, že pro maximální aktivitu fermentu I je nutné chladit zákys při kyselosti kolem 25 °SH a fermentu II pak při kyselosti 30-32 °SH. Chlazení kyselejších zákysů vede ke snížení jejich aktivity. Začátek chlazení byl zřejmě v tomto případě již na konci stacionární fáze nebo už ve fázi odumírání.

4.5 Metabolická aktivita mezofilního zákysu



Graf 17: Metabolická aktivita ve sterilním a výrobním mléce, pro zákys I



Graf 18: Metabolická aktivita ve sterilním a výrobním mléce, pro zákys II

Metabolická aktivita mezofilního zákysu ve sterilním mléce by měla být konstantní, protože aktivita mezofilu je garantována výrobcem a složení sterilního mléka je stále stejné. Výkyvy jsou způsobeny právě chybami spojenými s pomnožováním fermentu přímo v závodě (koncentrace obnoveného mléka, inkubační teplota, chlazení zákysů atd.). U výrobního mléka dochází k sezónním změnám složení mléka a především a hlavně výrobní mléko není ideálním médiem pro růst bakterií, je zde možný výskyt bakteriofága, kolísající množství živin (laktosa, minerální látky, vitamíny, peptidy...) a konkurence ve formě některých bakterií, které přežívají pasterační teplotu. Proto dochází i k nekonstantní aktivitě zákysu. Z měření změny aktivity během 6-ti hodinové inkubace lze vycházet, jak se zákys bude chovat během výrobního procesu.

Důvodem kolísající hodnoty aktivity v mléce je rozdílná aktivita vlastního fermentu. V podstatě mohou nastat tři případy:

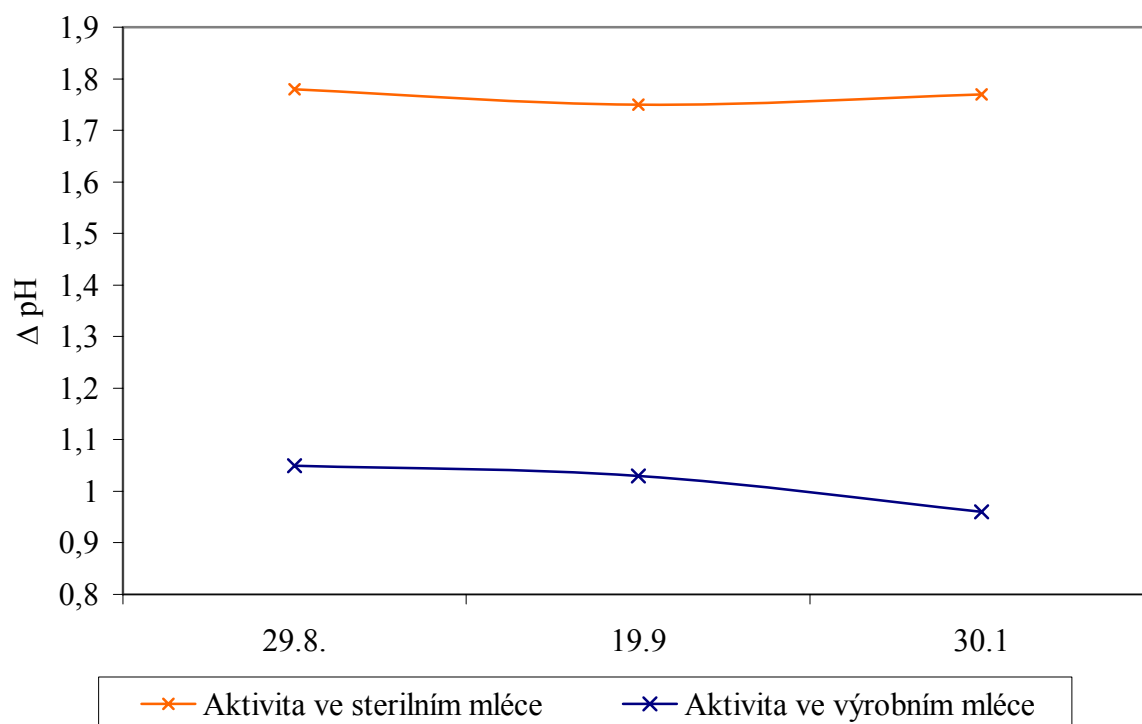
- a) ve sterilním i výrobním mléce je aktivita vysoká – zákys je správně připraven, je dostatečně aktivní
- b) ve sterilním mléce je aktivita vysoká, ve výrobním nízká – zákys je správně připraven, ale ve výrobním mléce jsou přítomny inhibitory zpomalující prokysávání
- c) ve sterilním i výrobním mléce je aktivita nízká – zákys je špatně připraven, je málo aktivní

Další příčinou špatné aktivity zákysu je přítomnost bakteriofágů nebo jiných inhibitorů ve výrobním mléce. V tomto případě je aktivita zákysu ve sterilním mléce průměrná a ve výrobním mléce velmi špatná.

Pokud dojde k narušení správného prokysávání, není změna pH tak výrazná a zákys nepracuje správně. Je méně aktivní.

Případ uvedený na grafu 18 dne 5. 12. ukazuje stav, kdy zákys prokysal ve sterilním mléce správně, ale ve výrobním ne. Z toho lze usuzovat, že zákys byl dostatečně aktivní, ale složení výrobního mléka nebylo pro něj vyhovující např. nedostatek vitaminů, minerálních látek atd.

4.6 Metabolická aktivita termofilního zákysu



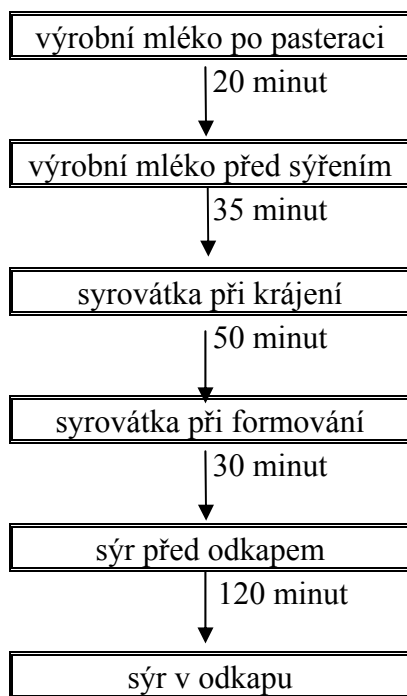
Graf 19: Aktivita termofilního zákysu ve sterilním a výrobním mléce

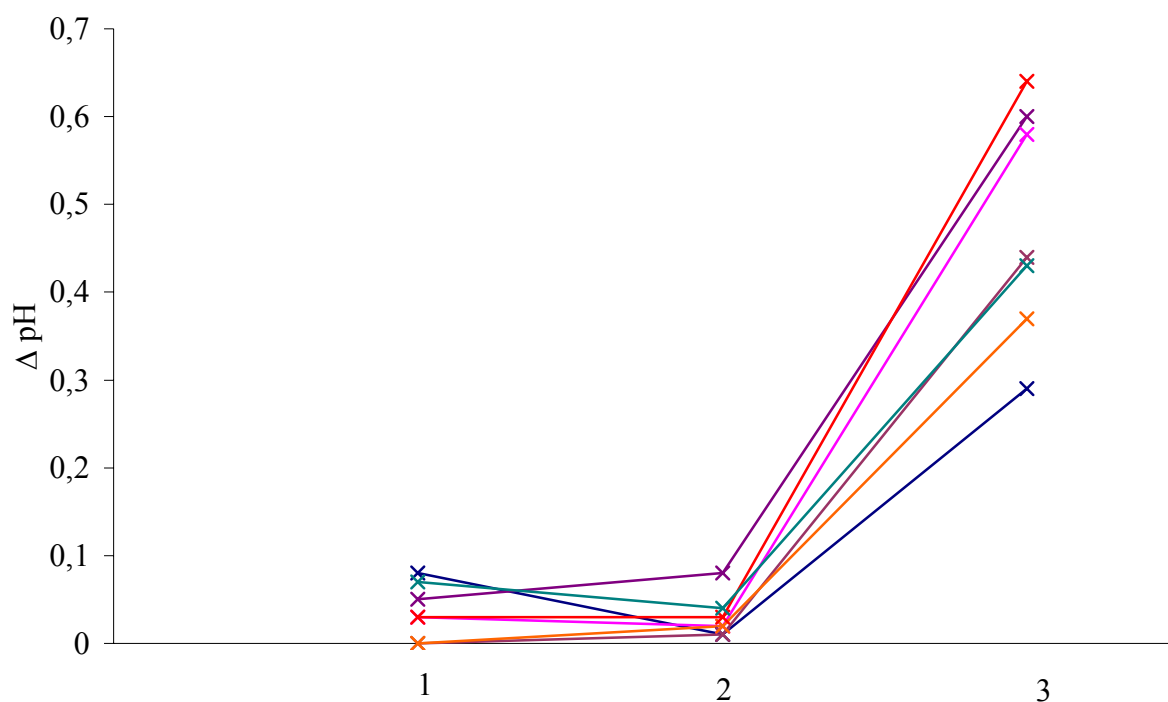
Garance aktivity fermentu výrobcem platí i v případě termofilního zákysu. Jelikož se termofilní zákys smíchává přímo s mlékem a není zde žádné pomnožování bakterií jako je tomu v případě mezofilního zákysu, nedochází k žádné chybě způsobené pomnožováním. Proto je aktivita termofilního zákysu ve sterilním mléce téměř konstantní. Anomálie jsou způsobeny chybou měření např. špatně rozpuštěný termofilní ferment, narušená sterilita, nestejná teplota vodní lázně nebo nepřesné dávkování fermentu. Aktivita termofilního zákysu ve výrobním mléce byla také konstantní i když byla její hodnota menší než změna pH u sterilního mléka. Výrobní mléko se svým složením liší od sterilního. To je hlavní příčinou snížené aktivity u výrobního mléka. Sterilní mléko má stále stejné složení, které dokonale vyhovuje požadavkům zákysu. U výrobního mléka se jeho složení sezónně mění. Metabolická aktivita je sice také téměř konstantní ale změna pH po 6-ti hodinách není tak výrazná jako je tomu u sterilního mléka.

Termofilní kultura je více náročná na složení mléka než mezofilní kultura. Nedostatek vitamínů a aminokyselin v mléce způsobuje menší aktivitu termofilu. Dále má termofil vyšší citlivost na bakteriofágy. Je třeba si uvědomit, že používaná termofilní kultura je monokultura, kdežto mezofilní se používá směsná. Po napadení kultury bakteriofágem je zničen jeden kmen bakterií. Pokud dojde k napadení fágem u monokultury, zůstane v médiu minimum mléčných bakterií, které mléko dostatečně neprokysají. Na rozdíl od směsné kultury, kde je více kmenů, které mohou dále přeměňovat laktosu na kyselinu. Jestliže je výsledná kultura (určitý poměr mezofilu a termofilu) napadena bakteriofágem, je narušen jejich vzájemný poměr a vznikne sýr s jinými sensorickými vlastnostmi.

4.7 Metabolická aktivita zákysů během výroby

V následujícím schématu jsou znázorněna jednotlivá místa odběru výrobního mléka, syrovátky a sýru, u kterých se měřila teplota, pH a titrační kyselost. Každý rozbor se prováděl v určitém časovém úseku, který je také znázorněn v následujícím schématu.

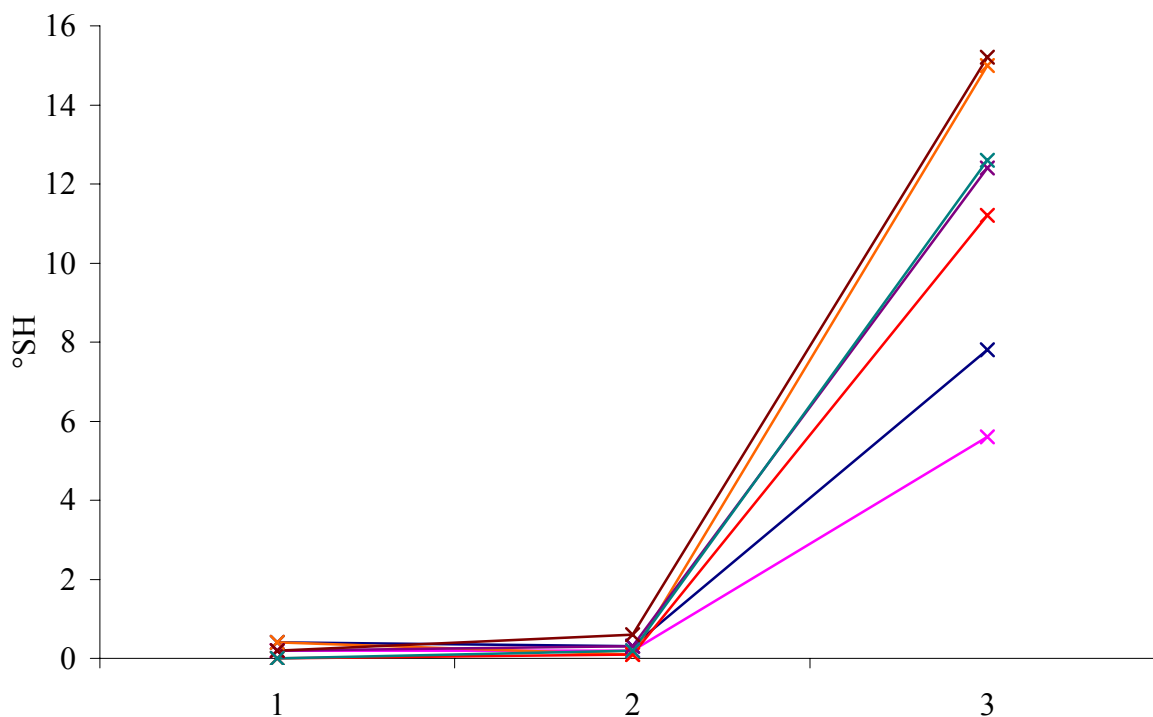




Graf 20: Průběh změn pH během výrobního procesu, pro všechny sledované výrobní procesy

Popisky osy x:

- 1- rozdíl pH mléka po pasteraci a mléka při sýření
- 2- rozdíl pH syrovátky při krájení a při formování
- 3- rozdíl pH sýru před odkapem a po 2,5 hodinách v odkapním sálu



Graf 21: Změna titrační kyselosti během výroby

Popisky osy x:

- 1- rozdíl titrační kyselosti u mléka po pasteraci a při sýření
- 2- rozdíl titrační kyselosti syrovátky při krájení a při formování
- 3- rozdíl titrační kyselosti sýru před odkapem a po 2,5 hodinách v odkapním sále

Rozdíl kyselosti mezi pasterací a sýřením mléka je minimální. Změna kyselosti syrovátky během procesu krájení a formování je téměř nulová. K největším změnám dochází až v odkapním sále u samotného sýru. Zde jsou také největší změny v teplotách. V ostatních krocích se teplota měnila o desetiny stupně, kdežto v odkapním sále se mění o jednotky. Proto je přesnější graf závislosti titrační kyselosti, která není závislá na teplotě jako je tomu u pH. Na začátku odkapu je sýr sladký a během 2,5 hodin se sýr stává kyselejší. V tomto procesu vzniká stále více kyseliny mléčné. Fermentaci zahajuje termofilní kultura a poté pokračuje mezofil. Tím vzniká typická chuť a aroma sledovaných sýrů. Změny pH a titrační kyselosti jsou uvedeny pro všechny sledované procesy výroby.

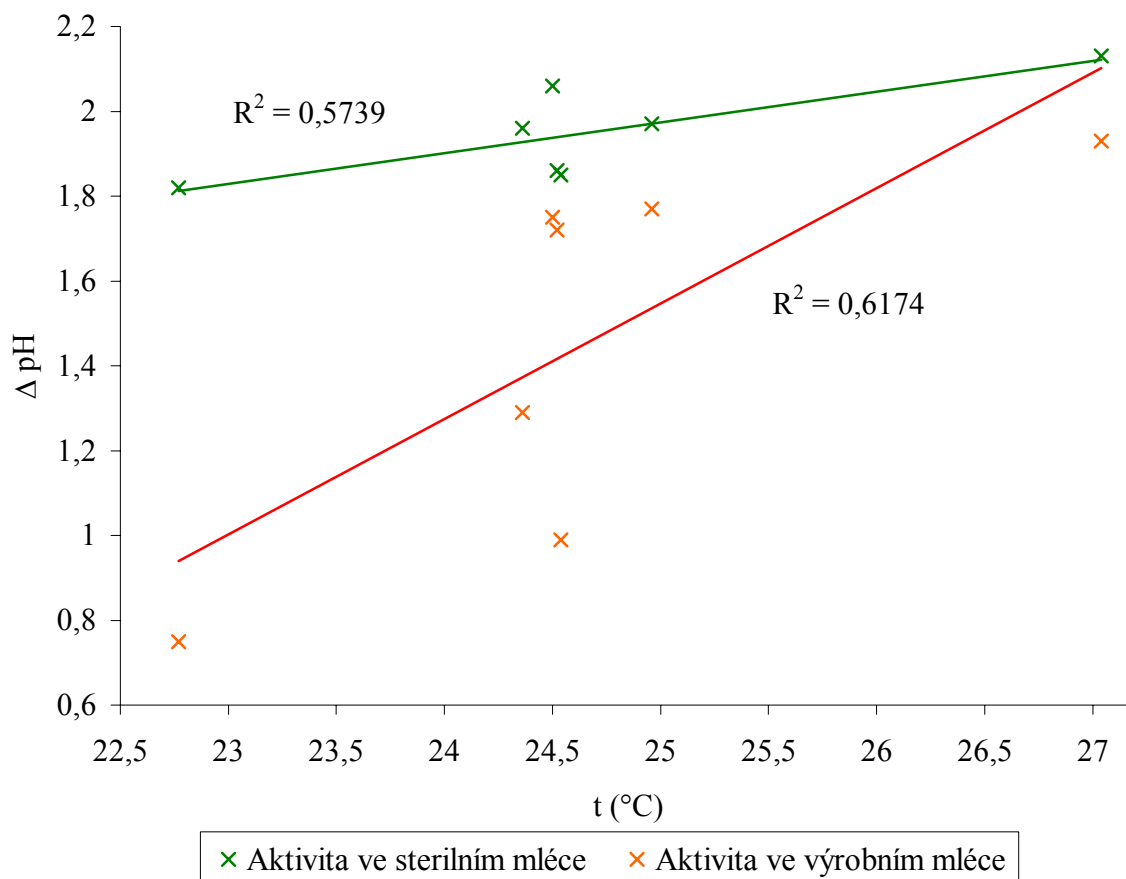
Vliv teploty na pH a titrační kyselost

Jak bylo uvedeno výše, pH je velmi závislé na teplotě, proto je přesnější používat k vyjádření kyselosti titrační kyselost °SH. V následující tabulce jsou uvedeny shodné hodnoty titrační kyselosti a k tomu rozdílné hodnoty pH. Hodnoty jsou uvedeny pro mléko, syrovátku i samotný sýr. Jako Δ pH je označen rozdíl nejmenší a největší hodnoty pH při konstantní °SH. Je patrné, že hodnota pH se mění i když kyselost zůstává stejná. Změna teploty se v průběhu výrobního procesu mění neustále. Největších změn teplot je dosaženo v odkapních sálech, kde se i nejvíce liší hodnoty pH.

Tabulka 4.2: Vliv teploty na pH při °SH=konst.

° SH	pH ₁	pH ₂	pH ₃	Δ pH (rozdíl nejvyšší a nejnižší hodnoty pH při °SH=konst.)
4,6	6,39	6,41		0,02
4,7	6,34	6,39		0,05
4,9	6,42	6,43		0,01
5	6,33	6,37		0,04
5,2	6,33	6,4		0,07
7,6	6,37	6,39		0,02
7,6	6,39	6,42	6,46	0,07
7,8	6,33	6,42		0,09
8	6,33	6,35	6,43	0,1
14,6	6,34	6,4		0,06

Při kultivaci mezofilních zákysů se teplota pohybovala mezi 22-25 °C. Teplota by měla být během kultivace konstantní, avšak tvorba kyseliny mléčné, hromadění metabolitů způsobuje mírný ohřev vznikajícího zákysu. Proto je v grafu 22 uvedena průměrná hodnota teploty a její spojitost s aktivitou zákysu ve výrobním a sterilním mléce.



Graf 22: Závislost aktivity zákysu ve výrobním a sterilním mléce na průměrné teplotě kultivace, pro ferment III

Optimální teplota pro kyselinotvorné mléčné bakterie je vyšší než pro aromatvorné kmeny. Při vyšší teplotě inkubace je více aktivní kyselinotvorná složka zákysu. Její zvýšená činnost se projeví při testování aktivity zákysu (větší Δ pH). Je zde tedy praktický nástroj pro regulaci složení zákysu a tím také pro výsledný charakter sýra. Ideální teplotou se jeví 25 °C.

5. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala sledováním metabolické aktivity mezofilních i termofilních zákysů, jejich změny v chování během kultivace, skladování i během výroby a to u sýrů s bílou plísní na povrchu. Dále byly sledovány kysací křivky používaných mléčných bakterií od začátku přípravy zákysu, jeho použití a chování na lince až do odkapu sýru. Kyselost byla měřena pomocí pH-metru a titrace. Při každém měření se dále sledovala teplota. Metabolická aktivita mezofilních a termofilních bakterií byla stanovena jako změna pH po 6-ti hodinové inkubaci ve sterilním a výrobním mléce. Daný zákys se sledoval během výrobních kroků od pasterace mléka až do odkapu sýru. V každém výrobním kroku byla proměřena kyselost pH-metrem i titrací a byla změřena teplota.

V experimentální části jsou uvedena složení jednotlivých používaných kultur. V případě mezofilní kultury se jedná o směsnou kulturu a termofilní je používaná monokultura. V této části jsou popsány testy kyselosti a testy aktivit pro mezofilní a termofilní zákys.

Dané zákysy byly chlazeny na konci stacionární fáze, kdy tento úsek je možné považovat za ideální okamžik pro začátek chlazení zákysu, při níž dochází k největší tvorbě kyseliny mléčné. Sledování kysacích křivek je důležité při zavádění nového fermentu do výroby (stanovení ideálního okamžiku chlazení zákysu). Rychlou metodou pro stanovení kyseliny mléčné je acidobazická titrace. Pro provozní podmínky je však dostačující měření kyselosti pomocí pH, za předpokladu konstantní teploty měření. Acidobazická titrace je sice přesnější, ale více subjektivní, zatímco měření pH není tak závislé na lidech.

Tři sledované fermenty se mezi sebou lišily jak v hodnotě kyselosti maximálního píku, tak i v čase dosažení tohoto píku. K nejrychlejší tvorbě kyseliny mléčné došlo u fermentu II po šesti hodinách kultivace. Tento zákys se začal i nejdříve chladit a to po 11 hodinách kultivace. Průběh kysání u fermentů I a III byl podobný. Baktérie využívaly laktosu pomaleji a tím došlo i k pozdějšímu chlazení zákysu.

Vzniklé zákysy byly dále sledovány během skladování při teplotě 5 °C. Testy byly prováděny po 10-ti a 30-ti hodinách. Teplota skladování 5 °C je volena tak, aby kysací schopnost bakterií byla minimální. Aby nedocházelo k dalšímu prokysávání laktosy, měl by být pokles kultivační teploty na teplotu skladování co nejrychlejší. Bylo zjištěno, že čím déle trvá doba kysání zákysu, tím se získal více kyselý zákys, ale jeho aktivita byla menší, protože mléčným bakteriím docházela laktosa – zdroj jejich energie a tak klesala i jejich činnost. Podle aktivity zákysů ve sterilním mléce bylo prokázáno, že aktivita během skladování klesne průměrně u fermentu I o 11,5 % (rozmezí 5-17 %), u fermentu II o 5 % (rozmezí 1-12 %). Pokles aktivity však není standardní. Příčiny nerovnoměrného poklesu aktivity jsou pravděpodobně způsobeny kolísající skladovací teplotou a rozdílnou aktivitou zákysu při skladování. Pro zajištění maximální aktivity je ideální okamžik chlazení pro ferment I 25 °SH a fermentu II pak při kyselosti 30-32 °SH.

Kultivační teplota zákysu zásadně ovlivňuje jeho druhové zastoupení. Při vyšších teplotách převládá kyselinotvorná složka nad aromativornou. Tím dochází ke zvýšené aktivitě zákysu. V opačném případě, kdy je teplota nižší, pracuje více aromativorná složka a aktivita zákysu je menší.

Metabolickou aktivitu ovlivňuje mnoho faktorů z nich nejdůležitější jsou aktivita samotného fermentu, složení výrobního mléka, přítomnost bakteriofágů a dodržování správné teploty. Sterilní mléko poskytuje bakteriím ideální médium. Složení výrobního mléka se však mění. Pokud je v mléce nedostatek vitamínů, minerálních látek nebo aminokyselin, snižuje se i

aktivita zákysu, přičemž termofilní zákys je ještě více náročný na správné složení mléka než mezofilní zákys. Ke snížení aktivity dochází také z důvodu hromadění dalších metabolitů a nebo přítomností jiných bakterií, které přežívají pasterační teplotu nebo přítomnost bakteriofágů. Nebezpečí napadení zákysu bakteriofágem je rizikovější pro termofilní kulturu, která obsahuje jen jeden kmen bakterií. V takovém případě mléko prokysá minimálně. V případě mezofilní směsné kultury dojde ke zkvašení i po napadení fágem, protože zákys obsahuje více druhů bakterií. Doba fermentace se ale značně prodlužuje a snižuje se aktivita zákysu.

Aktivita termofilu ve sterilním mléce byla téměř ideální, protože nedochází k žádné chybě z důvodu pomnožování bakterií. Ferment se sypal přímo do mléka. Aktivita termofilního zákysu ve výrobním mléce byla také konstantní, avšak nižší než ve sterilním mléce. Příčinou je náročnost kultury na složení mléka. Sledováním aktivity používaných fermentů poukazuje na to, jak se bude daný zákys chovat na lince a během zrání sýrů. Pokud je narušen správný poměr mezofilního a termofilního zákysu, vznikne sýr o jiných sensorických vlastnostech. Největší změny pH byly během odkapu sýrů, kde dochází k fermentaci laktosy. Proces zahajuje termofil, který laktosu zkvašuje asi z 50 % a zbytek fermentuje mezofil. Tím vzniká typická chuť a aroma sýru.

Z časových důvodů nebyla sledována postacidifikace sýrů v provozních podmínkách. Její sledování by přesáhlo rámec diplomové práce. Její možné příčiny jsou teplota, vlhkost, nevyvážený poměr termofilního a mezofilního zákysu, napadení jinými bakteriemi nebo kvasinkami během zrání sýrů nebo lidský faktor.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. GAJDŮŠEK, S., KLÍČNÍK, V.: Mlékařství, vyd. VŠ Zemědělská Brno, 1985, 128 stran, MZK 4- 947.885
2. ČEPIČKA, J., a kol.: Obecná potravinářská technologie, VŠCHT, Praha, 1995, ISBN 80-7080-239-1
3. MERGL, M.: Mliekarská mikrobiológia, vyd. Alfa, Bratislava, 1. vydání, 1984, 158 stran, sign. MZK Brno 2-885.835
4. ZELINKA, J.: Bakteriálne a plesňové fermentácie, vyd. Slovenskej akadémie vied Bratislava, 1. vydání, 1960, 360 stran, sign. MZK Brno 2-447.403
5. PROKŠ, J.: Mlékařství I., vyd. SNTL Praha, 1. vydání, 1964, 224 stran, sign. MZK Brno 2-510.879
6. DOLEŽÁLEK, J.: Biochemie a technologie plísňových sýrů, vyd. ÚVÚPP, Praha, 1. vydání, 1967, 287 stran, sign. MZK 2-584.898
7. Review of the Literature, Cranfield University Biotechnology Centre, UK, [cit. 21.4. 2008],
<http://www.brighton73.freemove.co.uk/tomsplace/scientific/phd/Introduction/phd-intr.htm>
8. GÖRNER, F., VALÍK, L.: Aplikovaná mikrobiológia potravín, vyd. Malé centrum Bratislava, 1. vydání, 2004, 528 stran, ISBN 80-967064-9-7
9. CVAK, Z., PETERKOVÁ, L., ČERNÁ, E.: Chemické a fyzikálně chemické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobků, vyd. VÚPP Praha, Středisko potravinářských informací, 1. vydání, 1992, 221 stran, ISBN 80-85120-36-4
10. The Glycolysis Pathway, [cit. 24.4.2008], dostupné z:
<http://biotech.icmb.utexas.edu/glycolysis/pathway.html>
11. HOĐÁK, K.: Fyziologie a biochemie bakterií, vyd. UJEP Brno, 2. vydání, 1979, 315 stran, MZK N 20-513
12. TEPLÝ, M. A KOL.: Výroba sýrů, kaseinů a kaseinátů, vyd. SNTL Praha, 1. vydání, 1985, 192 stran, MZK 227.030
13. HALFHIDE, B.: Bakteriophagen in der Käseerei, Christian Hansen Dänemark, 16 stran
14. TEPLÝ, M.: Technologie mléčných výrobků, vyd. SNTL, 1. vydání, 1981, 372 stran

15. KNĚŽ, MAŠEK, MAXA, TEPLÝ, VEDLICH: Čisté mlékařské kultury a jejich použití v mlékárenském průmyslu, vyd. SNTL, Praha, 2. vydání, 1960, 300 stran, MZK 2-367.825
16. ŠILHÁNKOVÁ, L.: Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology, vyd. Academia, 1. vydání, 2002, 363 stran, ISBN 80-200-1024-6
17. DVOŘÁK, J., STÝBLOVÁ, A.: O sýrech, vyd. ČSL Červený kříž, Praha, 1930, 4. svazek, 32 stran, MZK X 752.227
18. FORMAN, L. a kolektiv: Mlékárenská technologie II, VŠCHT, Praha, 1996, 228 stran, ISBN 80-7080-250-2
19. KADLEC, P. A KOL.: Technologie potravin II, vyd. VŠCHT, Praha, 2002, 1. vydání, 236 stran, ISBN 80-7080-510-2
20. Interní dokumentace od Pribiny s.r.o., 2008
21. GAJDŮŠEK, S.: Laktologie, MZLU, Brno, 2003, 1. vydání, 84 stran, ISBN 80-7157-657-3
22. HRADILOVÁ, J.: Aromatické látky v sýrech s bílou plísní na povrchu, diplomová práce VUT Brno, 2005, 95 stran
23. ZIMÁK, E.: Technológia pre 4. ročník stredných priemyselných škol potravinarskych študijného odboru spracovanie mlieka, vyd. Alfa, Bratislava, 1990, 389 stran, MZK 80-05-00309-9
24. BABÁK, L.: Přednášky Bioinženýrství pro 4. ročník, 2007
25. MINIATLAS MIKROORGANISMŮ: VŠCHT, Praha, poslední revize 5. února 2008 [cit. 24.3. 2008], dostupné z <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/>
26. GAJDŮŠEK, S.: Mlékařství II, MZLU, Brno, 1998, 142 stran, ISBN 80-7157-342-6
27. KNĚŽ, V.: Výroba sýrů, SNTL, Praha, 1960, 1. vydání, 284 stran
28. BEZDĚKOVÁ, Š.: Studium průběhu zrání sýrů s modrou plísní, diplomová práce VUT Brno, 2001, 74 stran
29. ROSICKÝ, J.: Sledování změn sýrů s plísní na povrchu v průběhu jejich zrání, diplomová práce MZLU Brno, 2006, 73 stran

30. IBURG, A.: Lexikon sýrů, vyd. Rebo Productions CZ, Čestlice, 2004, 1. vydání, 301 stran, MZK 1-1148-185
31. VELÍŠEK, J.: Chemie potravin II, vyd. OSSIS, Tábor, 2002, 2. vydání, 331 stran, ISBN 80-86659-01-1
32. PROKŠ, J.: Mlékařství II, SNTL, Praha, 1965, 368 stran, MZK 2-0510.879

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

FAO/WHO.....	Světová organizace pro zemědělství a výživu/ Světová zdravotnická organizace
unit (U).....	jednotka aktivity
ČSN.....	česká státní norma
°SH.....	vyjádření titrační kyselosti v jednotkách Soxhlet- Henkel
pH.....	vyjádření kyselosti, bezrozměrná veličina

