

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



Bakalářská práce

**Mikrobiologická zátěž surovin při prostojích v zásobních
tancích a zařízeních**

Lucie Kasalová

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Konzultant: Ing. Zuzana Řízková

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

Poděkování:

Chtěla bych tímto poděkovat vedoucí bakalářské práce paní Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D., za odborné vedení mé bakalářské práce, připomínky a rady, kterými mi byla nápomocna při zpracování této bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Zuzaně Řízkové a paní Michaele Kasalové, za odborné rady a nápomoc při práci v laboratoři.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 15. 5. 2018

Podpis studenta

ABSTRAKT:

Lucie Kasalová

Mikrobiologická zátěž surovin při prostojích v zásobních tancích a zařízeních

Bakalářská práce

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Zdravotnická bioanalytika

Cíl práce:

Cílem bakalářské práce je zjistit, zda suroviny používané pro potravinářskou výrobu je možné využívat po dobu doporučeného skladování, ale i po uplynutí této doby a v jaké míře jsou ovlivněny nárůstem mikrobů. Dále charakterizovat klasické kultivační metody využívané v mikrobiologii potravin a popsané postupy stanovování mikroorganismů v potravinách.

V experimentální části, která se zabývá testováním surovin (ovocných koncentrátů) uchovávaných v zásobních tancích, se pokusíme zjistit, v jaké míře podléhají mikrobiologické zátěži. Pro porovnání výsledků experimentální části budou zvolena dvě místa odběru vzorku – první na panelu u zásobního tanku, druhé na míchacím tanku, kdy jde surovina do výrobní části.

Metody:

Teoretická část je zaměřena na popis kultivačních metod používaných v mikrobiologických laboratořích pro stanovení jednotlivých druhů mikroorganismů, především stanovení celkového počtu mikroorganismů, stanovení počtu plísní a kvasinek atd.

V praktické části byly sledovány odlišnosti v počtech mikroorganismů v ovocných koncentrátech při prostojích ve výrobní sféře, kdy docházelo k odběrům vzorků v průběhu užívání suroviny 3 krát až 6 krát. Úkolem této bakalářské práce bylo zjistit, v jaké míře se v surovině nachází mikrobiologická zátěž a ověřit, zda je tato surovina samoudržná i po uplynutí doby doporučené ke spotřebování.

Výsledky:

Ve vzorcích ovocných koncentrátů byly počítány jednotlivé stanovované kolonie mikroorganismů. Počítání kolonií bylo prováděno u každého vzorku jablečného a hroznového koncentrátu paralelně na dvou Petriho miskách.

Pro jablečný koncentrát je vhodná doba skladování v zásobních tancích 2 měsíce. Z výsledných dat je patrné, že tato surovina může být označena jako samoúdržná, protože výsledky mikrobiologické zátěže odpovídaly mikrobiologickým parametrům stanovených pro skladování v tancích ještě o více jak 2 měsíce déle a došlo tak k využití celé suroviny pro výrobu.

U hroznového koncentrátu je tomu naopak. Ze získaných výsledků je viditelný nárůst mikrobiální zátěže s dobou skladování, kdy v surovině došlo k velké mikrobiální zátěži ještě před skončením doporučené doby skladování. Proto není možné označit hroznový koncentrát jako samoúdržnou surovinu.

Závěry:

Ze zjištěných výsledků je patrné, že vyšetřované suroviny se od sebe liší. A to jak složením, kde se liší sacharidy (fruktóza v jablečném koncentrátu, D-glukóza v hroznovém koncentrátu), tak i následnou mikrobiologickou zátěží, která byla mnohem vyšší u hroznového koncentrátu, jak vyplývá ze získaných hodnot.

Klíčová slova: ovocný koncentrát, mikroorganismy, kultivační metody

ABSTRACT:

Lucie Kasalová

Microbiological load of raw materials at downtimes in storage tanks and equipments

Bachelor thesis

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Health bioanalytics

Background:

The aim of bachelor thesis is to find out whether the raw materials, used for food production, can be used for the recommended storage period but also after this period and to what extent they are affected by the increase of microbes. Further characterize the classical cultivation methods used in food microbiology and the process for the determination of microorganisms in food.

In the experimental part, which deals with the testing of raw materials (fruit concentrates) stored in storage tanks, we try to find out to what extent they are subject to microbiological stress. For the comparison of the results of the experimental part, two sampling points will be selected - the first on the panel for the tank, the second on the mixing tank, where the raw material goes into the production part.

Methods:

The theoretical part is focused on description of cultivation methods used in microbiological laboratories for determination of individual microorganisms, especially determination of total number of microorganisms, determination of number of molds and yeasts etc.

In the practical part, the differences in the number of microorganisms in fruit concentrates were observed in the production sphere, where the samples were taken during the use of the raw material 3 times to 6 times. The aim of this work was to find out to what extent the microbiological burden is found in the raw material and to check if the raw material is self-sustaining even after the recommended period for consumption.

Results:

In the fruit concentrate samples individual colonies of microorganisms were counted. Counting colonies was performed on each sample of apple and grape concentrate in parallel on two Petri dishes.

For Apple concentrate, storage times in storage tanks should be 2 months. It can be seen from the results that this raw material can be labeled as self-sustaining since the results of the microbiological load corresponded to the microbiological parameters determined for storage in the tanks for more than 2 months longer and the whole raw material for production was used.

The grape concentrate is the opposite. From the results obtained, the increase of the microbial load with storage time is visible, when the raw material has a large microbial load before the end of the recommended shelf life. Therefore, it is not possible to mark grape concentrate as a self-sustaining raw material.

Conclusions:

The results found show that the raw materials under investigation differ from one another. Both the composition of carbohydrates (fructose in apple concentrate, D-glucose in grape concentrate) and the subsequent microbiological load, which was much higher in the grape concentrate, as evidenced by the obtained values.

Keywords: fruit concentrate, microorganisms, cultivation methods

Obsah

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	6
ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE:	10
ZKRATKY:.....	11
1. ÚVOD.....	13
2. MIKROORGANISMY DŮLEŽITÉ V POTRAVINÁŘSTVÍ.....	14
2.1 BAKTERIE	14
2.1.1 BAKTERIE DŮLEŽITÉ V POTRAVINÁŘTVÍ	14
2.2 PLÍSNĚ	15
2.2.1 VÝSKYT PLÍSNÍ A JEJICH VÝZNAM V POTRAVINÁŘSTVÍ.....	16
2.3. KVASINKY	17
2.3.1. VÝSKYT KVASINEK A JEJICH VÝZNAM V POTRAVINÁŘSTVÍ	18
3. ZÁKLADNÍ PRINCIPY MIKROBIOLOGICKÉ ANALÝZY POTRAVIN KULTIVAČNÍMI METODAMI	18
3.1 ODBĚR VZORKŮ	18
3.2 ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ POTRAVIN	19
3.2.1 ODBĚR NAVÁŽKY	19
3.2.2 ŘEDĚNÍ VZORKŮ	19
3.3 KVALITATIVNÍ ANALÝZA	19
3.4 KULTIVAČNÍ MÉDIA	20
3.5 IZOLAČNÍ TECHNIKY	20
3.5.1 IZOLACE ROZTĚREM	21
3.5.2 IZOLACE PŘELIVEM.....	21
3.6 INKUBACE	21
3.7 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ NA PEVNÝCH PŮDÁCH.....	22
4. ANALYZOVANÝ MATERIÁL A ZPŮSOB JEHO UCHOVÁNÍ.....	25
4.1 LABORATORNÍ METODY V MIKROBIOLOGICKÉ ANALÝZE.....	29
4.1.1 STANOVENÍ CELKOVÉHO POČTU MIKROORGANISMŮ (CP)	29
4.1.2 STANOVENÍ PLÍSNÍ A KVASINEK (PK)	29
4.1.3 STANOVENÍ ANAEROBNÍCH SPOROTVORNÝCH MIKROORGANISMŮ (SAA)	30

4.1.4	STANOVENÍ MEZOFILNÍCH A TERMOFILNÍCH AEROBNÍCH MIKROORGANISMŮ (SP).....	31
4.1.5	STANOVENÍ ACID TOLERANTNÍCH MIKROORGANISMŮ (OSA)	32
4.1.6	STANOVENÍ BAKTERIÍ RODU ALICYCLOBACILLUS (BAT) ..	32
5.	HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	34
6.	DISKUZE	45
7.	ZÁVĚR	47
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	48
9.	SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ A GRAFŮ	51

ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE:

Cílem bakalářské práce je zjistit, zda suroviny používané pro potravinářskou výrobu je možné využívat po dobu doporučeného skladování, ale i po uplynutí této doby a v jaké míře jsou ovlivněny nárůstem mikrobů.

V teoretické části bylo cílem práce zpracovat rešerši literatury na téma mikrobiologie potravin. Dále charakterizovat klasické kultivační metody využívané v mikrobiologii potravin a popsané postupy stanovování mikroorganismů v potravinách.

V experimentální části, která se zabývá testováním surovin (ovocných koncentrátů) uchovávaných v zásobních tancích, se pokusíme zjistit, v jaké míře podléhají mikrobiologické zátěži. Pro porovnání výsledků experimentální části budou zvolena dvě místa odběru vzorku – první na panelu u zásobního tanku, druhé na míchacím tanku, kdy jde surovina do výrobní části.

ZKRATKY:

atd.	= a tak dál
apod.	= a podobně
BAT	= bakterie rodu <i>Alicyclobacillus</i>
CP	= celkový počet mikroorganismů
Č.Š.	= číslo šarže
DNA	= deoxyribonukleová kyselina
HZKO	= hroznový koncentrát
JAKO	= jablečný koncentrát
KTJ	= kolonietvorné jednotky
LAS	= Látalův anaerobní systém
OSA	= acid tolerantní bakterie
PK	= plísně a kvasinky
SP	= mezofilní a termofilní mikroorganismy
SAA	= anaerobní sporetvorné mikroorganismy
TSA	= trypton sójový agar
tzn.	= to znamená

TEORETICKÁ ČÁST

1. ÚVOD

Mikrobiologické rozborů potravin a jejich surovin se provádějí k různým účelům, a proto mají různé zaměření. Účelem je kontrola průběhu technologických postupů a tím i kontrola kvality a hygienické nezávadnosti výrobků.

Běžné potraviny obsahují vždy mikroorganismy, aniž to představuje zdravotní riziko pro spotřebitele. Dokonce i tzv. teplem sterilované potraviny nejsou sterilní, neboť jde pouze o tzv. technickou sterilaci, jež ničí ty mikrobiální druhy, které by se v potravine mohly během jejího skladování pomnožit. Při sterilaci mohou přežívat spory termorezistentních bakterií.

Ohrožení zdraví konzumenta, vyvolané výskytem nežádoucích mikroorganismů v potravinách nastává při nedodržení základních sanitačních a hygienických podmínek, při nedodržení technologického postupu, při nesprávném skladování potravin nebo jejich surovin apod. V některých případech této technologické nebo distribuční nekázně sice nedochází k ohrožení konzumenta, ale ke zhoršení kvality výrobku z hlediska jeho senzorických nebo nutričních vlastností.

Zdravotní nezávadnost („bezpečnost“) potravin a její protiklad (rizikovost) je v současné době jedním z hlavních problémů potravinářské výroby. Bezpečné jsou potraviny, které neobsahují patogenní nebo podmíněně patogenní organismy ani cizorodé, zdraví škodlivé nebo toxické látky. K zabezpečení potravin před těmito škodlivými faktory je zapotřebí rozsáhlý systém preventivních opatření, který začíná u surovin, probíhá přes výrobu a distribuční síť až do podniků společného stravování a domácností spotřebitele.

Pro zajištění zdravotní nezávadnosti výrobků, podléhají suroviny, ale i hotové produkty kontrole v mikrobiologické a analytické laboratoři.

Práce byla vytvořena ve spolupráci s potravinářským závodem zpracovávajícím čerstvé ovoce, ovocné koncentráty a pyré.

2. MIKROORGANISMY DŮLEŽITÉ V POTRAVINÁŘSTVÍ

V běžné praxi jsou v kvalitativním mikrobiologickém rozboru potravin důležité jen mikroorganismy, které se rozhodující mírou podílejí na kažení potravin a surovin a mikroorganismy důležité z hlediska zdravotní nezávadnosti potravin (Betina, 1988).

Po kvalitativním stanovení izolátů z potravin, tj. spočítání množství kolonií na agarové plotně a po přepočítání na 1g vyšetřovaného vzorku, se přikročí k rodové identifikaci mikroorganismů.

Na základě vzhledu kolonií (barva, povrch, konzistence, ...) jsou mikroorganismy narostlé na kultivační půdě rozděleny na bakterie, kvasinky a plísně. V některých případech je těžké od sebe odlišit kvasinky od bakterií nebo plísní, proto je třeba zhotovit ještě preparát pro mikroskopii (Betina, 1988).

2.1 BAKTERIE

Bakterie jsou jednobuněčné prokaryotické mikroorganismy, které nemají morfologicky diferencované jádro oddělené jadernou membránou od cytoplazmy, ale mají DNA, která představuje chromozóm bakteriální buňky (Tvrdoň, 1986).

Při identifikaci bakterií se určují základní morfologické, kultivační, fyziologické, biochemické a další vlastnosti určité kultury. Na základě zjištěných vlastností se bakterie klasifikuje do příslušného rodu a druhu. Při identifikaci se musí vycházet z čisté kultury, pro kterou je potřeba znát její základní požadavky na výživu a kultivaci (např. druh a konzistenci média, pH, vztah ke kyslíku, optimální teplotu kultivace) (Betina, 1988).

2.1.1 BAKTERIE DŮLEŽITÉ V POTRAVINÁŘTVÍ

Kvantitativní a kvalitativní mikrobiologické zkoumání potravin vyžaduje spolehlivé diagnostické výsledky pomocí malého počtu diferenciačních zkoušek. V běžné potravinářské praxi se doporučuje sledovat jen bakterie, které mají osobitý význam z hlediska potravinářské mikrobiologie. Jsou to zejména bakterie, které se významně podílejí na kažení potravin a potravinových surovin a bakterie důležité z hlediska zdravotní nezávadnosti potravin.

Patogenní bakterie se v potravinách nesmí vyskytovat. Za patogenní se považují také bakterie, které po vniknutí do lidského organismu zapříčiní vznik onemocnění. Podmíněně patogenní a toxinogenní bakterie se mohou vyskytovat v povoleném

počtu nebo vůbec ne, závisí to na druhu vyšetřovaného vzorku a pro něho platných norem. Podmíněně patogenní bakterie způsobují onemocnění jen v určitých podmínkách a mohou být příčinou alimentárních (potravinových) infekcí. Toxinogenní bakterie mohou vyvolat alimentární intoxikaci toxickým metabolitem, který někdy nepodléhá destrukci ani při tepelné úpravě potravin (např. stafylokokový enterotoxin).

Pro určení rodové příslušnosti nejdůležitějších bakteriálních kontaminací se určují tyto znaky: barvitelnost dle Grama, základní morfologické vlastnosti buňky, tvorba spor, produkce oxidázy a katalázy, způsob zužitkování glukózy v aerobních a anaerobních podmínkách (Betina, 1988).

Přítomnost *Alicyclobacillus acidoterrestris* a zejména jeho spor, je v současné době hlavním problémem ovoce a zeleniny v potravinářském průmyslu. Tyto bakterie tvořící spory způsobují zhoršení kvality ovocných šťáv a koncentrátů, které jsou přičítány produkci metabolitů (nežádoucí změny chuti a vůně kontaminovaného výrobku). *Alicyclobacillus acidoterrestris* je odolný vůči pasterizaci. Tepelné zpracování může zničit vegetativní formy, přičemž je prakticky nemožné vyloučit tepelně odolné spory. Membránová filtrace je běžně používaná metoda pro eliminaci mikroorganismů v průmyslu. Nicméně kvůli vysoké viskozitě ovocných koncentrátů použití této metody není efektivní a spotřebuje velké množství energie. Proto jsou vyvíjeny nové alternativní metody pro inaktivaci spor *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Djas et al, 2011; Christopher, 2011).

Kombinované vysokotlaké a tepelné zpracování ukázalo účinnost pro kontrolu spor *A. acidoterrestris*. Účinnost kombinované kontroly se však může změnit na koncentraci jablečného džusu. Je pravděpodobné, že rozdíly v dostupnosti vody vysvětlují větší odolnost spor vůči vysokotlaké inaktivaci v koncentrátech šťávy než ve zředěných šťávách (Sun-Young Lee et al., 2006).

2.2 PLÍSNĚ

Vláknité houby neboli plísně představují velmi heterogenní skupinu eukaryotních mikroorganismů náležících mezi houby (Fungi). Jsou to jednobuněčné až mnohobuněčné organismy, tvořící vláknité povlaky na povrchu nebo uvnitř substrátů. Podle přítomnosti nebo typu rozmnožování náleží technicky důležité plísně do těchto taxonomických jednotek:

1. do podkmenu Zygomycotina a jsou charakterizována jednobuněčným, tj. nepřehrádkovaným myceliem a pohlavní rozmnožování se děje endosporami
2. do podkmenu Ascomycotina, charakterizovaného přehrádkovaným myceliem a pohlavním rozmnožováním za tvorby askospor tvořených v asku, nepohlavní rozmnožování nastává exosporami
3. do podkmenu Deuteromycotina (*Fungi imperfecti*, tj. houby nedokonalé) s přehrádkovým myceliem, avšak pouze s nepohlavním rozmnožováním (Cempírková, 1997).

2.2.1 VÝSKYT PLÍSNÍ A JEJICH VÝZNAM V POTRAVINÁŘSTVÍ

Hlavním rezervoárem plísní je půda, z níž se dostávají do vzduchu, na organický materiál převážně rostlinného původu, na exkrementy zvířat a průmyslové předměty uložené ve vlhku. Různá barviva konidií i endospor plísní chrání tyto buňky před nepříznivými vlivy ultrafialové složky slunečního světla, a proto se plísně vyskytují jako velmi častá vzdušná kontaminace.

Význam plísní je dán jejich fyziologickými vlastnostmi. Vzhledem k přísně aerobní povaze se mohou rozmnožovat většinou pouze na povrchu napadeného materiálu. Přísně aerobní povaha spolu se širokým enzymovým vybavením umožňuje plísním napadat nejrůznější materiál včetně kůže, tkanin, papíru, syntetických barviv, některých plastů apod. Plísně jsou schopny se rozmnožovat také za poměrně nízké vodní aktivity prostředí, a proto přednostně napadají povrch džemů, marmelád, chleba i různého pečiva, případně i navlhle suroviny, jako mouku, skladované obilí, mák, sóju, arašídů atd. Napadený materiál pak již není vhodný pro přípravu potravin. Schopnost rozmnožovat se i za velmi nízkého pH umožňuje plísním uplatnit se i tam, kde většina bakterií již není schopna metabolismu (např. v kyselém ovoci, ovocných šťávách, džemech a marmeládách).

Mimořádně vysoký negativní význam mají plísně z hlediska tvorby mykotoxinů (např. plesnivá jablka mohou být zdrojem toxinu patulinu, který je produkován některými peniciliny a aspergily). Některé plísně jsou patogenní pro člověka nebo zvířata, jiné vyvolávají alergické reakce u citlivých jedinců. Některé druhy jsou fytopatogenní.

Pozitivní význam mají plísně jako producenti antibiotik a organických kyselin (citronové, fumarové, itakonové, glukonové a šřavelové) a při provádění

specifických oxidací složitých chemických sloučenin při výrobě léků (Šilhánková, 2002)

2.3. KVASINKY

Kvasinky jsou eukaryotní organismy, které patří mezi houby. Netvoří taxonomickou skupinu a je proto obtížné je přesně definovat. Převážně se rozmnožují pučením a pouze výjimečně přehrádečným dělením. Některé kvasinky tvoří pravé mycelium a nebo pseudomycelium (Bendová, 1985).

Český název dostaly pro schopnost většiny druhů zkvašovat monosacharidy a některé disacharidy, případně i trisacharidy na etanol a oxid uhličitý (Šilhánková, 2002).

Podle způsobu sexuálního rozmnožování se kvasinky rozdělují do tří hlavních tříd:

1. rody tvořící askospory (Ascomycotina)
2. rody tvořící bazidiospory nebo sporidie a heterokaryotní mycelium s přehrádkami (Basidiomycotina)
3. rody, u nichž není známa tvorba pohlavních spor (Deuteromycotina, „kvasinkové mikroorganismy“)

Kvasinky hrají důležitou roli jak při výrobě, tak při znehodnocování potravin. Neustálý a rostoucí význam těchto mikroorganismů vedl k vývoji jejich taxonomie, nomenklatury a identifikace. Kvasinky jsou tradičně charakterizovány, klasifikovány a identifikovány pomocí morfologických a fyziologických znaků (např. tvar buněk, způsob sexuální a asexuální reprodukce, anaerobní fermentace a aerobní "asimilace" cukrů a určité požadavky na růst). Kromě běžných diagnostických testů poskytují biochemické metody důležité údaje pro charakterizaci kvasinek. Podobnosti nebo rozdíly v nejdůležitějších makromolekulách v buňkách (DNA, RNA, proteiny a polysacharidy) lze použít k objasnění nejen stupně příbuznosti, ale také k odhalení evolučních spojení (Deák, 1987).

2.3.1. VÝSKYT KVASINEK A JEJICH VÝZNAM V POTRAVINÁŘSTVÍ

Kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy jsou v přírodě velmi rozšířeny. Protože mají většinou pouze sacharolytické schopnosti, vyskytují se především na materiálech obsahujících cukry, tj. na ovoci a na cukernatých potravinách.

Rozmnožování kvasinek je podmíněno jejich fyziologickými vlastnostmi, tj. potřebou cukru, odolností ke kyselému prostředí, u některých druhů také tolerancí k vysokému osmotickému tlaku a je omezeno jejich neschopností štěpit bílkoviny.

Kvasinky se rozmnožují mnohem pomaleji než bakterie, a proto s nimi mohou soutěžit jenom za podmínek, jež jsou pro bakterie nepříznivé (nízké pH, nízký oxidoredukční potenciál apod.). Z těchto důvodů se kvasinky uplatňují při kažení kompotů, ovocných moštů a jiných ovocných výrobků.

Negativně se uplatňují také patogenní kvasinky (hlavně rod *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, rody *Filobasidiella* a *Malassezia* a některé druhy rodu *Trichosporon*). Většinou způsobují tyto kvasinky vážná onemocnění pouze u oslabených jedinců a při poškození imunitního systému.

3. ZÁKLADNÍ PRINCIPY MIKROBIOLOGICKÉ ANALÝZY POTRAVIN KULTIVAČNÍMI METODAMI

3.1 ODBĚR VZORKŮ

Důležitou součástí mikrobiologického rozboru je správný odběr vzorků. Vzorkování je stanovený postup, při kterém je část látky, materiálu nebo výrobku odebrána tak, aby poskytla reprezentativní vzorek. Volba odběrového místa, způsob odběru, vzorkovací pomůcky, podmínky transportu do laboratoře a uskladnění před vlastním zpracováním nesmí tedy ovlivnit jakost vzorku reprezentujícího posuzovaný celek. Správnost provedení je nezbytným předpokladem použitelnosti a srovnatelnosti dosažených výsledků jednotlivých analýz (Demnerová, 2016).

Musí být odebráno vždy tolik náhodně vybraných vzorků, aby vystihovaly svými vlastnostmi i masivností a druhem mikrobiální kontaminace vyšetřovanou potravinu. Nutnost vyšetření do určité míry reprezentativního souboru vzorků vyplývá především ze skutečnosti, že i mezi potravinami téhož druhu i téže šarže mohou být rozdíly v množství a složení mikroflóry (Hrubý, 1996).

3.2 ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ POTRAVIN

3.2.1 ODBĚR NAVÁŽKY

Příprava navážek vzorku se provádí ihned po otevření obalu sterilními nástroji v bezprostřední blízkosti plamene. Hmotnost navážky se řídí příslušnou normou a navážka musí vystihnout celý vzorek, což znamená, že musí být zastoupeny složky ve stejném poměru, v jakém se vyskytují v původním vzorku. Hmotnost navážky je obvykle pro kvantitativní vyšetření 10 gramů nebo 10 ml, pro přímé očkování vzorku je to 1 ml (Brožková, 2016).

3.2.2 ŘEDĚNÍ VZORKŮ

Příprava suspenze se řídí dle normy ČSN EN ISO 6887-1 Mikrobiologie potravin a krmiv – Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinásobné ředění – Část: Všeobecné pokyny pro přípravu výchozí suspenze a desetinásobných ředění.

Podstatou metody je připravit výchozí suspenzi tak, aby bylo dosaženo rovnoměrné distribuce mikroorganismů přítomných ve zkoušeném vzorku. V případě potřeby lze připravit i desetinásobná ředění ke snížení počtu mikroorganismů tak, aby bylo možno počítat jejich kolonie (interní materiály).

Jako univerzální ředící roztok se běžně používá sterilní fyziologický roztok s peptonem. Tekuté vzorky se promíchají, pevné a kašovitě vzorky se zhomogenizují. Aby nedošlo k teplotnímu šoku mikroorganismů, je velmi důležitá teplota ředícího roztoku, ta by měla odpovídat teplotě vzorku (běžné laboratorní teplotě) (Brožková, 2016).

Pro přípravu výchozí suspenze v experimentální části bylo použito primární ředění, u kterého je faktor ředění $d = 10^{-1}$. Výchozí suspenze (primární ředění) je suspenze, roztok nebo emulze získaná poté, kdy odvážené či objemově odměřené množství výrobku určeného ke zkoušení bylo smícháno s devítinásobným množstvím ředícího roztoku.

3.3 KVALITATIVNÍ ANALÝZA

Cílem kvalitativního stanovení vzorku je prokázat přítomnost či nepřítomnost jediné kolonii tvořící jednotky (KTJ) detekovaného mikroorganismu v 10g vzorku. Pro možnost zachytu a průkazu přítomnosti 1 KTJ v potravinovém vzorku je nutno nejprve přítomný mikroorganismus pomnožit. Toto pomnožení se provádí buď

v selektivních nebo v neselektivních tekutých půdách. Selektivní média obsahují látky podporující růst vybraného rodu či druhu mikroorganismů a zároveň inhibují růst doprovodné mikroflóry ve vzorku (Demnerová, 2016).

3.4 KULTIVAČNÍ MÉDIA

Kultivační – živná – média jsou koncipována tak, aby vyhovovala všem nárokům daného mikroorganismu na výživu (dostatek živin a zdrojů energie), pH, osmotický tlak, redox potenciál a další.

Kultivační půda představuje definovanou směs látek tekuté, polotuhé nebo tuhé povahy, která obsahuje přírodní a/nebo syntetické součásti určené k pomnožení nebo zachování životaschopnosti mikroorganismů.

Při přípravě jednotlivých půd se postupuje podle konkrétní normy a podle doporučení výrobce. K rehydrataci půd se používá destilovaná, případně deionizovaná voda. Předepsané množství dehydratované půdy se odváží a nasype se do poloviny potřebného objemu destilované vody ve vhodné nádobě. Zbytek vody se lije po stěnách nádoby, aby došlo k dokonalému spláchnutí prášku. Po promíchání se agarové půdy nechají asi 15 minut bobtnat, nabobtnání agaru umožní jeho snadnější rozpuštění.

Živné půdy se sterilizují autoklávováním nebo filtrací. Sterilizace autoklávováním se provádí v autoklávu, obecně trvá 15 minut při 121°C za tlaku 0,1 MPa, přičemž do doby sterilizace se nepočítá čas potřebný k docílení teploty 121°C a následné zchlazení. Živná média lze také sterilizovat filtrací za podmínek vakua nebo přetlaku. Používají se sterilní membrány nebo filtry s póry o průměru 0,22 µm a sterilní filtrační zařízení.

Hotová živná média se po sterilizaci rozplňují do příslušných kultivačních nádob nebo se uchovávají přímo v lahvích a před použitím se rozehřívají a temperují na teplotu 45-50°C (Cupáková, 2008).

3.5 IZOLAČNÍ TECHNIKY

Pro úplnou charakterizaci mikroorganismů přítomných ve vzorcích potravin, vody apod. je nutné získat čistou kulturu, která obsahuje pouze buňky jednoho druhu. Pro izolaci mikroorganismů významných v potravinářském průmyslu se využívají

techniky čárkování nebo roztěru na plochu příslušného agarového média v Petriho misce, nebo tzv. metoda přelivu.

3.5.1 IZOLACE ROZTĚREM

Při izolaci roztěrem se 0,1-0,3 ml analyzované suspenze rovnoměrně rozetře po povrchu předsušeného agarového média v Petriho misce pomocí ožehnuté skleněné zahnuté činky ve tvaru hokejky. Při vhodném naředění výchozí suspenze narostou po kultivaci na povrchu agaru jednotlivé kolonie mikroorganismů (Demnerová, 2016).

3.5.2 IZOLACE PŘELIVEM

Vzorek naředěný desítkovým ředěním v objemu 1 až 2 ml se napipetuje do sterilní Petriho misky a přelije se příslušnou agarovou půdou vytemperovanou na 45-50 °C. Krouživými pohyby se docílí rovnoměrného rozprostření buněk v agaru. Po ztuhnutí agarové půdy se suspenzí buněk následuje kultivace za vhodných podmínek (Demnerová, 2016).

3.6 INKUBACE

Po zaočkování půdy musíme nechat mikroorganismy inkubovat při jejich optimální teplotě růstu, což je pro kvasinky většinou 26-30 °C, pro plísň 20-28 °C, pro mezofilní bakterie 30-37 °C, psychrofilní 20 °C a termofilní 50-55 °C. Agarové desky se kultivují převrácené, tj. víčkem na podložce (tzv. zavěšený agar), aby nedošlo ke stékání zkondenzovaných par z víčka na kulturu.

Při optimálních podmínkách je doba potřebná pro dostatečný nárůst kultury (tzv. inkubační doba) různá (u bakterií a kvasinek 24-48 hodin, u plísni 2-5 dnů) (Demnerová, 2001).

Mikroorganismy se značně liší svými nároky na přítomnost nebo nepřítomnost kyslíku. V závislosti na stupni tolerance vůči molekulárnímu kyslíku je možno mikroorganismy klasifikovat do následujících skupin:

- aerobní mikroorganismy vyžadují pro svůj metabolismus jako konečný akceptor elektronů kyslík (např. rody *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Mycobacterium*);
- fakultativně anaerobní mikroorganismy mohou růst v aerobních i anaerobních podmínkách (např. rody *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Bacillus*);

- mikroaerofilní organismy nerostou dobře za přítomnosti vzdušného kyslíku, vyžadují specifické složení atmosféry – zejména zvýšenou tenzi CO₂ (např. rody *Campylobacter*, *Lactobacillus*);
- anaerobní mikroorganismy vyžadují absenci kyslíku v prostředí, kyslík na ně působí toxicky a odumírají (např. rod *Clostridium*) (Cupáková, 2008).

3.7 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ NA PEVNÝCH PŮDÁCH

Pro stanovení počtu mikroorganismů na pevných půdách se používají dvě kultivační techniky, a to očkování zaléváním do pevných agarových půd (metoda zalití) a očkování roztěrem na povrch pevné půdy (metoda roztěru).

V mikrobiologické laboratoři je nejrozšířenější metoda pro hodnocení počtu mikroorganismů desková metoda. Desková čili plotnová metoda je založená na zjištění počtu kolonií vyrostlých na ztužených půdách za předpokladu, že každá kolonie vznikla z jedné buňky. Tato metoda umožňuje zjištění počtu živých mikrobů jak v kapalných nebo tuhých látkách, tak i na povrchu předmětů, ve vzduchu apod. Používá se pro zjištění celkového počtu přítomných mikroorganismů nebo počet buněk určité skupiny mikroorganismů, což je umožněno použitím selektivních půd, na nichž se mohou rozmnožovat pouze ty druhy mikroorganismů, které chceme stanovit. Zjištěný počet kolonií se udává jako počet kolonietvorných jednotek (KTJ, angl. zkratka CFU = colony forming unit), což zahrnuje i fakt, že některé kolonie nevznikly z jedné buňky.

Odečítání a vyjádření výsledků:

- Nezjištěny žádné kolonie

Jestliže dvě paralelní misky očkované neředěným vzorkem (nápojem) nebo výchozí suspenzí (ostatní: koncentrátem, příkrmem) neobsahují žádné kolonie, výsledek se vyjádří takto:

neředěný kapalný vzorek: < 1/ml

Ostatní: < 10/g

- odhad nízkých počtů, 15 a méně kolonií

Jestliže dvě paralelní misky očkované neředěným vzorkem (nápojem) nebo výchozí suspenzí (ostatní: koncentrátem, příkrmem) obsahují méně než 15 kolonií, vypočte se aritmetický průměr m z počtu kolonií z obou misek

neřaděný kapalný vzorek: $NE = m/ml$

ostatní: $NE = m * 10/g$,

kde NE je odhadnutý počet mikroorganismů na gram výrobku

- 15 – 300 kolonií

Pro výpočet lze použít obě paralelní misky dvou po sobě jdoucích řaděních (celkem 4 misky). Je nutné, aby jedna z misek obsahovala alespoň 15 kolonií.

Celkový počet mikroorganismů N na ml nebo g výrobku se vypočítá:

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1 * n_2) * d}$$

kde N je celkový počet mikroorganismů v g nebo v ml, ΣC je součet všech kolonií na vybraných plotnách, n_1 je počet ploten z prvního řadění, n_2 je počet ploten z druhého řadění, d je faktor řadění n_1 .

PRAKTICKÁ ČÁST

4. ANALYZOVANÝ MATERIÁL A ZPŮSOB JEHO UCHOVÁNÍ

Praktická část byla provedena přímo ve výrobě a laboratořích potravinářského výrobního závodu. Materiálem ke zkoumání praktické části bakalářské práce byly jablečný a hroznový koncentrát, které jsou dodávány v cisternách a uchovávány v zásobních tancích před zpracováním ve výrobním procesu.

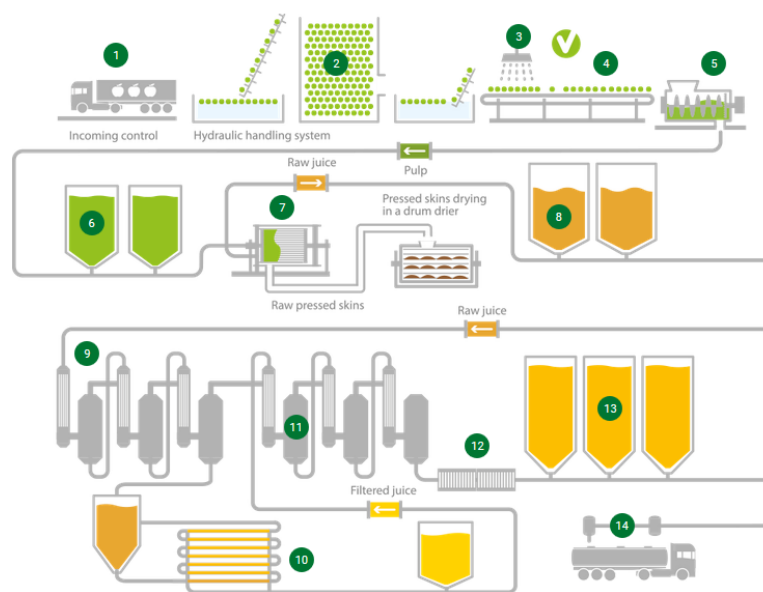
Ovocný koncentrát je vyčěřená a zahuštěná šťáva, bez přídavku cukru, kyselin nebo chemických konzervačních látek, tzn. koncentrát je 100% ovocný produkt. Principem výroby koncentrátu (obr. 1) je zahuštění ovocné šťávy až na koncentraci rozpustné sušiny 65 –70 %. Takto zahuštěná šťáva je v důsledku nízké aktivity vody a nízkého pH samoúdržná (tzn., že mají takové vlastnosti, jež zabraňují růstu kvasinek a plísní a nemusí být konzervovaná) (Večerková, 2013). Vyrábí se z čerstvého ovoce lisováním. Čerstvá vylisovaná šťáva je šetrně upravena na čistou šťávu, která je následně zahuštěna za hlubokého vakua a nízkých teplot pro zachování všech příznivých organoleptických vlastností, barvy a nutričních hodnot (Cvrková 2008; Frutig, 2016).

Jablečný koncentrát (JAKO) je zhuštěná čistá šťáva získávaná z čerstvě vylisovaných jablek, ze které se odpaří voda. Doba zpracovatelnosti této suroviny dodávané v cisternách je 2 měsíce. Jablečný koncentrát je dodáván od firmy Zipperle, která se řídí mottem, že neexistuje odvětví, pro které je prémiová kvalita tak důležitá jako při výrobě kojenecké výživy (Zipperle).

Hroznový koncentrát (HZKO) je získáván vylisováním plodů vinné révy a následného odpaření vody. Při dodání koncentrátu v cisterně je jeho doba zpracovatelnosti 1 měsíc. Hroznový koncentrát je dodáván od firmy Agrumaria Corleone.

Suroviny dodávané v cisternách a uchovávané v tancích jsou neseptické, tzn., nejsou zbaveny choroboplodných zárodků mikroorganismů. Zásobní tanky jsou vyrobené z nerezové oceli a jejich objem jímá 25 000 litrů suroviny. Schématický obrázek zásobního tanku je na obrázku č. 2. Před naplněním zásobního tanku surovinou musí být tank vysanitován, aby nedošlo ke znečištění nové suroviny. Sanitací prochází celé potrubí, které vede do výrobní sféry.

Pro suroviny uchovávané v zásobních tancích, jsou definované limitní hodnoty mikrobiologické zátěže, které nesmí být v průběhu používání suroviny překročeny. Limitní hodnoty, které by měla surovina splňovat, jsou uvedené v tabulce č. 1.

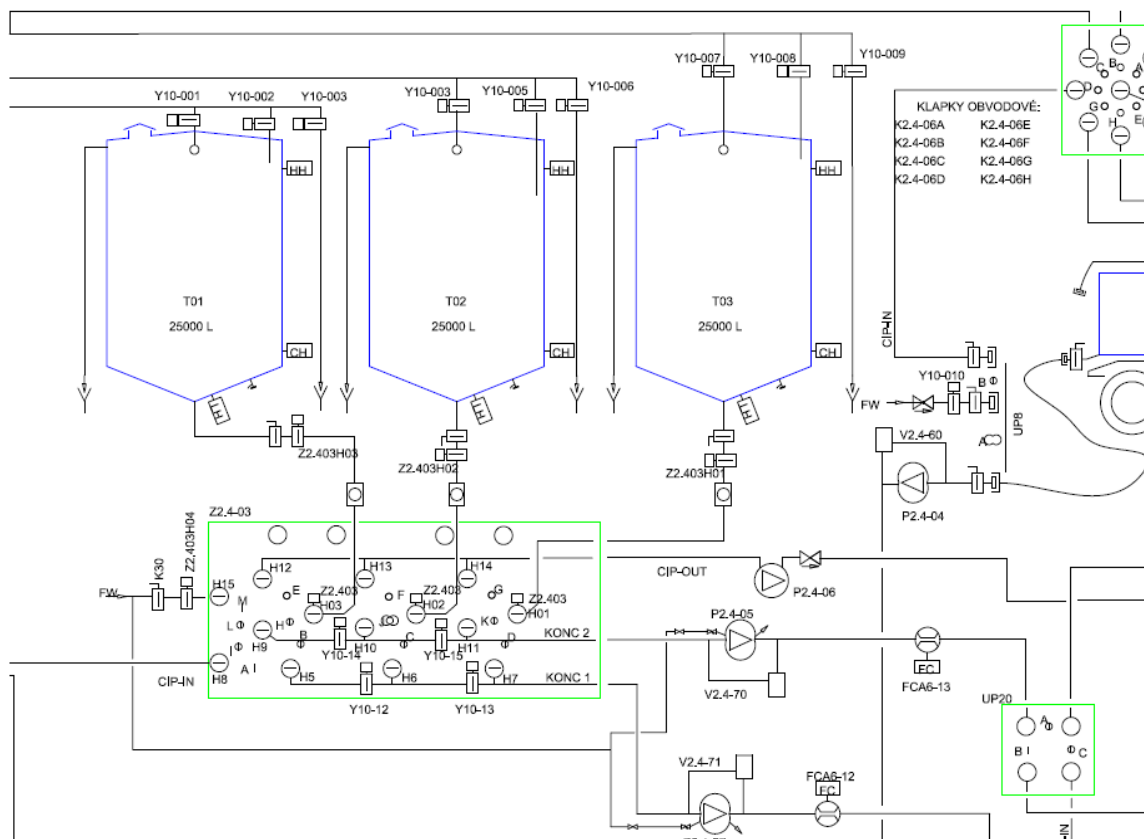


Obr. 1: Schéma výroby ovocných koncentrátů (zdroj: T. B. Fruit 2018)

Vysvětlivky: 1 – příjem suroviny, vstupní kontrola ; 2 – kontejnery pro dočasnou akumulaci; 3 – mytí; 4 – kontrola kvality; 5 – drcení; 6 – akumulace dužiny, 7 – lisování; 8 – meziprodukt surového koncentráту; 9 – pasterizace; 10 – ultrafiltrace, 11 – finální koncentrace produktu; 12 – chlazení; 13 – skladování; 14 – odeslání produktu

Tab. 1: Mikrobiologické parametry pro suroviny uchovávané v zásobních tancích

Parametr	KTJ
celkový počet mikroorganismů/1g	1000
kvasinky/1g	5
plísně/1g	100
<i>Alicyclobacillus</i> /10g	5



Obr. 2: Schématický náčrt zásobních tanků (zdroj: interní materiály firmy)

Vzorky byly odebírány v množství přibližně 100 ml na dvou odběrových místech, která byla stanovena pro možné porovnání výsledných hodnot. Odběry byly prováděny v různých časových intervalech, pro určení mikrobiální zátěže v závislosti na čase skladování, podle toho, v jakém množství byly suroviny využívány pro výrobu produktů.

Konkrétní data odběru vzorků jsou uvedena v tabulce 2.

Tab. 2.: Data odběru vzorků

JAKO 1 (č.š. L 16176/A)		JAKO 2 (č.š. L 16277/B)		JAKO 3 (č.š. L17003/A)		HZKO (č.š. E170009)	
1.	27.6.2016	1.	6.10.2016	1.	4.1.2017	1.	23.1.2017
2.	26.8.2016	2.	7.11.2016	2.	16.1.2017	2.	21.2.2017
3.	14.9.2016	3.	29.11.2016	3.	31.1.2017	3.	27.2.2017
		4.	9.1.2017	4.	20.2.2017	4.	17.3.2017
				5.	17.3.2017	5.	10.4.2017
				6.	5.4.2017		

4.1 LABORATORNÍ METODY V MIKROBIOLOGICKÉ ANALÝZE

4.1.1 STANOVENÍ CELKOVÉHO POČTU MIKROORGANISMŮ (CP)

Stanovení vychází z normy ČNS EN ISO 4833:2003(56 0083): Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů – Technika počítání kolonií vykultivovatelných při 30 °C. Norma specifikuje horizontální metodu stanovení počtu mikroorganismů počítáním kolonií vyrostlých na pevné půdě po aerobní kultivaci při 30 °C (Demnerová, 2016).

Příprava půdy: Do 500 ml lahve se odměří 400 ml destilované vody a naváží se 9 g půdy Plate Count Agar (PCA je bohaté médium vhodné pro růst všech kultivovatelných druhů bakterií a kvasinek), nechá se několik minut stát a promíchá se. Steriluje se v autoklávu 15 min při 121°C. Po sterilaci je nutné lahve promíchat před zatuhnutím. Trvanlivost: 1 měsíc při 4-10°C, 14 dní při pokojové teplotě.

Očkování: Pro každý vzorek se použijí 2 paralelní misky, kde do každé z nich se naočkuje po 1 ml vzorku. Bezprostředně poté se přelije inokulum kultivační půdou teplou 45 °C. Inokulum se promíchá a ponechá ztuhnout ve vodorovné ploše. Sterilita půdy se ověřuje kontrolní půdou, která obsahuje asi 15 ml půdy. Provádí se pro každou novou lahev půdy.

Inkubace: Plotny se inkubují v obrácené poloze dnem vzhůru 3 dny při 30 °C a 55 °C v termostatu.

Odečítání: Počítají se charakteristické kolonie.

4.1.2 STANOVENÍ PLÍSNÍ A KVASINEK (PK)

Stanovení vychází z normy ČSN ISO 7954 (56 0087) Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení počtu kvasinek a plísní. Technika počítání kolonií vykultivovaných při 25 °C a ČSN ISO 21527 – 1 Mikrobiologie potravin a krmiv – horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísní. Norma specifikuje metodu stanovení počtu kvasinek a plísní ve výrobcích určených k lidské výživě a ke krmení zvířat (Demnerová, 2016).

Příprava půdy: Do 500 ml lahve se odměří 400 ml destilované vody, naváží 16 g YGC agar (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar, MERCK) nebo 12,64 g DRBC agar (Chloramfenikolový agar s dichloranem a bengálskou červení, MERCK), nechá se několik minut stát a promíchá se. Steriluje se v autoklávu 15

minut při 121 °C. Po sterilaci je nutné lahve promíchat před ztuhnutím. Trvanlivost: 1 měsíc při 4-10 °C, 14 dní při pokojové teplotě.

Očkování: Pro každý vzorek se používají dvě paralelní misky, kde do každé z nich se naočkuje po 1 ml zkušební vzorku. Bezprostředně poté se přelije inokulum kultivační půdou teplou 45 °C. Inokulum se v misce s kultivační půdou pečlivě promíchá a ponechá se ztuhnout na vodorovné ploše. Sterilita půdy se ověřuje kontrolní půdou, která obsahuje asi 15 ml půdy. Provádí se pro každou novou lahev půdy.

Inkubace: Plotny se inkubují v termostatu v obrácené poloze dnem vzhůru 3-5 dnů při 25 °C.

Odečítání: Počítají se kolonie po 3, 4 a 5 dnech inkubace. Po 5 dnech se vyberou plotny, kde vyrostlo méně než 150 kolonií. Pokud jsou plotny přerostlé nebo lze kolonie špatně počítat, vychází se z počtů zjištěných po 4 nebo i po 3 dnech inkubace. V případě potřeby se provede mikroskopické rozlišení.

4.1.3 STANOVENÍ ANAEROBNÍCH SPOROTVORNÝCH MIKROORGANISMŮ (SAA)

Jde o stanovení počtu anaerobních sporotvorných mikroorganismů, které na selektivní půdě vytvářejí charakteristické kolonie. Předpis pro postup stanovení zpracován podle interních materiálů firmy.

Příprava půdy: Do 500 ml lahve se odměří 400 ml destilované vody a naváží se 16 g půdy Schaedler Anaerobe Agar (Oxoid). Nechá se několik minut stát a promíchá se. Steriluje se v autoklávu 15 min při 121 °C. Po sterilaci je nutné lahve promíchat před ztuhnutím. Trvanlivost: 3 měsíc při 0-4 °C, 14 dní při pokojové teplotě.

Inaktivace: 4 ml vzorku se převedou sterilní pipetou do sterilní zkumavky a uzavře zátkou. Inaktivuje se ve vodní lázni na 80 °C 10 min. Zkumavky se poté ihned schladí ve studené vodě.

Očkování: Pro každý vzorek se použijí 2 paralelní misky, kde do každé z nich se naočkuje po 1 ml vzorku. Bezprostředně poté se přelije inokulum kultivační půdou teplou 45 °C. Inokulum se promíchá a ponechá ztuhnout ve vodorovné ploše a znovu přelije ještě jednou vrstvou téhož agaru. Sterilita půdy se ověřuje kontrolní půdou, která obsahuje asi 15 ml půdy. Provádí se pro každou novou lahev půdy.

Inkubace: Plotny se inkubují za anaerobních podmínek. Mezofilní anaerobní sporotvorné mikroorganismy inkubujeme 72 h při 30 °C a termofilní anaerobní sporotvorné mikroorganismy při 55 °C v termostatu.

Vytvoření anaerobních podmínek za použití systému LAS: Do aplikačního sáčku se vkládá katalyzátor a poté naočkovaná kultivační půda v Petriho misce. Petriho miska se vkládá víkem nahoru. Aplikační sáček vložíme do vakuovací komory, přístroj začne vytvářet vakuum a po vyčerpání vzduchu se automaticky vpustí předem nadefinované množství plynu nebo směsi plynů z plynové lahve.

Odečítání: Počítají se charakteristické sporotvorné kolonie.

4.1.4 STANOVENÍ MEZOFILNÍCH A TERMOFILNÍCH AEROBNÍCH MIKROORGANISMŮ (SP)

Stanovení mezofilních a termofilních aerobních mikroorganismů podle předpisu zpracovaného podle normy ČSN 56 0100: Mikrobiologické zkoušení poživatin, předmětů běžného užívání a prostředí potravinářských provozoven.

Příprava půdy: Do 500 ml lahve se odměří 400 ml destilované vody a naváží se 9 g půdy Plate Count Agar, nechá se několik minut stát a promíchá se. Steriluje se v autoklávu 15 min při 121 °C. Po sterilaci je nutné lahve promíchat před zatumnutím. Trvanlivost: 1 měsíc při 4-10 °C, 14 dní při pokojové teplotě.

Inaktivace: 4 ml vzorku se převedou sterilní pipetou do sterilní zkumavky a uzavře zátkou. Inaktivuje se ve vodní lázni na 80 °C 10 min. Zkumavky se poté ihned schladí ve studené vodě.

Očkování: Pro každý vzorek se použijí 2 paralelní misky, kde do každé z nich se naočkuje po 1 ml vzorku. Bezprostředně poté se přelije inokulum kultivační půdou teplou 45 °C. Inokulum se promíchá a ponechá ztuhnout ve vodorovné ploše. Sterilita půdy se ověřuje kontrolní půdou, která obsahuje asi 15 ml půdy. Provádí se pro každou novou lahev půdy.

Inkubace: Plotny se inkubují v obrácené poloze dnem vzhůru 3 dny při 30 °C a 55 °C v termostatu.

Odečítání: Počítají se charakteristické sporotvorné kolonie.

4.1.5 STANOVENÍ ACID TOLERANTNÍCH MIKROORGANISMŮ (OSA)

Stanovení počtu acid tolerantních mikroorganismů, které na selektivní půdě vytvářejí charakteristické kolonie. Předpis pro postup stanovení zpracován podle interních materiálů firmy.

Příprava půdy: Do 500 ml lahve se odměří 400 ml destilované vody a naváží se 14,8 g půdy Orange Serum Agar (Oxoid), nechá se několik minut stát a promíchá se. Steriluje se v autoklávu 15 min při 121 °C. Po sterilaci je nutné lahve promíchat před zatuhnutím. Trvanlivost: 1 měsíc při 4-10 °C, 14 dní při pokojové teplotě.

Očkování: Pro každý vzorek se použijí 2 paralelní misky, kde do každé z nich se naočkuje po 1 ml vzorku. Bezprostředně poté se přelije inokulum kultivační půdou teplou 45 °C. Inokulum se promíchá a ponechá ztuhnout ve vodorovné ploše. Sterilita půdy se ověřuje kontrolní půdou, která obsahuje asi 15 ml půdy. Provádí se pro každou novou lahev půdy.

Inkubace: Plotny se inkubují v obrácené poloze dnem vzhůru 3 dny při 30 °C v termostatu.

Odečítání: Počítají se charakteristické kolonie.

4.1.6 STANOVENÍ BAKTERIÍ RODU ALICYCLOBACILLUS (BAT)

Stanovení počtu bakterií rodu *Alicyclobacillus* na selektivní půdě BAT agar (*Alicyclobacillus acidoterrestris* Medium) a confirmace na TSA agaru (Trypton sójový agar). Předpis pro postup stanovení zpracován podle interních materiálů firmy.

Alicyklobacily jsou G⁺ sporulující bakterie, jejichž optimální růst je při nízké hodnotě pH a zvýšené teplotě. BAT agar podporuje růst bakterií rodu *Alicyclobacillus*. Nízká hodnota pH v kombinaci s vysokou teplotou inhibuje růst kontaminující flóry.

Příprava půdy: Do 500 ml lahve se odměří 400 ml destilované vody a naváží se 11,6 g BAT agaru a zahřeje se k varu, dokud nedojde k úplnému rozpuštění. Steriluje se v autoklávu 15 min při 121 °C. Po sterilaci je nutné lahve ochladit na 45-50 °C, promíchat a nalít do sterilních Petriho misek, nechat ztuhnout. Připravené Petriho misky mohou být skladovány při teplotě 2-8 °C až 2 týdny.

Pracovní postup: Vzorek je inokulován roztěrem 0,1 ml na povrch na předem vysušené misky s BAT agarem.

Inkubace: Plotny se inkubují v 3 dny při 45 °C v termostatu.

Odečítání: Všechny kolonie, vyrostlé na BAT agaru, jsou počítány jako suspektní (podezřelé) alicyklobacily. Suspektní kolonie confirmujeme dalším testováním. Pro potvrzení jsou dobře izolované kolonie přeočkovány na TSA agar a BAT agar. Vzhledem k neutrální hodnotě pH TSA agaru na tomto agaru alicyklobacily nerostou, ale na BAT ano.

5. HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Ve vzorcích ovocných koncentrátů byly počítány jednotlivé stanovované kolonie mikroorganismů.

Počítání kolonií bylo prováděno u každého vzorku jablečného a hroznového koncentrátu paralelně na dvou Petriho miskách (v tabulkách značeno pomocí znaku „/“, v případě nulového výsledku na obou Petriho miskách značeno „0“).

Na prvním odběrovém místě (panel u zásobního tanku) docházelo k odběru vzorků až po dvouminutovém odpuštění suroviny (především u hroznového koncentrátu), aby došlo k pročištění odběrového místa. Tato část potrubí, kde byl vzorek odebírán, není přímo vybaveno ke standardním odběrům.

Výsledné hodnoty pro jablečný koncentrát z odběrů u zásobního tanku jsou uvedeny v tabulkách 3-5.

Tab. 3: Výsledné hodnoty pro jablečný koncentrát (č.š. L 16176/A) při odběru na panelu u zásobního tanku.

JAKO 1 (L 16176/A)									
datum odběru	CP	OSA	PK	BA T	BAT/8 0	SP/3 0	SP/5 5	SAA/3 0	SAA/5 5
27.6.201 6	8/2	6/3	1/1	0	0	1/4	0	0	0
KTJ/g	50	45	10	<10	<10	25	<10	<10	<10
26.8.201 6	44/5 5	31/4 2	37/4 8	0	0	0	0	0	0
KTJ/g	495	365	425	<10	<10	<10	<10	<10	<10
14.9.201 6	3/0	3/0	1/0	0	0	0	0	0	0
KTJ/g	15	15	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

Legenda: JAKO – jablečný koncentrát, CP – celkový počet mikroorganismů, OSA – acid tolerantní mikroorganismy, PK – plísňe a kvasinky, BAT – bakterie rodu *Alicyclobacillus*, SP – mezofilní a termofilní aerobní mikroorganismy, SAA – anaerobní sporetvorné mikroorganismy, KTJ – počet kolonietvorných jednotek

Tab. 4: výsledné hodnoty pro jablečný koncentrát (č.š. L16277/B) při odběru na panelu u zásobního tanku.

JAKO 2 (L16277/B)									
datum odběru	CP	OSA	PK	BAT	BAT/80	SP/30	SP/55	SAA/30	SAA/55
6.10.2016	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KTJ/g	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
7.11.2016	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KTJ/g	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
29.11.2016	236/56	360/536	300/340	0	0	0	0	0	0
KTJ/g	1460	4480	3200	<10	<10	<10	<10	<10	<10
9.1.2017	208/344	128/160	37/32	0	0	0	0	0	0
KTJ/g	2760	1440	345	<10	<10	<10	<10	<10	<10

Legenda: JAKO – jablečný koncentrát, CP – celkový počet mikroorganismů, OSA – acid tolerantní mikroorganismy, PK – plísňe a kvasinky, BAT – bakterie rodu *Alicyclobacillus*, SP – mezofilní a termofilní aerobní mikroorganismy, SAA – anaerobní sporetvorné mikroorganismy, KTJ – počet kolonietvorných jednotek

Tab. 5: výsledné hodnoty pro jablečný koncentrát (č.š. L17003/A) při odběru na panelu u zásobního tanku.

JAKO 3 (L17003/A)									
datum odběru	CP	OSA	PK	BA T	BAT/8 0	SP/3 0	SP/5 5	SAA/3 0	SAA/5 5
4.1.2017	4/7	5/2	1/0	0	0	5/4	0	2/5	0
KTJ/g	55	35	5	<10	<10	45	<10	35	<10
16.1.201	224/28	144/15	78/7	0	0	0	0	1/1	0
7	0	4	8						
KTJ/g	2520	1490	780	<10	<10	<10	<10	10	<10
31.1.201	0	0	1/0	0	0	0	0	0	0
7									
KTJ/g	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
20.2.201	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7									
KTJ/g	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
17.3.201	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7									
KTJ/g	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
5.4.2017	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KTJ/g	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

Legenda: JAKO – jablečný koncentrát, CP – celkový počet mikroorganismů, OSA – acid tolerantní mikroorganismy, PK – plísně a kvasinky, BAT – bakterie rodu *Alicyclobacillus*, SP – mezofilní a termofilní aerobní mikroorganismy, SAA – anaerobní sporetvorné mikroorganismy, KTJ – počet kolonietvorných jednotek

Tab. 6: Výsledné hodnoty pro jablečný koncentrát (č.š. L16277/B) při odběru z míchacího tanku.

JAKO 2 (č.š. L16277/B)									
datum odběru	CP	OSA	PK	BAT	BAT/80	SP/30	SP/55	SAA/30	SAA/55
6.10.2016	2/0	0	2/0	0	0	0	0	0	0
KTJ/g	10	<10	10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
7.11.2016	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KTJ/g	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
29.11.2016	14/13	4/0	4/2	0	0	0	0	0	0
KTJ/g	135	20	30	<10	<10	<10	<10	<10	<10
9.1.2017	0	2/2	3/1	0	0	0	0	0	0
KTJ/g	<10	20	20	<10	<10	<10	<10	<10	<10

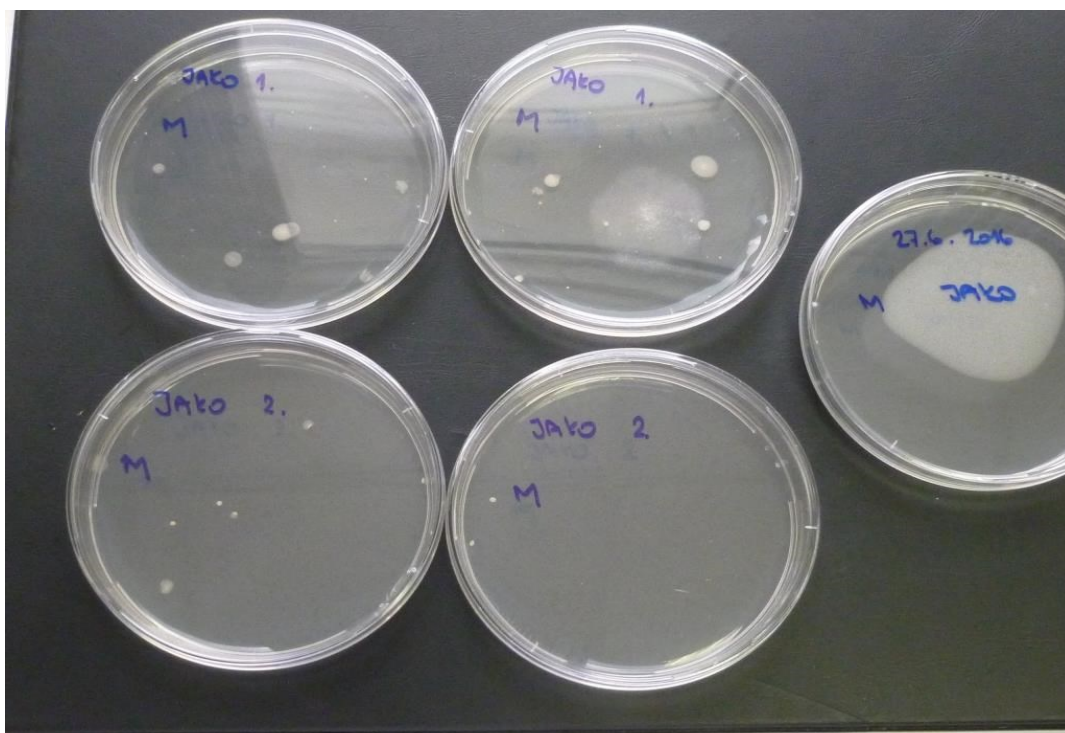
Legenda: JAKO – jablečný koncentrát, CP – celkový počet mikroorganismů, OSA – acid tolerantní mikroorganismy, PK – plísňe a kvasinky, BAT – bakterie rodu *Alicyclobacillus*, SP – mezofilní a termofilní aerobní mikroorganismy, SAA – anaerobní sporotvorné mikroorganismy, KTJ – počet kolonietvorných jednotek

Tab. 7: Výsledné hodnoty pro jablečný koncentrát (č.š. L17003/A)) při odběru z míchacího tanku.

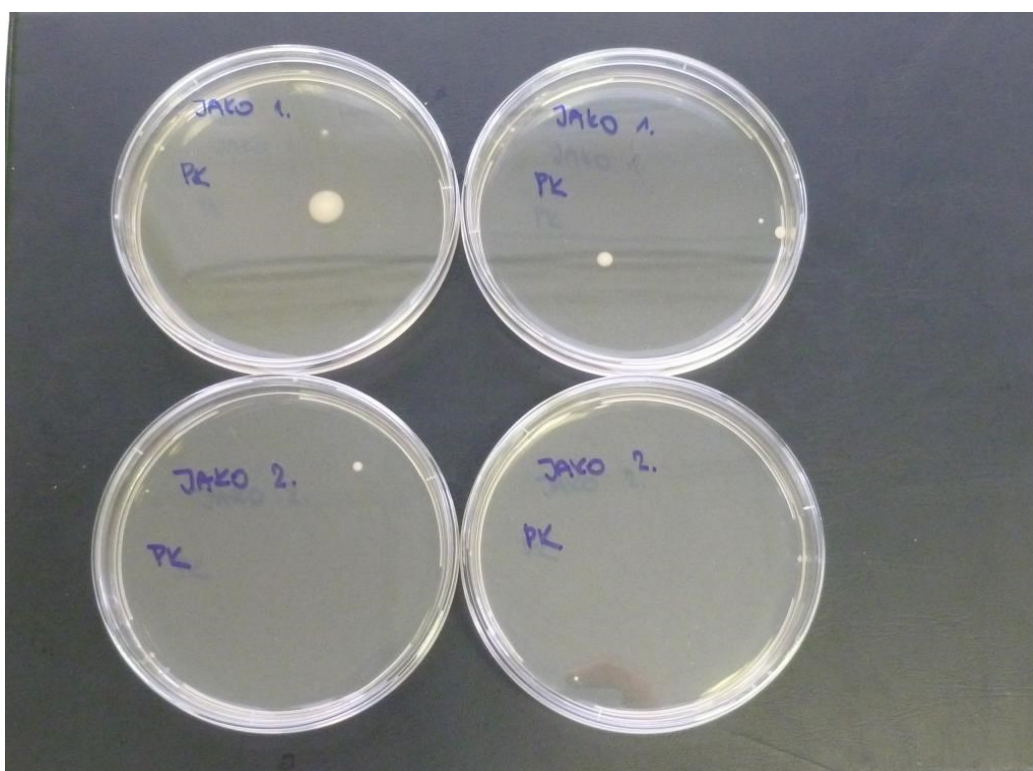
JAKO 3 (č.š. L17003/A)									
datum odběru	CP	OSA	PK	BAT	BAT/80	SP/30	SP/55	SAA/30	SAA/55
4.1.2017	3/1	2/2	1/0	0	0	4/2	0	4/1	0
KTJ/g	20	20	<10	<10	<10	30	<10	25	<10
16.1.2017	4/8	4/1	7/2	0	0	0	0	0	0
KTJ/g	60	25	45	<10	<10	<10	<10	<10	<10
31.1.2017	0	0	1/0	0	0	0	0	0	0
KTJ/g	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
20.2.2017	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KTJ/g	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
17.3.2017	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KTJ/g	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
5.4.2017	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KTJ/g	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

Legenda: JAKO – jablečný koncentrát, CP – celkový počet mikroorganismů, OSA – acid tolerantní mikroorganismy, PK – plísňe a kvasinky, BAT – bakterie rodu *Alicyclobacillus*, SP – mezofilní a termofilní aerobní mikroorganismy, SAA – anaerobní sporotvorné mikroorganismy, KTJ – počet kolonietvorných jednotek

Na obr. 4 a 5 jsou pořízeny fotografie Petriho misek použitých pro vyšetření celkového počtu mikroorganismů a plísni a kvasinek. Na fotografiích je možné vidět porovnání dvou odběrných míst, které jsou označeny: JAKO 1 – odběr z panelu u zásobního tanku, JAKO 2 – odběr z panelu u míchacího tanku. Pro každé odběrné místo byly použity dvě Petriho misky pro paralelní vyhodnocení výsledků.

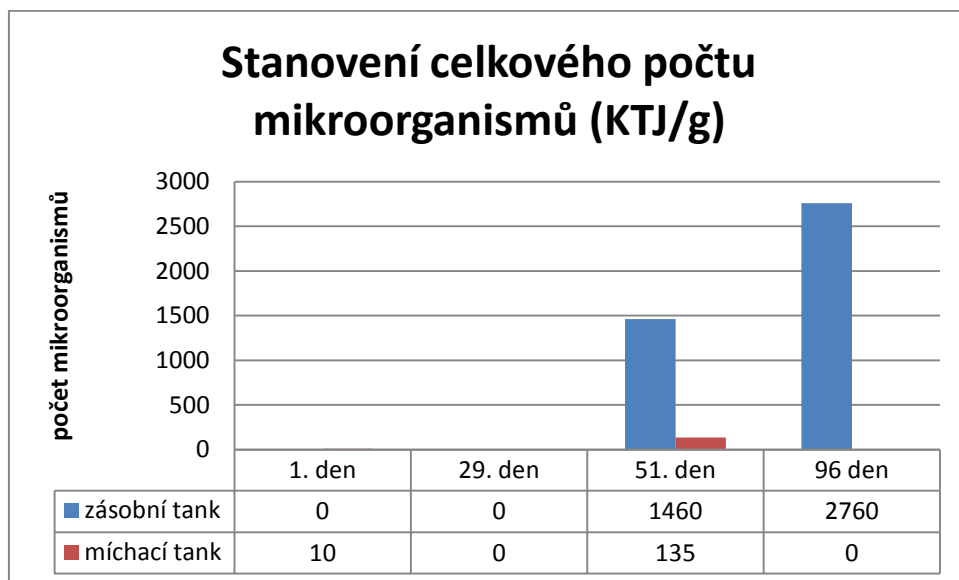


Obr. 4: Mikrobiologická analýza – stanovení celkového počtu mikroorganismů
(zdroj: vlastní fotografie)

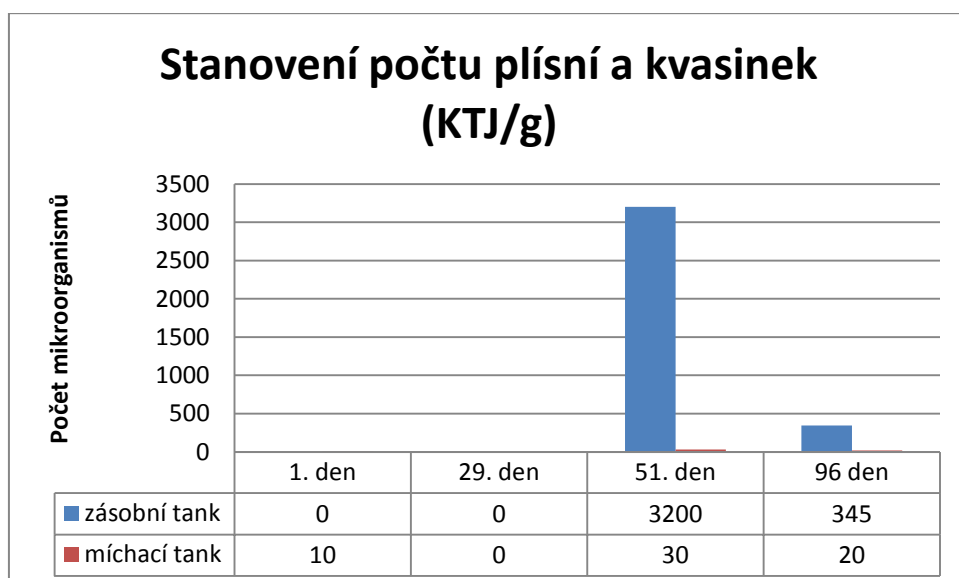


Obr. 5: Mikrobiologická analýza – stanovení počtu plísní a kvasinek (zdroj:
vlastní fotografie)

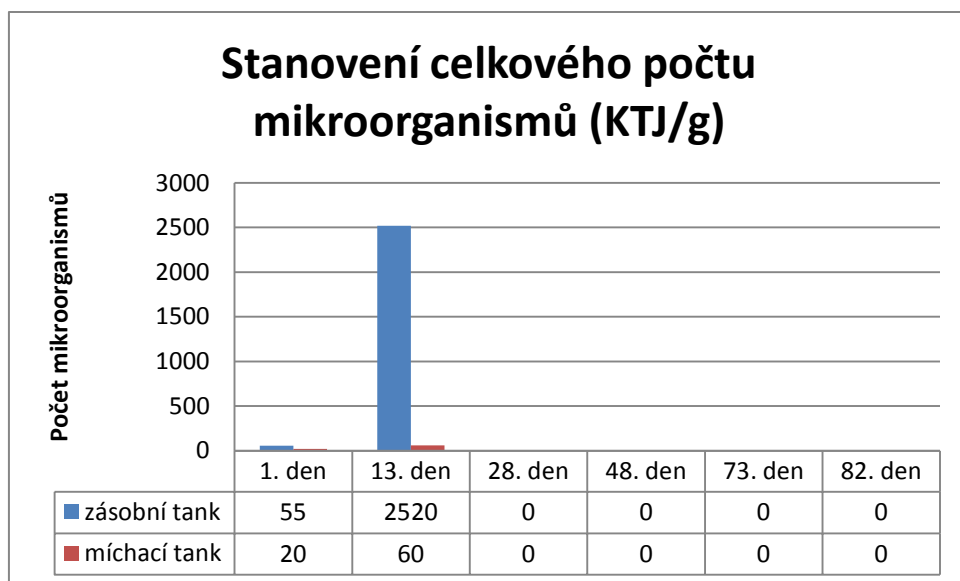
Následné porovnání hodnot z obou odběrných míst je zpracováno na grafech 1-4.



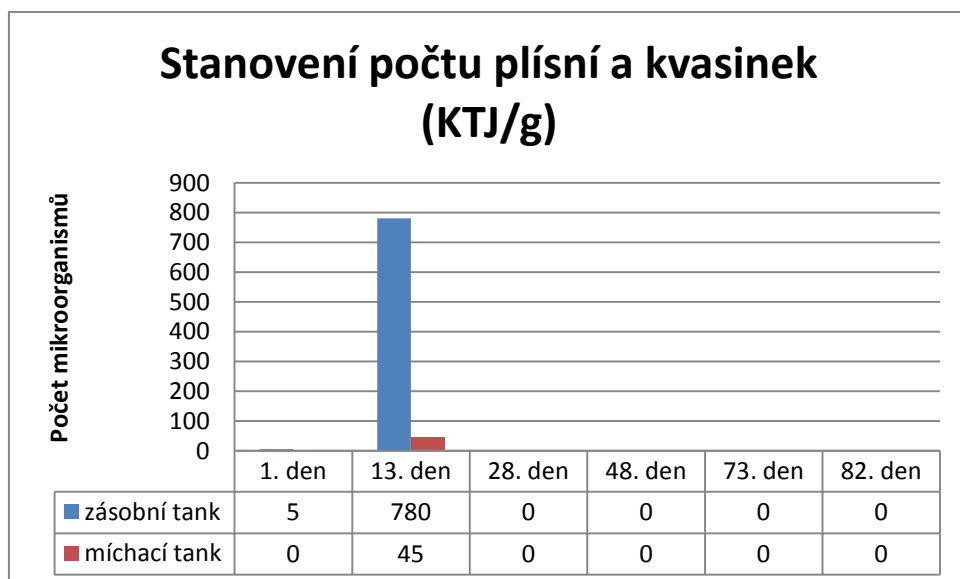
Graf 1: Stanovení celkového počtu mikroorganismů v jablečném koncentrátu č. š. L16277/B.



Graf 2: Stanovení počtu plísní a kvasinek v jablečném koncentrátu č. š. L16277/B.



Graf 3: Stanovení celkového počtu mikroorganismů v jablečném koncentrátu č. š. L 17003/A.



Graf 4: Stanovení počtu plísní a kvasinek v jablečném koncentrátu č. š. L17003/A.

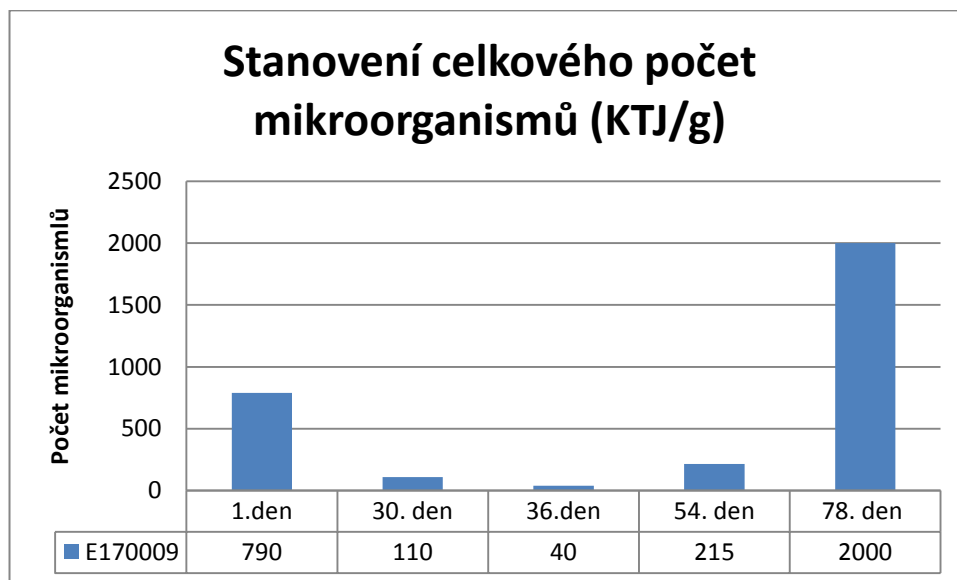
U hroznového koncentrátu byly provedeny odběry pouze u míchacího tanku. Než došlo k samotnému odběru vzorku, muselo být značné množství suroviny odpuštěno, protože hroznový koncentrát obsahuje ve svém základu molekulu D-glukózy, která je vhodným zdrojem energie pro kvasinky, a proto docházelo následně ke kvašení suroviny.

Výsledné hodnoty mikrobiologického zatížení u hroznového koncentrátu jsou uvedeny v tabulce č. 8. Vývoj mikrobiologické zatížení v hroznovém koncentrátu je zpracován v grafech.

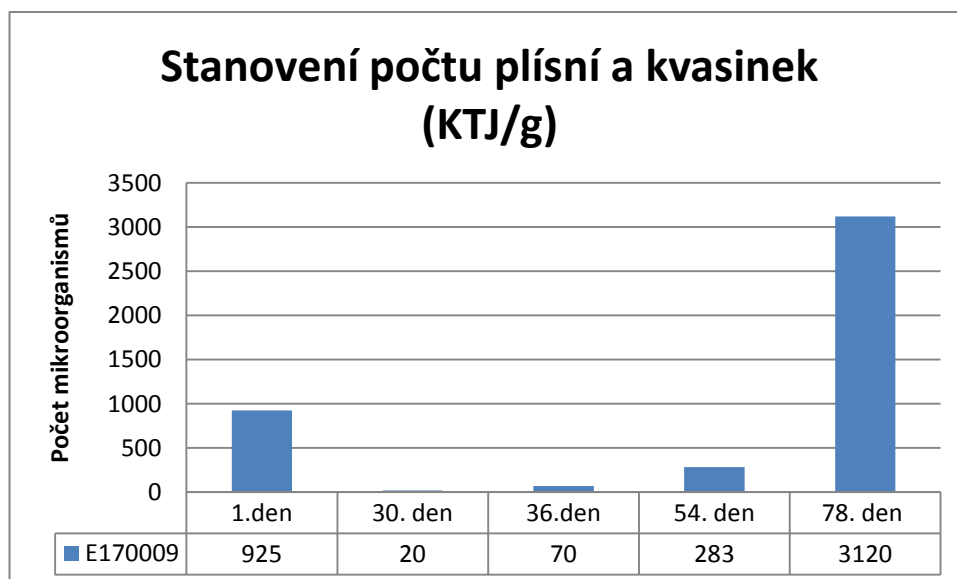
Tab. 8: Výsledné hodnoty pro hroznový koncentrát (č.š. E 170009) při odběru z míchacího tanku.

HZKO (č.š. E 170009)									
datum odběru	CP	OSA	PK	BA T	BAT/8 0	SP/3 0	SP/5 5	SAA/3 0	SAA/5 5
23.1.201 7	78/80	110/36	112/73	0	0	8/5	0	8/6	0
KTJ/g	790	730	925	<10	<10	65	<10	70	<10
21.2.201 7	9/12	3/1	3/1	0	0	6/10	0	15/4	0
KTJ/g	110	20	20	<10	<10	80	<10	95	<10
27.2.201 7	3/5	0	11/3	0	0	12/6	0	8/7	0
KTJ/g	40	<10	70	<10	<10	90	<10	75	<10
17.3.201 7	22/21	22/21	26/31	0	0	6/4	0	5/5	0
KTJ/g	215	215	285	<10	<10	50	<10	50	<10
10.4.201 7	200/20 0	264/26 4	312/31 2	0	0	6/6	0	4/4	0
KTJ/g	2000	2640	3120	<10	<10	60	<10	40	<10

Legenda: HZKO – hroznový koncentrát, CP – celkový počet mikroorganismů, OSA – acid tolerantní mikroorganismy, PK – plísně a kvasinky, BAT – bakterie rodu *Alicyclobacillus*, SP – mezofilní a termofilní aerobní mikroorganismy, SAA – anaerobní sporotvorné mikroorganismy, KTJ – počet kolonietvorných jednotek



Graf 5: Vývoj celkového počtu mikroorganismů v hroznovém koncentrátu č. š. E 170009.



Graf 6: Vývoj počtu plísní a kvasinek v hroznovém koncentrátu č. š. E 170009.

6. DISKUZE

JABLEČNÝ KONCENTRÁT

Jak je patrné z výsledků v tabulkách 3-5 nárůst mikrobiální zátěže s časem je viditelný pouze v tabulce č. 4. V porovnání s jinou šarží jablečného koncentrátu lze předpokládat, že nárůst mikrobiální zátěže mohl nastat kontaminací z prostředí při odběru vzorku, popřípadě nesprávným provedením mikrobiologické analýzy.

Z grafů 1-4 je vidět, že celkový počet mikroorganismů i počet plísní a kvasinek výrazně převyšuje při odběrech v místě zásobního tanku. Vyšší obsah CP poukazuje na produkt, který byl vyroben ze surovin obsahujících bakterie, nebo použitím nedostatečně čistého a dekontaminovaného nářadí a zařízení. Vysoký obsah CP může být také způsoben tím, že v produktu došlo k nežádoucímu množení mikroorganismů důsledkem nedostatečného chlazení anebo nepřiměřenou dobou skladování (Görner, Valík, 2004). Jelikož panel u zásobního tanku není přímo vybaven ke standardním odběrům, předpokládáme v tomto místě nárůst mikroorganismů především z důvodu nedostatečně čistého zařízení. Tato část zařízení prochází sanitací při úplném vypuštění zásobního tanku, v průběhu čerpání koncentrátu ze zásobního tanku, nelze toto místo vysanitovat. Odběry z tohoto panelu se za normálních okolností v rámci výroby neprovádí, byly použity pouze pro vypracování této bakalářské práce.

Pro jablečný koncentrát je vhodná doba skladování 2 měsíce. Z tabulek 3-7 je patrné, že tato surovina může být označena jako samoúdržná, protože výsledky mikrobiologické zátěže odpovídaly mikrobiologickým parametrům stanovených pro skladování v tancích ještě o více jak 2 měsíce déle a došlo tak k využití celé suroviny pro výrobu.

HROZNOVÝ KONCENTRÁT

Z tabulky č. 8 je patrný nárůst mikrobiální zátěže s časem skladování suroviny v zásobním tanku. Nárůst je viditelný u posledního provedeného odběru, kdy výsledek výrazně převyšuje limitní hodnoty mikrobiologické zátěže stanovené pro suroviny uchovávané v zásobních tancích.

Jak je patrné z grafu 6, převýšení mikrobiální zátěže u posledního odběru je mnohonásobné. Z tohoto výsledku lze o hroznovém koncentrátu říci, že se nejedná o samoúdržnou surovinu. S ohledem na dobu zpracovatelnosti je tomu ale naopak. Tato doba byla i u hroznového koncentrátu překročena. Vzhledem k tomu, že se hroznový koncentrát nepoužívá k výrobě nápojů tak často jako jablečný, nedošlo k využití celého objednaného koncentrátu a více jak polovina suroviny musela být po posledním odběru zlikvidována, protože ji již nebylo možné použít.

Hroznový koncentrát se liší od jablečného koncentrátu složením, a to především sacharidy (fruktóza v jablečném koncentrátu, D-glukóza v hroznovém koncentrátu), z toho vyplývá i následná rozdílná mikrobiologická zátěž, která byla mnohem vyšší u hroznového koncentrátu, jak vyplývá ze získaných hodnot.

7. ZÁVĚR

Mikrobiální zátěž potravin je obvykle výsledkem kombinovaných aktivit kvasinek, plísní a bakterií; avšak v závislosti na okolních podmínkách může mít jeden z nich přednost. Koncentráty jsou stabilnější než jiné ovocné šťávy; vysoké koncentrace cukru a nízké pH zachovávají tyto produkty (Combina M. et al, 2007).

Z výsledků získaných v bakalářské práci můžeme konstatovat, že jablečný koncentrát je možné označit za samoúdržnou surovinu. To vyplývá z výsledků získaných při stanovování počtu jednotlivých druhů mikroorganismů, kdy počty nepřesahují limitní parametry po celou dobu testování. Nebyl zaznamenán viditelný trend nárůstu mikrobiální zátěže ani po uplynutí doby doporučeného skladování.

U hroznového koncentrátu je tomu naopak. Je zde viditelný nárůst mikrobiální zátěže s dobou skladování, kdy v surovině došlo k velké mikrobiální zátěži ještě před spotřebováním celé suroviny. Proto není možné označit hroznový koncentrát jako samoúdržnou surovinu a je vhodnější odebírat tento koncentrát v menších barelech, aby docházelo k jeho celkovému zpracování před zkažením suroviny.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Betina, V. a kolektiv (1987): Mikrobiologické laboratorne metódy, Alfa Bratislava, 544 str.
- Brožková, I., Motřková, P., Pejchalová, M., Šilha, D. (2016): Laboratoř z potravinářské mikrobiologie, Univerzita Pardubice, 104 str., ISBN 978-80-7395-997-5
- Cempírková, R., Lukášová, J., Hejlová, Š. (1997): Mikrobiologie potravin, JU ZF České Budějovice, 165 str., ISBN 80-7040-254-7
- Combina M, Daguerre C, Massera A, Mercado L, Sturm ME, Ganga A, Martinez C. (2007): Yeast identification in grape juice concentrates from Argentina, dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1472-765X.2007.02291.x>, citováno dne 9.5.2018
- Cupáková, Š., Duřková, M., Karpíšková, R. (2008): Mikrobiologie potravin, Praktická cvičení 1. – Obecná mikrobiologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 300 str., ISBN 978-80-7305-043-6
- Cvrková Jana, Bakalářská práce: Ověření pravosti pomerančové šťávy Toma na základě vybraných chemických parametrů (2008), dostupné z: <https://core.ac.uk/download/pdf/30278372.pdf>, citováno dne 16. 4. 2018
- Deák T., Beuchat L. R. (1987) Identification of Foodborne Yeasts. Journal of Food Protection: March 1987, Vol. 50, No. 3, pp. 243-264., dostupné z: <http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-50.3.243>, citováno 16. 4. 2018
- Demnerová, K. a kolektiv (2016): Laboratoř mikrobiologického zkoumání potravin, VŠCHT Praha, 122 str., ISBN 978-80-7080-957-0

- Djas, M., Bober, M., Henczka, M. (2011): New methods for inactivation of Alicyclobacillus acidoterrestris spores in apple juice concentrate, časopis Challenges of Modern Technology, dostupné z: <https://yadda.icm.edu.pl/baztech/element/bwmeta1.element.baztech-0221adaf-51a4-40b8-a194-901db096fc13>, citováno dne 2.5.2017
- Görner F., Valík L., Aplikovaná mikrobiológia potravín. Bratislava: Malé Centrum, 2004, 528 s.
- Frutigo s.r.o. (2016): Ovocné koncentráty pro průmyslové zpracování, dostupné z: <http://www.frutigo.cz/ovocne-koncentraty-a15>, citováno dne 16. 4. 2018
- Hrubý, S., Turek, B. (1996): Mikrobiologická problematika ve výživě, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 145 str., ISBN 80-7013-232-9
- Interní materiály firmy
- McNamara, Christopher J.; Wiebe D., Gomez M. (2011): Recovery of Alicyclobacillus from Inhibitory Fruit Juice Concentrates. Journal of Food Protection: August 2011, Vol. 74, No. 8, pp. 1370-1373., dostupné z: <http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X.JFP-11-027>, citováno dne 16. 4. 2018
- SUN-YOUNG LEE, HYUN-JUNG CHUNG, and DONG-HYUN KANG (2006) Combined Treatment of High Pressure and Heat on Killing Spores of Alicyclobacillus acidoterrestris in Apple Juice Concentrate. Journal of Food Protection: May 2006, Vol. 69, No. 5, pp. 1056-1060., dostupné z: <http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-69.5.1056>, citováno dne 16. 4. 2018

- Svět zdraví (2015): Když se řekne ovocná šťáva z koncentrátu, dostupné z: <https://www.svet-zdravi.cz/clanky/ovocna-stava-z-koncentratu>, citováno dne 16. 4. 2018
- Šilhánková, L. (2002): Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology, Academia, 363 str., ISBN 80-200-1024-6
- T. B. Fruit (2018): Production, Scheme of production, dostupné z: <http://www.tbfruit.com/en/activity/production/>, citováno 28. 4. 2018
- Tvrdoň M. (1986): Biologie II – Obecná mikrobiologie pro 2. ročník SPS potravinářských, SNTL – Nakladatelství technické literatury, 191 str.,
- Večerková Hana, Test švestkových povidel (2013), dostupné z: <http://spotřebitelzakvalitou.cz/users/files/kvalita-sektory/PovidlaTesty.pdf>, citováno dne 16.4.2018
- Zipperle, Products for baby food, dostupné z: <http://www.zipperle.it/en/welcome-to-zipperle/products/products-for-baby-food/>, citováno dne 16.4.2018

9. SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ A GRAFŮ

Tabulky:

Tab. 1: Mikrobiologické parametry pro suroviny uchovávané v zásobních tancích.....	26
Tab. 2: Data odběru vzorků	28
Tab. 3: Výsledné hodnoty pro jablečný koncentrát(č.š. L 16176/A) při odběru na panelu u zásobního tanku	34
Tab. 4: Výsledné hodnoty pro jablečný koncentrát (č.š. L16277/B) při odběru na panelu u zásobního tanku.....	35
Tab. 5: Výsledné hodnoty pro jablečný koncentrát (č.š. L17003/A) při odběru na panelu u zásobního tanku.....	36
Tab. 6: Výsledné hodnoty pro jablečný koncentrát (č.š. L16277/B) při odběru z míchacího tanku	38
Tab. 7: Výsledné hodnoty pro jablečný koncentrát (č.š. L17003/A)) při odběru z míchacího tanku.....	39
Tab. 8: Výsledné hodnoty pro hroznový koncentrát (č.š. E 170009) při odběru z míchacího tanku	43

Obrázky:

Obr.1 : Schéma výroby ovocných koncentrátů.....	26
Obr. 2: Schématický náčrt zásobních tanků	27
Obr. 3: Schématický obrázek zapojení míchacího tanku.....	37
Obr. 4: Mikrobiologická analýza – stanovení celkového počtu mikroorganismů	40
Obr. 5: Mikrobiologická analýza – stanovení počtu plísní a kvasinek	40

Grafy:

Graf 1: Stanovení celkového počtu mikroorganismů v jablečném koncentráte č. š. L16277/B.....	41
Graf 2: Stanovení počtu plísní a kvasinek v jablečném koncentráte č. š. L16277/B.....	41
Graf 3: Stanovení celkového počtu mikroorganismů v jablečném koncentráte č. š. L17003/A.....	42

Graf 4: Stanovení počtu plísní a kvasinek v jablečném koncentrátu č. š. L17003/A.....	42
Graf 5: Vývoj celkového počtu mikroorganismů v hroznovém koncentrátu č. š. E170009.....	44
Graf 6: Vývoj počtu plísní a kvasinek v hroznovém koncentrátu č. š. E170009.....	44