

# Uplatněná certifikovaná metodika

## MSM 2672286101

### **Detekce bakteriofágové kontaminace, určení kritických míst možného zdroje kontaminace, metodický postup potvrzení bakteriofága a eliminace vzniklých technologických problémů, včetně návrhu sanitačních opatření**

**Autoři:** Ing. Jitka Peroutková, Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.  
Ing. A. Šalaková, CSc., Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.  
Marta Pechačová, Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.  
MVDr. Gabriela Kunová, Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

**Uplatněná certifikovaná metodika je výstupem z řešení výzkumného záměru MŠMT  
MSM 2672286101 Mléko - významná součást zdravé a bezpečné výživy.**

#### Úvod

Přítomnost fágů byla zjištěna v nejrůznějších odvětvích průmyslu od potravinářského, chemického, farmaceutického, krmivářského a dalších (Émond and Moineau, 2004), nicméně v mlékárenském průmyslu je výskyt fága nejvíce zdokumentovaný. Jedním z nejdůležitějších ukazatelů významně ovlivňujících kvalitu zákysových kultur a tím značnou část mlékárenských technologií (sýrařství, výroba tvarohu a fermentovaných výrobků) je právě přítomnost bakteriofága.

Termín bakteriofág pochází z řeckého překladu "vir, který může infikovat bakterie". Již z názvu je patrné, že hostitelem nejsou vyšší eukaryotní organismy, nýbrž prokaryotní bakterie. Jednou z klíčových rolí fágů je vyrovnat bakteriální populaci v daném prostředí a umožnit tak růst náročnějším bakteriálním kmenům.

Jedná se o nukleoproteinové částice, které nesou genetickou informaci, ale nemají enzymové vybavení pro zajištění základních životních funkcí. Jsou však schopny infikovat vhodnou hostitelskou buňku, jsou tedy obligátní parazité, přenášejí dovnitř buňky nukleovou

kyselinu a využívají hostitelova enzymového systému pro svou replikaci (Šilhánková, 1995). Po vpravení genetické informace mohou nastat 2 možnosti. Buď se fágová DNA začlení do bakteriálního chromozómu jako tzv. profág a je replikována společně s buněčnou DNA, genetický materiál fága je tedy přenášen do dceřiných buněk. Tento cyklus se nazývá lysogenní, nedochází při něm k lysi buněk. Druhou možností je cyklus lytický, po infekci fágem dochází uvnitř buňky k vzniku virových komponent. Po biosyntéze se jednotlivé fágové komponenty kompletují za vzniku velkého množství fágu, které se po lyzi buňky uvolňují a stávají se infekčními. Nejruznější bakteriální stresové faktory jako jsou např. vysoká teplota, vysoká koncentrace soli, přítomnost antimikrobních látek, nedostatek živin či UV záření, mohou indukovat profága a lysogenní cyklus se přemění na lytický (Lunde et al, 2005; Madera et al., 2009)

Lytický cyklus se u zákysových kultur projeví zpomalením prokysávání nebo úplným zastavením kysání. Toto s sebou nese riziko znehodnocení výroby a velké ekonomické ztráty. Ke snížení dopadu bakteriofágové kontaminace na mléčné kvašení je vhodné preferovat ve startovacích kulturách bakterie odolné vůči fágům, jejichž odolnost byla přezkoušena.

Je prokázáno, že téměř všechny používané druhy bakterií mohou sloužit jako hostitelé jednoho nebo několika druhů bakteriofága. Mlékárenské závody se i přes důslednou sanitaci opakovaně potýkají v průběhu technologického zpracování s kontaminací bakteriofágem. Mnohdy se jedná o ložiskové zdroje kontaminace. Tato fokusová kontaminace je způsobena přítomností biofilmů, a to zejména v provozech používajících tvrdou vodu.

Využívání syrovátky nebo koncentráту syrovátkových bílkovin do některých výrobků v průběhu výroby, může znamenat kontaminaci fágem právě prostřednictvím těchto komponent (Chopin, 1980)

V sýrařské technologii se z důvodu výtěžnosti a s ohledem na konzistenci běžně používá pasterační teplota 74 nebo 85 °C. Z toho důvodu je riziko bakteriofágové kontaminace o to větší, protože bakteriofág je zcela inhibován až teplotou vyšší než 92 °C. Menší riziko fágové kontaminace je v technologii fermentovaných výrobků, kde je pro zlepšení konzistence používána pasterační teplota 95 °C.

## **I. Cíl metodiky**

Cílem předkládané metodiky je podat ucelené shrnutí metod zjišťování bakteriofága a upozornit na kritická místa v technologiích výroby sýrů, tvarohů i fermentovaných výrobků. V metodice jsou doporučeny kroky, které je třeba v průběhu technologie udělat, tak aby ekonomické ztráty a zdravotní riziko při průkazu bakteriofága bylo minimální.

## II. Vlastní popis metodiky

### 1. Indikace možné přítomnosti bakteriofága v provozních zákysech a jeho eliminace

- dochází k prodloužení doby kultivace zákysu, tj. prodlužuje se dosažení optimální kyselosti při dodržení kultivačních podmínek (očkovací dávka, kultivační teplota, délka kultivace) specifikovaných výrobcem v technickém listu
- limitní hodnoty kyselosti  $\Delta \text{SH} \geq 10 \text{ SH}$ , nebo  $\Delta \text{pH} 0,4$ . Menší rozdíly v kyselosti nedetekují přítomnost bakteriofága. Mohou být způsobeny změnou ve složení mléka.
- je nezbytně nutné mléko na provozní zákys pasterovat při teplotě 95 °C s výdrží 30 minut. Důslednou sanitací zamezit průniku zbytků sanitačních přípravků. Mléko na provozní zákys musí být negativní na rezidua inhibičních látek.
- pokud má provozní zákys nízkou kyselost (< 25 SH mezofilní kultura) a musí být na výrobu sýrů použit, je nezbytně nutné volit vyšší dávku inokula o 50 až 100 % oproti běžné očkovací dávce.
- nový provozní zákys pak připravit z jiné kultury (rotace kultur). Nezbytně nutné je po běžné sanitaci dané HACCP (louh, kyselina) v provozech využívajících tvrdou vodu, kde je zvýšené riziko tvorby biofilmů, použít cyklus kyseliny citrónové (2 % roztok o teplotě minimálně 55 °C, doba působení minimálně 30 minut) a tak minimalizovat riziko ložiskové kontaminace bakteriofágem.
- pokud se v provozu nepoužívá tvrdá voda a riziko biofilmů je tedy minimální, je nezbytně nutné po ukončení daného sanitačního režimu použít k eliminaci případné bakteriofágové kontaminace dezinfekční přípravky na bázi aktivního chlóru (200-300 mg  $\text{Cl}_2$ / l mycího roztoku, 5000 mg  $\text{Cl}_2$ / l na desinfekci ovzduší, nebo chlornan sodný 12,5 g/ l mycího roztoku). Též je možné aplikovat kyselinu peroctovou v koncentraci 0,5 %.
- při napadení zákysu bakteriofágem, dochází k prodloužení technologického procesu v průběhu lisování. Je nutné dodržet kyselost sýra dle technologického postupu před vložením do solné lázně. Vysoký obsah zbytkové laktózy způsobuje konzistenční vady sýra, vlhnutí povrchu při zrání, zvýšení denzity nežádoucích mikroorganismů jako jsou koliformní bakterie, *E. coli* a kvasinky.
- doporučené pH sýrů před vložením do solné lázně:
  - sýry eidamského typu 5,4 - 5,6 pH
  - sýry ementálského typu 5,4 - 5,6 pH
  - bílé sýry 5,8 - 5,9 pH

### 2. Indikace možné kontaminace v technologii výroby fermentovaných výrobků

Při podezření na přítomnost bakteriofága dochází k prodloužení doby fermentace finálních výrobků při dodržení stejné kultivační teploty a dávky inokula. V průběhu kyselého srážení způsobeného činností kultury probíhá také sladké srážení činností termostabilních enzymů. Finální produkt má hrubou - písčitou konzistenci, netypickou a

nečistou chuť. Při vysoké denzitě bakteriofága (titr bakteriofága) může dojít až k úplnému zastavení fermentačního procesu a znehodnocení výroby. Pokud dojde k mechanickému porušení koagulátu při pH okolo izoelektrického bodu kaseinu (pH 4,60 - 4,65), bude finální produkt řídký, bude se uvolňovat plazma a v chladu již nedojde k obnově konzistence. V tomto případě je nutné okamžitě realizovat výměnu kultury předepsanou systémem rotace kultur a po běžné sanitaci zařadit navíc cílenou desinfekci chlorovými preparáty. Jestliže nedojde ke zlepšení prokysávání, je nezbytně nutné nechat surovinu vyšetřit na přítomnost bakteriofága.

### 3. *Metody zjištění přítomnosti bakteriofága*

Existuje celá řada metod pro zjištění přítomnosti bakteriofága v surovině. Jejich využitelnost v praxi je dána především dostupností vybavení, a to zejména po stránce finanční. Metody využívající jako kritérium kysací aktivitu a indikátorové testy jsou jednoduché a využitelné v jakékoli mlékárenské laboratoři. Některé metody vyžadující speciální vybavení, např. metody spektrofotometrické, impedanční, konduktometrické, PCR, jsou vhodné pro specializovaná pracoviště. Zde je uveden výčet některých metod:

- metoda inhibice mléčného kysání je při šetření na mlékárenských závodech nejpoužívanější, metodou zjistíme nejen přítomnost fága, ale máme možnost výběru jiné fágorezistentní kultury bez další časové prodlevy a nižších ekonomických ztrát
- indikátorová metoda (orientační metoda) detekuje oslabení bakteriálních mléčných kultur, ale neumožňuje rozlišení příčiny inhibice tj. inhibici způsobenou bakteriofágem nebo přítomností reziduí inhibičních látek (dále RIL). Metoda také neumožňuje výběr fágorezistentní kultury.
- zjištění přítomnosti bakteriofága elektronovým mikroskopem umožňuje fága detekovat a navíc rozlišit jeho možné morfologické variace, ale opět nelze otestovat fágorezistenci kultur. Metoda se využívá pouze pro výzkumné účely vzhledem k finanční nákladnosti zařízení (Svensson and Christiansson, 1991)
- PCR, snadná metoda využívaná pro taxonomické zařazení mlékárenských fágů (Dupont et al., 2005; del Rio et al., 2007)
- impedanční a konduktometrické metody zjišťují změnu vodivosti resp. impedance, tyto parametry jsou ovlivňovány množstvím metabolitů produkovaných buňkou.

### 3.1. Metoda inhibice mléčného kysání

#### Princip metody:

Inhibice vzorku podezřelého na přítomnost bakteriofága je měřena jako pokles tvorby kyseliny mléčné (titrační kyselost) ve srovnání s kontrolním vzorkem. Jako pozitivní je hodnocen vzorek, kdy rozdíl titrační kyselosti oproti kontrole je  $\geq 5$  SH.

#### Příprava filtrátu bakteriofága z testovaného vzorku (mléko, syrovátka):

- úprava vzorku (mléka, syrovátky) 10 % kyselinou mléčnou na pH 4,6
- filtrace vysráženého kaseinu přes řídký filtr
- membránová aseptická filtrace (0,45  $\mu\text{m}$ ) z důvodu oddělení bakterií od bakteriofága (ve finálním vzorku)
- inaktivace části získaného filtrátu při 95 °C s výdrží 10 minut → průkaz chemické inhibice po inaktivaci bakteriofága po teplotním záhřevu

#### Postup vlastního stanovení (pro jeden testovaný vzorek a jednu kulturu):

- sterilace mléka (3 x 100 ml ozn. A, B, K) prostého RIL při 114 °C /20 min
- temperace mléka na kultivační teplotu (23, 30, 37 °C dle specifikace technologického postupu ev. Technického listu kultury)
- očkování mléka A, B i K 1% testované zákysové kultury
  - \* přídavek 1% filtrátu bez inaktivace do mléka A
  - \* přídavek 1% filtrátu po inaktivaci 95 °C/10 min do mléka B
  - \* mléko K - kontrolní vzorek bez přídavku filtrátu bakteriofága
- kultivace 16 hodin při doporučené teplotě (23, 30, 37 °C)
- stanovení titrační kyselosti vzorků mléka A, B a K

Tab č. 1: Vyhodnocení metody dle titrační kyselosti SH

<b>titrační kyselost</b>	<b>přítomnost bakteriofága</b>	<b>přítomnost RIL</b>
A = B = K	negativní	negativní
A < K ( $\Delta > 5$ SH) B=K	pozitivní	negativní
A < K ( $\Delta \geq 5$ SH) B < K ( $\Delta \geq 5$ SH)	negativní	pozitivní

Metodou inhibice mléčného kysání je možné desítkovým ředěním stanovit titr bakteriofága (denzitu kontaminace bakteriofágem). Postup stanovení titru bakteriofága je shodný s výše uvedeným pouze s tím rozdílem že se sterilní mléko neočkuje filtrátem vzorku, ale filtrát se nejprve ředí desítkovým způsobem sterilním fyziologickým roztokem.

Na základě získaných výsledků v rámci řešení Záměru je možné konstatovat tyto závěry:

Pokud bude zjištěn titr bakteriofága:

- titr  $10^2$  → běžně zjišťované hodnoty, ve většině případů při dodržení technologických parametrů nedojde k problémům ve výrobě
- titr  $10^4$  → zvýšená hodnota, lze ji považovat za rizikovou denzitu bakteriofága, dochází k prodloužení technologického režimu
  - \* výroba sýrů: zpomalení prokysání sýrů před solnou lázní (prodloužení technologického postupu o 60 - 120 min)
  - \* výroba fermentovaných výrobků: prodloužení vlastní fermentace do dosažení pH 4,4
- titr  $10^6$  a vyšší → provozní zákys se nesráží (titrační kyselost SH nižší než 18, aktivní kyselost pH vyšší než 5,5), je nutné provést následující opatření:
  - \* výměna kultury v rámci rotace kultur
  - \* provedení cílené sanitace chlorovými preparáty
  - \* na výrobu použít kultury k přímému očkování

Po provedení desinfekce chlorovými přípravky, ev. zařazení režimu kyseliny citrónové v případě provozů s tvrdou vodou, ověřit, zda došlo ke snížení titru bakteriofága alespoň na  $10^3$ .

Také je důležitá správná volba startovacích kultur, jejichž fagorezistence byla testována (Coffey and Ross, 2002). Metodou inhibice mléčného kysání lze ověřit, srovnáním s dosud používanou kulturou, zda byl bakteriofág eliminován, nebo je kultura rezistentní.

### 3.2. Indikátorová metoda

#### Princip metody:

Jako barevný indikátor se používá methylenová modř v dávce 10 mg/1ml mléka prostého RIL. Pokud je přítomný bakteriofág, na kterého je testovaná kultura citlivá, dojde v porovnání s kontrolním vzorkem k časové prodlevě při redukci methylenové modři na bezbarvou formu, nebo se vzorek neodbarví. Touto metodou nelze rozlišit inhibici způsobenou přítomností RIL, výsledek při přítomnosti chemického inhibitoru může být uveden jako falešně pozitivní na bakteriofága.

#### Postup vlastního stanovení:

- 3 zkumavky se sterilním mlékem a methylenovou modří (vzorek A, B, K)
- do vzorku mléka A přidat 1 % testovaného mléka nebo syrovátky podezřelé na přítomnost bakteriofága + 1 % testované zákysové kultury
- do vzorku mléka B přidat 1 % pouze zákysové kultury
- vzorek mléka K - kontrolní
- kultivace 16 hod při doporučené teplotě (dle technologického postupu nebo Technického listu)

#### Vyhodnocení testu - závěry :

- vzorky mléka A i B jsou odbarvené, nebyl prokázán bakteriofág ani chemická inhibice
- vzorek A modře zbarvený (barva je srovnatelná s kontrolním vzorkem K) nebo jen částečně odbarvený a vzorek B zcela odbarvený, je testovaný vzorek mléka nebo syrovátky, pozitivní na přítomnost bakteriofága nebo RIL.

### 4. *Riziková místa v mlékárenské technologii*

- cisterny na mléko a na syrovátku (pozor na víka a ventily), cisterny nezaměňovat a striktně dodržovat oddělené syrovátkové hospodářství
- zásobní tanky
- ohřívák mléka
- míchadlo na výrobníku

- lisovací vany perforý, výpusti lisovacích van
- palety na sýry
- solné lázně
- homogenizátor
- termizační zařízení
- fermentační tanky

### **III. Srovnání novosti postupů a jejich zdůvodnění**

Novostí metodiky je podání ucelených informací o možnosti detekce bakteriofága včetně návrhů opatření v technologii fermentovaných výrobků a sýrů.

Jsou zde uvedeny metodické postupy nutné desinfekce. Na základě provozních postupů v rámci řešení projektu byly otestovány a vybrány chlorové desinfekční přípravky a stanovena optimální koncentrace s ohledem na výrobní zařízení.

Součástí metodiky je výčet vytipovaných rizikových míst v technologii fermentovaných výrobků, sýrů a tvarohů. V metodice jsou stanoveny mezní hodnoty kyselosti provozního zákysu. Kdy je ještě možné zákys do výroby použít a jaké opatření je nutno ve výrobě udělat. Tak aby ekonomické ztráty a zdravotní rizika byla co nejmenší.

### **IV. Popis uplatnění certifikované metodiky**

Předložená certifikovaná metodika by měla sloužit mlékárenským provozům zaměřeným na výrobu fermentovaných výrobků, tvarohů a sýrů. Metodickým postupem by se při používání tvrdé vody měl volit cyklus kyseliny citrónové (minimálně 1x za 14 dní), čímž se minimalizuje riziko biofilmů jako možné ložisko bakteriofága. Použitím chlorových preparátů, po běžné sanitaci louhem a kyselinou, minimalizovat riziko bakteriofága na technologicky únosnou denzitu (titr bakteriofága  $10^2$ ).



## V. Ekonomické aspekty

### 1. Kalkulace denní ztráty středně velké sýrárny při zpracování 60 000 l mléka/den

Tab. č. 2: Ceny surovin a produktu

suroviny	cena l (kg)	objem/hmotnost l (kg)	částka/Kč zpracování 60 000 l mléka/den
mléko	8,-	60 000 l	480 000,- (ztráta)
sýr	80,-	6 600 kg	533 000,- (ztráta)
nestandardní, neprokysaná výroby napadená fágem jako tavírenská surovina pro výrobu tavených sýrů	40,-	5455 kg	218 000,- (zisk)

**Celková denní ztráta při výrobě sýrů z 60 000 l mléka činí 795 000,- (cena mléka + cena za prodej sýrů - cena tavírenských surovin)**

### 2. Kalkulace denní ztráty ve výrobě fermentovaných výrobků při zpracování 18 000 l mléka/den

Tab. č. 3: Ceny surovin a produktů

suroviny	cena l	objem l	částka/Kč zpracování 18 000 l mléka/den
mléko	8,-	18 000 l	144 000,-
fermentovaný polotovar	10,-	18 000 l	180 000,-
neprokysaný polotovar ke zkrmení	1,-	18 000 l	18 000,-

Ztráta za zfermentovanou surovinu 162 000,- (180 000 - 18 000)

**Celková denní ztráta při výrobě fermentovaných výrobků z 18 000 l mléka činí 306 000,- (cena mléka + ztráta za zfermentovanou surovinu)**

### 3. Náklady na materiální vybavení při použití metody inhibice mléčného kysání

Tab. č. 4: Vstupní náklady na materiální vybavení

<b>zařízení a chemikálie</b>	<b>cena Kč</b>
kyselina mléčná	250,-/ 1
řídský filtr	300,-/ 100 ks
membrány z acetátu celulózy (0,45µm)	3 000,-/ 100 ks
zařízení pro membránovou filtraci (cena závislá na materiálu zařízení - plastové, skleněné, nerezové)	3 500,- až 20 000,-
<b>Cena celkem</b>	<b>7 050,- až 23 550,-</b>

Tab. č. 5: Náklady na provedení jednoho stanovení

<b>materiální vybavení</b>	<b>cena Kč</b>
řídský filtr	3,-
membrána z acetátu celulózy (0,45µm)	30,-
mléko prosté RIL	10,-
časová náročnost * (sterilizace zařízení, příprava vzorku, filtrace, inaktivace, očkování, titrace)	4000,-
<b>Cena celkem</b>	<b>4043,-</b>

\* časová náročnost pokusu čítá cca 8 hod, při kalkulaci 500,-/člověkohodina

#### **Vyčíslení ekonomického přínosu pro uživatele:**

Ekonomický přínos pro uživatele je závislý na denním množství zpracovávaného mléka a na typu provozu (sýrárny, výroba kysaných mléčných výrobků).

Výše ztrát je variabilní v závislosti na titru bakteriofága ve výrobě, může docházet pouze k prodlužování technologického procesu, kdy dochází k vyšší ekonomické zátěži, nebo k úplnému znehodnocení výrobku z důvodu nemožnosti zfermentovat mléko při výskytu fága na vysoké denzitě. Lze říci, že ztráty se pohybují u středně velkých mlékáren, jak ukazují kalkulace v tab. č. 2 a 3 řádově ve 100 tis. Kč. Naproti tomu zavedení nejjvhodnější metody pro provozy, tj. metody inhibice mléčného kysání, se pohybuje od 7 000,- do 25 000,-. Cena jednoho stanovení vychází na cca 4 000,-.

## VI. Seznam použité související literatury

- Coffey, A., Ross, R. P.:** Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002, 82: 303-321.
- Dupont, K., Vogensen, F. K., Josephsen, J.:** Detection of lactococcal 936-species bacteriophages in whey by magnetic capture hybridization PCR targeting a variable region of receptor-binding protein genes. *Journal of Applied Microbiology* 2005. 98 (4): 1001-1009.
- Émond E, Moineau S:** Bacteriophages in food fermentations. In Bacteriophage: genetics and molecular biology. UK: Caister Academic Press; McGrath S, Van Sinderen D. Norfolk 2007. 93-124.
- Chopin M. C.:** Resistance of 17 mesophilic lactic Streptococcus bacteriophages to pasteurization and spray-drying. *J Dairy Res* 1980. 47:131-139.
- Lunde M., Aastveit A. H., Blatny J. M., Nes I. F.:** Effects of diverse environmental conditions on  $\Phi$ LC3 prophage stability in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 2005. 71:721-727.
- Madera C., Garcia P., Rodriguez A., Suarez J. E., Martinez B.:** Prophage induction in *Lactococcus lactis* by the bacteriocin Lactococcin 972. *Int J Food Microbiol* 2009, 129: 99-102.
- del Rio, B., Binetti, A. G., Martín, M. C., Fernández, M., Magadán, A. H., & Alvarez, M. A.:** Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiology* 2007. 24:75-81.
- Svensson U., Christiansson A.:** Methods for phage monitoring. *Bulletin of the IDF* 1991, 263:29-39.
- Šilhánková L.:** Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologie. Praha, Victoria Publishing, 1995. 99-100. ISBN 80-85605-71-6

## VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

- Sborník Workshop pro sýraře a sýrařské mistry (2006)
- Metodické pokyny Workshop pro vedoucí laboratoří a laborantky mlékárenského průmyslu (2007)
- Sborník Workshop pro sýraře a sýrařské mistry (2007)
- Příručka Školení laborantek mlékárenského průmyslu (2007)
- Sborník Školení pro sýraře a sýrařské mistry (2007)
- Metodické pokyny Workshop pro vedoucí laboratoří a laborantky mlékárenského průmyslu (2008)
- sborník Workshop pro sýraře a sýrařské mistry (2008)
- Metodické pokyny Workshop pro vedoucí laboratoří a laborantky mlékárenského průmyslu (2009)
- Příručka Seminář pro technology a R&D (2010)
- Příručka Workshop pro sýraře a technology MADETA (2010)
- Sborník Workshop pro sýraře a sýrařské mistry (2010)

Příručka Seminář pro manažery jakosti a laborantky (2010)

Peroutková J. et al. (v tisku) Indikace bakteriofágové kontaminace v rizikových provozech, metody potvrzení fágů a možnost minimalizování rizika.

Výzkumný záměr MŠMT MSM 2672286101 Mléko - významná součást zdravé a bezpečné výživy, Výzkumný směr III, Výzkum mikroorganismů vztahujících se k mléku a mléčným výrobkům jak těch, které jsou technologicky a zdravotně potřebné, tak těch, jejichž vlastnosti jsou technologicky nežádoucí nebo jsou škodlivé pro zdraví člověka (2011)

**Oponenti:**

**Oponent ze státní správy:**

MVDr. Jiří Hlaváček  
Státní veterinární správa ČR  
Slezská 7  
120 56 Praha 2

**Oponent z oboru:**

Ing. Jiří Kopáček, CSc.  
Českomoravský svaz mlékárenský  
V Olšínách 75  
100 00 Praha 10