

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**STANOVENÍ MIKROBIOLOGICKÉ KVALITY
PEKÁRENSKÝCH VÝROBKŮ**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Eva Křenková

Vedoucí práce: Ing. Eva Popelářová, Ph.D.

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Stanovení mikrobiologické kvality pekárenských výrobků" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10. dubna 2015

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Evě Popelářové, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat svojí rodině za psychickou podporu.

Stanovení mikrobiologické kvality pekárenských výrobků

Souhrn

Chléb je nedílnou součástí stravy po tisíce let. Ve všech různých formách je nejvíce konzumovanou potravinou s významným zdrojem komplexních sacharidů.

Pokud se vyrábí v patřičných technologických podmínkách a za použití vhodných surovin, nemá negativní účinky na zdraví.

Není-li správně skladován a zkonzumován v době trvanlivosti, může být nevhodným zdrojem výskytu nežádoucích mikroorganismů, jako jsou plísně, kvasinky nebo bakterie. Největší problém představují plísně, které na rozdíl od bakterií ke svému růstu nepotřebují vyšší úroveň vlhkosti.

Cílem diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši týkající se vývoje chleba, popisu jeho druhů, vad a chorob. Dále charakterizovat hlavní nežádoucí mikroorganismy (zejména plísně), které mají vliv na znehodnocení chleba a faktory ovlivňující jeho trvanlivost.

Spory plísni jsou všudypřítomné, a proto je potřeba zajistit optimální podmínky pro skladování chleba. Předmětem praktické části bylo zjistit, jaký vliv má rozdílný způsob skladování na rozvoj plísni u různých druhů chleba zakoupených v maloobchodní síti.

Vzorky 40 zkoumaných chlebů byly skladovány v domácích podmínkách třemi způsoby – v mikrotenovém sáčku v lednici, v mikrotenovém sáčku při pokojové teplotě a chlebníku. Nebalené chleby byly skladovány 24 h, balené chleby 2 – 3 dny s ohledem na minimální trvanlivost. Mikrobiologický rozbor byl u jednotlivých chlebů prováděn před skladováním a po době skladování. Testování se zabývalo kvalitativním a kvantitativním zastoupením plísni.

Výsledky ukázaly, že výskyt plísni byl ve sledovaných vzorcích nízký. Bylo prokázáno, že způsob skladování má vliv na rozvoj plísni v chlebech, nejvíce se plísně vyskytovaly po skladování v mikrotenovém sáčku při pokojové teplotě. Rodové zastoupení plísni nebylo rozsáhlé, vyskytovaly se pouze rody *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* a *Mycelia sterilia*. Zjištěné rody mohou být nebezpečné z hlediska produkce mykotoxinů, avšak jejich počty byly nízké.

Klíčová slova: chléb, trvanlivost, mykologie, plísně

Determination of microbial quality of bakery products

Summary

Bread has been an integral part of our diet for thousands of years. In all the various forms bread is the most consumed food with a significant source of complex carbohydrates.

When produced under proper technological conditions and using the appropriate raw materials, no negative health effects arise.

If not properly stored and consumed within the durability it may be an inadequate source of undesirable microorganisms such as fungi, yeasts or bacteria. The biggest problem are moulds that unlike bacteria need to grow at a higher level of humidity.

The aim of thesis was to develop a literature search related to the development of bread, a description of its various types, defects and diseases. Furthermore, the author characterizes major undesirable microorganisms (especially fungi), which influence the impairment of bread and factors influencing its durability.

Mould spores are ubiquitous, and therefore it is necessary to ensure optimal conditions for storing bread. The subject of the practical part was to determine the influence of the different storage methods for the development of mould in different kinds of bread sold at retail.

Concerning the samples examined, 40 loaves were stored at home in three ways – in a plastic bag in the refrigerator, in a plastic bag at room temperature and haversacks. Unwrapped bread was stored for 24 h, packaged bread for 2 – 3 days with respect to the minimum durability. Microbiological analysis was performed for individual loaves before storage and after storage time. Testing dealt with qualitative and quantitative representation of mould.

The results showed that the occurrence of mould which was observed in the samples was low. It was shown that the storage methods has an effect on the development of fungi in bread, most fungi occurred after storage in a plastic bag at room temperature. The generic representation of mould was not extensive, there were only genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* and *Mycelia sterilia*. Identified genera can be dangerous in terms of production of mycotoxins, but their numbers were low.

Keywords: bread, durability, mycology, fungi

Obsah

1 Úvod.....	8
2 Cíl práce a vědecká hypotéza	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Historie chleba.....	10
3.1.1 Historie chleba v Čechách	11
3.2 Technologie výroby chleba	11
3.3 Druhy chleba.....	12
3.3.1 Spotřeba chleba.....	13
3.4 Vady chleba.....	14
3.5 Choroby chleba.....	15
3.6 Mikrobiologické znehodnocení chleba	16
3.6.1 Bakteriální znehodnocení	16
3.6.2 Mikrobiologické znehodnocení způsobené kvasinkami	16
3.6.3 Mikrobiologické znehodnocení způsobené plísněmi.....	18
3.7 Charakteristika mikroskopických hub	19
3.7.1 Taxonomie mikromycet	19
3.7.2 Morfologie mikromycet	20
3.7.3 Růst a rozmnožování mikromycet	20
3.7.4 Charakteristika vybraných mikromycet.....	24
3.7.4.1 Třída Zygomycetes	24
3.7.4.2 Třída Deuteromycetes a jim příslušející Ascomycetes	25
3.8 Toxinogenní plísňové kontaminanty	30
3.8.1 Plísně a jejich alergeny	30
3.8.2 Metabolické produkty - mykotoxiny	30
3.9 Faktory ovlivňující trvanlivost chleba	31
3.9.1 Chemické konzervační látky.....	31
3.9.2 Biologická konzervace.....	32
3.9.3 Balení v ochranné atmosféře.....	34
3.9.4 UV záření, mikrovlnné záření a infračervené záření	34
3.10 Podmínky skladování.....	35
4 Materiál a metody	36
4.1 Použitý materiál	36
4.2 Postup stanovení.....	38
4.2.1 Pomůcky	38
4.2.2 Příprava fyziologického roztoku.....	38
4.2.3 Příprava živných médií	38
4.2.4 Příprava ředící řady.....	39

4.2.5	Kultivace	39
4.2.6	Identifikace mikromycet	40
5	Výsledky	41
5.1	Statistické vyhodnocení výsledků	48
6	Diskuze	52
7	Závěr.....	56
8	Seznam použité literatury.....	57

1 Úvod

Chléb je náchylný k rychlému mikrobiálnímu kažení, zejména růstu plísní. Dominantní patogenní flora se liší podle typu chleba a skladovací teploty. Rozvoj plísní v chlebech lze snížit řadou technik, jako je např. způsob balení, použití konzervačních prostředků nebo správný způsob skladování.

Plísňové spory, které jsou přítomny i ve vzduchu, se mohou usadit na chlebu a množением způsobit jeho znehodnocení.

Nežádoucí vlastností vláknitých toxigenních hub je tvorba sekundárních metabolitů, mykotoxinů, které patří mezi nejvíce závažné kontaminanty přírodního původu. Expozice těmto toxinům může způsobit řadu zdravotních problémů.

Pro zachování trvanlivosti a zdravotní nezávadnosti chleba je proto důležité zajistit optimální skladovací podmínky. Na kvalitu produktu mají vliv zejména doba, teplota a způsob skladování.

2 Cíl práce a vědecká hypotéza

Cílem práce je zhodnotit výskyt nežádoucích mikroorganismů u různých druhů chleba po dobu minimální trvanlivosti, se zaměřením na rodové zastoupení mikromycet.

Dalším cílem je posoudit vliv skladovacích podmínek na rozvoj plísní v těchto pekařských výrobcích.

Práce vychází z předpokladu, že způsob uskladnění pekárenských výrobků bude mít významný vliv na jejich kvalitu. Hypotéza předpokládá, že kvalita bude ovlivněna také složením výrobku.

3 Literární rešerše

Chléb byl a stále je základní složkou potravy po celém světě. Vyrábí se z přístupných surovin do nejrůznějších tvarů a velikostí s typickou vůní a chutí. Obsahuje nutričně prospěšné látky, je proto považován za potravinu s vysokou výživovou hodnotou.

3.1 Historie chleba

První poznatky o chlebu se datují z dob neolitu, tedy z období 10 000 let př. n. l. Předchůdcem primitivního chleba byla jednoduchá kaše zhotovená nejprve máčením pšenice a později jejím vařením. Změklá textura obilí byla stravitelnější než syrová a proces vaření poskytl lepší přístup k živinám. Postupem času se původní kaše zahřívala na horkých kamenech nebo dokonce pekla pod uhlíky. Vznikla tak chlebová placka, která byla méně náchylná ke kažení a byla snadno přenosná (Suas, 2009).

Archeologické pozůstatky egyptských pekařských pecí z let 2700 př. n. l. dokazují, že si lidé připravovali chléb kynutý pomocí kvasinek. V této době byly pekárny často spojovány s pivovary, tudíž kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*), jako vedlejší produkt pivovarnictví, mohly být použity při pečení chleba (Montville and Matthews, 2008).

Nutričně byl chléb cenným zdrojem energie, bohatý na proteiny, škrob i stopové prvky. Bochníky se v dobách Nové říše značně lišily tvarem a velikostí. Textura chlebového těsta se pohybovala od velmi jemného až po moučné. Celá nebo hrubě popraskaná zrna se často přidávala k vytvoření textury podobné dnešním vícezrnným chlebům (Redford, 2001).

Řekové převzali výrobu chleba od Féničanů a Židů. Zhruba před 4000 lety př. n. l. se rozvinul kult bohyně Déméter jako ochránkyně zemědělství a chléb se potom stal základním pokrmem lidí. Spolu s vínem byl základní potravinou i ve starém Římě. Okolo roku 80 se v Římě začala vytvářet pekařská bratrstva nazývaná „collegium pistorium“, což byli předchůdci pozdějších cechů (Dřízal, 2014).

V Británii se stalo pečení chleba symbolem společenského postavení v dobách středověku. V roce 1834 byl ve Švýcarsku vynalezen válcový mlýn. Tento vynález radikálně změnil mletí po celém světě a zvýšil konzistenci mleté mouky. K rozvoji komunálních pekáren přispěl kvašený chléb často připravovaný mimo domov. Inovace průmyslové revoluce vytvořila normovanou masovou produkci bílého pšeničného chleba. Ve 20. století vstoupily hydrogenované oleje, umělé konzervační látky, emulgátory a další chemické přísady do těsta, kvůli změkčení textury a prodloužení trvanlivosti sériově vyráběných

chlebů. Továrenské chleby se staly standardem ve většině průmyslových zemí (Katz and Weaver, 2003).

3.1.1 Historie chleba v Čechách

Na českém území byla nalezena nejstarší pec na pečení chleba v Bylanech na Olomoucku, jejíž původ se datuje do období 4800 – 4600 př. n. l. Podle Kosmovy kroniky se v Čechách objevili pekaři již v 11. a 12. století. Chléb měl nezastupitelnou roli při korunovaci českých králů, kdy mu byla dávana přednost i před zlatem. Za vlády Jiřího z Poděbrad se peklo 12 druhů chleba: žitný, žemlový, nakyslý, ječný, mazancový, žaludový, prosný, pohankový, jáhlový, perníkový, rýžový a koláčový. Růst středověkých měst a s ním spojená dělba práce vytlačily výrobu chleba z domácností a pečení přešlo do rukou pekařů. Vytvářením cechů se postupem času zaváděla řemeslná výroba, pekaři se stávali bohatými a váženými měšťany. V roce 1930 činila spotřeba chleba na jednoho obyvatele přes 80 kg za rok. V 70. letech byly v jednotlivých okresech a krajích stavěny pekařské výrobní kombináty průmyslového charakteru, které vyráběly chleby na moderních zařízeních. Po roce 1989 došlo k renesanci řemeslných pekáren, začaly se prosazovat nové trendy v technologii v souvislosti s rostoucí nabídkou zlepšujících potravinářských přípravků, s rozvojem trhu začala prudce stoupat sortimentní nabídka, a také podíl krájených a balených chlebů (Dřízal, 2014).

3.2 Technologie výroby chleba

Základem pečení chleba je příprava směsi z mouky, pitné vody, tuku, cukru, soli, pekařského droždí (jehož součástí jsou kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*) a dalších složek. Do kváskového chleba se přidává stabilní směs heterofermentativních bakterií mléčného kvašení, na úrovni od 10^7 do 10^9 KTJ (kolonie tvořící jednotka) / g. *Lactobacillus* sp. zlepšuje texturu a brání znehodnocení chleba (Montville and Matthews, 2008).

Pro kynutí pšeničného těsta je používáno lisované droždí, u žitného těsta se používá kvas (žitná mouka a voda). Vyrobené těsto se hněte a následně nechá zrát přibližně 1 hodinu při max. teplotě 30 °C. Dále se dělí do klonků, tvaruje a osazuje do ošatek, kde těsto kyne asi 45 minut při 30 °C. Poté se chléb sází do pece a peče přibližně ¾ hodiny při 250 °C (pro 1 kg chleba). Ke konečným úpravám výroby chleba patří chlazení, krájení, balení, ukládání do přepravek a expedice (Edwards, 2007).

Hamr (2011) rozděluje chleby vyráběné dle použité technologie do následujících skupin:

- Kvasový chléb ze žitného kvasu, vyráběný klasickou technologií třístupňovým nebo zkráceným vedením. Chléb je vyráběn klasickým způsobem dle receptury s přibližně stejným poměrem žitné a pšeničné mouky. Výrobce třístupňovým vyváděním přírodních kvasů ze žitné mouky docílí kyselin (především octové a mléčné) díky biochemickým procesům probíhajících v kvasu, a také charakteristické navinulé chuti chleba. Oxid uhličitý vznikající při zrání kvasu zapříčiňuje kynutí.
- Chléb vyrobený z mouky a suchých, tekutých nebo pastovitých kvasů, kynutý pomocí droždí. Kynutí chleba je realizováno pomocí droždí a k okyselení je použit umělý kvas obsahující kyseliny (obvykle octovou nebo citronovou podle toho, zda se jedná o umělý kvas tekutý nebo sypký). Navinulost střídky i další její chuťové a jakostní parametry bývají odlišné od chleba kvasového.
- Chleby formové (žitné, celozrnné, vícezrnné a speciální s přidavkem různých semen a dalších nutričně a chuťově významných látek) se pečou ve formách, protože by díky charakteru těsta neudržely při kynutí a pečení svůj objem a tvar.

3.3 Druhy chleba

Chleba se rozděluje podle obsahu mouk (mlýnských obilných výrobků) v souladu s platnou legislativou (vyhláškou Ministerstva zemědělství č. 182/2012 Sb. v platném znění) následovně:

- **pšeničný** - obsahuje nejméně 90% podíl pšeničných mlýnských obilných výrobků (pšeničných mouk) z celkové hmotnosti mlýnských obilných výrobků a tedy jen zanedbatelné množství mouk žitných (max. 10 % na celkovou hmotnost mouk).
- **žitný** - obsahující nejméně 90% podíl mlýnských obilných výrobků ze žita (žitných mouk) z celkové hmotnosti.
- **žitnopšeničný** - pekařský výrobek obsahující nadpoloviční množství žitné mouky (tedy více než 50 %) v poměru k mouce pšeničné, které musí být více než 10 % z celkové hmotnosti mlýnských obilných výrobků.
- **pšeničnožitný** - pekařský výrobek obsahující nejméně 50 % pšeničných mlýnských obilných výrobků (pšeničných mouk) a podíl mlýnských obilných výrobků ze žita musí být více než 10 % z celkové hmotnosti mlýnských obilných výrobků.

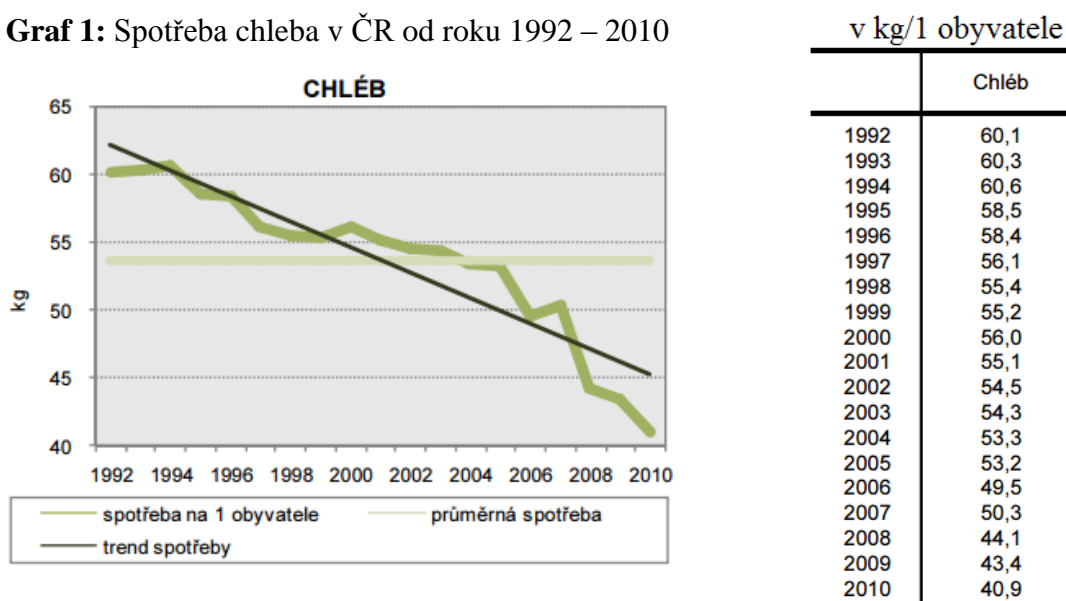
- **celozrnný** - pekařský výrobek, jehož těsto musí obsahovat z celkové hmotnosti mlýnských obilných výrobků nejméně 80 % celozrnných mouk nebo jim odpovídající množství upravených obalových částic z obilky.
- **vícezrnný** - pekařský výrobek, do jehož těsta jsou přidány mlýnské výrobky z jiných obilovin než pšenice a žito, luštěniny nebo olejniny v celkovém množství nejméně 5 %.
- **speciálním** druhem chleba nebo pečiva se rozumí pekařský výrobek, který obsahuje kromě mlýnských výrobků ze pšenice a žita další složku, jako obiloviny, olejniny, luštěniny nebo brambory, v množství nejméně 10 % z celkové hmotnosti mlýnských výrobků.

V poslední době je obliba biopotravin, včetně biopečiva. Jedná se o produkty ekologického zemědělství, které neobsahují geneticky modifikované organismy, ani žádné chemické látky a mají tudíž lepší výživovou hodnotu.

3.3.1 Spotřeba chleba

Podle Českého statistického úřadu v posledních 60 letech vytrvale klesá spotřeba chleba za současného růstu spotřeby pšeničného pečiva. V roce 2010 se snížila spotřeba chleba ve srovnání s rokem 2009 o 2,5 kg na 40,9 kg (průměrná dlouhodobá spotřeba byla 53,6 kg). Za rok 2013 byla průměrná spotřeba chleba pouze 40 kg na obyvatele.

Graf 1: Spotřeba chleba v ČR od roku 1992 – 2010



Zdroj: <http://www.czso.cz/csu/csu.nsf/informace/cpotr041012analyza12.pdf>

Spotřeba chleba je v jednotlivých evropských zemích odlišná. Stejně tak je tomu u výživových doporučení pro každodenní příjem chleba, které znázorňuje tabulka 1.

Tab. 1: Vybraná doporučení týkající se denní spotřeby chleba v evropských zemích

Česká republika	3 – 6 porcí na den; 1 porce = 1 krajíc chleba (60 g)
Německo, Rakousko	5 – 7 plátků chleba (250 – 350 g) z nichž 2 plátky by měly být celozrnné
Island	8 – 10 porcí na den (1 porce = 1 krajíc chleba)
Řecko	8 porcí na den celozrnného chleba (1 krajíc = 25 g)
Španělsko	6 – 10 porcí (1 porce = 40-60 g chleba)

Zdroj: http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0017/150083/E79832.pdf

Během výrobního procesu chleba může docházet k různým defektům, které se mohou negativně projevit na výsledném produktu. Protože tyto výrobky odpovídají platným normám, jakostní vady se u nich vyskytují ojediněle.

3.4 Vady chleba

Mezi viditelné vady chleba patří zejména vady v jeho vzhledu, tvaru, objemu a dále různé vady kůrky. Naopak ke skrytým vadám, které se poznají až po rozkrojení chleba a jeho následném smyslovém hodnocení, patří vady střídky, vady vůně a chuti. Čerstvost chleba je jedním ze znaků jeho kvality a dá se poznat zejména podle pružnosti střídky, která se na řezu po stlačení u čerstvého, správně propečeného chleba okamžitě vrací do původního stavu před stlačením. Mezi viditelné vady patří vady ve vzhledu, chlebové kůrce a hmotnosti. Značně deformovaný a nepravidelný tvar výrobku svědčí o nedodržování technologického postupu při výrobě, plochý a nízký chléb vypovídá např. o špatném kynutí, jehož důsledkem je příliš hutná a neporézní střídka. Chlebová kůrka může být ušpiněná buď na svrchní straně, nebo spodní straně (což vypovídá o nedostatečném čištění pečících plechů). Nevyhovujícím jakostním znakem je i připálená kůrka, se kterou se objevuje i nahořklá až hořká chuť chleba (dle intenzity připálení). Nedopečená, příliš bledá kůrka naznačuje celkově nepropečený výrobek s vlhkou a mazlavou střídkou, která může začít brzo plesnivět.

Jakostní vadou je chléb na omak měkký s propadávajícím se povrchem kůrky, k čemuž došlo odtržením ("odfouknutím") kůrky od střídky. Podle charakteristických vlastností chleba může být jeho kůrka rozpraskaná (Hamr, 2011).

3.5 Choroby chleba

Známou chorobou chleba je **nitkovitost**. Ta může být způsobena nedostatečným propečením pekařských výrobků, protože bakteriální původce choroby *Bacillus mesentericus* a *Bacillus subtilis*, vyskytující se běžně v malých množstvích v mouce, se může v takovýchto podmínkách množit. Chlebová střídka začne druhý až třetí den po upečení vlhnout, je lepivá a mazlavá, zbarvuje se dožluta a hnilobně zapáchá. V posledním stádiu se střídka lepí na přitlačený prst a po jeho odtazení se tvoří tenké nitky (odtud název nitkovitost). Tato choroba se projevuje především v letních měsících a kromě nedostatečného propečení může její rozvoj podpořit např. i nedostatečná hygiena v pekárně. Ačkoliv je nitkovitost závažným jakostním ukazatelem, nemůže nijak ohrozit zdraví spotřebitele (Kolejková, 2005).

Relativně rozšířenou chorobou chlebů (zejména balených) je **plesnivění**, a to ke konci trvanlivosti, kterou si výrobce sám stanovuje na obalu. K tomuto plesnivění napomáhají různá porušení technologické kázně, mezi něž patří:

- nedostatečné propečení chleba, který má poté vlhkou, polosyrovou střídku
- vložení chleba nikoli bezprostředně po vytažení z pece, ale až po jeho částečném vychladnutí, čímž se vlaščí voda neodpaří z povrchu chleba a naopak jej navlhčí
- balení chleba ještě teplého, nevychladlého

Kombinací výše uvedených nedostatků může balený chléb začít viditelně plesnivět i třeba druhý, třetí den od jeho vyrobení. K plesnivění chleba může přispět i další chyba ze strany výrobce, a to stanovení neúměrně dlouhého data minimální trvanlivosti (resp. použitelnosti) na obalu. Čerstvě upečený chléb, který byl zabalen ještě nevychladlý, má po určitou dobu obal z vnitřní strany orosený. Takto kondenzované vodní páry na vnitřní straně obalu zvyšují vlhkost uvnitř obalu (tedy i výrobku), která je spolu s vyšší teplotou nevychladlého chleba živnou půdou pro růst mikroorganismů, a tedy i plísní. Pokud je zabalen teplý až horký výrobek, pak po zabalení chladne mnohem pomaleji, než výrobek nebalený, neboť obal se vyznačuje izolačními schopnostmi. Zvýšená teplota uvnitř pekařského výrobku je kromě vlhkosti další faktor, který podporuje růst mikroorganismů. Všechny uvedené skutečnosti obvykle vedou k tomu, že balený, nevychladlý pekařský výrobek obvykle nevydrží v nezměněné kvalitě po celou dobu trvanlivosti a v mnoha případech viditelně zplesniví již před skončením této trvanlivosti. Tento nedostatek jde na vrub výrobce, neboť délku doby trvanlivosti baleného pečiva si určuje výrobce sám na základě skladovacích zkoušek a nejlépe pomocí mikrobiologických rozborů baleného výrobku po určité době jeho skladování

za standardních podmínek. Výrobce ručí za kvalitu baleného pekařského výrobku po celou dobu jeho trvanlivosti, kterou uvádí na etiketě obalu (Hamr, 2011).

3.6 Mikrobiologické znehodnocení chleba

Pekárenské výrobky mohou být kontaminovány plísněmi, bakteriemi nebo kvasinkami, pokud mají zajištěné optimální podmínky k růstu a množení.

3.6.1 Bakteriální znehodnocení

Příčinou znehodnocení chleba a dalších pekařských výrobků s vysokou rovnovážnou relativní vlhkostí (> 90 %) jsou bakterie *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis*. Jelikož se *B. subtilis* přirozeně vyskytuje v půdě, může být přítomen na vnějších částech zrn a zeleniny; a dále ve vzduchu nebo ve formě aerosolu v prachu pekárenského prostředí. Zmíněné bakterie obecně preferují teplé a vlhké teploty. Primární zdroj kontaminace pochází z mouky a ze zařízení, která byla již dříve v kontaktu s kontaminovaným těstem. Spory často přežívají pečení, jejich klíčení a růst nastává do 36 – 48 h uvnitř bochníku a tvoří charakteristicky měkkou, vláknitou, hnědou masu se zápachem zralého ananasu nebo melounu (Cauvain and Young, 2007).

Druhy rodu *Bacillus* tvoří většinou grampozitivní, peritrichní tyčinky, které mají bohatý enzymový aparát. Mají aktivní amylolytické, pektolytické i proteolytické enzymy. Řada druhů produkuje antibiotika polypeptidové povahy, která se tvoří ve stadiu sporulace. Některé druhy tvoří slizovitá pouzdra polysacharidové povahy (dextransy a levany), která způsobují nežádoucí nitkovitost pečiva a pšeničného chleba. Nejrozšířenějším druhem v přírodě je *Bacillus subtilis* (Šilhánková, 2002).

3.6.2 Mikrobiologické znehodnocení způsobené kvasinkami

Znehodnocení chleba kvasinkami je vzácné, pokud je použito krátkého postupu kynutí. Může se ale vyskytnout, pokud se používá dlouhého kynutí těsta. Kvasinky (stejně jako plísně) nepřežijí proces pečení, ale ke kontaminaci chleba může docházet během operace chlazení a krájení. Hlavní zdroj kontaminace je prostřednictvím fyzického kontaktu se špinavým zařízením nebo infikovaných potravin s vysokým obsahem cukru, které jsou ideálním substrátem pro osmofilní kvasinky (Cauvain and Young, 2007).

Legan and Voysey (1991) charakterizují dva hlavní typy kvasinek, podílejících se na kažení chleba:

1. Fermentační kvasinky - fermentují cukry přítomné v chlebu. Znehodnocení se projevuje rozvojem "alkoholického" nebo "esterového" zápachu v závislosti na druhu přítomných kvasinek. Mnoho různých typů kvasinek je schopno růst na chlebu a způsobovat tyto vady, avšak pekařská kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* bývá v chlebu nejčastěji.
2. Vlákňité kvasinky - jsou běžně označovány jako "křídové plísně", protože tvoří bílý, šířící se růst na povrchu chleba a mohou být snadno zaměněny s růstem plísni. Existuje řada různých forem křídových plísni, nejčastější a nejproblematictější je však *Pichia burtonii*, která má schopnost velmi rychlého růstu na chlebu. Ukázalo se, že je odolnější vůči konzervačním látkám a dezinfekčním prostředkům, než mnoho jiných plísni.

Druhy rodu *Saccharomyces* jsou schopny zkvašovat většinou několik cukrů, nikdy však nevyužívají laktózu jako zdroj uhlíku a NO_3^- jako zdroj dusíku. Tvar mají většinou krátce elipsoidní, vejčitý nebo protáhlý. Askospory jsou kulovité až elipsoidní v asku po 1 – 4 (Šilhánková, 2002; Görner a Valík, 2004).

Saccharomyces cerevisiae je široce používána v potravinářském a nápojovém průmyslu (pivní, pekařská či vinařská kvasinka). Její velikost činí 6-7 x 7,5-8,7 μm ; má kulovitý až oválný tvar buněk a pro starší buňky je charakteristická zřetelná ostře ohraničená vakuola. Zkvašuje glukosu, galaktosu, sacharózu, maltosu a částečně nebo úplně rafinosu za produkce etanolu a CO_2 . Rozmnožování probíhá pučením (Görner and Valík, 2004).

Tato kvasinka je jedním z nejlépe studovaných experimentálních organismů a ukázala se jako užitečný „model“ pro eukaryotní biologii. Genom kvasinky *S. cerevisiae* obsahuje přibližně 6000 genů a přibližně 31 % genů může být homologní s lidskými geny (Botstein et al., 1997).

Kwolek-Mirek et al. (2011) využili *S. cerevisiae* jako modelový organismus pro zkoumání biochemických mechanismů toxicity akrylamidu, což je známá cytotoxická a genotoxická složka tepelně zpracovaných škrobnatých potravin. Bylo zjištěno, že akrylamid má inhibiční účinek na růst kvasinek (konkrétně snížení buněčné životaschopnosti). Toxicita akrylamidu na kvasinkovou buňku může být zrušena antioxidanty.

Na kažení pečiva se také podílejí kvasinky *Pichia anomala* a *Hypopichia burtonii* (Deschuyffeleer et al., 2011).

Rod *Pichia* obsahuje přibližně 40 druhů a vyznačuje se nízkou kvasnou schopností. Tvoří protáhlé vegetativní buňky. Spory mají vzhled kulovitý, klubkovitý, nebo hranatý a rychle opouštějí askus. Na tekutých substrátech tvoří křís bílé barvy a moučnatého vzhledu. Tyto kvasinky mohou působit nepříjemnou chuť a pach kontaminovaného produktu, kterým je často pivo, víno, ovocné šťávy nebo kysané zelí (Janderová and Bendová, 1999).

3.6.3 Mikrobiologické znehodnocení způsobené plísněmi

Plísně jsou častými znehodnocujícími organismy chleba. Důvodem výskytu je relativně vysoký obsah vlhkosti a vodní aktivity s pH okolo 6 této potravinové matrice. Zmíněné vlastnosti chleba jsou nápomocné pro klíčení a růst jakýchkoli kontaminujících plísní během jeho výroby. Nejvíce náchylné ke kažení plísněmi jsou krájené a balené chleby. Krájené produkty poskytují vlhké řezné plochy pro růst plísní a zabalení brání ztrátě vlhkosti a umožňuje vytvořit vlhkou atmosféru kolem bochníku. Více než 90 % kontaminace plísněmi nastává během chlazení, krájení nebo balicí operace (Magan et al., 2003).

Kontaminace je převážně způsobená sporami hub, zanesených z pekárenského prostředí, z moučného prachu a vstupem z vnější atmosféry. Mnoho různých druhů vláknitých plísní jsou původci kažení chleba včetně *Penicillium*, *Aspergillus*, dále druhů *Cladosporium*, *Mucorales* a *Neurospora*. Tolerance na široký rozsah podmínek prostředí a jejich schopnost převážně myceliálního růstu jim umožňuje kolonizovat produkty potravy rychle a produkovat sadu enzymů k využití potravy jako substrátu. Jak uvádí tabulka 2, růst plísní je všeobecně rychlejší při pH 6 než 4,5 a relativní rychlost růstu byla snížena se snížením aktivity vody bez ohledu na pH. *Eurotium repens* byl nejrychleji se rozvíjející druh, následoval mykotoxigenní *Aspergillus ochraceus* a kmeny *Penicillium verrucosum*. Jiné druhy *Penicillium* rostly pomaleji (Cauvain, 2003).

Cauvain and Young (2007) publikují, že převaha rodu *Penicillium* může být částečně způsobena díky jeho schopnosti růst v širokém rozsahu teplot, dostupnosti vody a bohaté produkci spor, které jsou všudypřítomné v atmosféře a převládají v chladnějších teplotách. Při teplotě mezi 22 až 24 °C je o 50 % snížena kontaminace plísní *Penicillium*, naopak v teplejších klimatických podmínkách se vyskytují plísně *Aspergillus* a *Eurotium*.

Aybud et al. (2003) uvádí hlavní druhy plísní způsobujících znehodnocení chleba: *Rhizopus nigricans* s bílým bavlněným myceliem a černými tečkami sporangií, zelené spory *Pencillium expansum* nebo *Pencillium stoloniferum* a *Aspergillus niger* s nazelenalými nebo purpurově hnědými až černými konidiiemi a žlutými pigmenty rozptýlených v chlebu.

Tab. 2: Vliv environmentálních faktorů na kolonizaci (diametrální rychlosti růstu, mm den⁻¹) analogů chleba pomocí plísní způsobujících jejich kažení při 25 ° C

	pH 4,5 Vodní aktivita			pH 6,0 Vodní aktivita		
	0,93	0,95	0,97	0,93	0,95	0,97
<i>Eurotium repens</i>	2,8	2,6	4,6	4,1	7,5	9,3
<i>Penicillium verrucosum</i> (M450)	0,8	1,3	1,4	1,0	1,8	1,9
<i>P. verrucosum</i> (PV3)	0,8	1,0	1,6	1,1	2,2	2,3
<i>Aspergillus ochraceus</i>	1,5	2,3	2,7	1,8	2,8	3,3
<i>Penicillium corylophilum</i>	0,2	0,4	0,7	0,7	1,2	1,6
<i>Penicillium roquefortii</i>	1,1	1,7	2,2	0,8	1,3	1,4

(Cauvain, 2003)

Spory plísní jsou vždy přítomny v atmosféře, čímž mohou přilnout k přerušenému povrchu chleba při chlazení, a nakonec se přenést do střídky, kde rostou a způsobují plesnivění. Při pečení jsou spory zničeny, a tudíž způsobují nákazu až po upečení, pokud jsou zajištěny vhodné podmínky k jejich růstu.

3.7 Charakteristika mikroskopických hub

3.7.1 Taxonomie mikromycet

Vláknité mikroskopické houby (plísně, mikromycety) jsou vícebuněčné organismy zařazené do říše hub – *Fungi* (Ostrý, 1998).

Podle Clarka and Moncalva (2005) dělíme houby do čtyř velkých skupin: odd. Chytridiomycota, odd. Zygomycota, odd. Ascomycota, odd. Basidiomycota.

Taxonomie vláknitých hub je založena na uznávaných vědeckých zásadách. Třídění mikromycet do jednotlivých skupin je složité vzhledem k širokému stupni variability velikosti, tvaru, pigmentace, včetně konidií a konidioforů. V posledních letech se využívají DNA sekvence, které jsou užitečné pro identifikaci neznámého houbového organismu tzv. DNA barcoding (Seifert, 2009).

Šilhánková (2002) rozděluje technicky důležité plísně do tří skupin podle způsobu rozmnožování. Jedná se o třídy Zygomycetes, Ascomycetes a nesystematickou umělou skupinu mitosporních hub Deuteromycetes (*Fungi imperfecti*), která zahrnuje pouze nepohlavně se rozmnožující houby.

3.7.2 Morfologie mikromycet

Základem těla mikromycet je vegetativní vláknitý útvar - stélka (thallus). Vlákna hub se nazývají hyfy, které jsou coenocytické (bez přehrádek, typické pro spájkivé houby - Zygomycota) nebo jsou rozděleny septy (příčnými přehrádkami). Průměr vláken je 2 – 10 μm a jejich délka může být až několik cm. Hyfy se většinou větví v pravém úhlu a jejich spleť se nazývá mycelium. Tvrdý polokruhovitý útvar tvořený hustou spleť hyf je označován jako sklerocium (Ostrý, 1998).

Buněčná stěna mikromycet je složena je převážně z polysacharidů, v první řadě se skládá z chitinu, glukanu, mannanu a glykoproteinů (Bowman and Free, 2006).

Dále jsou přítomny bílkoviny i značné množství lipidů. Vedle neutrálních lipidů obsahuje také vosky, které přispívají k nízké smáčitelnosti vegetativních i sporonosných hyf. Velmi vysoký obsah vosků a tuků mají např. stěny sporangioforů a stěny konidií. Stěny konidií obsahují různá barviva, nejčastější je zelená a modrozelená barva (rod *Aspergillus*, *Penicillium*), běžná je i barva béžová až hnědá, černá (*Aspergillus*) nebo růžová (*Trichothecium*). Stěny vegetativních hyf jsou obvykle bez barviva (Ruiz-Herrera, 2012).

Šilhánková (2002) publikuje, že v každé buňce mikromycet je jedno či více jader, většinou haploidní povahy. Cytoplasma buněk obsahuje strukturní útvary – endoplasmatické retikulum, mitochondrie, vakuoly, zrníčka polyfosfátů a kapénky tuku. Cytoplasma a cytoplasmatická membrána plísni má podobné složení jako u kvasinek. Hlavní rezervní látkou jsou lipidy, tvořící v buňkách různě velké kapičky, které mohou být ve starších kulturách zaměňovány za konidie.

3.7.3 Růst a rozmnožování mikromycet

Vláknitá struktura umožňuje mikroskopickým hubám růst a někdy i přežít v relativně velmi nepříznivých podmínkách, pokud jde o obsah živin a vody, které jsou pro jejich růst nezbytné. Vláknité mikromycety tvoří substrátové (podpovrchové) mycelium, které prorůstá substrát. Na povrchu substrátu tvoří houby vzdušné mycelium s fruktifikačními orgány, které zajišťuje reprodukci houby (Malíř et al., 2003).

Vláknité houby, jak popisují Pele and Cimpeanu (2012), se rozmnožují rozrůstáním hyf nebo spory. Spory mohou vznikat buď vegetativním způsobem (nepohlavní spory neboli mitospor), nebo po spájení (pohlavní spory neboli meiospor).

Ostrý (1998) popisuje u mikromycet výskyt dimorfismu, např. rod *Mucor* se za přístupu vzduchu vyskytuje ve formě vláknité a při zplynování oxidem uhličitým ve formě kvasinkové. Kvasinková forma je typická zejména pro patogenní plísně. Dále se vyskytuje

polymorfismus, kdy se podle způsobu rozmnožování u plísní rozlišuje forma nepohlavní – anamorfa (A) a forma pohlavní – telomorfa (T).

VEGETATIVNÍ SPORY

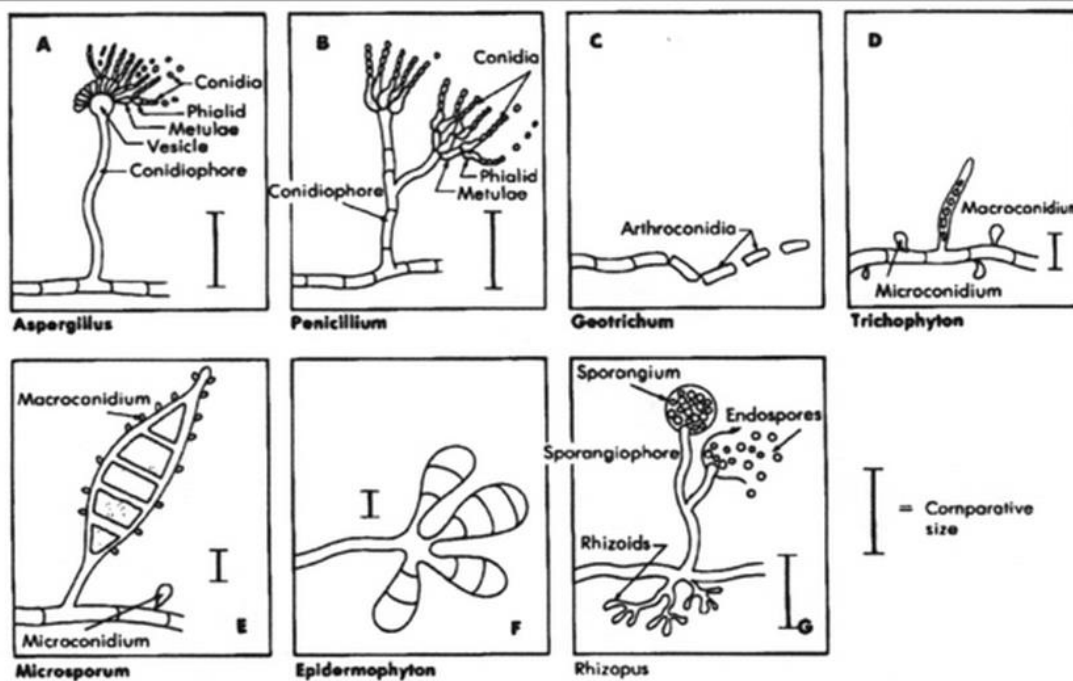
Vegetativní spory se tvoří buď na vegetativních hyfách, nebo na fruktifikačních orgánech. Spory nacházející se uvnitř orgánů se označují jako **endospory**. Spory umístěné vně orgánů se označují jako **exospory** neboli **konidie** (Pele and Cimpeanu, 2012).

Tvar konidií je u různých rodů odlišný (viz obr. 1), mohou být jednobuněčné (mikrokonidie) či vícebuněčné (makrokonidie) a mohou být umístěny jednotlivě, v řetízcích nebo kulovitých útvarech. Podle způsobu tvorby se rozeznávají oidie (artospory), které vznikají rozpadem vláken v jednotlivé buňky, blastospory tvořící se pučením a konidie, které vznikají ze základní buňky, tj. bazipetálně (nejmladší konidie z řetízku konidií je nejbližší základně). Řetízky blastospor vznikají bazifugálně, neboť nejmladší spora, vznikající pučením ze spory předešlé, je na vrcholu řetízku. Pučení s následnou tvorbou přehrádek se uplatňuje i při tvorbě vícebuněčných spor (př. u rodů *Alternaria*, *Cladosporium*). Bazipetálním způsobem se tvoří např. fialospory, vznikající z fialidy (lahvovité buňky); formují se z vnitřního obsahu fialidy buď dříve, než opustí její hrdlo, nebo až nad zúženým hrdlem fialidy. Vyskytují se např. u rodů *Aspergillus* nebo *Penicillium* (Pele and Cimpeanu, 2012).

Šilhánková (2002) zmiňuje, pokud je hyfa nesoucí konidie zřetelně odlišena od ostatních hyf, nazývá se konidiofor, který může být jednoduchý, větvený nebo na konci zduřelý ve vezikule. Například rod *Aspergillus* může mít fialidy ve dvou vrstvách na povrchu vezikuly: primární fialidy (metuly) vyrůstají z vezikuly a sekundární fialidy vyrůstají ve svazcích z metul. Přeslenovitě uspořádaný konec konidioforu u rodu *Penicillium* má různě bohaté členění. U některých vláknitých hub (např. některé druhy rodů *Aspergillus*, *Penicillium*) srůstají konidiofory ve svazek zvaný koremium, ukončený paličkou spor.

U některých plísní se kolem jednotlivých buněk mycelia může vytvořit silný obal, přičemž obsah buňky se zahustí – vytváří se tzv. chlamydospora, která je odolná proti nepříznivým vlivům (Pele and Cimpeanu, 2012).

Obr. 1: Typy konidií a konidioforů vybraných druhů vláknitých hub



Zdroj: http://images.slideplayer.pl/1/59711/slides/slide_28.jpg

Endospory vznikající ve vakovitém útvaru tzv. sporangium, se nazývají sporangiospory a mají většinou několik jader. Sporangium má tvar kulovitý, hruškovitý nebo válcovitý a je umístěno na jednoduchém nebo větveném sporangioforu. Část sporangioforu, která zasahuje do kulovitého sporangia, se nazývá kolumela a podle jejího tvaru lze určovat druhy. Některé rody kolumelu nemají (Šilhánková, 2002).

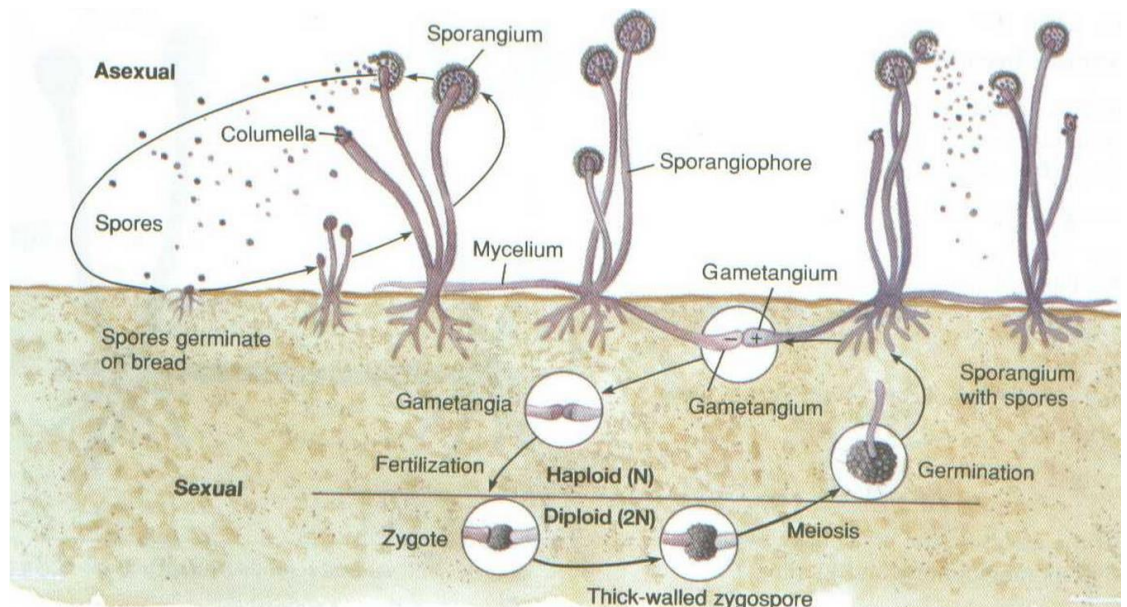
POHLAVNÍ SPORY

Pohlavní rozmnožování vyhovuje zvláště patogenním plísním a je důležitým kritériem pro jejich zařazení. Během tohoto rozmnožování se tvoří dokonalé pohlavní spory, mezi které patří oospory, zygospory, askospory a bazidiospory. Z potravinářského hlediska jsou pak důležité zygo- a askospory (Kalina and Váňa, 2005).

Zygospora - vznikají po dotknutí výběžků hyf (progametangií) a po spájení buněk (gametangií), které se oddělily na konci obou progametangií. Pokud byla progametangia přibližně stejně velká, pak se jedná o izogamní spájení, v opačném případě jde o heterogamní spájení. Zygospora je diploidní buňkou se silnou, tmavě zbarvenou obalovou vrstvou a nápadnými výrůstky. Při klíčení zygospory dojde k meióze, při které tři haploidní jádra zaniknou a čtvrté se dále dělí mitózou. Ze zygospory pak vyroste sporangiofor se sporangiemi (tzv. zygosporangium).

Askospory - většinou se tvoří po osmi ve vřecku neboli asku. Asky vznikají z dvoujaderných hyf, jež jsou buď volné, nebo uloženy ve fruktifikačních orgánech. Kulovitý až lahvovitý útvar s uspořádanými asky umístěnými paralelně a s otvorem pro jejich uvolnění se označuje jako perithecium; uzavřený fruktifikační orgán kulovitěho tvaru s neuspořádanými asky se označuje jako kleistothecium. Rody *Aspergillus*, *Byssochlamys*, *Penicillium* a další tvoří neuspořádané asky kulovitěho až elipsoidního tvaru, obsahující shluk osmi askospor.

Obr. 2: Nepohlavní a pohlavní rozmnožovací cyklus hub



Zdroj: <http://imgarcade.com/1/conidiophore-vs-sporangiophore/>

3.7.4 Charakteristika vybraných mikromycet

3.7.4.1 Třída Zygomycetes

Houby spájkivé jsou charakterizovány jednobuněčným (nepřehrádkovaným) myceliem a pohlavním rozmnožováním s tvorbou zygospor. Nepohlavní rozmnožování se děje pomocí endospor (vznik sporangiospor). Stěny endospor a blána sporangia u zygomycet obsahují většinou hnědočerné barvivo melanoidní povahy, které chrání spory před nepříznivými účinky UV záření (Šilhánková, 2002).

Rod *Mucor*

Zástupci tohoto rodu jsou považovány za saprofytické kolonizátory, schopné využívat jednoduché cukry dostupné z rozkládajícího se materiálu (Carlile et al., 2001).

Vzdušné mycelium je vatovité, zpočátku bílé nebo šedé, později tmavé a rychle se rozrůstá. Hyfy jsou málo větvené a neseptované. V hyfách se tvoří částečně soudkovité nebo kulovité, silnostěnné, a tmavozelené chlamydospory (Görner and Valík, 2004).

Mucor je nejrozsáhlejším rodem, vyskytujícím se na různých potravinách, např. chlebu, mase, másle, ovoci, zelenině apod. a tvoří volně vláknitý, často bělavý porost s kulovitými nahnědlými sporangii, jejichž kolumela má různý tvar (Šilhánková, 2002).

Na vlhkém chlebu se často vyskytují bělavé kolonie s béžovým zbarvením, jež tvoří heterothalický druh *Mucor mucedo* (Carlile et al., 2001).

Rod *Rhizopus*

Rhizopus je velmi rozšířená saprofytická, ale i parazitická plíseň. Nachází se na ovoci, zelenině, obilí, mlýnských produktech, sladě aj., roste i na mase i při chladírenských teplotách (Görner and Valík, 2004).

Tvoří delší vlákna přesahující 1 cm. Sporangiofory vyrůstají po 2 až 3 ze šlahounovitých hyf neboli stolonů v místech, kde vznikají kořínkovité hnědavé útvary – rhizoidy. Konec sporangioforu pod sporangiemi je rozšířený v tzv. apofýzu a přechází spojitě v čočkovitou kolumelu. Spory jsou nepravidelně oválné až podlouhlé, často jsou opatřeny membránou a podélně rýhované (Šilhánková, 2002).

Za nejvýznamnější druh se považuje *Rhizopus stolonifer*. Jedná se o heterothalický druh tvořící husté šedé povlaky na špatně uskladněném chlebu, vyskytující se v potravinách bohatých na škroby a cukry, mj. i v půdě. Kolonie jsou rychle rostoucí za ideální teploty 25 °C. Spory obsahují alergenní proteiny, které mohou vyvolat respirační potíže,

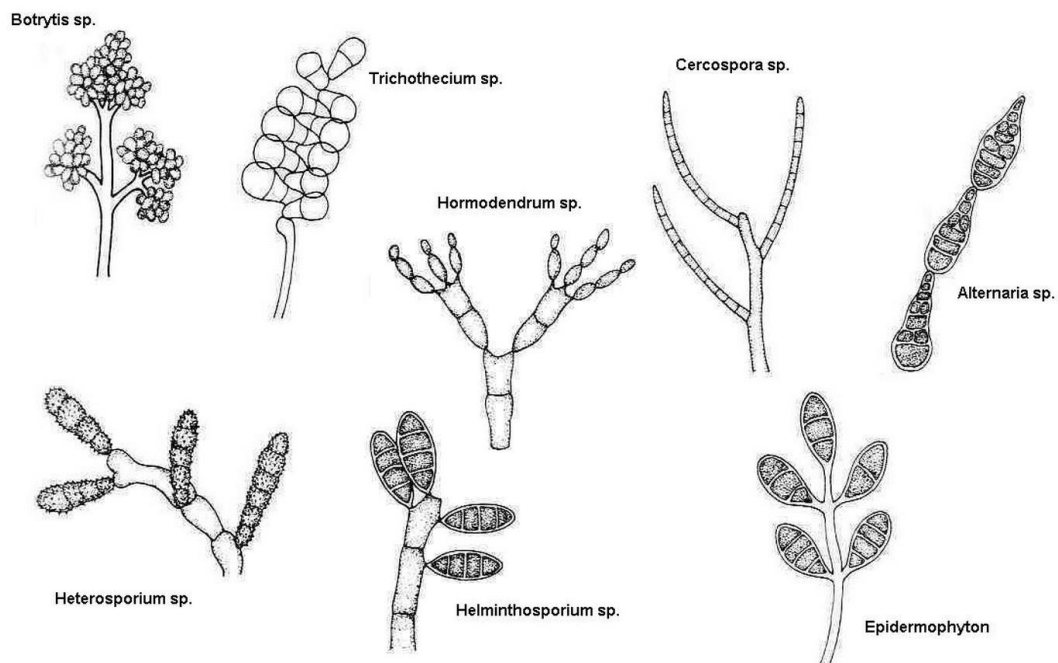
zejména u pracovníků potravinářských provozoven. Neprodukuje mykotoxiny. Synonymum pro tento druh je *R. nigricans* (Pontón et al., 2002).

3.7.4.2 Třída Deuteromycetes a jim příslušející Ascomycetes

Houby nedokonalé (přesněji nedokonale známé) mají přehrádkované mycelium a nepohlavní rozmnožování, které se děje pomocí exospor (Šilhánková, 2002).

Třída zahrnuje řád **Mycelia sterilia**, který tvoří pouze mycelium, popř. sklerocia. Není možné tyto houby klasifikovat, protože nevytváří sexuální ani asexuální spory (Hodkinson and Parnell, 2006).

Obr. 3: Tvary konidií a konidioforů u hub nedokonalých (Fungi imperfecti)



Zdroj: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/hesla/img_d10e8808.html

Rod *Aspergillus*

Tento velice rozšířený rod se vegetativně rozmnožuje konidiemi, které vznikají v řetězcích z fialid na rozšířeném konci konidioforu. U některých druhů je známa tvorba neuspořádaných asků obsahujících osm askospor. Jde o rod, který je velmi bohatě vybaven enzymy (amylolytickými, pektolytickými a proteolytickými); některé druhy jsou vhodné pro průmyslovou přípravu těchto enzymů, jež se používají v potravinářství. Jinou schopností je produkce antibiotik, jež však jsou velmi toxická (Šilhánková, 2002).

Görner and Valík (2004) popisují vzhled mycelia, které je plstnaté až vatovité, bezbarvé nebo barevné. Staré kolonie jsou pokryté černou, šedou, bílou, zelenou či žlutou vrstvou spor.

Nejrozšířenějším druhem je *Aspergillus niger*, bohatě enzymaticky vybaven, jehož konidie jsou svým černým barvivem chráněny proti nepříznivému účinku slunečního světla. Askosporogenní *Aspergillus fumigatus* způsobuje onemocnění dýchacích cest lidí i zvířat. Osmofilní *A. glaucus* tvoří zelené konidie a zapříčiňuje plesnivění chleba, džemů a jiných potravin o relativně nízkém obsahu vody. Na potravinách s poměrně nízkou vlhkostí (chléb, obilí, sušené ovoce či zelenina) se vyskytuje druh *A. versicolor* (Šilhánková, 2002).

Plísně rodu *Aspergillus* se nacházejí nejčastěji v subtropických a teplých klimatických podmínkách, kde jsou schopny odolávat vysokým teplotám. Často kontaminují obilná zrna. K zemědělsky významným toxigenním kontaminantům zrn patří *A. flavus* a *A. parasiticus*, produkující toxické sekundární metabolity aflatoxiny, které jsou karcinogenní (Khachatourians and Arora, 2002).

Aflatoxiny jsou blízce příbuzné sloučeniny, z nichž nejvíce toxický je aflatoxin B₁, patřící mezi nejvíce karcinogenní látky (Adams and Moss, 2008).

Na pekařských výrobcích byla detekována chromatografickou metodou přítomnost aflatoxinů B₁ a G₁ (Simon et al., 1984).

Rod *Alternaria*

Alternaria je všudypřítomný houbový rod způsobující před i posklizňové škody zemědělských produktů, včetně obilí, ovoce a zeleniny. Druhy mají schopnost produkovat různé sekundární metabolity, včetně mykotoxinů, které vyvolávají nepříznivé účinky u zvířat i člověka (Barkai-Golan, 2008).

Jejich tmavě zbarvené spory (zelenočerná až hnědočerná) mají příčné i podélné přepážky a tvoří se v řetízcích. Mycelium je stejně tak tmavě zbarvené, což chrání tuto plíseň před nepříznivými účinky slunečního světla. Často se vyskytuje ve vzduchu i v různých potravinářských provozovnách (Šilhánková, 2002).

Rod *Cladosporium*

Tento rod tvoří řetízky vícebuněčných spor, které vznikají pučením, jde o tzv. blastospory. Starší mycelium i spory jsou tmavě zbarveny, podobně jako u rodu *Alternaria*. Vzdušné hyfy jsou většinou tmavozelené, substrátové hyfy modrozelené až černozelené. Konidiofory jsou nepravidelně větvené, septované a na koncích s kratšími

nebo delšími rozvětvenými řetězci konidií, které mají vzhled většinou kulovitý, vejčitý či válcovitý (Görner and Valík, 2004).

Vyskytují se na stěnách potravinářských provozoven, ve vinařských a pivovarnických sklepích. Parazitují na potravinách, jako jsou obilí (polní flóra), chlazené maso a vejce, citrusové plody a zelenina (zelená hniloba). Rozkládá pektiny, celulosu a tuky (Šilhánková, 2002).

Významným zástupcem je *C. herbarum*, jehož sametové kolonie jsou olivovězelené až olivověhnědé. Optimální teplota růstu je 18 – 28 °C max. 32 °C, min. -6 °C (Dijksterhuis and Samson, 2007).

Konidie druhů *Cladosporium* představují nejčastější plísňové složky izolované ze vzduchu. Díky malým konidiím, obvykle tvořených do rozvětvených řetězců, se snadno šíří na dlouhé vzdálenosti. Jsou původci skvrn na listech a jiných lézí, mohou se vyskytovat jako hyperparazit na jiných houbách (Bensch et al., 2012).

Protože mnoho druhů *Cladosporium* je kosmopolitních, jsou příčinou mnoha alergií, astmatu, způsobují různé typy mykotických infekcí na kůži, očích, dutinách a mozku (Bouziane et al., 2005).

Rod *Fusarium*

Vzdušné mycelium rodu *Fusarium* je řídké a nepravidelné, šedě nebo pestře zbarvené (žlutá, hnědá, růžová, červená, fialová), pigmenty mohou difundovat do substrátu (Lane et al., 2012).

Konidiofory jsou krátké a tvoří tenkostěnné, větvenovité nebo srpkovité vícebuněčné konidie - makrokonidie. Někdy se tvoří malé, převážně jednobuněčné a hladkostěnné mikrokonidie. U některých druhů se hojně vyskytují chlamydospory různého tvaru, velikosti. Mají různý počet buněk, často se zbarvenou stěnou, která má bradavičnatou strukturu. Vznikají buď na konci vláken – terminálně, nebo na konci vlákna – interkalárně (Malíř a kol., 2003).

Mnoho druhů způsobuje na obilovinách předčasné bělicí příznaky známé jako strupovitost. Jsou nejčastěji přítomny na obilných zrnech, produktech mletých obilovin (mouka, kukuřičná moučka), ječném sladu a krmivech pro zvířata (Montville and Matthews, 2008).

Houby rodu *Fusarium* produkují tzv. fusariotoxiny. Do této skupiny patří přes 140 látek. Nejdůležitějšími však jsou deoxynivalenol (DON), zearalenon (ZEA, ZON), nivalenon (NIV), T-2 toxin a HT-2 toxin (Siantar et al. 2008).

Toxiny T-2 a HT-2 jsou produkovány různými druhy z rodu *Fusarium*. T-2 toxin je rychle metabolizován ve značném množství produktů a HT-2 toxin bývá hlavním metabolitem. Nejvyšší průměrné koncentrace pro sumu T-2 a HT-2 toxinů byly pozorovány u obilí, výrobcích z mouky, zejména v ovsu a výrobcích z ovsu. Potravin vyrobené z obilí, především chléb, vybrané pekařské výrobky a výrobky z mouky, přispívají k celkové expozici těmito toxiny (EFSA, 2011).

WHO Food Additive Series (2001) shrnuje, že pšenice a ječmen jsou hlavní potravinové zdroje T-2 toxinu v evropské stravě a pšenice, ječmen a oves jsou nejdůležitější potravinové zdroje pro HT-2 toxin.

V současné době existují omezená data zabývající se osudem trichothecenů v lidském organismu. Byla zkoumána biodostupnost toxinů T-2 a HT-2 pomocí přirozeně a uměle kontaminovaných chlebů během trávení in vitro. Výsledná biodostupnost byla znatelně vyšší u HT-2 toxinu ve srovnání s T-2 toxinem (Angelis et al., 2014).

Rod *Monilia*

Plísně rodu *Monilia* produkují dlouhé řetězce oidií, jež tvoří bělavé až lososovitě červené povlaky na různých druzích materiálu. Jejich perfektní forma – rod *Neurospora*, je používána jako modelový organismus pro genetické studie (Šilhánková, 2002).

Druhy těchto mikromycet způsobují plesnivění obilí, masových produktů, jádrového a peckovitého ovoce. *M. sitophila* je velmi termotolerantní, nazývá se také jako červená pekárenská plíseň (Görner and Valík, 2004).

Rod *Penicillium*

Mikromycety tohoto rodu patří mezi všudypřítomné organismy na zemi. Způsobují destruktivní hniloby v potravinářském průmyslu, kde produkují širokou škálu mykotoxinů (Blackburn, 2006).

Kolonie jsou obvykle rychle rostoucí s velkým množstvím žlutozelených až modrozelených konidií, které jsou patrné na potravinách jako zelené, sametové až moučné povlaky. Okraje kolonií, na nichž nejsou spory, jsou zbarveny bíle (Šilhánková, 2002).

Konidiofory jsou vzpřímené, na koncích symetricky či asymetricky větvené (metuly). Na koncích rozvětvených stopek jsou fialidy, svazky odškrucujících se konidií uspořádaných v dlouhých řetězcích (až 50 i více). Některé druhy vykazují i pohlavní rozmnožování a tvoří kulové asky, ve kterých jsou umístěny askospory (Görner and Valík, 2004).

Druhy rodu *Penicillium* jsou hojnější v mírnějším pásmu. Požadavky na vlhkost se velmi liší mezi druhy, některé kolonizují substráty bez volné vody, jiné napadají obilí a jejich produkty s relativní vlhkostí 90 % i vyšší, při teplotách od -2 do 5 °C. Produkce toxického patulinu od *P. expansum* může nastat při teplotách mezi 0 až 24 °C (Dijksterhuis and Samson, 2007).

Penicillium spp. může růst a produkovat mykotoxiny v širokém rozmezí teplot na rozdíl od rodu *Aspergillus* a je častěji spojen se skladováním než s kontaminací zrn před sklizní (Khachatourians and Arora, 2002).

Druh *Penicillium chrysogenum* je schopen produkovat toxin citrinin u celozrnného chleba, celozrnného chleba s pšeničnými klíčky, celozrnného chleba s lněným semínkem a žitného chleba s pšeničnou moukou. Optimální teplota pro růst a tvorbu citrininu je 25 až 30 °C (Reiss, 1977).

Nejdůležitějším toxinem produkovaným tímto rodem je ochratoxin A. Cílovým orgánem toxicity všech druhů savců jsou ledviny. Ochratoxin A je produkován druhem *P. verrucosum*, který roste na pšenici a ječmeni při relativně nízkých teplotách kolem 0 °C a při maximálních 31 °C (Montville and Mathews, 2008).

Soriano et al. (2007) se zabývali dietním příjmem ochratoxinu A z konvenčního a bio chleba. Ochratoxin A (OTA) byl ze vzorků extrahován a poté analyzován pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s fluorescenční detekcí. Nejvyšší hodnoty byly získány z běžných chlebů ve srovnání s bioprodukty. Předpokládaný denní příjem OTA v této studii byl 1,6 ng/kg tělesné hmotnosti a den, což představuje 32 % a 10 % přijatelného denního příjmu (TDI) podle Vědeckého výboru pro potraviny Evropské komise a FAO/WHO Výboru expertů pro potravinářské přídatné látky.

Rod *Trichothecium*

Mikromycety zmíněného rodu mají bílé a ploché kolonie, které se rychle pokrývají vrstvou růžových nebo meruňkově zbarvených konidií; často rostou v soustředěných kruzích. Konidiofory jsou vzpřímené a nevětvené. Konidie jsou ve dvojicích nebo shlucích a vznikají na zašpičatěném konci konidioforu, přičemž se 3 až 10 konidií spájí. Jedná se o časté saprofyty, které způsobují kažení jádrového ovoce, zeleniny i chleba (Görner and Valík, 2004).

3.8 Toxinogenní plísňové kontaminanty

Toxinogenní mikromycety mají schopnost produkovat mykotoxiny a díky svému enzymatickému vybavení jsou velmi adaptabilní pro kontaminaci téměř jakéhokoliv substrátu. Díky široké morfoloické rozmanitosti a schopnosti přizpůsobit se nejrozličnějším ekologickým podmínkám mohou osídlit potraviny jakožto vhodný substrát pro jejich růst, rozmnožování a následnou produkci toxinů (Ostrý, 1998).

K hlavním mykotickým rodům, které kontaminují obilná zrna a produkují mykotoxiny, patří *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium* (Gursoy and Bicici, 2004).

Plísně také patří k významným alergenům. Alergeny pocházejí nejčastěji ze spor, mají negativní vliv na lidské zdraví, především na inhalační systém.

3.8.1 Plísně a jejich alergen

Mykoalergie jsou definovány jako hypersenzitivní reakce imunitního systému hostitele na antigenní stimulaci houbovým alergenem. Po chemické stránce je většina mykoalergenů tvořena proteiny a glykoproteiny, popř. polysacharidy (Malíř et al., 2003).

Za nejvýznamnější se považuje alergenní působení spor, které mohou pronikat do dýchacích cest, podobně jako pylová zrna. Většina alergologicky významných spor má rozměry 3 – 10 μm . podařilo se izolovat řadu alergenů plísni, např. hlavní alergen rodu *Alternaria* (Alt a 1), *Aspergillus* (Asp f 1) a *Cladosporium* (Cla h 1). Plísně mohou vyvolávat běžné alergické příznaky u vnímavých osob např. astma nebo alergickou rýmu (Liška, 2010).

K dalším významným alergenům patří mitosporické druhy rodu *Fusarium*, *Penicillium*, *Epicoccum* a zygomycety jako je *Mucor* a *Rhizopus* (Malíř et al., 2003).

Kalhotka (2014) uvádí, že u pekařů byly zjištěny alergické projevy proti antigenům *Monilia sitophila*.

K alergologické diagnostice se využívají kožní prick testy a vyšetření specifického IgE. Kvůli značnému počtu alergenů a jejich různému rozmístění v jednotlivých částech plísni může být diagnostika obtížnější (Janíčková, 2009).

3.8.2 Metabolické produkty - mykotoxiny

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity již zmíněných vláknitých hub, které jsou v nízkých koncentracích toxické pro rostliny, zvířata, ale i člověka. Vzhledem k širokému spektru aktivity toxinů a typicky vysoké odolnosti vůči teplotě, se přítomnost mykotoxinů

v potravinách a krmivech váže k vážným zdravotním rizikům. Mykotoxikózy, otravy a nemoci způsobené plísňovými toxiny, jsou celosvětovým problémem. Mezinárodní organizace proto kladou důraz na nepřetržité sledování kvality rostlinného a živočišného původu potravin, z hlediska přítomnosti toxických houbových metabolitů (Waśkiewicz, 2014).

K potravinářským procesům, které mohou mít vliv na mykotoxiny, patří např. čištění, frézování, vaření, pečení, smažení, konzervování, olupování, alkalické vaření nebo extruze. Některé procesy významně snižují jejich koncentraci, neodstraní je však úplně. Proces pražení a extruze se jeví jako slibný pro snižování koncentrace mykotoxinů. Extruzí dojde při teplotách vyšších než 150 °C ke snížení zearalenonu, aflatoxinů, deoxynivalenolu a fumonisinů. Největší snížení fumonisinů nastává při extruzní teplotě 160 °C nebo vyšší a v přítomnosti glukózy (Bullerman and Bianchini, 2007).

Kontaminaci chleba plísněmi může ovlivnit doba jeho trvanlivosti a nevhodné podmínky skladování.

3.9 Faktory ovlivňující trvanlivost chleba

Na kvalitu a trvanlivost chleba mají vliv různé typy přírodních a chemických konzervačních látek. Jejich hlavním cílem je posílit celkovou integritu bochníku, zpomalit růst plísní a následný rozklad chleba. Přidání určitých chemických látek může pomoci udržet chléb čerstvý několik týdnů, dokonce i měsíců.

3.9.1 Chemické konzervační látky

Nejběžnější způsob, jak omezit nebo zabránit růstu plísní v potravinách, je použití antifungálních látek. Tyto složky zastaví klíčení a růst nežádoucích mikrobů, i když k růstu může dojít na neošetřených místech potraviny. Fungicidní látky jsou více efektivní, protože dokáží přímo zničit plísně. Koncentrace antifungálních látek má do značné míry vliv na bezpečnou údržnost potravinářského výrobku (Cauvain, 2003).

Ideální antimikrobiální látka by měla inhibovat mikroorganismus v jeho počáteční lag fázi růstu, a nikoliv v exponenciální log fázi, protože nezbytné dávkování činidla ve druhém případě by bylo příliš vysoké a s největší pravděpodobností by mělo nepříznivý vliv na kvalitu potraviny (Smid and Gorris, 1999).

Ryan et al. (2008) dospěli k závěru, že přídavek antifungálního kvásku má potenciál ke snížení hladiny chemických přísad potřebných v pekárenském průmyslu pro zajištění mikrobiologické bezpečnosti chleba.

Přidáním potravinářských konzervačních prostředků, jako je kyselina propionová, sorbová, octová a jejich solí, se obvykle minimalizuje mikrobiální růst (Cauvain, 2003).

Amra et al. (1996) publikovali, že použití kyseliny propionové, jako konzervačního prostředku při pečení francouzského chleba, má účinnější efekt na zničení aflatoxinů B1 a G1 než sorban draselný.

Další látkou s účinným konzervačním účinkem je etylalkohol. Přidáním etanolu v množství v rozmezí 0,5 – 3,5 % hmotnosti bochníku vede k podstatnému prodloužení trvanlivosti chleba (Legan, 1993).

Cauvain and Young (2007) publikují, že skladovatelnost plísňě-prostých bochníků ošetřených alkoholem roste s koncentrací etanolu, protože zvýšení životnosti o 50 % je dosaženo po přidání 0,5 % etanolu vztažené na váhu bochníku. K obdobnému zvýšení trvanlivosti došlo při nástřiku stejného množství etanolu přes celý povrch bochníku před balením a utěsněním. Sensorické testy ukázaly, že přidáním vyššího stupně než 1 % hmotnosti produktu může být nepřijatelné pro spotřebitele.

Antioxidanty fenolických derivátů mají antimikrobiální účinnost na běžné kontaminanty chleba, jako je *Cladosporium herbarum*, *Penicillium coryolophilum*, *P. verrucosum* a *Aspergillus ochraceus* (Cauvain, 2003).

Podle Islama (2006) má dimethyl fumarát (DMF) vliv na inhibici plísní v bílých chlebech, protože bochníky obsahující 0,32 g nebo více DMF na kg mouky zabalené do polyethylenových sáčků, skladované při 22 - 23 °C a 45 – 55 % relativní vlhkosti vykazovaly nulový růst plísní v průběhu 475 dnů skladování.

3.9.2 Biologická konzervace

Antimikrobiální látky mikrobiálního původu používané u potravinářských komodit, včetně kynutého těsta chleba, jsou známy jako tzv. bio konzervanty. Jedná se např. o bakterie mléčného kvašení, které produkují antibakteriální sloučeniny se širokým antimikrobiálním spektrem, jako jsou organické kyseliny nebo peroxid vodíku a sloučeniny s úzkým spektrem zvaných bakteriociny (Smid and Gorris, 1999).

Bakterie mléčného kvašení (BMK) produkují celou řadu produktů látkové výměny, které jsou schopné interferovat s růstem jiných mikrobů (Vandenbergh, 1993).

Příkladem těchto bakterií je *Lactobacillus plantarum*, který se vyskytuje v rostlinném materiálu, gastrointestinálním traktu zvířat i lidí. Používá se při fermentaci kynutého pečiva, zelí apod., je zdravější možností konzervace potravin. Má antibakteriální aktivitu proti několika patogenním agens i antioxidační aktivitu, čímž může být využit v potravinářském průmyslu (Daeschel and Nes, 1995).

Bello et al. (2007) publikují, že antimykotickým kmenem *L. plantarum* se může zlepšit trvanlivost pšeničného chleba, protože ukázal konzistentní schopnost zpomalovat růst *Fusarium* (*F. culmorum* a *F. graminearum*).

Gerez et al. (2009) zmiňují prevencí proti znehodnocení chleba pomocí bakterií *Lactobacillus plantarum* CRL 778, *Lb. reuteri* CRL 1100, *Lb. brevis* CRL 772 a CRL 796, jež mají schopnost inhibovat hlavní plísňové kontaminanty chleba *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium*.

Rod *Lactobacillus* zahrnuje grampozitivní, nepohyblivé, fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní bakterie. Jejich hlavním metabolitem fermentace sacharidů je kyselina mléčná, ale také octová, etanol a CO₂. Při fermentaci snižují kyselost prostředí až pod pH 4,0. Kyselina mléčná a octová jsou v kyselém prostředí málo disociované a v tomto stavu působí se sníženým pH inhibičně až mikrobicidně na ostatní mikroorganismy v prostředí. Laktobacily rostou, rozmnožují se a metabolizují za anaerobních podmínek, ale i při sníženém obsahu kyslíku ve všech prostředích, které jim poskytují dostatek fermentovatelných sacharidů, štěpných produktů bílkovin, nukleových kyselin a vitamínů skupiny B. Upřednostňují mezofilní a mírně termofilní teploty, všeobecně jsou acidotolerantní až acidofilní. Využívají se při výrobě fermentovaných potravin, např. jogurtu, kde jsou součástí tzv. probiotik, dále součástí sýra, nakládaných okurek, kysaného zelí, piva nebo vína (Görner and Valík, 2004).

Ducrotté et al. (2012) charakterizují *L. plantarum* 299v, jež byl poprvé izolován z lidského střeva. Bylo prokázáno, že má mimořádné schopnosti: slizniční kolonizace, tolerance vůči různým námahám (př. žlučové kyseliny), regulace bakteriálního přerůstání, prevence zánětlivých změn. Díky těmto vlastnostem je *Lp* 299v výborným probiotickým kmenem ve srovnání s jinými komensálními bakteriálními kmeny.

Nguyen et al. (2007) uvádí bakterii *Lactobacillus plantarum* PH04 jako potenciální probiotikum, mající snižující účinky na cholesterol.

Jiným příkladem bakterií produkující organické kyseliny a bakteriociny jako inhibiční látky proti nežádoucím mikroorganismům, jsou *Pediococcus acidilactici* a *P. pentosaceus*. Postřikem jednobuněčné suspenze těchto kmenů na povrch chleba dochází k inhibici růstu hub do 8 dnů ode dne uložení v igelitových pytlích (Cizeikiene et al., 2013).

3.9.3 Balení v ochranné atmosféře

Uplatňování modifikované atmosféry se zvýšenou koncentrací oxidu uhličitého se stalo předmětem zájmu v letech 1970, a to zejména v Evropě. Výhodou balení pečiva v této atmosféře je zvýšení trvanlivosti bez ovlivnění vůně, chuti nebo vzhledu. Atmosféra CO₂ je účinná při zpomalení vývoje růstu plísní přítomných v koncentracích vyšších než 20 %. Při koncentracích okolo 100 % je antimikrobiální účinek CO₂ maximalizován skrze anaerobiózu. Bylo prokázáno, že vyšší koncentrace oxidu uhličitého má efektivnější vliv na údržnost. Běžnou metodou balení výrobků v rámci modifikované atmosféry je také vakuové balení s následným přidáním směsi plynu. Použití plynu se využívá především u vysoce kvalitních chlebů, které mají mít dlouhou trvanlivost při skladování (Cauvain and Young, 2007).

3.9.4 UV záření, mikrovlnné záření a infračervené záření

UV záření je silným antibakteriálním činidlem s neúčinnější vlnovou délkou 260 nm. Používá se pouze povrchově, a to k ošetření zabalených pekařských výrobků proti výskytu nežádoucích spor. Výhodou je, že nevytváří teplo, které by mohlo poničit balicí folii výrobku (Cauvain and Young, 2007).

Mikrovlnný ohřev je rychlý a rovnoměrný, bez velkých teplotních gradientů mezi povrchem a vnitřkem homogenních produktů. Použití mikrovln jako prostředek k uchování chleba je omezen tepelným účinkem. To může způsobit problémy s kondenzací, která může negativně ovlivnit vzhled produktu (Cauvain, 2003).

Cauvain and Young (2007) popisují ošetření infračerveným zářením, které může být použito ke zničení spor plísní do teploty 75 °C, aniž by mělo nepříznivý vliv na kvalitu a vzhled výrobku nebo integritu obalového materiálu. Čas potřebný k dosažení této teploty je závislý na tloušťce obalového materiálu, povaze produktu a vzdálenosti mezi infraprojektorem a povrchem výrobku.

3.10 Podmínky skladování

Metody skladování jsou velmi důležité pro udržení čerstvosti pečiva. Během uchovávání totiž dochází k fyzikálně-chemickým změnám. V důsledku těchto změn chléb rychle ztrácí svoji čerstvost, což má za následek zvýšení pevnosti a tuhosti střídky (Pateras, 1998).

Rozsah poklesu kvality závisí na faktorech, jako je velikost produktu, úroveň kvasinek v těstě a skladovací teplota. Teplota má významný dopad na mikrobiální znehodnocení. Při chladnějších teplotách jsou významné druhy *Penicillium*, zatímco při teplotě okolního prostředí (20 – 25 °C) může docházet k nákaze druhy *Aspergillus* a *Eurotium* a velmi zřídka druhy *Rhizopus* a *Neurospora*, produkujících hojné množství amylázy (Blackburn, 2006).

U čerstvých chlebů doba skladování málokdy přesáhne 3 dny kvůli ztrátě kvality spojené s dehydratací těsta (Cauvain and Young, 2007).

Technologie předpečení a následného zmrazení je pro skladování pečiva stále modernější. V této formě je bochník relativně stabilní proti stárnutí. Uchovávání se uskutečňuje v uzavřených nádobách, aby se zabránilo ztrátě vlhkosti (Ribotta et al., 2001).

Fik and Salad (2002) zjistili, že zmrazený chléb se 71% podílem času pečení ukázal po rozmrazení vysokou stabilitu sensorických vlastností a reologických parametrů po celou dobu skladování (11 týdnů).

V domácnostech je chléb obvykle uchováván v mikrotenovém sáčku, látkové utěrce nebo chlebníku a uložen ve spíži či chladničce. Avšak nesprávné skladování a nedodržování hygienických podmínek vede k množení spor plísní a v konečném důsledku ke zkažení chleba. Těmito záležitostmi se dále zabývala praktická část diplomové práce.

4 Materiál a metody

4.1 Použitý materiál

Jako testovaný materiál bylo použito 40 náhodně vybraných chlebů (viz tabulka 3), nebalených i balených, zakoupených v maloobchodní síti. Testování se zabývalo kvalitativním a kvantitativním zastoupením mikromycet. Rozvoj vláknitých hub byl zjišťován v souvislosti s minimální trvanlivostí chlebů (u balených chlebů trvanlivost stanovená výrobcem, u nebalených 24 h), a dále se způsobem uskladnění chlebů v těchto domácích podmínkách:

- chlebník
- mikrotenový sáček uložený při pokojové teplotě
- mikrotenový sáček uložený v chladničce

Výrobky byly testovány jednak v den nákupu a s ohledem na trvanlivost po domácím skladování.

Tabulka 3 uvádí seznam testovaných výrobků. Jednalo se o širokou škálu chlebů s odlišným složením od různých výrobců.

Tab. 3: Seznam výrobků pro mikrobiologický rozbor

Číslo vzorku	Název výrobku	Výrobce/distributor	Balený/nebalený
1	Ječný chléb	Mr. Barley	B
2	Chléb konzumní krájený (pšenično-žitný)	Pekárna a cukrárna Hořovice	B
3	Chléb Šumava	Delta	B
4	Chléb vícezrnný lámankový krájený	Albert	B
5	Chléb celozrnný žitný	Billa	B
6	Chléb celozrnný slunečnicový	Billa	B
7	Chléb celozrnný pochoutkový	Billa	B
8	Chléb toastový světlý pšeničný	Penam	B
9	Chléb toastový tmavý pšeničný	Penam	B
10	Psyllium chléb Dr. Popova Arizona	Dr. Popov	B
11	Psyllium chléb Dr. Popova (pšenično-žitný)	Dr. Popov	N
12	Mamma mia (pšenično-žitný)	Delta	B

13	Chléb Sojkův vícezrný	Penam	B
14	Držkovský řemeslný chléb (žitno-pšeničný)	Semilská pekárna	B
15	Desetizrný chléb	Cvrčovická pekárna	B
16	Bezlepkový chléb	Mirečkovsko pekařství	B
17	Bio žitný chléb slunečnicový	Statek Tilia	N
18	Slunečnicový chléb	Pekárna Arbesovo náměstí	N
19	Vícezrný chléb se špaldou	Dinkel Wachauer	N
20	Chalupářský chléb	Tesco	N
21	Chléb dýňový	Tesco	N
22	Bio žitný chléb	Bio Smíchov	N
23	Bio semínkový chléb	Bio Smíchov	N
24	Bio Alantura celozrný žitný chléb z celozrného žitného škrobu	DM	B
25	Bio Alantura celozrný špaldový chléb	DM	B
26	Bio Alantura celozrný žitný chléb s lněným semínkem	DM	B
27	Chléb toastový s celozrnnou moukou	Kaufland	B
28	Královský chléb (žitno-pšeničný)	Kaufland	N
29	Chléb Fitness vícezrný	Kaufland	N
30	Cibulový chléb pšeničný	Kaufland	N
31	Celozrný bochník	Kaufland	N
32	Chléb žitný krájený	Český pekař	B
33	Chléb Vitoraz (pšenično-žitný)	Český pekař	B
34	Žitný chléb se semínky slunečnice a dýně	Hradecká pekárna	B
35	Bio celozrný chléb s 5 % slunečnicových semínek	Pema	B
36	Celozrný slunečnicový chléb – Fit den	Penam	B
37	Norský chléb vícezrný	Cais	B
38	Zrníčko - vícezrný	Cais	B
39	Mušketýr chléb vícezrný	Penam	B
40	Negrill chléb vícezrný	Pekárna Tanvald	B

Vysvětlivky:

N – nebalený chléb, trvanlivost 24 h

B – balený chléb, rozbor v rozmezí 3 – 7 dní po nákupu, vždy před datem expirace

4.2 Postup stanovení

V práci byla využita technika kultivační stanovení počtu mikroorganismů deskovou metodou.

4.2.1 Pomůcky

- Erlenmeyerovy baňky
- Zkumavky
- Pěstební prostředí (viz dále)
- Sterilní pipety (1 a 2 ml)
- Petriho misky
- Zkoumané vzorky (viz tabulka)

4.2.2 Příprava fyziologického roztoku

- 8,5 g NaCl
- 1 g peptonu
- 1000 ml destilované vody

Do každé Erlenmeyerovy baňky bylo naplněno 90 ml fyziologického roztoku a do každé zkumavky pak 9 ml fyziologického roztoku. Následně proběhla sterilace v autoklávu 20 minut při 121 °C.

4.2.3 Příprava živných médií

Živné médium pro kvasinky a plísň (ČSN EN ISO 21527-1,2)

- **Rose Bengal Agar**
 - 5 g mykologický pepton
 - 10 g glukóza
 - 1 g fosforečnan di-draselný
 - 0,5 g síran hořečnatý
 - 0,05 g růže bengálská
 - 15,5 g agar
- 1000 ml destilovaná voda

- **Potato Dextrose Agar**
 - 4 g bramborový extrakt
 - 20 g dextróza
 - 15 g agar
- 1000 ml destilovaná voda

Agary byly sterilovány v autoklávu po dobu 20 minut při 121 °C a před použitím vytemperovány ve vodní lázni na teplotu 50 °C.

4.2.4 Příprava ředící řady

10 g malých kusů vzorku bylo vloženo do Erlenmeyerovy baňky s obsahem 90 ml fyziologického roztoku a následně třepáno na třepačce (cca 7 min.). Poté byl z baňky odebrán 1 ml do připravené zkumavky s obsahem 9 ml fyziologického roztoku a obsah byl protřepán. K rozboru byl využit ředící desítkový systém.

4.2.5 Kultivace

Počty mikromycet byly stanovovány kultivační deskovou metodou. Vzorky byly pipetovány od nejvyššího k nejnižšímu doporučenému ředění 1 ml suspenze do prázdných Petriho misek, a poté přelévány rozvařeným, vytemperovaným agarem. Následně byl obsah dobře promíchán a ponechán ztuhnout. Pro každé ředění byla připravena dvě opakování.

Mikromycety byly kultivovány v termostatu dnem vzhůru při teplotě 22 °C. Po 5 denní kultivaci byly spočítány narostlé kolonie a výsledek byl vyjádřen na množství mikroorganismů v 1 g vzorku; jako mikroorganismy se počítají jednotky tvořící kolonie KTJ (CFU).

Výpočet

Počet kolonií na vhodných ředěních se vypočítá jako aritmetický průměr vynásobený převrácenou hodnotou ředění podle níže uvedeného vzorce.

$$N = \sum c / [(n_1 + 0,1n_2) \cdot d]$$

Kde $\sum c$ je součet vyrostlých kolonií na Petriho miskách
 n_1 počet ploten použitých pro výpočet z prvního ředění
 n_2 počet ploten použitých pro výpočet z druhého ředění
 d první pro výpočet použité ředění

K vyhodnocení výsledků byl použit statistický program Statistica 12.

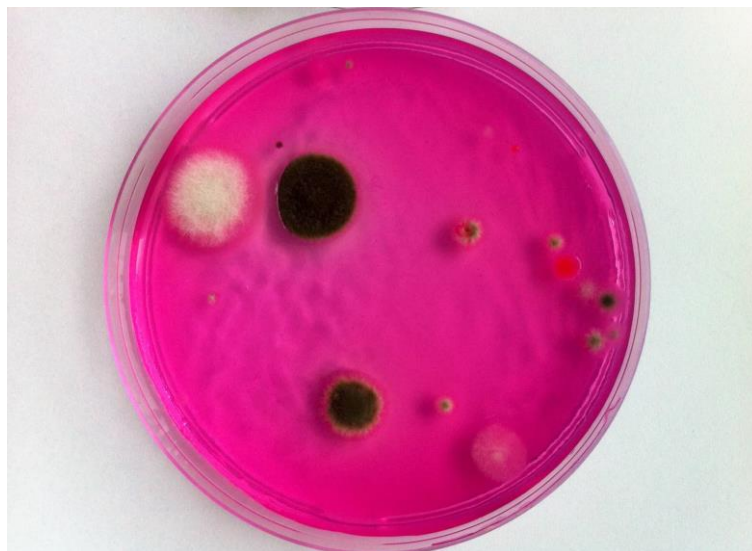
4.2.6 Identifikace mikromycet

Prvním krokem identifikace bylo spočítání narostlých kolonií na Petriho miskách. Následně byly plísně určeny makroskopicky, kde byla sledována barva mycelia, velikost a povrch kolonií, barva difundujíc do okolního prostředí, neobvyklé útvary viditelné okem atd.

Po stanovení počtu plísní byla určena jejich rodová příslušnost. Pod mikroskopem se zvětšením 15 x 10 nebo 15 x 45 byly pozorovány morfologické znaky, např. charakter mycelia, konidiofor, fruktifikační orgány.

Na základě pozorování se k identifikaci jednotlivých rodů použil určovací klíč (Fassatiová, 1979).

Obr. 4: Nárůst kolonií mikromycet na RBA na Petriho misce



5 Výsledky

V praktické části diplomové práce byl sledován vliv skladovacích podmínek na mikrobiologické znehodnocení balených a nebalených chlebů. Vybrané výrobky byly skladovány v domácím prostředí následujícími způsoby: v chlebníku (zabalené do plátýnka), v mikrotenovém sáčku v chladničce, v mikrotenovém sáčku uskladněného za pokojové teploty a ¼ vzorků v mrazáku. Výsledky byly stanoveny v rámci doby spotřebitelnosti.

Jako živné médium byly použity agary Rose Bengal Agar a Potato Dextrose Agar, mezi kterými však nebyl rozdíl při vyhodnocování.

Tab. 4: Výsledky mikrobiologického rozboru – kvantitativní zastoupení plísní

Číslo vzorku	Množství KTJ/g bez skladování	Způsob skladování (KTJ/g)		
		Lednice	Mikrotenový sáček	Chlebník
1	10	x	30	x
2	100	x	x	x
3	0	x	x	x
4	0	x	x	x
5	0	10	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	10	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	10	0	10	0
11	0	0	3000	0
12	0	0	0	0
13	0	0	100	0
14	0	0	0	10
15	0	0	0	0
16	0	0	10	0
17	10	x	x	x
18	10	x	x	x
19	0	x	10	x
20	0	x	0	x
21	0	x	0	x
22	0	x	0	x
23	10	x	30	x
24	0	0	0	0

25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	10	0	0
28	0	x	x	x
29	0	x	x	x
30	0	x	x	x
31	0	x	x	x
32	0	10	0	0
33	0	10	1300	0
34	0	10	10	10
35	0	0	10	10
36	0	10	0	10
37	0	20	26 000	0
38	0	10	20	0
39	0	10	0	10
40	0	10	0	0

Vysvětlivky:

x – způsob skladování nebyl použit

Jak vyplývá z tabulky č. 4, celkové množství mikromycet bylo nízké. Nárůst plísní byl nejčastější po skladování chlebů v mikrotenovém sáčku při pokojové teplotě.

Vzorky skladované v chlebníku ukázaly třetinový výskyt plísní oproti skladování v mikrotenovém sáčku.

Výskyt plísní byl prokázán u čerstvých (neskladovaných) vzorků chleba v maximálním množství 100 KTJ/g.

U skladovaných vzorků se výskyt mikromycet lišil podle způsobu uskladnění. Celkový počet se pohyboval v rozmezí 10 – $3,0 \cdot 10^3$ KTJ/g, výjimkou byl Norský chléb vícezrný (Cais), kde bylo zjištěno až $2,6 \cdot 10^4$ KTJ/g. Toto množství bylo stanoveno u chleba skladovaného 2 – 3 dny v chladničce v mikrotenovém sáčku.

U chleba čerstvého a skladovaného jiným způsobem nebyly plísně prokázány v tak velkém množství.

Tab. 5: Kvalitativní zastoupení mikroorganismů u pozitivních vzorků

Číslo vzorku	Bez skladování	Způsob skladování		
		Lednice	Mikrotenový sáček	Chlebník
1	<i>Aspergillus</i>	x	<i>Penicillium</i> Mycelia sterilia	x
2	<i>Penicillium</i>	x	x	x
5	NP	<i>Penicillium</i>	NP	NP
7	NP	NP	<i>Penicillium</i>	NP
10	Mycelia sterilia	NP	<i>Cladosporium</i>	NP
11	NP	NP	<i>Penicillium</i>	NP
13	NP	NP	<i>Cladosporium</i>	NP
14	NP	NP	NP	Mycelia sterilia
16	NP	NP	Mycelia sterilia kvasinky	NP
17	Mycelia sterilia	x	x	x
18	Neurčeno	x	x	x
19	NP	x	<i>Cladosporium</i> kvasinky	x
20	NP	x	kvasinky	x
21	NP	x	kvasinky	x
23	<i>Cladosporium</i>	x	<i>Cladosporium</i> Neurčeno	x
27	NP	Mycelia sterilia	NP	NP
32	NP	<i>Aspergillus</i>	kvasinky	kvasinky
33	NP	NP	<i>Penicillium</i>	NP
34	NP	<i>Aspergillus</i>	Neurčeno	<i>Cladosporium</i> kvasinky
35	NP	NP	<i>Cladosporium</i> kvasinky	Mycelia sterilia
36	NP	Mycelia sterilia	NP	<i>Aspergillus</i>
37	NP	<i>Aspergillus</i> Neurčeno	<i>Penicillium</i>	NP
38	NP	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	NP
39	NP	<i>Cladosporium</i>	NP	<i>Aspergillus</i>
40	NP	<i>Penicillium</i> kvasinky	NP	NP

Vysvětlivky:

NP – nebyly prokázány plísně

x – způsob skladování nebyl použit

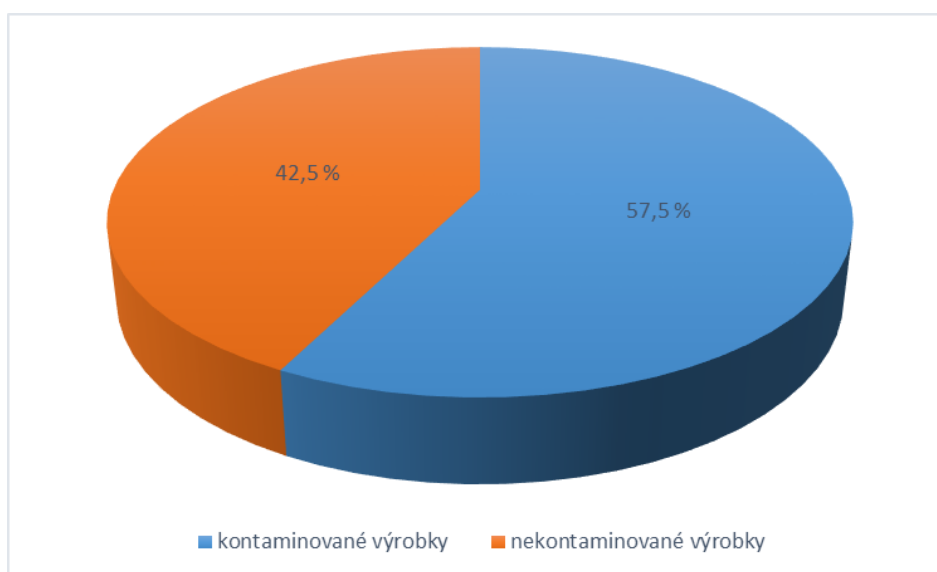
U ¼ zakoupených výrobků byl použit 4. způsob skladování v mrazáku při teplotě -20 °C. Po vyjmutí byl chléb rozmražen (2 hod) a následně podroben mikrobiologickému rozboru. U těchto výrobků se objevily pouze kvasinky a *Mycelia sterilia*. Množství stanovených mikroorganismů se nelišilo od neskladovaných výrobků.

Jak ukazuje tabulka 5, většinou se jedná o 100% zastoupení jednoho druhu plísni. Nejčastěji se vyskytovaly rody *Penicillium* a *Aspergillus*, které jsou nebezpečné z hlediska produkce mykotoxinů, dále rod *Cladosporium* a *Mycelia sterilia*. Zejména u chlebů *Psyllium Dr. Popova* pšenično-žitný, *Vitoraz* a *Norský vícezrný* byl zastoupen rod *Penicillium* s největším počtem KTJ/g.

Tabulka č. 5 také udává zastoupení kvasinek, které se vyskytovaly pouze u 9 různě skladovaných vzorků (včetně mrazáku) ze 40 zkoumaných.

Celkově bylo mikromycetami kontaminováno 23 výrobků, v 17 výrobcích se plísně nevyskytovaly vůbec. Procentuální zastoupení znázorňuje graf 2.

Graf 2: Celkové porovnání všech testovaných výrobků



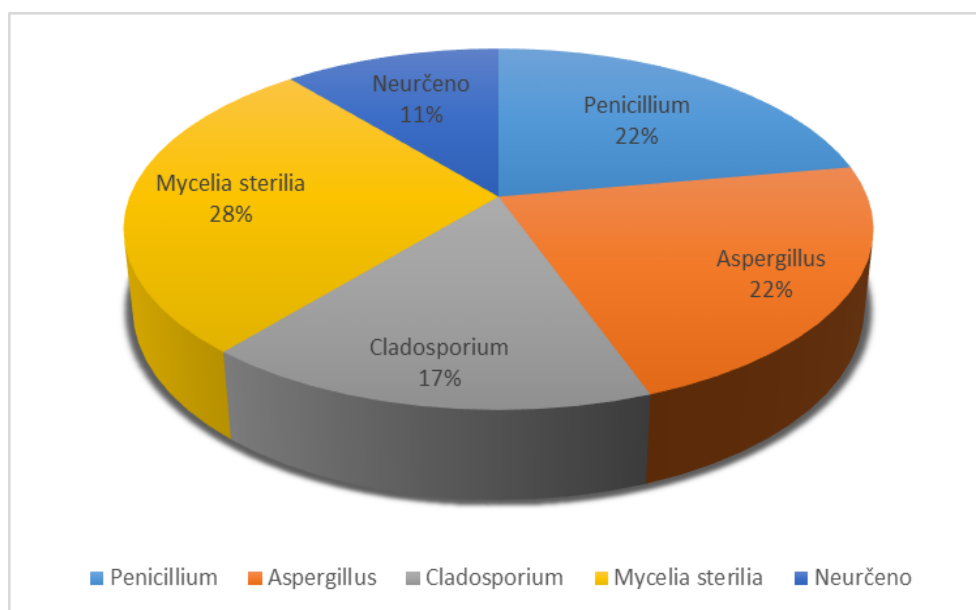
V kontaminovaných chlebech se nevyskytovalo široké druhové zastoupení mikroskopických hub. Celkové procentuální zastoupení mikromycet ve 40 zkoumaných výrobcích znázorňuje tabulka 6.

Tab. 6: Zastoupení mikromycet ve 40 zkoumaných výrobcích

Mikromycety	Celkový počet mikromycet v pozitivních vzorcích	% zastoupení
<i>Penicillium</i>	8	12,8 %
<i>Aspergillus</i>	8	12,8 %
<i>Cladosporium</i>	6	9,6 %
Mycelia sterilia	10	15,9 %
Neurčeno	4	6,4 %
Neprokázáno	17	42,5 %

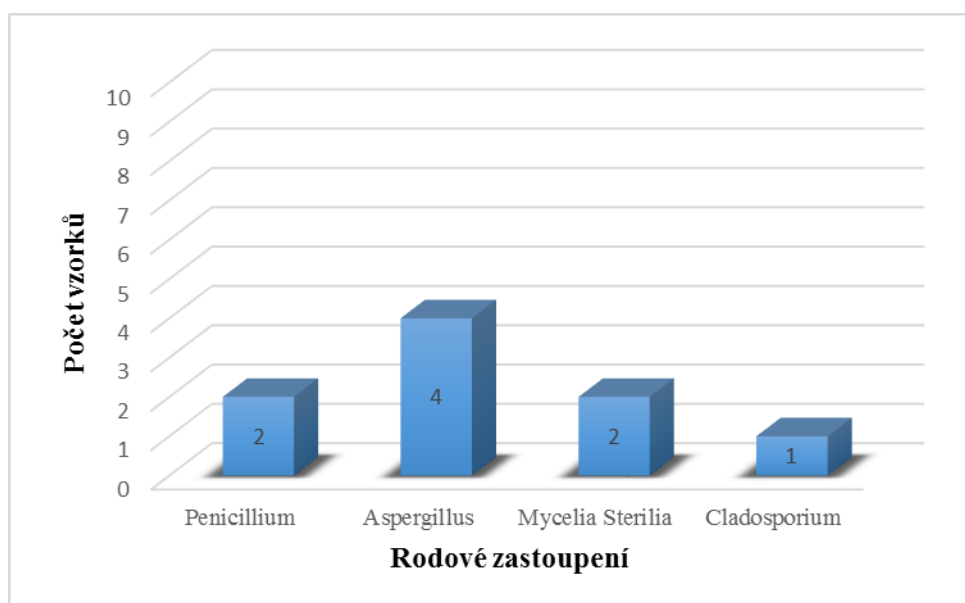
Tabulka 6 udává, že největší procentuální zastoupení má *Mycelia sterilia* s téměř 16 %. Mezi rody *Penicillium*, *Aspergillus* a *Cladosporium* nebyl velký procentuální rozdíl. Průměr jejich výskytu byl 12 %. U 4 výrobků nebyly plísně určeny.

Graf 3: Procentuální zastoupení mikromycet u 23 pozitivních vzorků



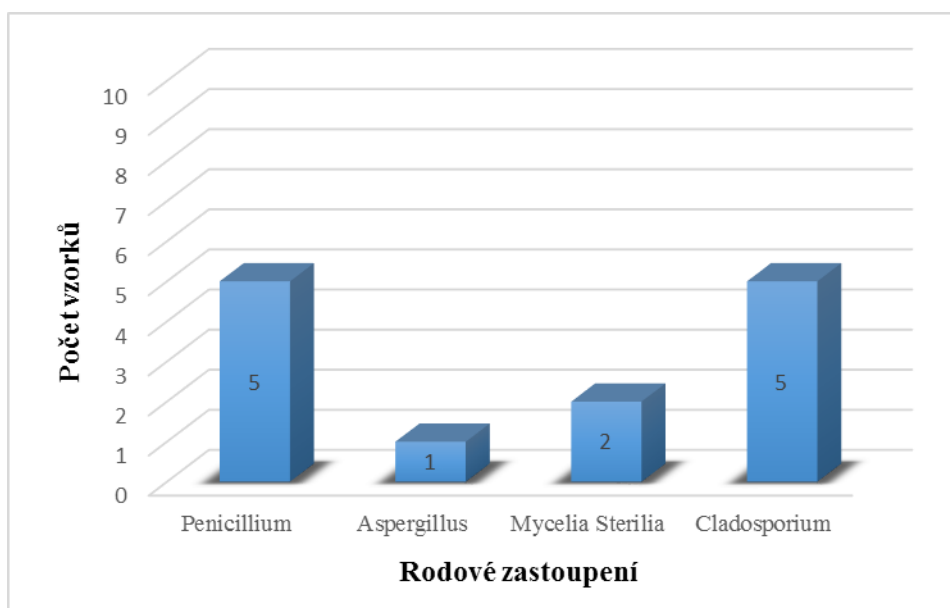
Jak uvádí graf 3, u kontaminovaných výrobků byla zastoupena *Mycelia sterilia*, rody *Penicillium* a *Aspergillus* měly stejné 22% zastoupení v pozitivních vzorcích. Rod *Cladosporium* se vyskytoval jen v nepatrně nižším počtu, byl zastoupen ze 17 %. 11 % plísní z pozitivních vzorků nebylo určeno.

Graf 4: Rodové zastoupení plísní ve vzorcích skladovaných v lednici



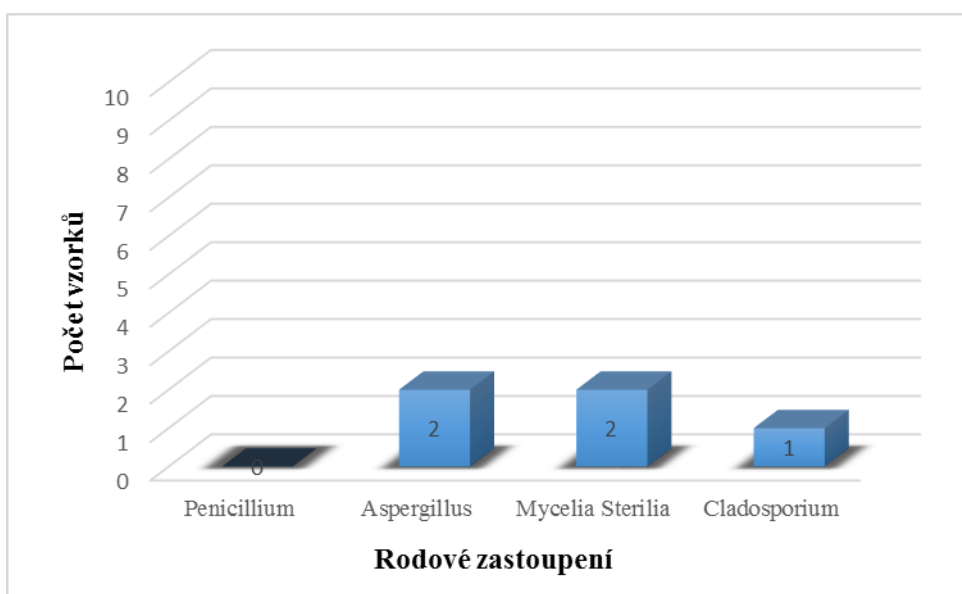
Jak ukazuje graf 4, nejvíce zastoupeným rodem ve 25 vzorcích skladovaných v lednici byl *Aspergillus*, vyskytoval se z 16 %. Rod *Penicillium* a *Mycelia Sterilia* se vyskytovaly z 8 %. Nejméně zastoupeným rodem byl *Cladosporium* se 4 %.

Graf 5: Rodové zastoupení plísní ve vzorcích skladovaných v mikrotenovém sáčku



Graf 5 znázorňuje rodové zastoupení plísní v 31 vzorcích skladovaných v mikrotenovém sáčku. Zde se z 16 % vyskytovaly rody *Penicillium* a *Cladosporium*. *Mycelia Sterilia* se objevila z 6 % a pouze z 3 % byl zastoupen rod *Aspergillus*.

Graf 6: Rodové zastoupení plísní ve vzorcích skladovaných v chlebníku

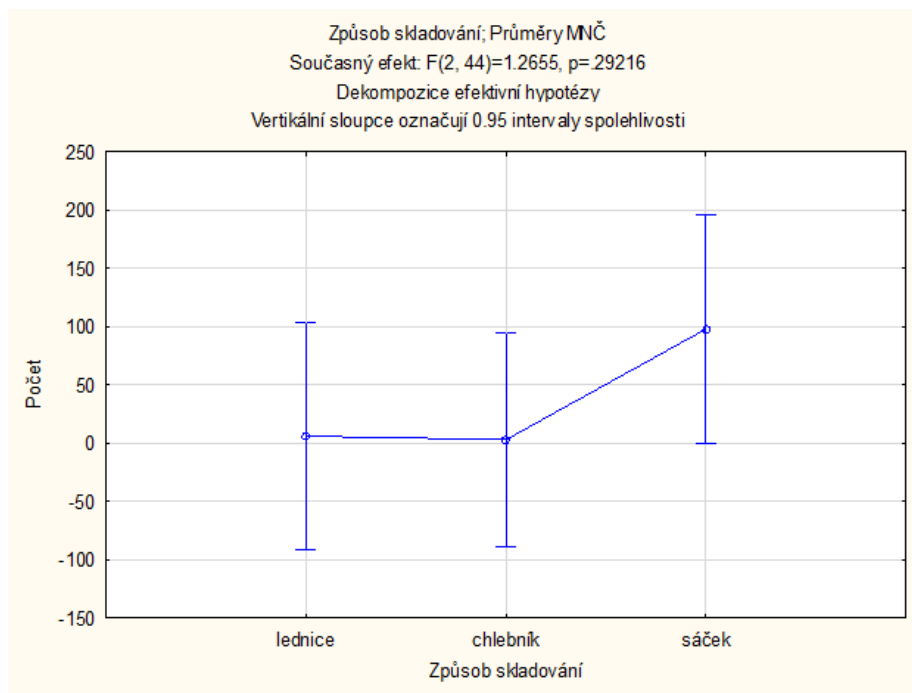


Rod *Penicillium* se nevyskytoval v žádném z 25 vzorků skladovaných v chlebníku, jak znázorňuje graf 6. Rod *Cladosporium* měl 4% výskyt, *Aspergillus* a *Mycelia Sterilia* měly v těchto vzorcích 8% zastoupení. U tohoto způsobu skladování bylo nejmenší rodové zastoupení mikromycet.

5.1 Statistické vyhodnocení výsledků

Byl sledován vliv tří typů skladování na počet KTJ/g, jak znázorňuje graf 4. Statistickému zkoumání byly podrobeny významné hodnoty. Mezi různým způsobem skladování nebyl prokázán statisticky významný rozdíl.

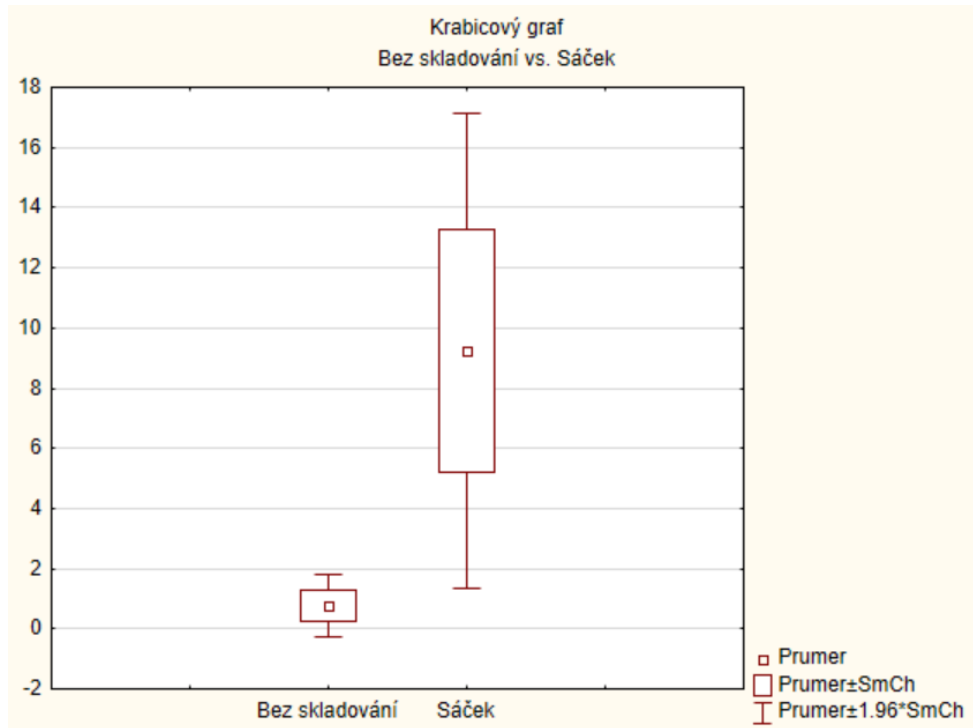
Graf 7: Vliv daného způsobu skladování na počet KTJ/g



Podrobnější statistické zkoumání potvrdilo, že je statisticky neprůkazný rozdíl mezi jednotlivým způsobem skladování.

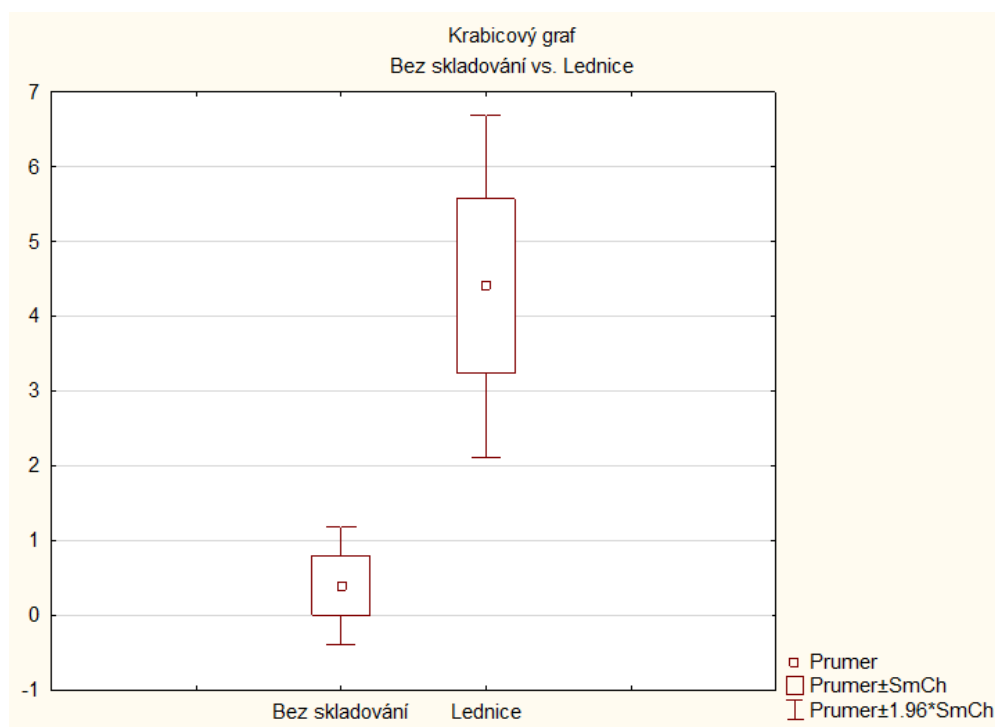
Pro statistické šetření byly dále porovnávány hodnoty KTJ/g u vzorků bez skladování s hodnotami při více typech skladování. Každý typ skladování byl porovnáván zvlášť.

Graf 8: Statistické šetření mezi vzorky bez skladování a vzorky skladovaných v sáčku



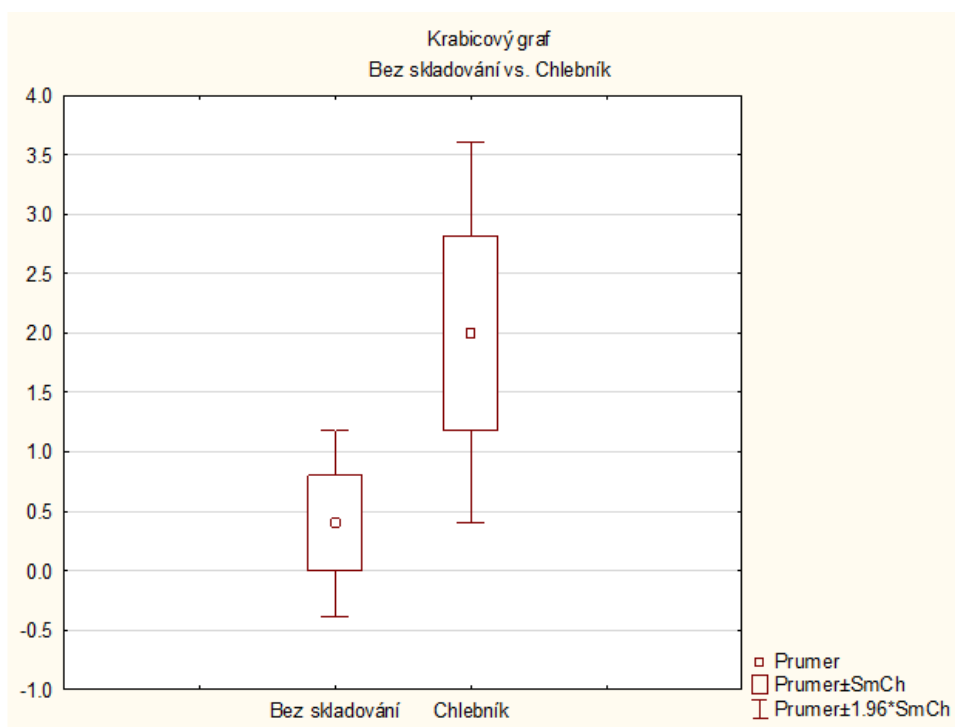
U tohoto pozorování nebyly do statistického šetření zařazeny abnormální hodnoty KTJ/g. Rozdíly průměrných hodnot mezi soubory bez skladování a mikrotenovým sáčkem jsou statisticky významné.

Graf 9: Statistické šetření mezi vzorky bez skladování a vzorky skladovaných v lednici



Rozdíly průměrných hodnot mezi soubory bez skladování a lednicí jsou statisticky významné.

Graf 10: Statistické šetření mezi vzorky bez skladování a vzorky skladovaných v chlebníku



Rozdíly průměrných hodnot mezi soubory bez skladování a chlebníkem nejsou statisticky významné.

6 Diskuze

Dle norem je chléb a běžné pečivo skupina potravin mikrobiologicky nerizikových, proto není stanovena norma na nežádoucí mikroorganismy. Chléb může být zdrojem mikrobů, jako jsou plísňe, které jsou přítomny ve vzduchu a mohou způsobit jeho znehodnocení.

V diplomové práci bylo zkoumáno množství mikromycet u neskladovaných (před skladováním) vzorků, které bylo velmi malé.

Jak ukázaly výsledky Aziz et al. (2014), bílý chléb nemá negativní vliv na zdraví za předpokladu, že je uchován ve vhodných podmínkách. Z výše uvedených výsledků bylo zjištěno, že počet aerobních plísní a kvasinek roste s dobou skladování.

Dle Tarar et al. (2010) ošetření bílých chlebů z pšeničné mouky pomocí 0,2% a 0,3% kyseliny mléčné v kombinaci s 0,2% propionátem vápenatým bylo nejúčinnější proti mikrobiálnímu kažení.

Výsledky diplomové práce ukázaly, že se plísňe nevyskytovaly na čerstvých vzorcích třech bílých chlebů – Šumava, Toastový světlý pšeničný a Cibulový chléb. Naopak čerstvý světlý Chléb konzumní krájený pšenično-žitný (Hořovice) vykazoval nárůst vláknitých hub rodu *Penicillium* v počtu 100 KTJ/g.

V práci byly zaznamenány abnormální hodnoty KTJ/g u nebaleného chleba Psyllium Dr. Popova, baleného chleba Vitoraz a baleného Norského chleba vícezrnného po skladování v mikrotenovém sáčku za pokojové teploty. Možným důvodem mohla být přítomnost celých kusů zrníček, které mohly být zdrojem hojné mikrobiální nákazy.

Výrobce uvádí u baleného Bezlepkového chleba (Mirečkovo pekařství) podmínky skladování v chladu a temnu do +4 °C. Po 24 h skladování v lednici se vyskytovala Mycelia sterilia v počtu 10 KTJ/g. Jedním z důvodů výskytu mohla být nákaza během balicí operace.

U Bio žitného chleba slunečnicového a Bio semínkového chleba byl identifikován výskyt plísní rodu *Cladosporium* a Mycelia sterilia před skladováním v počtu 10 KTJ/g. Po 24 h skladování v mikrotenovém sáčku byl u Bio semínkového chleba zaznamenán dvojnásobný nárůst mikromycet rodu *Cladosporium*.

Počty plísní byly ovlivněny způsobem skladování. Nejhorší výsledky vykazovalo skladování v mikrotenovém sáčku, rozdíl byl statisticky průkazný. Stejně tak rozdíly vzorků bez skladování a lednicí byly statisticky významné. Hypotéza, že způsob uskladnění bude mít vliv na kvalitu chlebů, byla v těchto případech prokázána.

Needham et al. (2005) použili metodu plynové chromatografie s hmotnostní detekcí ke zjištění mikrobiálního znehodnocení chlebů způsobené bakteriemi, kvasinkami a plísněmi.

Podle jejich výsledků se nákaza mikroorganismy zvyšuje s časem. Ke shodnému závěru dospěla i diplomová práce, ačkoliv byla použita jiná metoda pro stanovení mikroorganismů.

Vlivem skladovacích podmínek na možný rozvoj plísní v bílém chlebu se zabývala také Maina (2014). Doba použitelnosti byla stanovena skladováním vzorků v ledničce, ve vlhkém prostoru, při pokojové teplotě a ve vzduchotěsném sáčku po dobu 12 dnů. Plísně byly kultivovány na agaru Potatoe dextrose agar, identifikace byla založena na morfologických a mikroskopických vlastnostech mikromycet. Z výsledků Mainy (2014) vyplývá, že chléb balený ve vzduchotěsném sáčku a uchovávaný v lednici byl skladován nejlépe po 8 dní. Chléb ve vzduchotěsném sáčku plesnivěl od 6. dne; chléb při pokojové teplotě a relativní vlhkosti plesnivěl od 5. dne, zatímco vlhký chléb se kazil od 3. dne. Identifikované plísně v infikovaném bílém chlebě zahrnovaly druhy *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. a *Rhizopus* sp. Vysoký výskyt houbové infekce mohl být vyvolán vysokou výživnou hodnotou chleba a vysokou relativní vlhkostí, zvláště ve vlhkém chlebu ve vzduchotěsných obalech.

Tančinová et al. (2012) také determinovali mikroskopické houby v různých chlebech skladovaných v lednici, sáčku uskladněném při pokojové teplotě a chlebníku. Po 3 dnech skladování bylo 25 % chlebů plesnivých. Kontaminace chleba byla způsobena druhy rodů *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* a *Rhizopus*.

Na zkoumaných chlebech se vyskytovala jen omezená skupina plísní, nejčastěji *Mycelia sterilia*, dále *Penicillium*, *Aspergillus* a *Cladosporium* jako u Tančinové et al. (2012).

Po skladování v domácích podmínkách byl nárůst mikromycet identifikován zejména na balených celozrnných/vícezrnných chlebech a chlebech posypaných semínky. Průměrně se vyskytovaly všechny uvedené rody plísní.

Celkově bylo kontaminováno 23 ze 40 sledovaných výrobků. Většinou se při kontaminaci nevyskytovalo více rodů v jednom vzorku, ale šlo o 100% zastoupení v různém počtu KTJ/g.

Z 28 zkoumaných balených chlebů bylo 64 % kontaminováno. Výskyt plísní se u nebalených chlebů vyskytoval v menší míře, 12 vzorků bylo kontaminováno ze 42 %. Na rozvoj plísní mohla mít vliv doba skladování, kdy nebalené chleby byly uchovány pouze 24 hod, aby byla zachována doba spotřebitelnosti.

Z 12 nebalených chlebů byly infikovány plísněmi pouze Chléb *Psyllium* Dr. Popova, Slunečnicový chléb a dva bio chleby (Bio žitný chléb slunečnicový a Bio semínkový chléb).

Z výsledků diplomové práce vyplynulo, že mezi jednotlivými druhy chleba nebyl statisticky významný rozdíl. Bez ohledu na typ skladování byly bílé chleby kontaminovány z 50 %. Chleby se semínky na povrchu byly nakaženy z 56 %. Celozrnné chleby podléhaly nákaze nejvíce v lednici, celkově byly kontaminovány z 57 %. Plísně se u vícezrnných chlebů vyskytovaly z 63 % bez ohledu na typ skladování, avšak nejčastější výskyt byl zaznamenán při skladování v mikrotenovém sáčku a lednici. Výjimkou byl Norský vícezrnný chléb, kde u skladování chleba v mikrotenovém sáčku došlo k nárůstu plísní v množství $2,6 \cdot 10^4$ KTJ/g. Nejmenší výskyt plísní byl zaznamenán u bio chlebů, zde měly plísně 42% zastoupení. Tento výsledek mohl být ovlivněn výběrem chlebů, jelikož zkoumání byly podrobeny 3 balené biochleby (zakoupené v síti DM) s dlouhou trvanlivostí. Není tedy potvrzena hypotéza, že na výskyt plísní má vliv složení výrobku.

Slunečnicové chleby byly podrobeny nákaze z 67 %. Více byly kontaminovány slunečnicové chleby balené oproti nebaleným. Na hojnější výskyt plísní u balených chlebů mohla mít vliv delší doba skladování.

Výsledky práce dále ukázaly, že u bezlepkového chleba došlo k mikrobiální nákaze plísněmi i kvasinkami po době skladování v mikrotenovém sáčku. Tyto výsledky se liší od nálezů Ternovskoy et al. (2013), jejichž studie prokázala, že použití startovacích bakteriálních kultur a bakterií mléčného kvašení v technologii výroby bezlepkového chleba má vliv na odolnost proti patogenním mikroorganismům během skladování.

Výsledky Vláška et al. (2013) ukázaly, že vzorky bezlepkového chleba, Bavorského chleba a chleba Šumava balené v atmosféře CO₂, skladované při pokojové teplotě 20 °C, měly nejvyšší dobu použitelnosti. Ke shodnému tvrzení došla i tato práce, kdy u zkoumaného chleba Šumava nebyl prokázán výskyt plísní ani po skladování.

Lund et al. (1996) uvádí rody *Penicillium* a *Eurotium* jako významnou znehodnocující mikroflóru žitného chleba. Tyto plísně byly dominantní u baleného žitného chleba téměř každý měsíc po dobu zkoumání 4 let. V rámci diplomové práce byl testovaný balený Žitný chléb (Billa) také nakažen rodem *Penicillium* po skladování.

Carson (2006) dospěl k výsledkům, že na bílém medovém chlebu, který nebyl ošetřen konzervačními látkami, vyrostly plísně 6. den. Po 27 dnech byl chléb 100 % pokryt plísněmi či jinými organismy. Na neošetřeném celozrnném chlebu začaly plísně růst po 12 dnech a po 27 dnech byl chléb pokryt plísněmi z 33,7 %. Naopak chleby ošetřené konzervačními prostředky vykazovaly nárůst plísní až po 27 dnech. Tři testované celozrnné biochleby značky Alatura (zakoupené v síti DM), které jsou v této práci uvedeny, nebyly ošetřeny konzervačními látkami. Tyto výrobky neprokázaly nárůst plísní před skladováním

ani po něm. Důvodem nulového výskytu nežádoucích mikroorganismů může být neustálá kontrola surovin z biologického zemědělství u značky Alantura. Naopak testovaný chléb vícezrný lámankový krájený (Albert) byl ošetřen konzervačními látkami, které se zřejmě projeví jako účinná ochrana proti mikrobiální nákaze. Ta nebyla zaznamenána po skladování tohoto výrobku všemi testovanými způsoby.

Cílem studie Dagnas et al. (2014) bylo zhodnotit vliv aktivity vody (0,80 - 0,98), pH (3 - 7) a teploty skladování (15 - 35 °C) na růst *Eurotium repens*, *Aspergillus niger* a *Penicillium corylophilum* izolovaných z pekařských výrobků. Rychlost růstu se lišila u rozdílného pH a vodní aktivity, naopak vliv teploty nebyl rozhodující. Z výsledků této práce bylo zjištěno, že výskyt rodu *Penicillium* byl odlišný v mikrotenovém sáčku a chlebníku za podmínek skladování při pokojové teplotě. V chlebníku se tento rod nevyskytl vůbec, zatímco v mikrotenovém sáčku měl 16% zastoupení. Růst mohl být ovlivněn rozdílnou aktivitou vody prostředí. U chlebů skladovaných v chlebníku se projevila změna textury, kdy došlo ke ztvrdnutí po 2 – 3 denní době uchování.

Biase et al. (2014) publikovali, že skladované chleby jsou nejvíce náchylné na kontaminaci mikromycetami rodu *Penicillium* a *Aspergillus*. Tyto rody se také objevovaly u zkoumaných chlebů v rámci diplomové práce.

Aybud et al. (2003) uvádějí mezi plísně kontaminující chleba *Rhizopus*, *Penicillium* a *Aspergillus*, podobně jako Blackburn (2006).

I výsledky této práce potvrdily častý výskyt rodů *Aspergillus* a *Penicillium*, což je nežádoucí, neboť jmenované plísně jsou producenty mykotoxinů. Počty těchto plísní však byly nízké.

Rodové zastoupení plísní se lišilo u různých typů skladování. V lednici se nejvíce vyskytoval rod *Aspergillus* z 16 %. Ve shodném procentuálním zastoupení se vyskytovaly v mikrotenovém sáčku rody *Penicillium* a *Cladosporium*. V chlebníku bylo nejmenší rodové zastoupení, rod *Aspergillus* a *Mycelia Sterilia* se vyskytovaly z 8 %. Poslední uvedený způsob skladování neprokázal výskyt plísní rodu *Penicillium*. Výskyt rodu *Aspergillus* u všech typů skladování potvrdil, že je tento rod častěji spojován se skladováním než kontaminací zrn před sklizní, což uvádí také Khachatourians and Arora (2002).

Závěrem lze říci, že počty plísní byly ve sledovaných vzorcích nízké. I variabilita rodového zastoupení byla nízká, vyskytovaly se pouze rody *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* a *Mycelia sterilia* většinou v 100% zastoupení. Skladování chlebů v mikrotenovém sáčku je nejběžnějším způsobem skladování, avšak bylo statisticky prokázáno jako nejméně vhodné.

7 Závěr

Na základě zkoumání vlivu odlišného způsobu skladování na rozvoj plísní u různých druhů chleba se zaměřením na rodovou příslušnost mikromycet lze konstatovat, že:

- Ve zkoumaných neskladovaných vzorcích chlebů bylo velmi malé množství plísní, maximálně do 100 KTJ/g.
- Rodové zastoupení mikromycet nebylo široké, vyskytoval se rod *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* a *Mycelia sterilia*, z toho toxinogenní plísně byly ve 22 % pozitivních vzorků.
- U některých vzorků se vyskytl nárůst kvasinek po době skladování.
- Největší výskyt plísní byl zaznamenán u balených vícezrnných chlebů, celozrnných chlebů a chlebů posypaných semínky, ale celkový rozdíl mezi jednotlivými druhy chleba nebyl statisticky významný.
- Byla prokázána hypotéza, že způsob skladování má vliv na rozvoj plísní v chlebech. Nejčastěji se mikromycety vyskytovaly po skladování v mikrotenovém sáčku, což mohlo být ovlivněno vlhkostí a pokojovou teplotou (rozdíl byl statisticky významný).
- Vlhkost mohla ovlivnit také nákazu chlebů uskladněných v lednici, kde byl prokázán statisticky významný rozdíl. Plísně zde dosahovaly max. počtu 20 KTJ/g.

8 Seznam použité literatury

Adams, M., Moss, O. 2008. Food Microbiology. Royal Society of Chemistry. UK. p. 463. ISBN: 9780854042845.

Amra, H., Mahmoud, S., Tana, A., El-azab, M. 1996. Destruction of aflatoxins B1 and G1 in bread making. *Mycotoxins Res.* 12(2). 73 – 78.

Angelis, E. Monaci, L. Mackie, A., Salt, L. Visconti, A. 2014. Bioaccessibility of T-2 and HT-2 toxins in mycotoxins contaminated bread models submitted to in vitro human digestion. *Innovative Food Science & Emerging Technologies.* 22. 248 – 256.

Aybud, M., Wahab, S., Durrani, Y. 2003. Effect of Water Activity (Aw) Moisture Content and Total Microbial Count on the Overall Quality of Bread. *International journal of agriculture & biology.* 5(3). 274 – 278.

Aziz, A., Ho, L., Bhat, R., Azahari, B. 2014. Storage studies of bread prepared by incorporation of the banana pseudo-stem flour and the composite breads containing hydrocolloids. *Journal of Food.* 12(2). 141 – 149.

Barkai-Golan, R. 2008. Mycotoxins in Fruits and vegetables. Academic Press. p. 408. ISBN: 9780123741264.

Bello, F., Clarke, C., Ryan, L. Ulmer, H., Schober, T., Störm, K., Sjörgen, J., Sinderen, D., Schnürer, J., Arendt, E. 2007. Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *Journal of Cereal Science.* 43(3). 309 – 318.

Bensch, K. Braun, U. Groenewald, J., Crous, P. 2012. The genus *Cladosporium*. *Studies in mycology.* 72. 1 – 401.

Biase, MD, Lavermicocca, P., Lonigro, SL, Valerio, F. 2014. *Lactobacillus brevis*-based bioingredient inhibits *Aspergillus niger* growth on pan bread. *Italian Journal of Agronomy.* 9(4). 146 – 151.

- Blackburn, C. 2006. Food spoilage microorganisms. Woodhead Publishing. USA. p. 736. ISBN: 9781845691417.
- Botstein, D., Chervitz, S., Cherry, J. 1997. Yeast as a model organism. NIH Public Access. 277. 1259 – 1260.
- Bouziane, H. Latge, JP. Fitting, C. Mecheri, S. Lelong, M. David, B. 2005. Comparison of the allergenic potency of spores and mycelium of *Cladosporium*. Allergol Immunopathol (Madr). 33(3). 125-30.
- Bowman, S., Free, S. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. Bioessays. 28(8). 799 – 808.
- Bullerman, L. B., Bianchini, A. 2007. Stability of mycotoxins during food processing. International Journal of Food Microbiology. 119. 140 – 146.
- Carlile, M., Watkinson, S., Gooday, G. 2001. The Fungi. Gulf Professional Publishing. p. 588. ISBN: 9780127384467.
- Cauvain, P. 2003. Bread making: improving quality. UK. Woodhead Publishing Limited. p. 589. ISBN: 9781855735538.
- Cauvain, P., Young, L. 2007. Technology of Breadmaking. UK. Springer Science+Business Media, LLC. p. 397. ISBN: 9780387385631.
- Cizeikiene, D., Paskevicius, A., Bartkeine, E. 2013. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. Food control. 31. 539 – 545.
- Clark, T., Moncalvo, J-M. 2005. Fungal phylogeny based on complete mitochondrial genome sequences. In: Deshmukh, S., Rai, M. (eds.) Biodiversity of fungi. Their role in human life. Enfield. USA. p. 15 – 32. ISBN: 1578083680.

Dagnas, S. Onno, B. Membré, J-M. 2014. Modeling growth of three bakery product spoilage molds as a function of water activity, temperature and pH. *International Journal of Food Microbiology*. 186. 95 – 104.

Daeschel, M., Nes, I. 1995. *Lactobacillus plantarum*: physiology, genetics, and applications in food. In: Hui, Y., Khachatourians, G. (eds). *Food biotechnology: microorganism*. Wiley-VCH. New York. p. 721 – 742. ISBN: 9780471185703.

Dijksterhuis, J. Samson, R. 2007. *Food Mycology – A multifaceted approach to fungi and food*. Boca Raton. CRC Press. p. 403. ISBN: 9780849398186.

Deschuyffeleer, N1. Audenaert, K. Samapundo, S. Ameye, S. Eeckhout, M. Devlieghere, F. 2011. Identification and characterization of yeasts causing chalk mould defects on par-baked bread. 28(5). 1019 – 27.

Ducrotté, P. Sawant, P., Jayanthi, V. 2012. Clinical trial: *Lactobacillus plantarum* 299v improves symptoms of irritable bowel syndrome. *World journal of gastroenterology*. 18(30). 4012 – 4018.

Edwards, W. P. 2007. *The Science of Bakery products*. Royal Society of Chemistry. p. 259. ISBN: 9780854044863.

Fassatiová, O. 1979. *Plísňe a vláknité houby v technické mikrobiologii*. SNLT - Nakladatelství technické literatury. Praha. 211 s.

Fik, M., Salad, K. 2002. Effect of prebaking and frozen storage on the sensory quality and instrumental texture of bread. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82(11). 1268 – 1275.

Gerez, C. Torino, M. Rollán, G., Valdez, G. 2009. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*. 20(2). 144 – 148.

Görner, F. Valík, L. 2004. Aplikovaná mikrobiológia požívatin: potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny: mikrobiológia potravinárskych výrob: ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami. Malé centrum. 528 s. ISBN: 9788096706495.

Gursoy, N., Bicici, M. 2004. A Review on current situation of toxigenic fungi and mycotoxins formation in turkey. An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe. 237 – 246.

Hodkinson, T., Parnell, J. 2006. Reconstructing the Tree of Life: Taxonomy and Systematics of Species Rich Taxa. CRC Press. p. 368. ISBN: 9781420009538.

Islam, M. 2006. Inhibition of mold in bread Dimethyl Fumarate. Journal of Food Science. 47(5). 1710 – 1712.

Janderová, B., Bendová, O. 1999. Úvod do biologie kvasinek. Karolinum. Praha. 108 s. ISBN: 8071849901.

Janíčková, H. 2009. Alergie na roztoče a plísňe. Pediatrie pro praxi. 10(3). 163 – 166.

Kalhotka, L. 2014. Mikromycety – vláknité mikromycety (plísňe) a kvasinky – v prostředí člověka. Mendelova univerzita v Brně. 78 s. ISBN: 9788073759438.

Kalina, T., Váňa, J. 2005. Sinice, řasy, houby, mechorosty, a podobné organismy v současné biologii. Praha: Karolinum. 606 s. ISBN 8024610361.

Katz, S., Weaver, W. 2003. Encyclopedia of food and culture. Scribner. New York. p. 1800. ISBN: 9780684805689.

Khachatourians, G., Arora, D. 2002. Applied mycology and biotechnology. Amsterdam. p. 347. ISBN: 0444510303.

Kwolek-Mirek, M., Tecza, R., Bednarska, S. Bartosz, G. 2011. Yeast *Saccharomyces cerevisiae* devoid of Cu, Zn-superoxidedismutase as a cellular model to study acrylamide toxicity. Toxicology in vitro. 25. 573 – 579.

Lane, R., Beales, P., Hughes, K. 2012. Fungal plant pathogens. UK. p. 324. ISBN: 13:9781845936686.

Legan, J. 1993. Mould spoilage of bread: The problem and some solutions. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 32. 33 – 53.

Legan, J. D., Voysey, P. A. 1991. Yeast spoilage of bakery products and ingredients. *Journal of Applied Bacteriology*. 70. 361 – 71.

Liška, M. 2010. Alergie na roztoče a plísňe - novinky. *Medicína pro praxi*. 7(12). 462 – 465.

Lund, F., Sweden, Filtenbory, O., Westall, S., Frisvad, J. 1996. Associated mycoflora of rye bread. *Applied Microbiology*. 23(4). 213 – 217.

Malíř, F., Ostrý, V., Bárta, I., Buchta, V., Dvořáčková, I., Paříková, J., Severa, J., Škarková, J. 2003. Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. NCO NZO. Brno. 349 s. ISBN: 8070133953.

Megan, N., Arroyo, M., Aldred, D. 2003. Mould prevention in bread. In: Cauvain, S. (ed.) *Bread Making: improving quality*. UK. 500 - 514 p. ISBN: 9781855735538.

Montville, T., Matthews, K. 2008. *Food microbiology: an Introduction*. ASM Press. Washington, DC. p. 428. ISBN: 9781555813963.

Needham, R., Williams, J., Beales, N., Voysey, P., Magan, N. 2005. Early detection and differentiation of spoilage of bakery products. *Sensor and Actuators B: Chemical*. 106(29). 20 – 23.

Nguyen, T., Kang, J. Lee, M. 2007. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *International Journal of Food Microbiology*. 113. 358 – 361.

- Ostrý, V. 1998. Vlákňité mikroskopické houby (plísňe), myktoxiny a zdraví člověka. Státní zdravotní ústav. Praha. 20 s. ISBN: 8070711027.
- Pateras, I. M. C. 1998. Bread spoilage and staling. In S. P. Cauvain & L. S. Young (Eds.), Technology of breadmaking. UK. Blackie Academic & Professional. p. 240. ISBN: 9780387385631.
- Pele, M., Cimpeanu, C. 2012. Biotechnology: An Introduction. WIT Press. UK. p. 315. ISBN: 9781845646660.
- Reiss, J. 1977. Mycotoxins in foodstuffs. x. Production of citrinin by *Penicillium chrysogenum* in bread. Food and Cosmetics Toxicology. 15(4). 303 – 307.
- Pontón, J., Moragues, M., Gené, J., Guarro, J., Quindós, G. 2002. Hongos y actinomicetos alergénicos. Revista Iberoamericana de Micología. España. p. 46. ISBN: 8460753700.
- Redford, B. 2001. The Oxford Encyclopedia of ancient Egypt. Oxford University Press. p. 782. ISBN: 9780195102345.
- Ribotta, P., León, A. Anón, M. 2001. Effect of freezing and frozen storage doughs on bread quality. Journal of agricultural and food chemistry. 49 (2). 913 – 918.
- Ruiz-Herrera, J. 2012. Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis, and Assembly. CRC Press. Boca Raton. p. 203. ISBN: 9781439848388.
- Ryan, L. Bello, F., Arendt, EK. 2008. The use of sourdough fermented by antifungal LAB to reduce the amount of calcium propionate in bread. International Journal of Food Microbiology. 125. 274 – 278.
- Seifert, K. 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. Molecular Ecology Resources. 9. 83 – 89.
- Siantar, P., Trucksess, M. Scott, P., Herman, E. 2008. Food Contaminants: Mycotoxins and Food Allergens. Washington, DC. p. 543. ISBN: 9780841269545.

Simon., Cutuli, T., Suárez, G. 1984. Determination of aflatoxins in bread and bakery products. *Journal of Food Protection*. 8. 588 – 653.

Smid, E. J., Gorris, L. G. M. 1999. Natural antimicrobials for food preservation. *Handbook of food preservation*, M. Shafiur Rahman (ed), Marcel Dekker, Inc., NY.

Suas, M. 2009. *Advanced Bread and Pastry: A Professional Approach*. USA. Delmar, Cengage Learning. p. 1041. ISBN: 13:9781418011697.

Sorian, J.M, González-Osnaya, L. Moltó, J. C. Mañes, J. 2007. Dietary intake of ochratoxin A from conventional and organic bread. *International Journal of Food Microbiology*. 118. 87 – 91.

Šilhánková, L. 2002. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Akademie věd ČR. Praha. 363 s. ISBN: 8020010246.

Tančinová, D.; Barboráková, Z.; Mašková, Z.; Cíсарová, M.; Bojňanská, T. 2012. The occurrence of micromycetes in the bread samples and their potential ability produce mycotoxins. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 1. 813 – 818.

Tarar, O., Rehman, S., Mueen-ud-din, G., Murtaza, M. 2010. Studies on the shelf life of bread using acidulants and their salts. *Turkish Journal of Biology*. 34. 133 – 138.

Vandenbergh, P. A. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*. 12. 221 – 237.

Ternovskoy, G., Kuznetsova, L., Shleikin, A., Martinovic, A., Oreshko, L. 2013. Application of sour dough in the production of gluten free bread. *Radiobiologica, Technologia Alimentaria*. 12(4). 355 – 358.

Vandenbergh, P. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology reviews*. 12(1-3). 221 – 237.

Vlášek, V., Langová, J., Štěněl, J. 2013. Effect of modified atmosphere on stability three kinds of bread. *Journal of the University of Brno*. 61(6). 1881 – 1887.

Vyhláška č. 182 ze dne 23. května 2012, kterou se mění vyhláška č. 333/1997 Sb., kterou se provádí § 18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro mlýnské obilné výrobky, těstoviny, pekařské výrobky a cukrářské výrobky a těsta, ve znění pozdějších předpisů. In: Sbírka zákonů České republiky. 2012. částka 64. s. 2658 – 2664.

Waśkiewicz, A. 2014. Encyclopedia of Food Microbiology. p. 3248. ISBN: 9780123847331.

WHO Food Additive Series # 47. 2001. Safety evaluation of certain mycotoxins in food: Fifty-sixth meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA): 47 (WHO food additives). WHO. Geneva. p. 701. ISBN: 9251046646.

INTERNETOVÉ ZDROJE:

Carson, N. 2006. How Much Longer Does It Take Bread with Preservatives to Grow Mold Than It Takes Bread without Preservatives? [online]. 2. April 2006 [cit. 2015-03-20]. Dostupné z <<https://www.usc.edu/CSSF/History/2006/Projects/J1305.pdf>>.

Český statistický úřad. Analýza spotřeby potravin v roce 2010 [online]. 11. dubna 2013 [cit. 2014-10-25]. Dostupné z <<http://www.czso.cz/csu/csu.nsf/informace/cpotr041012analyza12.pdf>> - spotřeba ČSÚ>.

Dřížal, J. Chléb v proměnách staletí. Tisková zpráva PSPaC v ČR. Konference ke světovému dni chleba [online]. 20. října 2014 [cit. 2014-11-19]. Dostupné z <<http://www.svazpekaru.cz/index.php/akce/71-svetovy-den-chleba-v-cr-2010/108-vyroba-a-spotreba-chleba-cr>
http://www.svazpekaru.cz/attachments/352_CHL%C3%89B%20V%20prom%C4%9Bn%C3%A1ch%20stalet%C3%AD.pdf>.

EFSA. Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed [online]. EFSA Journal. 19. December 2011. [cit. 2014-11-23]. Dostupné z <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2481.htm>>.

Hamr, K. Chléb – jeho druhy a hlavní vady [online]. Státní zemědělská a potravinářská inspekce. 29. září 2011 [cit. 2014-10-05]. Dostupné z <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1000770&docType=ART&nid=11342>.

Kolejková, D. Za „nemocný“ chleba pokuta [online]. Státní zemědělská a potravinářská inspekce. 20. července 2005 [cit. 2014-10-06]. Dostupné z <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1006315&docType=ART&nid=11438>.

Maina, W. A. 2014. Effects of storage conditions on mold contamination of white Bread [online]. duben 2014 [cit. 2014-03-14]. Dostupné z <http://erepository.uonbi.ac.ke/handle/11295/71844>.