

Základní a doplňkové kultury pro výrobu polotvrdých a tvrdých sýrů.

ing. Vladimír Dráb

Výzkumný ústav mlékárenský Praha,
Sbírka mlékárenských mikroorganismů
Laktoflora[®], CCDM, ČR

Sýry patří do skupiny fermentovaných potravin stejně jako pivo, víno, chléb, kysané zelí, rybí omáčka atd.

Pouze několik druhů sýrů je možné vyrobit bez fermentace (Cottage).

Role fermentace v potravinách

- Obohacení lidské výživy o řadu potravin s různou chutí, vůní a texturou.
- Alkoholické, mléčné, octové a jiné kvašení má také zpravidla za následek výrazné prodloužení trvanlivosti oproti výchozí surovině.
- Obohacení potravin o různé bioaktivní látky, esenciální aminokyseliny, mastné kyseliny a vitamíny.
- Zvýšení stravitelnosti, odstranění toxinů, potlačení škodlivých bakterií v trávicím traktu

Tradiční výroba sýrů

- Výroba sýrů je dokumentována již před 6 tis. lety v Sumeru a 4 tis. lety v Egyptě. První sýry zřejmě vznikly při skladování mléka ve zvířecích žaludcích. Staří Římané byli první, kdo povýšili výrobu sýrů na umění, zavedli zrání a skladování sýrů. Do objevení Ameriky byli motorem inovací mniši, 14-16. století sýry pokládány za nezdravé- pokles zájmu, obnovení zájmu v 19. století, zahájení průmyslové výroby.

Gorgonzola 879



Roquefort 1070



Cheddar 1500



Parmesan 1579



Gouda 1697



Camembert 1791



- Tradiční výroba sýrů vychází ze syrového buvolího, kozího, kravského nebo ovčího mléka či jejich směsí. V menší míře se používá také mléko sobí, kobyli, jačí. Používají se různé postupy fermentace suroviny.
- ❖ Fermentace za využití mikroorganismů přítomných v syrovém materiálu (přírodní fermentace).
 - nejstarší způsob – má řadu nevýhod
 - nekontrolovatelný a nepředvídatelný výsledek souvisejícím s možnými změnami složení původní mikroflóry
 - zdravotní rizika při kontaminaci suroviny bakteriálními či virovými patogeny
- ❖ Použití přírodních kultur získaných kultivací suroviny za selektivních podmínek nebo přidání části kvalitního produktu do nové nové šarže suroviny (backslopping).
 - Syrovátkové kultury (Grana Padano) – syrovátka je odebrána z výrobníku při teplotě 48-50 °C a je inkubována přes noc při teplotě 45 °C nebo 37- 40 °C do dosažení pH až 3,3.
 - Selekce (teplota, pH, čas) ➡ termofilní laktobacily a malý podíl *Str. thermophilus* a enterokoků.
- ❖ Přídavek komerčně dostupných definovaných zákysových kultur (DSS) do čerstvého syrového nebo tepelně ošetřeného mléka (úprava poměru mo).

Definice zákysu (startéru)

Mikrobiální kultura obvykle obsahující bakteriální nebo plísňové kmeny v čisté formě nebo ve směsi používaná k zahájení fermentačního procesu.

Obsahuje kmen/kmeny vybrané na základě známých a stabilních metabolických aktivit a dalších charakteristik vedoucích k výrobě fermentované potraviny žádoucího vzhledu a organoleptických vlastností.

Získávají izolací kmenů z kvalitních výrobků nebo surovin.

Role zákysu

- Úkolem zákysu je potlačit růst existující mikroflóry v surovině a provést požadované změny
 - zajistit novou funkčnost výrobku
 - zvýšit trvanlivost produkcí kyselin, antimikrobiálních látek, využitím živin
 - snížit mikrobiální rizika
 - zvýšit nutriční hodnotu a zlepšit senzorické vlastnosti
 - zvýšit ekonomickou hodnotu

Klasifikace zákysů

▪ Klasifikace na základě typu fermentace

dělení podle konečného produktu metabolismu glukózy

Homofermentativní

produkují kyselinu mléčnou jako jediný nebo hlavní produkt - *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, některé laktobacily

Heterofermentativní

produkují stejné množství kyseliny mléčné, etanolu a CO_2 – *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, některé laktobacily (*L.brevis*, *buchneri*, *fermentum*)

Homofermentativní mikroorganismy získávají ze stejného množství glukózy 2 x více energie než heterofermentativní.

Heterofermentativní mikroorganismy jsou důležité z hlediska tvorby aroma (acetaldehyd, diacetyl).

■ Klasifikace na základě optimální teploty růstu

➤ mezofilní

optimální teplota růstu je 30 °C a rostou v rozmezí 22 – 40 °C. Základem mezofilních kultur bývají různé kmeny *Lactococcus lactis*. Tyto kultury jsou obvykle používány pro výrobu kontinentálních druhů sýrů, jejichž teplota dohřívání je nižší než 40 °C.

➤ termofilní

optimální teplota růstu je 40 °C a rozsah od 32 do 45°C. Vždy obsahují *Str. thermophilus* společně s jedním nebo více druhy laktobacilů (*L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L. rhamnosus*). Především používané při výrobě sýrů italského nebo švýcarského typu.

■ **Klasifikace na základě obsahu mikroorganismů**

➤ **Jednokmenové**

Dnes málo používané jako základní kultury, technologické problémy při napadení kultury fágů. Časté v případě protektivních nebo probiotických kultur.

➤ **dvoukmenové**

Dva kmeny se stejnou schopností produkovat kyselinu mléčnou lišící se citlivostí k fágům. Napadení bakteriofágem ovlivní pouze jeden kmen a fermentace proběhne bez problémů.

➤ **směsné**

Obsahují více než dva kmeny s různými vlastnostmi (produkce kyseliny mléčné, aroma, exopolysacharidů, rezistence k fágům).

Typu DSS tj. s definovaným složením (známe počet kmenů a jejich zastoupení v kultuře).

Typu MSS tj. s nedefinovaným složením. Tyto kultury připravují výrobci kultur z nejlepších přírodních zákysů reprodukcí za kontrolovaných podmínek, což snižuje vnitřní diversitu kultury (např. DelvoTec UX-11A DSF, DSM).

- **Klasifikace na základě produktu pro který je určen**

- Kultura pro výrobu sýrů holandského typu
- Kultura pro výrobu sýrů švýcarského typu
- Kultura pro výrobu čedaru atd.

■ Klasifikace na základě produkce aroma

Používá se pouze pro mesofilní kultury.

- **B (L) typ**: obsahuje leukonostoky jako producenty aroma (původní název *Betacoccus*)
- **D typ**: Cit⁺ *L. lactis* subsp. *lactis* (často používaný taxonomicky nesprávný název *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*)
- **BD (LD) typ**: směs výše uvedených kultur
- **N (O) typ**: obsahuje pouze laktokoky nefermentující citrát

■ Klasifikace na základě formy

- Tekuté
- Mražené
- Sušené (vakuové, sprejové sušení, lyofilizace)

Mražené a sušené kultury dodávány ve formě koncentrátů pro přímé očkování (DVS, DVI) nebo pro přípravu provozního zákysu.

VÝHODY A NEVÝHODY KONCENTRÁTŮ KULTUR PRO PŘÍMÉ OČKOVÁNÍ (DVS, DVI)

- **Usnadňují práci a snižují mikrobiální rizika.**

potřebujete mnohem méně kultury na zaočkování mléka, úspora času
odstranění kultivačních mezistupňů (matečná kultura, provozní zákys)
snižuje rizika kontaminace kultur a jejich napadení bakteriofágy.

- **Zvyšují spolehlivost a flexibilitu**

standardizace kultur (1U /100 l), snadno spočtete kolik kultury potřebujete
na množství zpracovávaného mléka.

jistota stejného výchozího mikrobiálního složení a kysací aktivity každý den,
změny ve složení kultury jako při přípravě matečných a provozních zákysů.

máte na výběr z mnoha kultur pro různé typy sýrů od různých dodavatelů.

- **pořízení úschovných zařízení na kultury**
- **vyšší cena kultur na litr mléka**
- **závislost na dodavateli kultur**
- **rozdělení odpovědnosti v případě špatného fungování zákysu**
- **uniformita chuti**

■ Klasifikace na základě důležitosti

➤ Základní (primární) kultury

Hlavní funkce - fermentace laktózy na kyselinu mléčnou, podílí se i na proteolýze a tvorbě aroma, používané v koncentraci 10^6 - 10^7 KTJ/ml. Dělí se na mesofilní a termofilní.

➤ Doplňkové (sekundární) kultury

Používané především pro zlepšení senzorických vlastností, protektivní či probiotické vlastnosti, zpravidla výrazně nižší množství inokula.

- *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*

výroba ementálu, sýrů švýcarského typu a jiných sýrů s tvorbou ok (Maasdam, Leerdamer), fermentace laktátu za vzniku propionátu, octanu a CO₂ - tvorba ok a nasládlá chuť

- **Koryneformní bakterie**

Arthrobacter, Brachybacterium, Brevibacterium, Microbacterium

Sýry zrající pod mazem (Limburger, Muenster, Tilsiter, Comté)

Některé druhy sýrů s plísní na povrchu (imitace kamembertu ze syrového mléka).

Vliv na tvorbu aroma, texturu a barvu sýrů.

- **Koagulázo- negativní stafylokoky**

Staphylococcus xylosus, equorum, succinus subsp. casei

Některé druhy sýrů zrajících pod mazem.

Podpora růstu brevibakterií, tvorba aroma.

- **Kvasinky**

Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus

Sýry zrající pod mazem

- neutralizace povrchu využíváním laktátu
- tvorba aroma
- stimulace růstu koryneformních bakterií

Sýry s plísní v těstě

- tvorba kaveren produkcí CO₂ (*Saccharomyces cerevisiae*)
- lipolýza (*Candida*)

- **Vláknité houby (plísně)**

- **sýry s plísní v těstě**

(*Penicillium roqueforti*)

- **sýry s plísní na povrchu**

(*P. camemberti*, *Geotrichum candidum* (*Oospora lactis*)).

Velmi omezeně se používají i jiné druhy
např. *P. nalgiovense*.



- **některé druhy sýrů zrajících pod mazem (*Geotrichum*).**

Protektivní kultury (ochranné)

- Ochrana proti patogenním nebo technologicky škodlivým mikroorganismům.

Listeria monocytogenes, *Staph. aureus*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Clostridium sp.*, vláknité houby

- Použití za účelem zvýšení bezpečnosti potravin.
- Snížení ekonomických ztrát způsobených kažením potravin (změna barvy, chuti, textury).

Bakteriocin produkční kmeny (Bac⁺)

Bakteriociny - látky peptidové povahy, dělení do několika tříd.
Účinnost zejména vůči G⁺ mikroorganismům.

Použití :

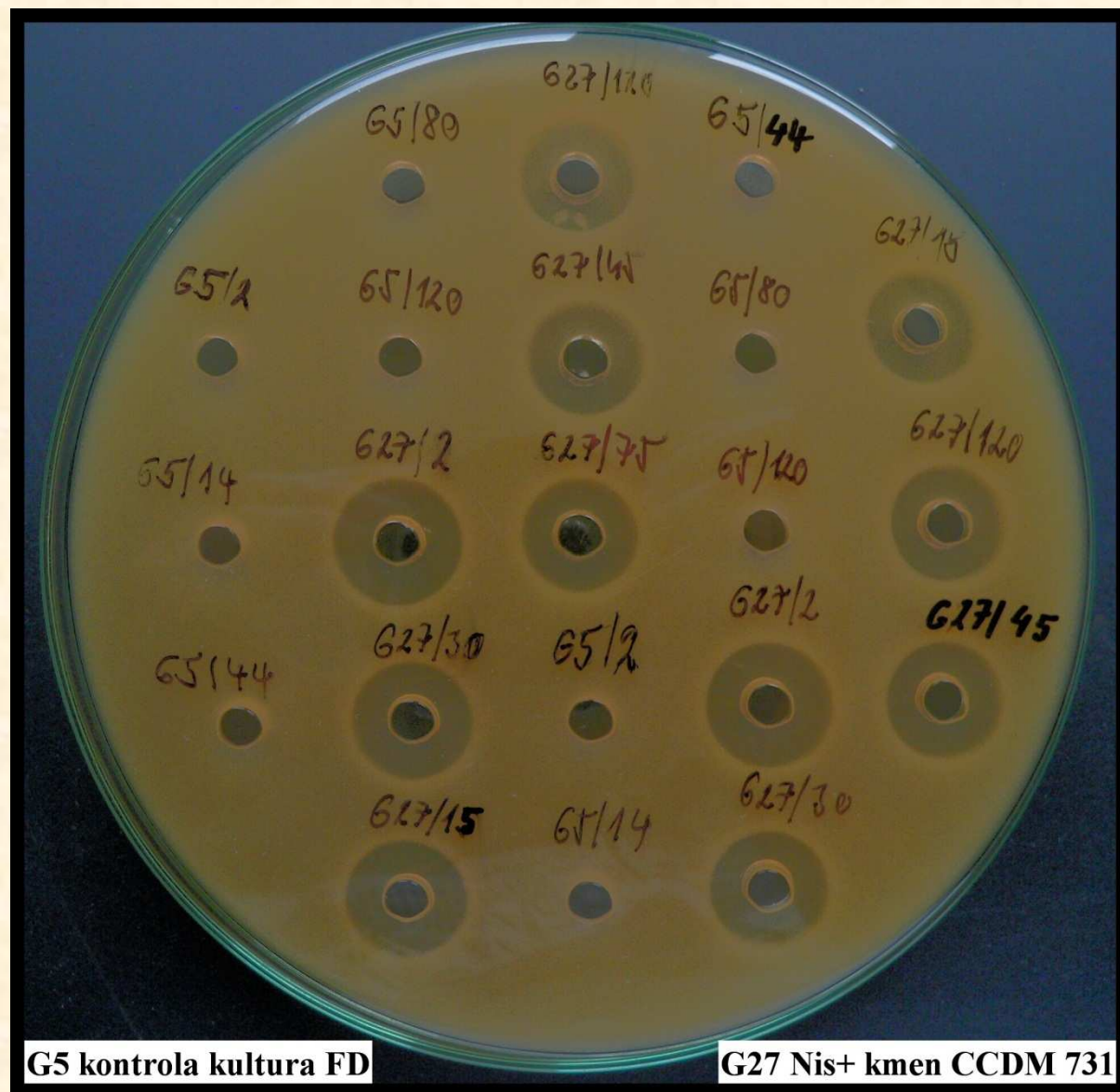
- ❑ Inhibice růstu patogenních mo v potravinách
nisin, pediocin PA1/AcH, enterocin AS-48 – účinné vůči *L. monocytogenes*, účinnost klesá v sýrech s vyšší hodnotou pH (Havlíková a kol., 2012)
- ❑ kontrola růstu rodu *Clostridium* (původci pozdního duření sýrů)
- ❑ kontrola NSLAB způsobujících vzhledové nebo chuťové vady (síťovitost)
- ❑ kontrola růstu producentů biogenních aminů
- ❑ urychlení zrání prostřednictvím zvýšené lyze buněk zákysové kultury a uvolnění intracelulárních enzymů

Použití Nis⁺ kmenů v sýrech

- pomalé prokysávání
- omezená proteolytická schopnost
- vysoká citlivost na fágy
- inhibice ostatních laktokokových kmenů v kultuře

Kombinace Nis⁺ kmenů s nisin resistantními nebo tolerantními kmeny, zdrojem vhodných Nis⁺ kmenů mohou být sýry ze syrového mléka. Při použití Nis⁺ kmenů v sýrech typu Gouda byla prokázána přítomnost nisinu i po 120 dnech zrání (obr. 1).

Obr. 1 Stanovení přítomnosti nisinu v sýrech vyrobených s přídavkem Nis+ kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 731 během 120 dnů zrání pomocí indikátorového kmene *Lbc. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CCM 7190^T.

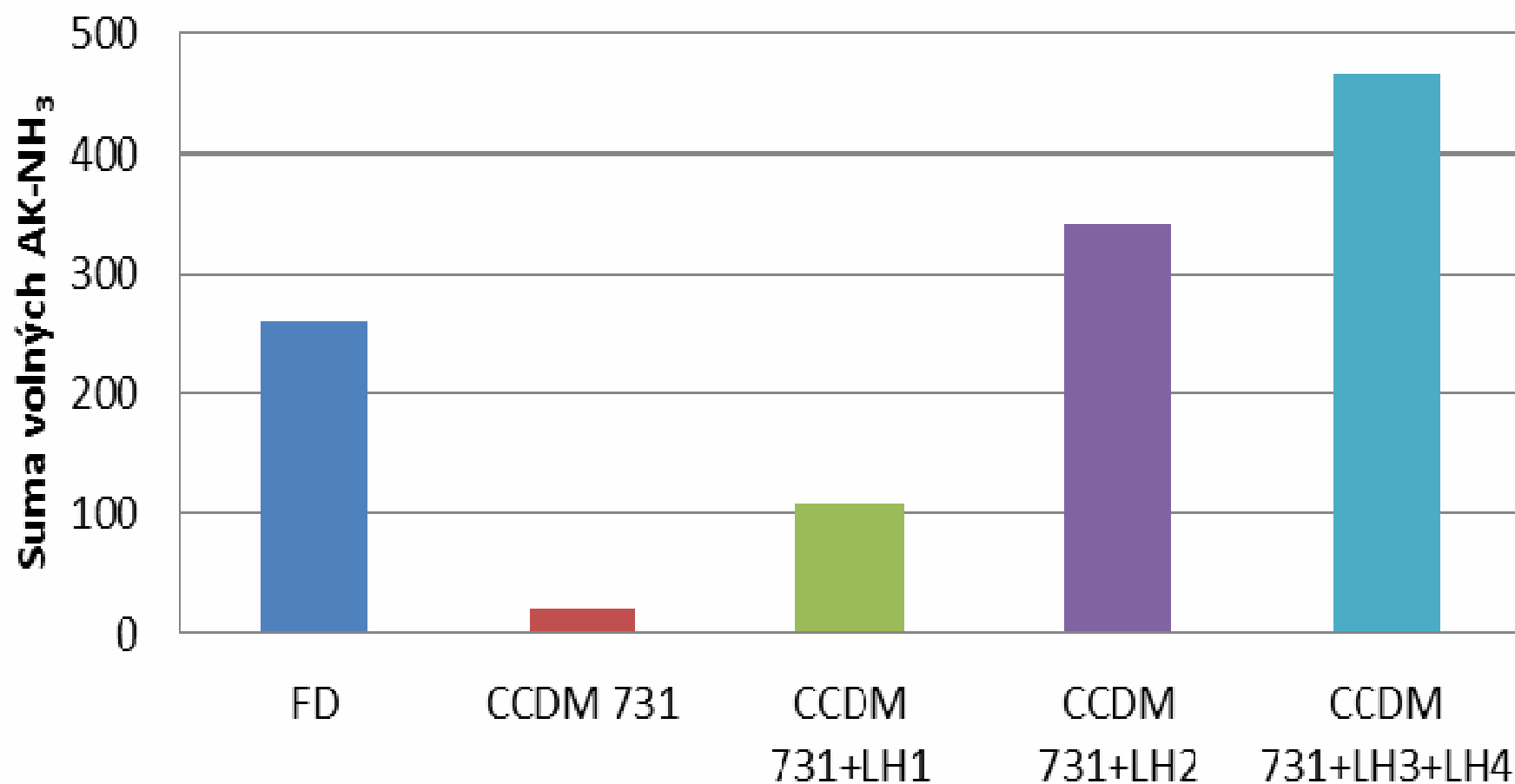


Využití Bac⁺ kmenů pro urychlení zrání sýrů

- musí být výrazně zvýšena proteolýza, lipolýza a tvorba těkavých látek působením intracelulárních enzymů uvolněných z lyzovaných buněk
- zvýšení sekundární proteolýzy - vyšší obsah volných AK, nižší zastoupení hydrofobních peptidů-hořkost sýrů).
- Zaznamenatečná změna senzorických vlastností.

Kombinací Nis⁺ kmenů a různých kmenů *Lbc. helveticus* citlivých na nisin bylo možné zvýšit obsah volných aminokyselin po 120 dnech zrání sýrů typu Gouda na 341-466 mmol/ kg sýra v porovnání s 261 mM dosaženými se smetanovou kulturou FD (obr. 2, převzato z práce Dráb a kol., 2006).

Obr. 2 Vliv přidavku Nis⁺ kmene *Lactococcus lactis* CCDM 731 na obsah volných aminokyselin v sýrech po 120 dnech zrání



Kmeny produkující antifungálně účinné metabolity

- Řada potravin je náchylná na znehodnocení v důsledku změny chuti, barvy, měknutí nebo tvorby toxinů či alergenů způsobené růstem vláknitých hub.
- Antifungální účinek synergické působení různých sloučenin – org. kyseliny (C2, C3, C5, 3-PLA), laktony, cyklické peptidy aj. Především laktobacily, pediokoky, propionibakterie.
- Pro aplikaci v polotvrdých a tvrdých sýrech zatím nejsou komerčně dostupné kmeny. Existují kultury určené pro aplikaci v jogurtech, tvarohu a cottage - Holdbac YMB a YMC, MicroGARD® 400 (Danisco) nebo v siláži - Feedtech™ F3000 (DeLaval).

Probiotické kultury

- Probiotika jsou bakterie, obvykle laktobacily nebo bifidobakterie spojované s řadou příznivých zdravotních účinků od zmírnění symptomů intolerance laktózy a průběhu průjmových onemocnění až po potlačení nádorů, redukci obsahu cholesterolu v krvi a modifikaci imunitní odpovědi.
- Běžně používané v jogurtech a kysaném mléce (ABT kultury).

- Použití v sýrech komplikovanější
- Relativně dlouhá doba zrání, která může přesáhnout i dva roky – kmen musí přežít v počtu min. 10^6 - 10^7 KTJ/g
- Důležitost správné volby kmene pro konkrétní druh sýra – technologický postup a fyz. chemické složení (A_w , sušina) mohou značně ovlivnit schopnost růstu a přežívání kmene v sýrech a následně i po požití v trávicím traktu.
- Některé metabolity vznikající působením probiotických kmenů mohou mít negativní vliv na senzorické vlastnosti sýrů (C2- bifidobakterie).
- Podstatně vyšší náklady na vývoj.

- Existuje řada prací popisujících vývoj různých sýrů obsahujících probiotické kmeny bifidobakterií, laktobacilů a enterokoků.
- Řada prací prokázala, že sýry mohou být výborným nosičem těchto kultur a vzhledem k pH, obsahu tuku a bílkovin mají některé výhody oproti jogurtům a kysanému mléku, zejména z hlediska ochrany mikrobiálních buněk před působením žaludečních šťáv.
- Komerčně dostupná nabídka je nízká-
Gefilus® od (Valio) nízkotučný sýr ementálského typu obsahující *Lbc. rhamnosus* GG
LiveActive® (Kraft) čedar obsahující *B. animalis* subsp. *lactis* vyráběný firmou Kraft.

Výrobci komerčních kultur

- Existuje řada firem komerčně dodávající kultury pro výrobu mléčných výrobků na národní úrovni (MILCOM a.s.). V oblasti celosvětově aktivních firem došlo v posledních letech k celé řadě akvizic a nyní tomuto trhu dominují Chr Hansen's, DuPont (Danisco) a DSM.

Trendy

- V oblasti kultur pro výrobu mléčných výrobků se budou stále více uplatňovat metody molekulární genetiky a genové manipulace (GMO).
- ❖ taxonomické zařazení kmenů a odlišení izolátů na kmenové úrovni
- ❖ Charakterizace klíčových metabolických drah a zjištění přítomnosti genů kódujících některé žádoucí či nežádoucí vlastnosti (antibiotická rezistence, dekarboxylázy aminokyselin, atd).
- Rozšiřovat se bude nabídka sekundárních kultur nabízejících přidanou hodnotu formou zlepšení sensorických vlastností sýrů, zkrácení potřebné doby zrání či nabízejících různé zdravotní či technologické benefity.

Děkuji za pozornost.