

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Mykologické aspekty běžného a bio chleba

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Aneta Kremová

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

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Mykologické aspekty běžného a bio chleba" 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 12.4.2017

Poděkování

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

Mykologické aspekty běžného a bio chleba

Souhrn

Chléb je součástí našeho každodenního jídelníčku již od starověku. Ačkoli se nejedná o rizikovou potravinu, je možná mikrobiální kontaminace a to hlavně plísněmi.

Kontaminace závisí především na podmínkách zpracování, skladování a dodržení hygienických zásad. Riziko kontaminace lze ovlivnit přidáním konzervantů a jiných látek, které inhibují růst patogenních mikroorganismů. Spory plísní, které kontaminují chléb, jsou přenášeny vzduchem. Plísně mohou vytvářet, jako sekundární metabolismus, toxické látky zvané mykotoxiny.

Cílem práce bylo zhodnotit mykologické aspekty u 40 náhodně vybraných vzorků chleba v běžné kvalitě a BIO kvalitě. Stanovení mikromycet bylo hodnoceno v souvislosti s balením a složením výrobku. Dále byly plísně identifikovány na úroveň rodu.

Ve zkoumaných vzorcích bylo zjištěno minimální množství plísní, celkové počty se pohybovaly od 0 KTJ/g (danou metodou nebyly zjištěny žádné plísně) do 22 KTJ/g.

Rodové zastoupení plísní nebylo příliš rozmanité. Téměř polovinu všech zjištěných plísní tvořil rod *Cladosporium*, dále se v omezeném množství vyskytovaly *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* a *Mycelia sterilia*.

Plísně se vyskytovaly v obou druzích způsobu produkce, z celkových 40 vzorků bylo pozitivní na plísně právě 22; 12 z konvenčního zemědělství a 10 z ekologického zemědělství. Statisticky nebyl dokázán vliv produkce na přítomnost mikromycet v chlebu. Vliv balení hrál jen nepatrnou roli v přítomnosti mikromycet, statisticky však nebyl prokázán vliv balení na mykologickou kvalitu chleba.

Kontaminovaný chléb obsahoval převážně semínka jak na svém povrchu, tak i uvnitř svého složení. Lze tedy tvrdit, že složení chleba má vliv na kvalitu výrobku.

Klíčová slova: chléb, trvanlivost, mykologie, mykotoxiny

Mycological aspects of normal and bio-bread

Summary

Bread has been a part of our daily diet since ancient times. Although it is not a risky food to consume, there is still a possibility of microbial contamination, mainly by fungi. Contamination depends primarily on the conditions of processing, storage and hygienic factors. The risk of contamination can be influenced by the addition of preservatives and other substances which inhibit the growth of pathogenic microorganisms. Mold spores which contaminate the bread are transmitted through the air. Mold can further form as secondary metabolism, toxic substances called mycotoxins.

The aim of this study was to evaluate aspects of mycology in 40 randomly selected bread samples of both conventional and organic quality. Packaging and product composition were used as the basis of evaluation with regard to the determination of fungi. Fungi species were further identified. There was a minimal amount of mold present in the analyzed samples. Total amounts ranged from 0 CFU/g (no identifiable mold) to 22 CFU/g.

The generic representation of mold was not very diverse. Nearly half of all identified species was the formation of *Cladosporium* mold. *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* and *Mycelia sterilia* were also identified in limited quantities.

From a total of 40 samples, 22 tested were positive for mold. This includes samples representative of both methods of production, conventional agriculture and organic farming (12 positive samples from conventional and 10 from organic farming). There is no statistical evidence of productional factors causing the presence of fungi in bread. Furthermore, the influence of packaging played only a minor role in the presence of fungi. However, there is no statistical proof of the impact that packaging has on the mycological quality of bread either.

The contaminated bread contained mostly seeds, both on its surface and within its actual composition. It can be argued that the composition of bread has an effect on product quality.

Keywords: bread, shelf life, mycology, mycotoxins

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl práce	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Chléb a jeho historie	10
3.2	Co znamená BIO?	11
3.3	Druhy chleba	12
3.4	Základní technologie výroby chleba	13
3.4.1	Kvalita obilí.....	13
3.4.2	Zrno a jeho kvalita.....	14
3.4.3	Hodnocení pekárenské kvality mouky	15
3.4.4	Výroba chleba	15
3.5	Mikrobiologické znehodnocení chleba	16
3.5.1	Druhy znehodnocení.....	17
3.5.2	Mykologické znehodnocení	18
3.6	Plísně	19
3.6.1	Morfologie plísní	19
3.6.2	Charakteristika a vlastnosti vybraných plísní znehodnocující chléb.....	20
3.6.2.1	Mucor	20
3.6.2.2	Rhizopus	21
3.6.2.3	Aspergillus	22
3.6.2.4	Penicillium	23
3.6.2.5	Cladosporium	24
3.6.2.6	Fusarium.....	25
3.6.3	Faktory ovlivňující výskyt plísní.....	26
3.6.4	Ochrana před mykologickým znehodnocením	27
3.6.5	Mykotoxiny	28
3.6.5.1	Charakteristika vybraných mykotoxinů a jejich vlastnosti	28
4	Materiál a metody	33
4.1	Použitý materiál	33
4.2	Metodika	34
4.2.1	Živná média.....	35
4.2.2	Postup	35
4.2.3	Kvalitativní určení mikromycet	36
5	Výsledky	37

6	Diskuze	46
7	Závěr	49
8	Seznam použité literatury.....	50

1 Úvod

Chléb je nedílnou součástí našeho jídelníčku již od dob starověku a je považován za nerizikovou potravinu. Chléb je však snadno kontaminován mikroby, které způsobují jeho znehodnocení a následnou zkázu. Nejčastějším kontaminantem jsou plísně. Avšak kontaminace je závislá hlavně na podmínkách zpracování, skladování a typu chleba. Riziko kontaminace lze snížit přidavkem konzervantů a jiných látek potlačujících růst patogenních mikrobů.

Spory plísní se snadno šíří vzduchem a následně kontaminují chléb. Pokud dojde k rozvoji plísní, některé mohou vytvářet i mykotoxiny, které nejsou identifikovatelné lidskými vjemy a jsou velmi toxické.

Kvalitu ovlivňují zejména teplota, vlhkost a způsob skladování. Při dodržení hygienických předpisů, optimálních skladovacích podmínek a správné výrobní praxe se zamezí riziku kontaminace a tím i následné zkáze chleba.

2 Cíl práce

Chléb a běžné pečivo patří mezi mikrobiologicky nerizikové potraviny, nejsou proto stanovené limity pro mikroorganismy, které je znehodnocují. Přesto je však důležité sledování kvality těchto výrobků, hlavně z hlediska zvýšeného rizika zavlečení plísní.

Cílem práce je zhodnotit výskyt nežádoucích mikroorganismů, se zaměřením na zastoupení mikromycet.

Hypotéza: Práce vychází z předpokladu, že kvalita pekárenských výrobků bude ovlivněna složením výrobku.

3 Literární rešerše

3.1 Chléb a jeho historie

Chléb je nepochybně jeden z nejstarších pokrmů na světě, první zmínky jsou z období 10 000 let př. n. l. Dříve byl vyráběn z hrubě nadrceného obilí, které bylo smícháno s vodou. Z těsta byly vytvořeny placky, které se následně opékaly na ohni nebo rozpáleném kameni. Existuje i zmínka, že ve starověkém Řecku se konzumovaly i placky nepečené - mázy. Byly uhnětené z ječné mouky a následně se nechaly usušit (Beranová, 2005).

K objevu přípravy kvašeného chleba došlo před šesti tisíci lety v Egyptě. Jednalo se s nejvyšší pravděpodobností o náhodu. V nilské deltě byla pěstována pšenice, která byla pomocí kamenů rozdrčena na mouku. Mouka se následně smísila s vodou a solí, což byla normální nekvašená technika. Avšak těsto zůstalo na slunci a vzhledem k přítomnosti mikroorganismů následně pak vykynulo. Po upečení v peci byl chléb vzdušný, nadýchaný se zabarvenou kůrkou (Dřízal, 2010).

Nejstarší nalezená pec v Čechách se datuje do období 4800 – 4600 př. n. l. V letech 2700 př. n. l. si lidé připravovali chléb kynutý pomocí kvasinek. Dokazují to nálezy pecí. Pivovary byly totiž spojovány s pekárnou, a proto se kvasinky využívaly při pečení chleba (Montville and Matthews, 2008).

Z chleba se postupně stala základní potravina. Na území Čech se objevili pekaři v 11. a 12. století. Rozvinula se i pravidla ohledně váhy a ceny chleba. Již v roce 1387 se v Čechách peklo několik druhů chleba. Například žitný, ječný, prosný, žaludový, jáhlový a pohankový.

Vzniklé pekařské cechy stanovily vztahy mezi mistry a uční, byly určeny pro vzájemné podporování se a vytváření vztahu k zákazníkům. Cechy zároveň dohlížely na kvalitu výroby.

Od 18. století se v Čechách pekařství velmi hlídalo a vztahovalo se na něj předpisy. Od druhé poloviny 19. století došlo k mechanizaci v pekařské výrobě a to zaváděním strojů. V roce 1834 byl vynalezen válcový mlýn, který změnil mletí zrn na celém světě a došlo tak k revoluci v produkci chleba (Beranová, 2005; Dřízal, 2010).

Od 20. století v českých městech vznikaly moderní pekárny, zatímco na vesnicích se zachovávala primitivní řemeslná výroba. V 50. letech 20. století byly uzavírány malé provozy, z důvodu znárodnování v souvislosti s politickým režimem po roce 1948. V 70. letech 20. století se chléb vyrábí na moderních zařízeních.

Po roce 1989 došlo k privatizaci všech výroby a vzrostla sortimentní nabídka (Dřízal, 2010). V dnešní době je trendem nakupovat i BIO výrobky.

3.2 Co znamená BIO?

V dnešní době se zvedá zájem o bio potraviny, neboli organické potraviny a to nejen v České republice. Konzumenti a prodejci na tento zájem reagují díky médiím, které se zabývají otázkou zdraví, ekologických dopadů na životní prostředí, geneticky modifikovaných potravin a hlavně ochranou spotřebitele před nežádoucími účinky z potravin (food safety).

Spotřebitel je však často zmaten, co to vlastně znamená pojem bio (organický) produkt. Jedná se o produkt ekologického zemědělství, tedy byl vypěstován nebo chován v souladu s principy ekologického zemědělství. Dle IFOAM jsou tyto principy kořeny ekologického zemědělství a dělíme je na princip zdraví (Principle of Health), ekologické principy (Principles of Ecology), princip čestnosti (Principle of Fairness) a princip péče (Principle of Care). Princip zdraví se zabývá „zdravím“ půdy, rostlin, zvířat a lidí. Tento princip má tedy za cíl udržet planetu „zdravou“. Ekologický princip však napodobuje a udržuje přírodní systém v jeho přirozenosti. Princip čestnosti se zabývá rovnocenností, respektem a spravedlností pro všechny živé bytosti. Princip péče se stará o budoucí generaci (IFOAM, 2016).

IFOAM dále definuje ekologické zemědělství jako produkční systém, který udržuje zdraví půdy, ekosystému a lidí. Podmínky zemědělství spoléhají na ekologické procesy, biodiverzitu a koloběhy adaptované místním podmínkám. To znamená nepoužívat jiné, než přírodní vstupy (přídavky). Ekologické zemědělství kombinuje tradici, inovaci a vědu k dosažení prospěchu sdíleného s životním prostředím a podpořit tak spravedlivý vztah s dobrou kvalitou života všech zúčastněných (zahrnutých) v ekosystému.

Produkt ekologického zemědělství lze poznat i tak, že v obchodech má toto označení (viz obrázek č. 1 a č. 2), tedy byl certifikován dle zákona o ekologickém zemědělství - zákon č. 242/2000 Sb., o ekologickém zemědělství (Suková, 2012b).

Obrázek 1 Označení biopotraviny ze zemí EU



zdroj: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/nova-pravidla-pro-oznacovani-biopotravin.aspx>

Obrázek 2 Označení bio produktu



zdroj: http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Organic_Prague_Czech%20Republic_4-21-2011.pdf

Ze statistického šetření bylo zjištěno, že zájem o ekologické zemědělství v České republice rok od roku stoupá. Počet ekologických zemědělců a využití půdy pro tyto účely se navýšil (Mikulášová, 2011).

3.3 Druhy chleba

Chléb je dle platné české legislativy (vyhláška Ministerstva zemědělství č. 182/2012 Sb. v platném znění) rozlišen dle obsahu mouk na tyto druhy:

- pšeničný chléb, který 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 chléb, obsahující nejméně 90% podíl mlýnských obilných výrobků ze žita (žitných mouk) z celkové hmotnosti
- žitno-pšeničný chléb je 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 chléb je 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
- celozrnným chlebem se rozumí 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 chléb je pekařský výrobek, do jehož těsta jsou přidány mlýnské výrobky z jiných obilovin než pšenice a žita, 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

3.4 Základní technologie výroby chleba

Se současnými trendy ve výživě a zavádění alternativních způsobů stravování také dochází ke změnám v technologii výroby chleba. Nyní se trend obrací i k využívání jiných druhů obilovin, které byly donedávna opomíjené. Současně se využívá k výrobě pekárenských výrobků i slabší pšenice a to díky zlepšovacím přísadám. Největší využití pro pekařské účely má pšenice obecná (Příhoda et al., 2003).

3.4.1 Kvalita obilí

Kvalita obilí spočívá nejvíce v jeho jakostním charakteru a tím je celkový počet mikroorganismů. Tato hodnota vypovídá o tom, jak bylo pečováno o obilí během sklizně, jeho transportu a také, jak s ním bylo naloženo během jeho skladování. Celkový počet mikroorganismů se týká i obsahu plísní v obilí a zároveň vypovídá o dodržování hygienických a technických standardů během zpracování obilí od pole až po zpracovaný produkt. Vyjadřuje i možné riziko tvorby mykotoxinů, které nepříznivě ovlivňují lidský i animální organismus. Nejčastější je napadení plísněmi rodu *Fusarium*, jedná se o především o polní plíseň, a *Aspergillus*, která je považována za skladištní plíseň. Avšak polní plíseň mohou být odstraněny během správných podmínek při skladování (Görner a Valík, 2004).

3.4.2 Zrno a jeho kvalita

Základní surovinou pro výrobu chleba je mouka. Pro výrobu mouk se používá výhradně obilné zrno. Zrno se chová jako živý organismus do té doby, než je mechanicky zpracováno, neboli naruší se jeho struktura. Jakákoli chemická změna vede ke změně biologického a biochemického systému zrna. Velmi významnou složkou jsou proto enzymy působící ještě ve vymleté mouce, ale i v těstě během pečení v peci (Příhoda et al., 2003).

Zrno se skládá z obalových vrstev (oplodí a osemení), aleuronové vrstvy, klíčku (embryo) a endospermu (vnitřní obsah zrna). Ochrana samotného zrna je zajištěna přes obalové vrstvy (otruby). Zajišťují hlavně ochranu před mechanickými a mikrobiálními vlivy, například plísněmi. Vnitřní vrstva zajišťuje vyrovnaní vlhkosti v obilce. Vnější obaly zhoršují pekárenskou kvalitu, neboť tyto obaly obsahují velké množství nestravitelné vlákniny. Podpovrchové vrstvy příznivě ovlivňují vaznost mouky a vláčnost výrobku, ale také lepivost těsta. Celozrnná mouka obsahuje právě tyto obaly.

Klíček neboli embryo, je při mlýnském zpracování oddělováno. Obsahuje mnoho významných látek pro lidskou výživu, avšak při kontaktu se vzduchem dochází ke žluknutí jeho tukové složky. Není tedy možné ho pekárensky zpracovat bez brzké stabilizace (Příhoda et al., 2003).

Nejvýznamnější složkou obilky je endosperm, který ovlivňuje tvrdost zrna, sklovitost zrna, velikost a tvar vymletých částic. Endospermová struktura je dána především geneticky. V endospermu jsou přítomny zásobní látky, které jsou významné pro klíčení. Pro výrobu pšeničných mouk je využíván právě endosperm. U žitných mouk je to nejen endosperm, ale i některé podobalové vrstvy. Endosperm je tvořen převážně škrobem, ale nejvýznamnější je bílkovinná složka, která u pšeničné mouky určuje pekárenskou kvalitu (Příhoda et al., 2003; Faměra a Hrušková, 2000).

Zrno obsahuje mnoho látek a největší zastoupení látek v zrně tvoří sacharidy. Jsou převážně zastoupeny v podobě polysacharidů (škrob 50 – 70 %), celulóza, hemicelulóza, pentozany a slizy) a oligosacharidů a monosacharidů. Sacharidy tvoří v zrně i komplexy a to s lipidy a bílkovinami (glykolipidy a glykoproteiny). Díky obsahu škrobu zrno bobtná a mnohonásobně zvětšuje svůj objem, což je pro pekárenskou technologii zásadní věc. Lipidy tvoří přibližně 1,5 – 3% podíl a vyskytují se v klíčkové části. Lipidy jsou složeny hlavně z kyseliny linolové a olejové. Lipidy mají velký význam pro skladování mouky a obilí. V případě nevhodného skladování mohou za zhoršení senzorických vlastností (žluknutí). Další význam je v biochemických procesech během kynutí a pečení. Největší význam však

mají bílkoviny, jak již bylo zmíněno. Jsou důležité jak pro technologické zpracování, tak i pro nutriční hodnotu samotnou. Obsah není vždy stejný v různých částech zrna, nejvíce bílkovin je v aleuronové vrstvě a v klíčku (Prugar, 2008; Zavřelová, 2014).

Obsah vitamínů je tvořen převážně skupinou B, a to thiaminem, riboflavinem, niacinem, kyselinou panthotenovou, pyridoxinem, kyselinou listovou a biotinem. Další skupinu vitamínů tvoří tokoferoly a karoteny. Největší koncentrace vitamínů jsou, stejně jako u bílkovin, v klíčku a aleuronové vrstvě zrna. Z hlediska minerálních látek je zrno tvořeno převážně fosforem, draslíkem, sírou, hořčíkem, vápníkem, sodíkem, železem, manganem, zinkem, borem a mědí (Prugar, 2008).

Vlastnosti zrna vytvářejí mlynářskou jakost. Nejvíce tyto vlastnosti ovlivňuje ročník sklizně a méně druh odrůdy (Faměra a Hrušková, 2000).

3.4.3 Hodnocení pekárenské kvality mouky

Tradiční ukazatele pekařské kvality pšeničné mouky jsou schopnost tvorby kypřících plynů, pekařská síla a barva mouky. Byl prokázán i čtvrtý parametr, a to granulační spektrum mouky (Příhoda et al., 2003).

Pro žitnou mouku není hodnocení pekárenské kvality příliš detailně definováno. Rozdílnost této mouky určuje hlavně odlišná bílkovina, která není schopna vytvořit strukturní síť, tak jako lepek u pšenice. Nejdůležitější roli v tomto případě hraje škrob, který pomáhá tvořit strukturu hotového výrobku.

Kvalita mouky je zohledňována i dle mikrobiologických požadavků. Její kvalita je ovlivněna i mikroorganismy v obilí (Görner a Valík, 2004; Příhoda et al., 2003).

3.4.4 Výroba chleba

K výrobě chleba v našich podmínkách je základní surovinou obilná mouka, nejčastěji pšeničná a žitná mouka. K mouce jsou přidány další různé složky, jako například pitná voda, kuchyňská sůl, kypřící přípravky a jiné přísady, jako kmín, droždí a další chuťově nebo technologicky významné látky (Görner a Valík, 2004; Hamr, 2015).

Biologická varianta kypření se děje za procesu zrání a to pomocí kvasinek, které jsou schopny produkovat oxid uhličitý (CO₂). Chemické kypřící přípravky fungují na podobném principu, zajišťují tvorbu oxidu uhličitého až při pečení. Žitná těsta nekvasí samovolně, ale pomocí kyselin (mléčná nebo octová), nejčastěji je však využit kvas. U pšeničné mouky je

voda navázána pomocí bílkovin (lepku), avšak žitná mouka neobsahuje tuto bílkovinu. (Görner a Valík, 2004; Hamr, 2015)

Dle Görnera a Valíka (2004) je výroba chleba z pšeničné mouky možná dvěma způsoby a to zaváděním kvasnic přímo do mouky při zapracování těsta, nebo zavedením kvasnic pouze do části těsta. Po vyzrání, při určité teplotě, je zbytek těsta zapracován společně s částí, kde byly aplikovány kvasnice.

Hamr (2015) popisuje rozdělení výroby chleba dle použité technologie do tří skupin.

- Kvasový chléb, vyráběný klasickou technologií ze žitného kvasu, a to třístupňovým nebo zkráceným vedením. Jedná se o chléb vyráběný klasickým způsobem dle tradiční receptury s obvykle přibližně stejným poměrem žitné a pšeničné mouky, kdy výrobce třístupňovým vyváděním přírodních kvasů, připravených ze žitné mouky, docílí pomocí biochemických procesů probíhajících v kvasu vznik kyselin (zejména octové a mléčné) a tím i charakteristické navinulé chuti chleba. Tento typ chleba je kynutý prostřednictvím oxidu uhličitého, který vzniká právě při zrání kvasu. Kvas je řídké těsto připravené z vody a žitné mouky a zkvašené přirozenou mikroflórou žitné mouky.
- Chléb vyrobený z mouky a suchých, tekutých nebo pastovitých kvasů, kynutý pomocí droždí. Kynutí u tohoto chleba je na rozdíl od prvního uvedeného typu chleba realizováno pomocí droždí a k okyselení je použit umělý kvas, který obsahuje kyseliny (obvykle octovou nebo citronovou podle toho, zda se jedná o umělý kvas tekutý nebo sypký). V tomto případě bývá navinulost střídky i další její chuťové a jakostní parametry odlišné od chleba kvasového.
- Chleby formové (žitné, celozrnné, vícezrnné a speciální s přídavkem různých semen a dalších nutričně a chuťově významných látek). Tyto chleby se pečou ve formách zejména z toho důvodu, že by díky charakteru těsta neudržely při kynutí a pečení svůj tvar a objem.

3.5 Mikrobiologické znehodnocení chleba

Chléb a jiné pekárenské výrobky jsou výrobky, které díky svému složení umožňují výhodné prostředí pro rozvoj mikroorganismů, způsobující zkázu produktu. Mnoho mikroorganismů může být sice odstraněno pomocí pečení, ale zvláště některé spory mohou tento proces přežít.

3.5.1 Druhy znehodnocení

V případě, že je vytvořeno ideální prostředí pro rozvoj mikroorganismů v chlebu, dochází k rozvoji hlavně plísní, ale také kvasinek a bakterií.

Spory bakterií mohou být významným kontaminantem. Největší riziko představuje hlavně rod termorezistentních bakterií *Bacillus*. Způsobují nitkovitost a vláčnost chleba. Nitkovitost je důvod špatného skladování hotového chleba, a to za vysoké vlhkosti a teploty. Následně se vytvoří slizovitá pouzdra těchto bakterií a dojde k enzymové hydrolýze lepku a škrobu. Dalším faktorem, způsobující nitkovitost je kontaminace mouky určené k pečení chleba. Může být způsobena i kontaminací droždí nebo kontaminací sladového přípravku rodem *Bacillus*. Nitkovitost je způsobena i nedostatečně rychlým zchlazením chleba po jeho upečení. Spory nejsou schopny klíčit při kyselém pH, proto se tento jev objevuje pouze u nekynutých, málo kynutých pšeničných a pšenično-žitných chlebů. Nitkovitost chleba neohrožuje zdraví konzumenta, ale jedná se o závažný jakostní problém (Görner a Valík, 2004; Saranraj a Geetha, 2012).

Dalším, méně častým kontaminantem, jsou kvasinky. Kvasinky jsou využívány při výrobě chleba hlavně kvůli vytvoření nadýchané pórovité struktury (Ravimannan et al., 2016). Kontaminace chleba je normálně způsobena z nečistého nádobí a zařízení. Dojde k ní tedy po upečení, hlavně prostřednictvím krájecích zařízení, také během chlazení chleba, nebo prostřednictvím dopravníkového pásu. Pokud dojde ke kontaminaci, kvasinky jsou viditelné na povrchu produktu. Nejčastějšími kvasinkovými kontaminanty je *Pichia burtonii*, která je známá jako křídová plíseň (chalk mould). Tato kvasinka se rychle množí na chlebu a předchází tak plísní. Dalšími kvasinkovými kontaminanty jsou například rod *Trichosporon*, *Saccharomyces* a *Zygosaccharomyces*. *Saccharomyces* sp. produkuje bílé skvrny a může vést také ke zkřídovatění chleba. Kvasinkovou kontaminaci v pekárenských výrobcích rozdělujeme na kontaminaci viditelnými kvasinkami, které jsou schopny růstu na povrchu chleba a tvoří bílé až narůžovělé skvrnky a na fermentační kvasinkové znehodnocení spojené s alkoholovým a esterovým zápachem. Zápach se projevuje dle přítomnosti různých typů kvasinek. Riziko kvasinkové kontaminace se sníží v případě dodržování hygienických předpisů a zásad správné výrobní praxe (Saranraj a Geetha, 2012).

Plísňové znehodnocení je způsobeno převážně rody *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Rhizopus* a *Neurospora* (Santos et al., 2016).

3.5.2 Mykologické znehodnocení

Plísně hrají nejvýznamnější a nejdůležitější roli v pekárenství a pekárenských produktech, kvůli jejich častému výskytu v zrnech a mouce (Santos et al., 2016).

Chléb je také ideální potravinou pro rozvoj plísní kvůli svému pH, vlhkosti a obsahu živin. V případě, že jsou nastoleny vhodné podmínky pro rozvoj plísní, první viditelné známky zaplísnění jsou zjevné již třetí den. Chlebová střídká plesniví po 4-5 dnech (Jesenská, 1987).

Plísňová kontaminace se vyskytuje převážně po upečení, kdy je produkt kontaminován spory plísní z ovzduší, z povrchů, manipulátorů, krájecích zařízení, během chlazení a balení. Kromě toho, výskyt plísní je významně ovlivněn i obsahem mikromycet v mouce a zrnech. V případě nedodržení hygienických podmínek tak dochází ke znehodnocení výsledného produktu (Santos et al., 2016).

Teplota pro pečení chleba se pohybuje mezi 200 – 250 °C a v jeho jádře se teplota pohybuje do 100 °C (Görner a Valík, 2004). Upečený chléb proto tedy neobsahuje plísně nebo spory. Chléb je kontaminován hlavně sekundárně. Sekundární kontaminace je způsobena veškerou manipulací s chlebem po jeho upečení. Prvními kontaminanty, na základě studií, jsou *Mucor* a *Rhizopus*. Dále pak následují *Penicillium*, *Aspergillus* a *Fusarium* sp. (Ravimannan et al., 2016). *Penicillium* sp. je však nejčastějším kontaminantem a *Aspergillus* sp. je nejvýznamnější kontaminant v tropických oblastech (Legan, 1993). Dle Santose et al. (2016) jsou i dalšími kontaminanty *Cladosporium*, *Neurospora*. Spory plísní se nejhojněji vyskytují v prachových částicích v ovzduší pekárny, proto je chléb s popraskanou kůrkou nejnáchylnější k jeho kontaminaci (Görner a Valík, 2004). Ke kontaminaci dochází i během chlazení, krájení, balení a uchovávání chleba. V případě krájení chleba se narušuje řezem vlhký povrch, na kterém mohou být přichyceny plísně a po zabalení, které brání úniku vlhkosti, dojde tedy k zapaření a následnému rozmnožení plísní na kůrce (Ravimannan et al., 2016; Legan, 1993).

Dle Görnera a Valíka (2004) se chléb v praxi po upečení nechává vychladnout volně na vzduchu a poté je zabalen. Avšak bylo zjištěno, že pokud chléb takto chladne, je zvýšené riziko vyklíčení a růst spor rodu *Aspergillus* přímo v obalu. Proto není doporučeno balit chléb, který nedostatečně chladl volně na vzduchu. Extrémně náchylné na kontaminaci plísněmi jsou krájené chleby. Při jejich výrobě jsou proto přidávány konzervační látky. Zároveň chléb krájený v atmosféře oxidu uhličitého má menší tendenci plesnivět.

Dále je nutno zajistit, aby se do procesu nedostala zrna napadená plísní *Claviceps purpurea*, kvůli její toxicitě.

Doporučený limit celkového obsahu mikroorganismů mouky je 5×10^4 KTJ/g a pro plísně 4×10^3 KTJ/g. Doporučené limity plísní u pšenice jsou 3×10^4 KTJ/g a celkový počet mikroorganismů 5×10^6 KTJ/g (Görner a Valík, 2004).

3.6 Plísně

Plísně jsou velmi obávanými kontaminanty, z důvodu jejich schopnosti produkce mykotoxinů. Dále také jsou schopny změnit barvu zrna, jeho chuť a aroma. Mohou také zvýšit hodnotu volných mastných kyselin v zru.

Většina potravin z obilných zrn prochází tepelnou úpravou, která inaktivuje většinu mikroorganismů. Některé spory plísní však mohou tento proces přežít (Montville a Matthews, 2008) díky jejich vyšší odolnosti vůči nepříznivým podmínkám.

3.6.1 Morfologie plísní

Plísně jsou eukaryotní vícebuněčné vláknité mikroorganismy, které zařazujeme pod houby (Fungi). Dle typu rozmnožování je Šilhánková (2002) zařazuje do 3 kategorií – *Zygomycetes*, *Ascomycotina*, *Deuteromycotina*. Ostrý (1998) zmiňuje další třídu a to *Basidiomycetes*.

Buňka obsahuje jedno až více jader haploidní povahy. V cytoplazmě lze identifikovat útvary, jako jsou mitochondrie, endoplazmatické retikulum, vakuoly a zrníčka polyfosfátů a kapénky tuku. Rezervní látkou v cytoplazmě jsou lipidy, proto buňka obsahuje velké množství kapének tuku (Šilhánková, 2002).

Základní stavební jednotkou je stélka (thallus), která tvoří vlákna. Hyfa je houbovitě vlákno a tvoří mycelium. V případě rozvětvení hyf se tvoří kolonie. Hyfy se větví většinou v pravém úhlu. Hustá spleť hyf s tvrdým polokulovitým útvarem vytváří sklerocium, které je odolné proti nepříznivým podmínkám. Spleť kožovitých hyf vytváří stroma, které je typické pro plísně parazitující například na ovoci. Zbarvení kolonie je způsobeno pigmenty ve sporech a membráně a je velmi různorodé (Ostrý, 1998).

Prokázalo se, že buněčná stěna plísní se primárně skládá z chitinu, glukanů, mannanů a glykoproteinů, které jsou k sobě spojeny kovalentně (Bowman a Free, 2006).

Třída *Zygomycetes* je typická jednobuněčným myceliem a pohlavním rozmnožováním, kde dojde k vytvoření zygospor. Stélka, neboli thallus, je tvořena hyfy bez přepážek (Šilhánková, 2002). Do této skupiny patří například *Mucor*, *Rhizopus* (Banwart, 1989).

Podkmen *Ascomycotina* je charakteristický svým přehrádkovým myceliem a vytváří askosporu díky pohlavnímu rozmnožování v asku. V případě nepohlavního rozmnožování tvoří exosporu.

Podkmen *Deuteromycotina* se vyznačuje přehrádkovým myceliem a rozmnožování probíhá pouze nepohlavně, pomocí exospor. Jedná se o podkmen nedokonalých hub – *Fungi imperfecti* (Šilhánková, 2002).

3.6.2 Charakteristika a vlastnosti vybraných plísní znehodnocující chléb

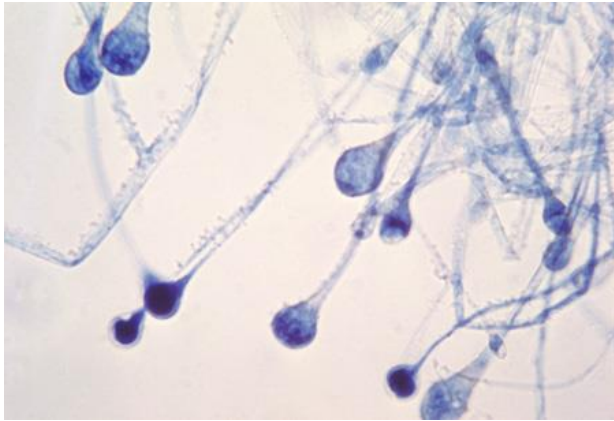
Jesenská (1987) uvádí, že na chlebu se zpravidla objevují plísně *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium expansum* a *Aspergillus versicolor*. Santos et al. (2016) uvádějí, že plísně znehodnocení je způsobeno převážně rody *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* a *Neurospora*. Legan (1993) popisuje, že incidence *Aspergillus* se zvyšuje se středozemním podnebím a zároveň klesá incidence *Penicillium*. Zastoupení kontaminujících plísní tedy závisí i na klimatických podmínkách, kde byl chléb vyroben.

3.6.2.1 *Mucor*

Mucor je nejrozsáhlejším rodem třídy *Zygomycetes*. Vyskytuje se v různých potravinách (chlebu, másle, mase, ovoci a zelenině) a také v půdě, hnoji a v obilí. *Mucor*, jako ostatní dimorfické plísně, dokáže rozvinout kulovité výtrusnice a množit se pučením nebo vytvářet mycelium bez přepážek. Za aerobních podmínek roste s vlákny. V Orientu je *Mucor* využíván pro fermentaci potravin (Banwart, 1989; Šilhánková, 2002).

Vytváří vzdušná mycelia s vatovitým charakterem, která rychle rostou. Na začátku jsou mycelia bílá nebo šedá, postupně pak tmavnou. Hyfy jsou větvené s tmavě zelenými chlamydosporami. *Mucor* tvoří bělavý porost s kulovitými nahnědlými sporangii, jejichž kolumela připomíná límeček, avšak netvoří mykotoxiny (Kalhotka, 2014). Šilhánková (2002) uvádí, že pouze některé rody dokáží vytvářet mykotoxiny a některé rody jsou patogenní povahy.

Obrázek 3 *Mucor*



Zdroj: <http://www.medicinenet.com/mucormycosis/page3.htm>

3.6.2.2 *Rhizopus*

Rod *Rhizopus* je velmi podobný rodu *Mucor* a patří do třídy *Zygomycetes*, avšak rozdíl je v tvorbě stolonů (šlahounovité hyfy), rhizoidů (kořínkovité útvary) a jejich velikosti. Z místa vzniku rhizoidů vyrůstají ze stolonů dlouhé sporangiofory, obvykle 2 nebo 3. Sporangiofor je na konci rozšířen v apofýzu a spojitě přechází v čočkovitou kolumelu. Sporangiofory dosahují 1,5 – 3 mm délky, jsou nevětvené a mají hnědou stěnu. Většinou vyrůstají jednotlivě, popřípadě ve skupině. Vytváří kulovitou, oválnou nebo elipsovitou strukturu (Kalhotka, 2014; Šilhánková, 2002).

Obrázek 4 *Rhizopus*



Zdroj: <http://www.idimages.org/atlas/organism/?atlasentryID=43&organism=Rhizopus>

Rod *Rhizopus* se dále vyznačuje poměrně rychlým růstem stolonů a mohutnými vlákny a sporangii s tvorbou bochníkovitých kolumel ve stáří. Díky obsahu pektinolytických

enzymů, je schopen způsobovat hnilobu ovoce (Banwart, 1989), avšak neprodukuje žádné mykotoxiny. Šilhánková (2002) uvádí, že některé druhy mohou vytvářet mykotoxiny a mohou být patogenní. *Rhizopus* je považován za nebezpečný kontaminant v laboratořích, právě kvůli svému rychlému růstu a snadnému šíření (Kalhotka, 2014).

Druhy *R. japonicus* a *R. delemar* se v Japonsku využívají k fermentaci cukrů a obilí k vytváření alkoholických nápojů (Banwart, 1989).

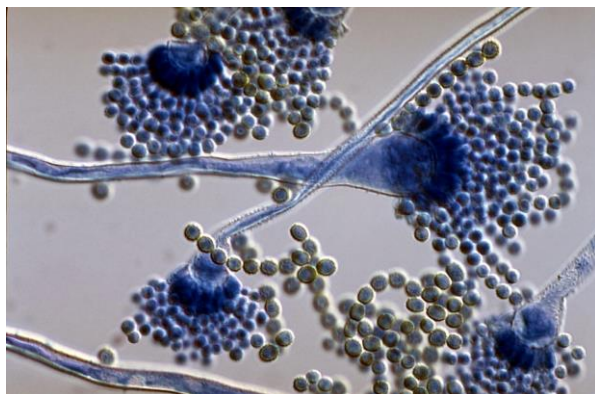
R. stolonifer je nejběžnější chlebová plíseň, která se nejvíce vyskytuje v teplejších oblastech (Saranraj a Geetha, 2012).

3.6.2.3 *Aspergillus*

Aspergillus je rozšířeným a častým kontaminantem skladovaných potravin z třídy *Deuteromycotina*. Je známo přes 100 typů. Napadá nejčastěji například obilná zrna, ořechy a koření. Tato plíseň se vyskytuje spíše v tropických a subtropických klimatech. *A. flavus* se nachází volně v přírodě, zatímco *A. parasiticus* je méně rozšířen. *A. flavus* velmi dobře roste na obilovinách a koření, ale produkce aflatoxinu je snadno inhibována sušením, správných zacházením a správným skladováním (Jesenská, 1987; Banwart, 1989).

Rozmnožování probíhá vegetativně a to konidiami vznikající v řetězcích z fialid na konci konidioforu. Rozlišujeme dva druhy fialid a to primární a sekundární. Primární fialidy rostou z vezikuly a sekundární rostou z primárních fialid ve formě svazků. *Aspergillus* tvoří svazek srůstajících konidiofor, který je nazýván koremium. Koremium je zakončeno paličkou spor. Některé druhy se rozmnožují pohlavně tak, že tvoří askospory ve vřecku neboli asku. Asky jsou neuspořádané a kulovitého až elipsoidního tvaru po osmi shlucích askospor. Nejčastější barva konidií je zelená až modrozelená, ale také hnědá a černá. Rod *Aspergillus* obsahuje škálu enzymů – amylolitické, proteolytické a pektolytické. Některé enzymy jsou využívány v potravinářství (Šilhánková, 2002). Konidie *A. flavus* jsou obvykle jemné až lehce hrubé, ale konidie *A. parasiticus* jsou hrubé (Jesenská, 1987).

Obrázek 5 *Aspergillus*



Zdroj: <https://cz.pinterest.com/kaiser254/aspergillus/>

Nejnámějším a nejrozšířenějším zástupcem je *A. niger*. Využívá se i pro výrobu kyseliny citronové. Černě obarvené konidie chrání *A. niger* před účinky slunečního záření. *A. flavus* tvoří žlutozelené konidie. *A. fumigatus* naopak tvoří zelené konidie a způsobuje dýchací onemocnění lidí i zvířat. Plesnivění džemů a chlebů nejčastěji způsobuje *A. glaucus*, který tvoří zelené konidie. *A. versicolor* způsobuje plesnivění potravin s nízkou aktivitou vody (Šilhánková, 2002).

Pokud *Aspergillus* napadne semena, způsobí jejich diskoloraci a zástavu klíčení. Avšak *Aspergillus oryzae* může být prospěšný a to tak, že štěpí škrob v rýži na glukózu při výrobě sake (alkoholický nápoj). Některé druhy jsou využívány při výrobě miso (fazolová pasta) nebo sójové omáčky (Banwart, 1989).

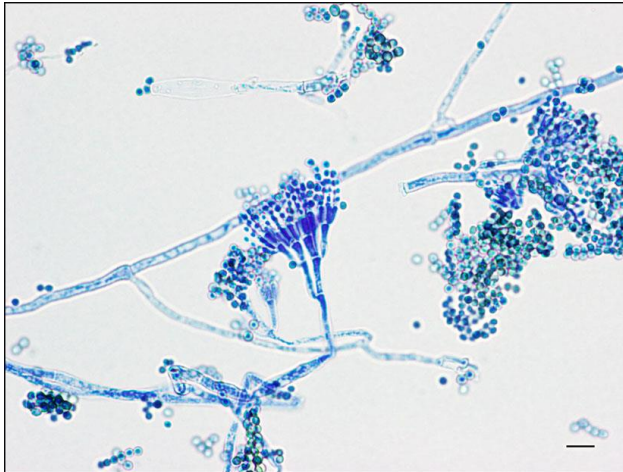
U mnoho druhů *Aspergillus* je velmi problematická jejich schopnost produkovat mykotoxiny a například *A. flavus* a *A. parasiticus* jsou schopné produkovat aflatoxiny. Některé druhy rodu *Aspergillus* způsobují aspergilózu, onemocnění plic u lidí s oslabenou imunitou, které může být pro ně i smrtelné (Barberán et al., 2017).

3.6.2.4 *Penicillium*

Penicillium je nejrozsáhlejší a nejrozšířenějším rodem plísní. Tato skupina zahrnuje zhruba 150 druhů. Konce konidiofor jsou přeslenovité a jsou velmi členěné. Stejně jako u rodu *Aspergillus*, tvoří svazek srůstajících konidiofor neboli koremium, které je ukončeno paličkou. Konidiofory jsou vzpřímené a na koncích větvené. Asky jsou neuspořádané a mají kulovitý až elipsoidní tvar, tak jako u rodu *Aspergillus*. Nejčastější barva konidií je

žlutozelená až modrozelená a na potravinách vytváří sametový až moučný povlak (Kalhotka, 2014; Šilhánková, 2002; Görner a Valík, 2004).

Obrázek 6 *Penicillium*



Zdroj: <https://www.inspq.qc.ca/en/moulds/fact-sheets/penicillium-spp>

Penicillium je schopno produkovat mykotoxiny, například patulin a může vyvolávat i alergické reakce u citlivějších osob. Tvoří také látky antibiotické povahy (*P. chrysogenum*) a dále i například kyselinu citrónovou, glukonovou *P. roqueforti* a *P. camemberti* se využívají v potravinářství pro tvorbu plísňe na povrchu sýrů (Šilhánková, 2002; Carlile at al., 2001).

Penicillium je nejvíce rozšířeno v mírném pásmu a optimální vlhkost, vhodná pro růst, se velmi liší mezi druhy (Dijksterhuis and Samson, 2007).

Nejvíce je *Penicillium* identifikováno v jablečných produktech a může napadat i zeleninu. Výskyt byl hlášen i v dalším ovoci, jako například v hroznovém víně, hruškách, pomerančích, třešních a v meruňkách. Na jablkách způsobuje takzvanou modrou plíseň (Carlile at al., 2001).

3.6.2.5 *Cladosporium*

Rod *Cladosporium* pučením vytváří řetízky vícebuněčných spor, které jsou nazývané blastosporý. Nejčastěji se nachází v anamorfním stádiu, zatímco teleomorfní stádium se vytváří velmi zřídka.

Obrázek 7 *Cladosporium*



Zdroj: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.cz/2014/06/cladosporium-species-revisited.html>

Spory a mycelia jsou tmavé barvy a spory se nacházejí jak ve vzduchu (více jak 80 % všech zachycených spor), tak v půdě i ve vodě. V potravinářských provozech jsou to nejčastěji vlhké stěny, kde se *Cladosporium* vyskytuje. Dále se nachází i ve vinařských, pivovarských sklepeních a v chladících prostorách na mase nebo na chlazených vejcích. Na mase vytváří černé skvrny a například na broskvích *C. carpophilum* způsobuje strupovitost. Parazituje tedy i na ovoci a zelenině, chmelu nebo máku (Kalhotka, 2014; Ogórek et al., 2012; Šilhánková, 2002).

Cladosporium je aktivní při nízké teplotě a vysoké vlhkosti. Je schopen rozložit celulosu, pektiny a tuky. Díky malé velikosti konidií se velmi snadno šíří na větší vzdálenosti (Šilhánková, 2002; Banwart, 1989).

Cladosporium spp. způsobuje u lidí alergické reakce, které se projevují jako astma. Alergie je převážně způsobována *C. herbarum* a *C. cladosporioides*. V některých případech mohou vyvolat i infekci (Ogórek et al., 2012).

3.6.2.6 *Fusarium*

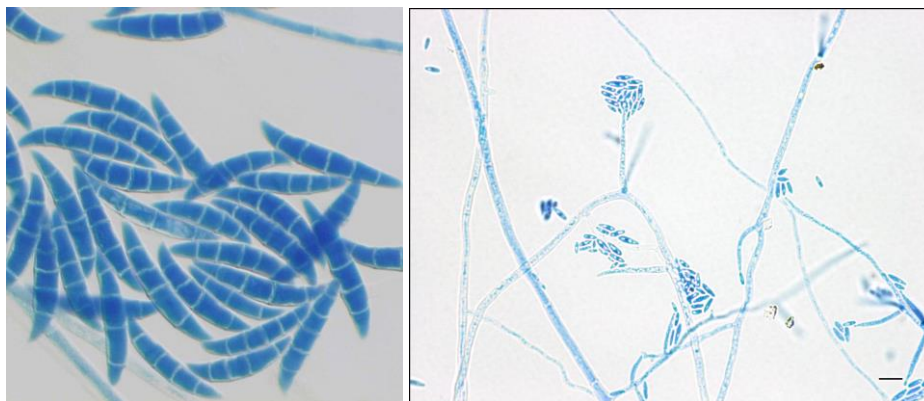
Plísně rodu *Fusarium* jsou další rozsáhlou skupinou, která vytváří velmi toxické mykotoxiny. Způsobuje zkázu potravin a nemoci rostlin. Jedná se o velmi významného polního patogena, nejčastěji kontaminuje obilí (Kalhotka, 2014).

Vytváří vzdušné, řídké a nepravidelné mycelium. Rozmnožování probíhá díky vícebuněčným konidiím rohlíčkovitého nebo banánovitého tvaru. Může vytvářet i tzv. mikrokonidie hladkostěnného a jednobuněčného charakteru, které jsou formovány do řetízků či nepravých paliček. Shluky vznikají díky lepkavé vlastnosti spor. Dále hojně vytváří i

kulovité chlamydospory se silnou stěnou na konci nebo uprostřed hyfy, někdy i v mikrokonidiích (Šilhánková, 2002; Malíř et al., 2003; Kalhotka, 2014).

Fusarium produkuje červené, tmavě modré, zelené nebo černé barviva, která následně zbarvují mycelium (Banwart, 1989).

Obrázek 8 *Fusarium*



Zdroj: <http://www.medical-labs.net/fusarium-species-colony-and-microscopic-description-3138/>

3.6.3 Faktory ovlivňující výskyt plísní

Potraviny jsou možným médiem pro rozvoj mikroorganismů. Mezi nejdůležitější faktory patří voda, která je předpokladem života. Voda zároveň vytváří ideální prostředí pro růst mikroorganismů. V suchých potravinách se mikroorganismy nevyskytují, pro rozvoj mikroorganismů musí mít potravina vlhkost 18 až 20 %.

Mezi významné faktory patří stav obilí před sklizní, zejména jeho vlhkost. V případě, že je obilí sklizeno při vyšší vlhkosti (nad 14,5 %), je vhodným prostředím pro rozvoj plísní či jiných mikroorganismů. Ti dále produkují toxické metabolity poškozující lidský, ale i animální organismus. Kontaminované obilí proto nelze využívat ani jako krmivo pro zvířata (Prugar, 2008).

Při skladování obilí je více než nutné hlídat jeho vlhkost, ale i aktivitu vody (a_w). Optimální podmínky pro skladování obilí jsou nízká vlhkost (do 14 %), nízká aktivita vody (maximálně 0,65) a nepřítomnost živočišných škůdců.

Skladovací prostory pro obilí musí mít teplotu prostředí nepřesahující rozmezí 10 až 15 °C a též musí být suché. Dekontaminace od skladištních škůdců je samozřejmostí. Relativní vlhkost prostředí nepřesahuje 75 % (Görner a Valík, 2004).

Prugar (2008) tvrdí, že nejzávažnějšími kontaminanty jsou rody plísní *Penicillium* a *Aspergillus*, které produkují toxiny (aflatoxiny, ochratoxin) už při vlhkosti obilí 13 - 18 % a při teplotách 10 - 50 °C.

Dalším faktorem ovlivňující výskyt mikroorganismů je pH potraviny. Potraviny s pH nižší než 5 mohou být napadeny pouze plísněmi, kterým tyto podmínky vyhovují. Dalším podstatným faktorem je přístup vzduchu a teplota (Weeks a Alcamo, 2008).

V mouce již nedochází k rozvoji plísní, z důvodu nízké aktivity vody, neboť se jedná o suchý materiál. Dle Weekse a Alcama (2008) mouka tedy není nadále brána jako kritická potravina. Görner a Valík (2004) tvrdí, že mikroflóra mouky se nedá významně ovlivnit hlavně během jejího zpracování v mlýnech. Ale v případě, že je mouka kontaminována, mokré čištění pomáhá rozvoji plísní. Dnes se metoda mokrého čištění nevyužívá.

Díky nízké aktivitě vody (a_w) nedochází k růstu patogenních mikroorganismů. Avšak pokud nastanou pro ně příznivé podmínky, mohou tuto nepřízeň přežít a následně se mohou projevit. Suková (2012a) uvádí, že mouka je kontaminována mnoha zdroji, jako například půdou, živočišnými exkrementy, hmyzem nebo chorobami rostlin. Dále tvrdí, že kontaminace mouky není zvláště důležitá, neboť mouka je suchý materiál s nízkou aktivitou vody a během její tepelné úpravy se mikroorganismy zničí. Suková (2012a) zároveň dále tvrdí, že v případě kontaminace mouky, je velmi rizikové i ochutnávání těst před upečením, nebo obecně ochutnávání syrových produktů.

Z mikrobiologického pohledu je tedy významným faktorem vlhkost, která může v upečeném chlebu dosahovat až 40 % a aktivita vody 0,94 – 0,97. Tyto podmínky umožňují optimální prostředí pro plísně, které znehodnocují chléb a tím se snižuje i jeho trvanlivost na 3 až 7 dní (Legan, 1993).

3.6.4 Ochrana před mykologickým znehodnocením

K zamezení ztrát, a to nejen ekonomických, je nutné dodržovat určitá preventivní opatření k dosažení maximální ochrany sklizně, či potraviny.

Jedna z možností jak dosáhnout nezávadnosti potraviny je zaměřením se na redukci počtu plísňových spor. Zničení plísňových spor v potravinech se docílí například UV zářením, přidáváním konzervantů nebo jiných plísňových inhibitorů a použitím modifikované atmosféry, nebo další balící techniky, která zabrání rozvoji plísní (Legan, 1993).

Největší důraz by však měl být kladen na předsklizňové a posklizňové manipulace s potravinou. Co se týče předsklizňových technik, hovoříme o použití fungicidů, které zabraňují

kontaminaci plísní a o vlhkosti během sklizně, která je také významným faktorem pro rozvoj plísní. V případě posklizňových technik je vhodné kontrolovat vlhkost skladované potraviny a teplotu prostředí, ve kterém se potravina skladuje. Vhodnými sušicími zařízeními ve skladových prostorách se zamezí dalšímu rozvoji plísní. V některých případech lze ručně nebo strojově oddělit zaplísňené části nebo potraviny, které by mohly pomoci dalšímu šíření plísní. Také skladovací prostory musí splňovat hygienické požadavky (Olsen a Magan, 2004).

3.6.5 Mykotoxiny

Jako sekundární metabolismus plísní vznikají mykotoxiny, které je obtížné zničit i při vysokých teplotách a to kvůli jejich chemické stabilitě. Jejich účinek negativně ovlivňuje jak člověka, tak i zvířata. Výskyt mykotoxinů je podstatně vyšší v teplejších oblastech s vysokou vlhkostí, ale vyskytují se i v mírném pásmu. Přítomnost mykotoxinů v potravinách má za následek kažení potraviny, nebo carry over efekt, kdy mykotoxin přechází do masa zvířete, které je následně konzumováno člověkem a tím dojde k infekci člověka. Nejčastější expozice mykotoxinů je požitím, ale také inhalací a kožní cestou. V případě expozice dojde v organismu k rozvoji nemoci, tzv. mykotoxikózy (Zain, 2010; Olsen a Magan, 2004).

Jejich maximální limit v potravinách je vymezen legislativou.

3.6.5.1 Charakteristika vybraných mykotoxinů a jejich vlastnosti

Mykotoxiny mohou být děleny například dle jejich účinku na organismus a to na dermatotoxiny, estrogeny, genotoxiny, hematotoxiny, hepatotoxiny, imunotoxiny, neurotoxiny, nefrotoxiny a toxiny gastrointestinálního traktu. Je možné je rozdělit i dle způsobu biosyntézy na polyketidy, peptidy, terpeny, diketopiperaziny a tetramické kyseliny (Ostrý, 1998).

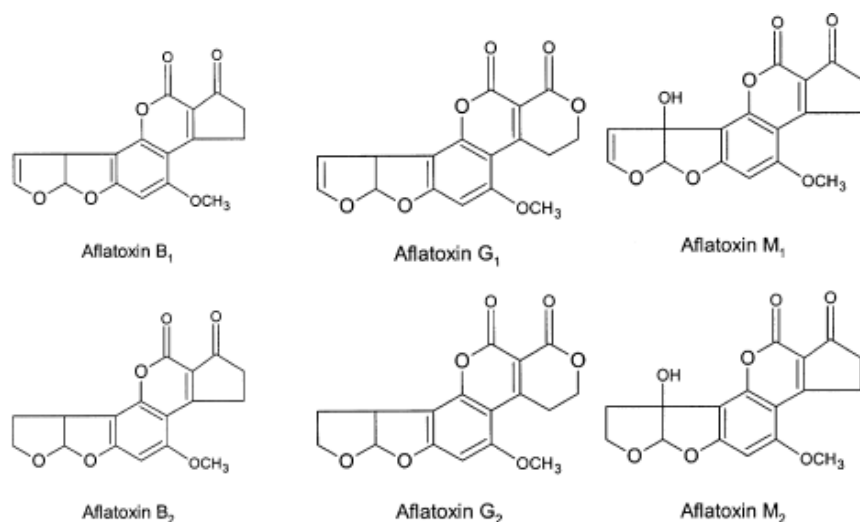
3.6.5.1.1 Aflatoxiny

Aspergillus flavus, *Aspergillus parasiticus* a *Aspergillus nomius* jsou jedny z nejvýznamnějších plísní, kvůli jejich produkci aflatoxinů. Aflatoxin tvoří 6 hlavních typů toxinů B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂. Písmeno B a G je označení jejich fluorescenční barvy pod UV světlem; G = green, B = blue a písmeno M = milk. Jedná se o termorezistentní vysoce toxický mykotoxin patřící do skupiny difuranokumarinových derivátů a vzniká syntézou polyketidů. K jejich deaktivaci je nutná dlouho trvající vyšší teplota 100 – 120 °C. Pečení a pasterizace

nezpůsobuje jejich inaktivaci. Akutní otravy nejsou příliš běžné, ale chronická toxicita je pro člověka nebezpečnější. Z chronického hlediska aflatoxiny B₁ a B₂ způsobuje poškození jater a ovlivňuje jejich funkci, způsobuje také cirhózu jater a nádorové bujení nejen jater. Nejnebezpečnější je aflatoxin B₁. Na lidský organismus působí teratogenně, karcinogenně a imunosupresivně. *A. flavus* je schopen produkovat aflatoxiny B₁ a B₂ a kyselinu cyklopiazonovou, ale pouze některé izoláty jsou toxické. *A. parasiticus* produkuje aflatoxin B₁, B₂, G₁ a G₂ a všechny izoláty jsou toxické. *A. nomius* produkuje aflatoxin B a G.

Aflatoxiny jsou nejčastěji identifikovány na pšeničném a pšenično-žitném chlebě. Aflatoxiny se nejčastěji vyskytují v arašídech, kukuřici, oříšcích a semenech (Montville a Matthews, 2008; Görner a Valík, 2004).

Obrázek 9 Chemická struktura jednotlivých aflatoxinů (Zain, 2010)



3.6.5.1.2 Patulin

Patulin je produkován plísněmi *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssochlamys*, *Eupenicillium*, a *Paecilomyces* (Olsen a Magan, 2004) a vyskytuje se na poškozených místech dané potraviny, nikoli v potravině. Poškozené místo totiž slouží jako ideální prostředí pro infekci plísněmi, obzvláště rodem *Penicillium* (Murphy et al., 2006).

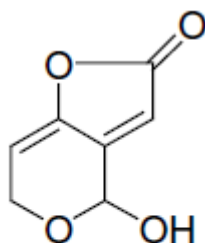
Nejvíce se nachází na jablkách a v jablečných produktech, v meruňkách, hroznech, kde tvoří modrou plíseň (blue mold). Patulin je možné najít i v broskvích, hruškách, olivách, obilovinách a silážích. Nejstabilnější je v sušených potravinách a jablečném a hroznovém džusu. Velmi snadno se však rozkládá ve vlhkých obilovinách, ale i během produkce cideru, z důvodu fermentace, která jeho stabilitu snižuje (Olsen a Magan, 2004). Největší riziko

představuje pro děti a mladistvé, jedná se totiž o hlavní skupinu konzumentů jablečných džusů a dalších jablečných výrobků (Barad et al., 2016).

Patulin se také vyznačuje schopností inhibovat proteinovou syntézu ATPázy, alkalické fosfatázy, aldolázy a hexokinázy. Je také schopen selektivní antibiotické činnosti vůči Gram-pozitivním bakteriím, což může dát Gram-negativním střevním patogenům výhodu (Olsen a Magan, 2004).

Patulin působí vůči organismu genotoxicky a je považován za potenciální karcinogen (Murphy et al., 2006). Ostrý (1998) navíc uvádí, že působí imunotoxicky, Olsen a Magan (2004) ještě zmiňují cytotoxicitu a neurotoxicitu.

Obrázek 10 Chemická struktura patulinu (Murphy et al., 2006)



Patulin

3.6.5.1.3 Ochratoxin A

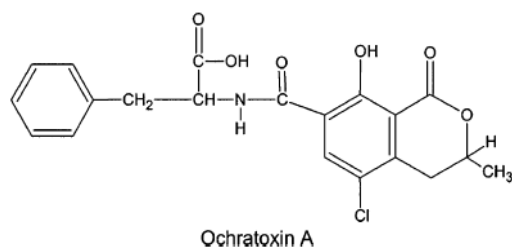
Ochratoxin A, nebo 4 - hydroxyochratoxin A, ochratoxin α a OTA, je produkován plísněmi rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. Nejrozšířenějšími producenty ochratoxinu jsou *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*, *Penicillium verrucosum* (Olsen a Magan, 2004).

OTA je častým kontaminantem potravin, avšak nejvíce se nachází v obilovinách a sušených potravinách, jako třeba v pšenici, rýži, kukuřici, ovsu, žitu, prosu, podzemnici olejné, kakaových bobech a kávových zrnech. Dále v ořechách, fazolích, sušeném ovoci, víně a v sušených rybách. Přes kontaminovaná krmiva se může OTA dostat do masa zvířat, ale i do vajec a mléka a může dojít k tzv. carry over efektu (Zain, 2010).

V přírodě se vyskytuje i Ochratoxin B, který je vzácnější a méně toxický než OTA. Další strukturně příbuzné ochratoxiny jsou ochratoxin C, α a β . Nevyskytují se však v potravinách (Montville a Matthews, 2008; Olsen a Magan, 2004).

Ochratoxin A působí na organismus hlavně nefrotoxicky, imunotoxicky a je považován i za teratogen a karcinogen (Montville a Matthews, 2008).

Obrázek 11 Chemická struktura OTA (Zain, 2010)



3.6.5.1.4 Fusariové toxiny

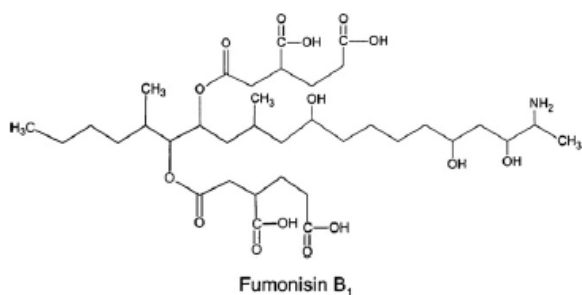
Hlavním producentem fusariových mykotoxinů je rod plísní *Fusarium*. Nejvýznamnější jsou zearalenon, trichotheceny a fumonisiny (Jesenská, 1987).

Zearalenon se vyznačuje svojí silně estrogení aktivitou. Ostrý (1998) zmiňuje i jejich genotoxicitu. Zearalenon se vyskytuje hlavně v obilovinách a kukuřici, také i v ječmeni, ovsu, pšenici, rýži, čiroku, banánech, amarantu a černém pepři (Olsen a Magan, 2004).

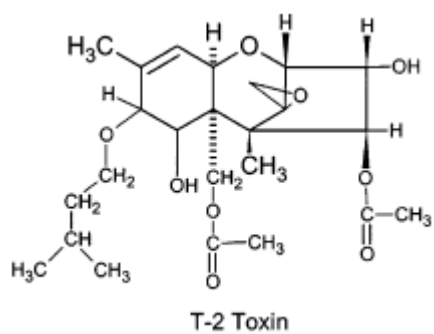
Jesenská (1987) uvádí, že trichotheceny jsou potenciální biologická zbraň, kvůli jejich schopnosti inhibovat syntézu bílkovin. Mezi důležité trichotheceny patří deoxynivalenon, diacetoxyscirpenol, nivalenol, HT-2-toxin a T-2 toxin. T2 toxin je silně imunotoxický a je spojován s výskytem alimentární toxické aleukie (ATA), která způsobuje horečku a hemoragické krvácení (Görner a Valík, 2004; Jesenská, 1987).

Fumonisiny mají převážně neurotoxický a karcinogenní účinek a také poškozují ledviny a játra. Ze skupiny fumonisinů je nejtoxictější typ B₁. Vyskytují se v obilných zrnech, kukuřici, kukuřičných výrobcích, ječmeni, pšenici, rýži, ovsu, prosu a čiroku (Olsen a Magan, 2004; Zain, 2010).

Obrázek 12 Chemická struktura Fumonisinu B₁ (Zain, 2010)



Obrázek 13 Chemická struktura T-2 toxinu (Zain, 2010)



V diplomové práci byly zmíněny vybrané mykotoxiny z důvodu jejich toxicity a jejich negativnímu vlivu na lidský organismus a také, protože jsou produktem patogenních plísní.

4 Materiál a metody

K testování bylo v maloobchodní síti náhodně vybráno 20 vzorků chleba v běžné kvalitě a 20 v BIO kvalitě. Analýza byla zaměřena na kvantitativní a kvalitativní zastoupení mikromycet. Zjišťování mikromycet bylo stanovováno v souvislosti s balením výrobku, která ovlivňuje kvantitu. U nebalených chlebů byla trvanlivost 24 hodin, u balených byla stanovena výrobcem.

Chleby byly analyzovány druhý den po jejich nákupu, pro stanovení mikromycet byl použit Rose Bengal agar.

4.1 Použitý materiál

V tabulce č. 1 je uveden seznam analyzovaných chlebů, včetně prodejce. Jedná se o druhy různého složení, s přidavkem semínek, v BIO a běžné kvalitě.

Tabulka 1 Seznam analyzovaných vzorků chleba

Číslo	Běžný/Bio	Název vzorku	Balení	Prodejce
1.	Běžný	Psyllium Dr. Popov Arizona - pšeničný-žitný	Ano	AHOLD Czech Republic, a.s.
2.	Běžný	Penam Fit den žitno-slunečnicový chléb celozrnný	Ano	AHOLD Czech Republic, a.s.
3.	Běžný	Chléb celozrnný s vlákninou	Ne	AHOLD Czech Republic, a.s.
4.	Běžný	Chlebík sedmizrnný	Ne	AHOLD Czech Republic, a.s.
5.	Běžný	Spar chléb bramborový	Ne	AHOLD Czech Republic, a.s.
6.	Běžný	Chléb žitný celozrnný Roggenvollkornbrot	Ano	Lidl Holding s.r.o.
7.	Běžný	Penam Beta chleba s ječmenem	Ano	AHOLD Czech Republic, a.s.
8.	Běžný	Pekárna Tanvald Chléb tmavý žitno-pšenčný	Ano	AHOLD Czech Republic, a.s.
9.	Běžný	Chlebánek Venezia tmavý	Ne	AHOLD Czech Republic, a.s.
10.	Běžný	Chléb celozrnný s dýní bez "ěček"	Ne	AHOLD Czech Republic, a.s.
11.	Běžný	Chléb slunečnicový	Ne	AHOLD Czech Republic, a.s.
12.	Běžný	Mrkvový chléb žitný Řemeslná Kolářkova pekárna	Ne	Sklizeno s.r.o.
13.	Bio	Radešovský bio chléb žitný	Ne	Sklizeno s.r.o.
14.	Běžný	Svijanská cihla Pekárna Mšeno	Ne	Sklizeno s.r.o.
15.	Bio	Kváskový chléb žitný celozrnný	Ne	Country Life s.r.o.

16.	Bio	Chléb žitný celozrnný	Ne	Country Life s.r.o.
17.	Bio	Mrkvovo-dýňový chléb	Ne	Country Life s.r.o.
18.	Bio	Radešovský bio chléb kváskový se špaldou	Ne	Sklizeno s.r.o.
19.	Bio	Bio žitný kváskový chléb celozrnný se sluneč. semenem	Ne	Sklizeno s.r.o.
20.	Bio	Bio chléb lněný - Bio Leinsamen-Brot	Ano	Sklizeno s.r.o.
21.	Bio	Bio chléb ze tří zrn - Bio Dreikorn	Ano	Sklizeno s.r.o.
22.	Bio	Bio žitný chléb	Ano	Sklizeno s.r.o.
23.	Bio	Bio chléb se špaldou a Grünkernem	Ano	Sklizeno s.r.o.
24.	Běžný	Křupavý chléb semínkový	Ano	Country Life s.r.o.
25.	Bio	Selský chléb pšenično-žitný	Ne	Country Life s.r.o.
26.	Bio	Chléb z naklíčeného obilí, nekvašený	Ano	Country Life s.r.o.
27.	Bio	Špaldový křehký chlebiček	Ano	Rossmann
28.	Běžný	Olivový chléb Řemeslná Kolářkova pekárna	Ne	Sklizeno s.r.o.
29.	Bio	Chléb ASON velký žitný	Ne	Country Life s.r.o.
30.	Bio	Chléb špaldovo-žitný celozrnný	Ne	Country Life s.r.o.
31.	Běžný	Chléb Albert světlý	Ano	AHOLD Czech Republic, a.s.
32.	Běžný	Severský chléb Cerea	Ano	AHOLD Czech Republic, a.s.
33.	Běžný	Chléb kmínový vícezrnný tmavý	Ano	AHOLD Czech Republic, a.s.
34.	Běžný	Cereální chléb Cerea	Ano	AHOLD Czech Republic, a.s.
35.	Běžný	Chléb vícezrnný tmavý	Ano	AHOLD Czech Republic, a.s.
36.	Bio	Chia chléb	Ne	Zdravá výživa v Král. Vinohradech
37.	Bio	Pural Bezlepkový celozrnný chléb BIO	Ano	Rozmarýna CZ, s.r.o.
38.	Bio	Pural Bezlepkový celozrnný chléb s pohankou a slunečnic. semínky BIO	Ano	Rozmarýna CZ, s.r.o.
39.	Bio	Bio chléb žitný celozrnný, KOSHER	Ne	Cesmína BIO, s.r.o.
40.	Bio	Pural celozrnný žitný chléb s ovesnými vločkami BIO	Ano	BIOOBCHOD.CZ s.r.o.

Vysvětlivky:

Nebalený – trvanlivost 24 hodin

Balený – trvanlivost uvedena na balení – stanovena výrobcem; rozbor do 1 dne po zakoupení

4.2 Metodika

V rámci diplomové práce byl zjišťován počet mikromycet ve vzorcích chleba. Ke stanovení byla použita desková kultivační metoda, jako živné medium Rose Bengal agar.

4.2.1 Živná média

Fyziologický roztok byl připraven rozpuštěním 8,5 g NaCl a 1 g peptonu v 1000 ml destilované vody a následně rozdělen do Erlenmeyerových baněk a zkumavek. Poté byly baňky a zkumavky s roztokem sterilovány 20 min při 121 °C

Rose Bengal Agar (složení dle normy ČSN ISO 21527-1,2)

- 5 g pepton
- 10 g D-glukóza
- 1 g dihydrogenfosforečnan draselný
- 0,5 g síran hořečnatý
- 0,002 g dichloran
- 0,025 g bengálská červeň
- 15 g agar
- 0,1 g chloramfenikol
- 1000 ml destilovaná voda

Dané množství agaru bylo rozpuštěno v destilované vodě a poté následovala sterilace v autoklávu na 20 minut při teplotě 121 °C. Před samotným použitím byl agar vytemperován na teplotu 50 °C ve vodní lázni.

4.2.2 Postup

Do Erlenmayerovy baňky s 90 ml fyziologického roztoku bylo naváženo 10 g vzorku. Erlenmayerova baňka byla s obsahem třepána po dobu 7 min. Z protřepaného obsahu (ředění 10^{-1}) byl odpipetován 1 ml vzorku do zkumavky s obsahem 9 ml fyziologického roztoku (ředění 10^{-2}). Zkumavka byla následně protřepána.

Vzorky byly asepticky pipetovány od nejvyššího k nejnižšímu ředění a to vždy po 1 ml vzorku sterilní pipetou do Petriho misek. Poté byly Petriho misky zality rozvařeným a vytemperovaným agarem. Obsah misek byl promíchán a ponechán ztuhnout. Pro každé ředění byla připravena dvě opakování.

Mikromycety byly kultivovány v termostatu při teplotě 25 °C. Po 5 dnech kultivace byly spočítány narostlé kolonie a výsledek byl vyjádřen jako množství mikroorganismů v 1 g vzorku. Mikromycety byly vyjádřeny v jednotkách tvořící kolonie (KTJ).

Výpočet mikromycet byl spočítán dle vztahu: $N = \Sigma c / [(n_1 + 0,1n_2) \cdot d]$; tedy počet kolonií se rovná aritmetickému průměru vynásobeného převrácenou hodnotou ředění

Σc = 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 použité ředění pro výpočet

4.2.3 Kvalitativní určení mikromycet

Nejprve byl spočítán počet narostlých kolonií na Petriho miskách a hned poté byly sledovány makroskopické znaky, jako například barva mycelia, velikost kolonií, tvar kolonií, neobvyklé útvary atd.

Pro mikroskopické vyšetření byly připraveny preparáty, které byly sledovány při zvětšení 150x, respektive 675x, následovala identifikace na úroveň rodu podle klíče Hampl a Šilhánková (1957).

5 Výsledky

V praktické části diplomové práce byl sledován výskyt nežádoucích mikromycet u vybraných vzorků běžného a bio chleba. Vzorky jak balené, tak i nebalené, byly analyzovány druhý den po zakoupení v maloobchodní síti a to vždy v rámci doby spotřeby uvedené na balení. V případě nebalených vzorků byla dodržována 24 hodinová doba spotřeby.

Jako živné medium byl použit Rose Bengal agar.

Tabulka 2 Kvantitativní zastoupení mikromycet ve vzorku

Číslo	KTJ/g	Balení
1.	20	Ano
2.	0	Ano
3.	0	Ne
4.	0	Ne
5.	5	Ne
6.	0	Ano
7.	5	Ano
8.	0	Ano
9.	0	Ne
10.	0	Ne
11.	5	Ne
12.	6	Ne
13.	10	Ne
14.	10	Ne
15.	5	Ne
16.	22	Ne
17.	5	Ne
18.	5	Ne
19.	0	Ne
20.	0	Ano
21.	0	Ano
22.	5	Ano
23.	0	Ano
24.	0	Ano
25.	12	Ne
26.	0	Ano
27.	6	Ano
28.	10	Ne
29.	0	Ne

30.	5	Ne
31.	15	Ano
32.	5	Ano
33.	6	Ano
34.	11	Ano
35.	10	Ano
36.	0	Ne
37.	0	Ano
38.	0	Ano
39.	0	Ne
40.	5	Ano

Vysvětlivky:

Modrá barva = běžná konvenční produkce

Zelená barva = bio produkce – produkt ekologického zemědělství

Z tabulky č. 2 vyplývá, že největší nárůst 22 KTJ/g vykazoval vzorek č. 16 - chléb žitný celozrnný (BIO produkce) a to z obchodní sítě Countrylife s.r.o. a nárůst 20 KTJ/g měl vzorek č. 1 - Psyllium Dr. Popov Arizona - pšeničný-žitný z obchodní sítě AHOLD Czech Republic, a.s.

V 18 vzorcích chleba nebyl prokázán žádný nárůst plísní, tedy 0 KTJ/g. 10 pozitivních vzorků bylo baleno výrobcem a 12 pozitivních vzorků bylo nebaleno. Průměrné množství plísní v kontaminovaných vzorcích bylo 8 KTJ/g, což znamená velmi nízký počet. Celkově bylo množství mikromycet zanedbatelné a nemohlo ohrozit spotřebitele. Z celkových 40 vzorků, bylo pozitivní na plísně právě 22 vzorků, tedy 55 %.

Tabulka 3 Kvalitativní zastoupení pozitivních vzorků

Vzorek	Rose Bengal agar
1.	Mycelia sterilia
5.	<i>Cladosporium</i>
7.	Mycelia sterilia
11.	Mycelia sterilia
12.	<i>Cladosporium</i>
13.	<i>Cladosporium</i> ; Mycelia sterilia
14.	<i>Cladosporium</i>
15.	<i>Cladosporium</i>
16.	<i>Cladosporium</i> ; Mycelia sterilia
17.	Mycelia sterilia
18.	<i>Mucor</i>
22.	<i>Rhizopus</i>
25.	<i>Penicillium</i>

27.	<i>Cladosporium</i>
28.	<i>Cladosporium</i> ; <i>Mycelia sterilia</i>
30.	<i>Cladosporium</i>
31.	<i>Cladosporium</i>
32.	<i>Cladosporium</i> ; Neurčeno
33.	<i>Cladosporium</i>
34.	<i>Cladosporium</i>
35.	<i>Penicillium</i> ; <i>Mycelia sterilia</i>
40.	Neurčeno

Vysvětlivky:

Modrá barva = běžná konvenční produkce

Zelená barva = bio produkce – produkt ekologického zemědělství

Tabulka č. 3 ukazuje kvalitativní zastoupení plísní. Nejvíce zastoupené bylo právě *Cladosporium*.

Tabulka 4 Zastoupení semínek a celozrnné mouky u pozitivních vzorků

Číslo	Název vzorku	Celozrnná mouka	Semínka
1.	Psyllium Dr. Popov Arizona - pšeničný-žitný	Ne	Ano
5.	Spar chléb bramborový	Ne	Ne
7.	Penam Beta chleba s ječmenem	Ano	Ano
11.	Chléb slunečnicový	Ano	Ano
12.	Mrkvový chléb žitný Řemeslná Kolářkova pekárna	Ano	Ano
13.	Radešovský bio chléb žitný	Ano	Ne
14.	Svijanská cihla Pekárna Mšeno	Ano	Ano
15.	Kváskový chléb žitný celozrnný	Ano	Ano
16.	Chléb žitný celozrnný	Ano	Ano
17.	Mrkvovo-dýňový chléb	Ano	Ano
18.	Radešovský bio chléb kváskový se špaldou	Ano	Ne
22.	Bio žitný chléb	Ne	Ne
25.	Selský chléb pšenično-žitný	Ne	Ne
27.	Špaldový křehký chlebiček	Ano	Ne
28.	Olivový chléb Řemeslná Kolářkova pekárna	Ano	Ano
30.	Chléb špaldovo-žitný celozrnný	Ano	Ne
31.	Chléb Albert světlý	Ne	Ne
32.	Severský chléb Cerea	Ano	Ano
33.	Chléb kmínový vícezrnný tmavý	Ano	Ano
34.	Cereální chléb Cerea	Ne	Ano
35.	Chléb vícezrnný tmavý	Ne	Ano
40.	Pural celozrnný žitný chléb s ovesnými vločkami BIO	Ano	Ano

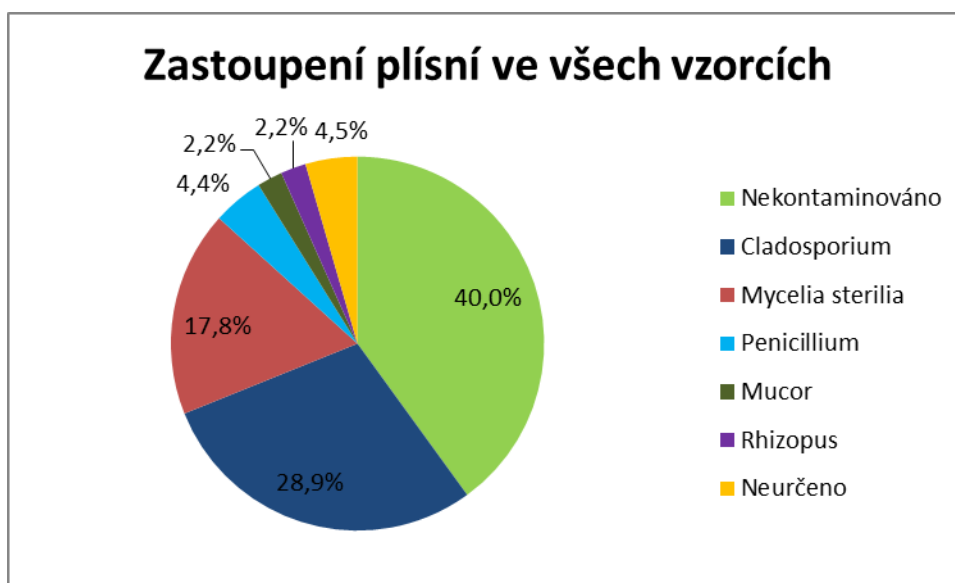
Vysvětlivky:

Modrá barva = běžná konvenční produkce

Zelená barva = bio produkce – produkt ekologického zemědělství

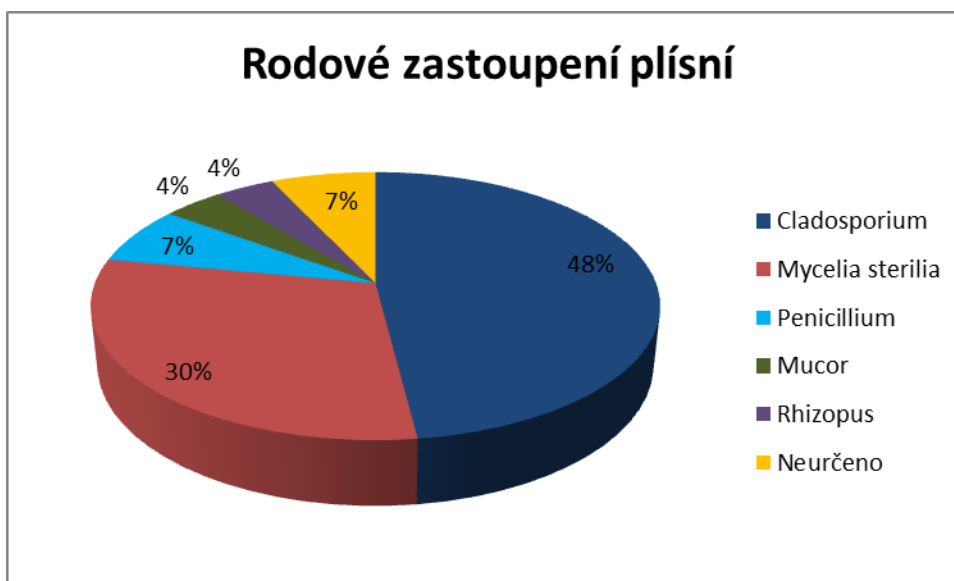
Z tabulky č. 4 vyplývá, že 14 pozitivních vzorků z 22 obsahovalo semínka a 15 vzorků bylo vyrobeno z celozrnné mouky. 11 pozitivních vzorků obsahovalo současně celozrnnou mouku a semínka.

Graf 1 Zastoupení plísni ve všech vzorcích



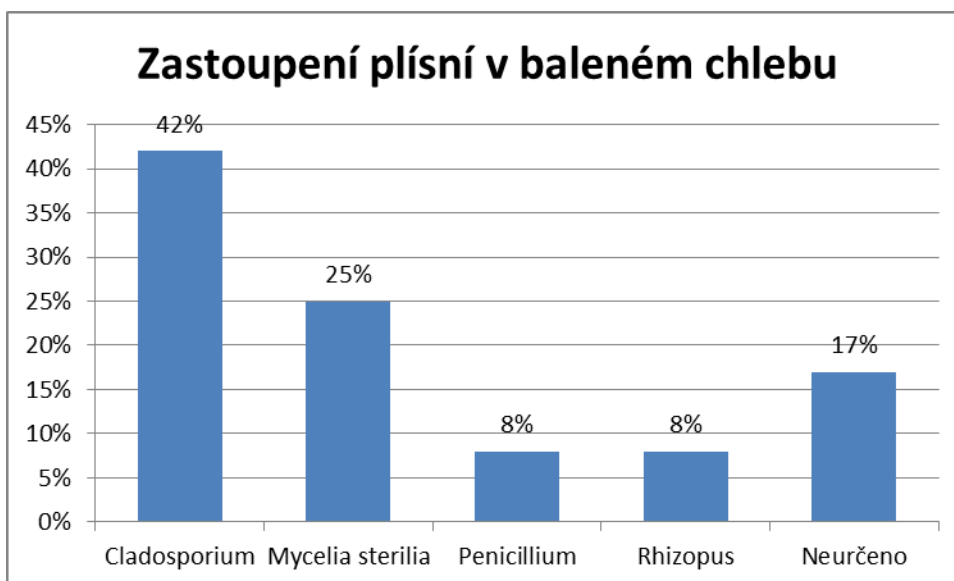
Graf 1 znázorňuje zastoupení plísni ve všech vzorcích. 40 % všech vzorků nebylo kontaminováno. 60 % kontaminovaných obsahovalo 28,9 % plísni rodu *Cladosporium*, 17,8 % plísni *Mycelia sterilia*, 4,4 % plísni rodu *Penicillium*, 2,2 % plísni rodu *Mucor* a 2,2 % plísni rodu *Rhizopus* a u 4,5 % se nepodařilo určit rod.

Graf 2 Procentuální zastoupení plísní v pozitivních vzorcích



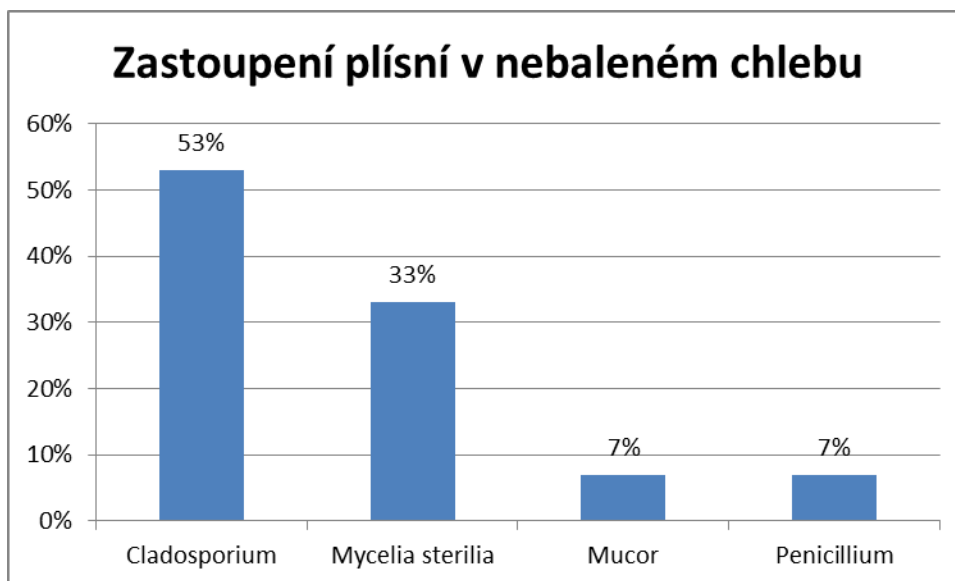
Co se týká rodového zastoupení pozitivních vzorků, graf č. 2 ukazuje, že nejvíce byl zastoupen rod *Cladosporium* a to ve 48 % všech pozitivních vzorků. Naopak nejméně zastoupený byl rod *Mucor* a *Rhizopus* se 4 % ve všech pozitivních vzorcích. *Mycelia sterilia* byla zastoupena ve 30 % pozitivních vzorcích a rod *Penicillium* v 7 %. U 7 % pozitivních vzorků se nepodařilo určit rod.

Graf 3 Zastoupení plísní v baleném chlebu



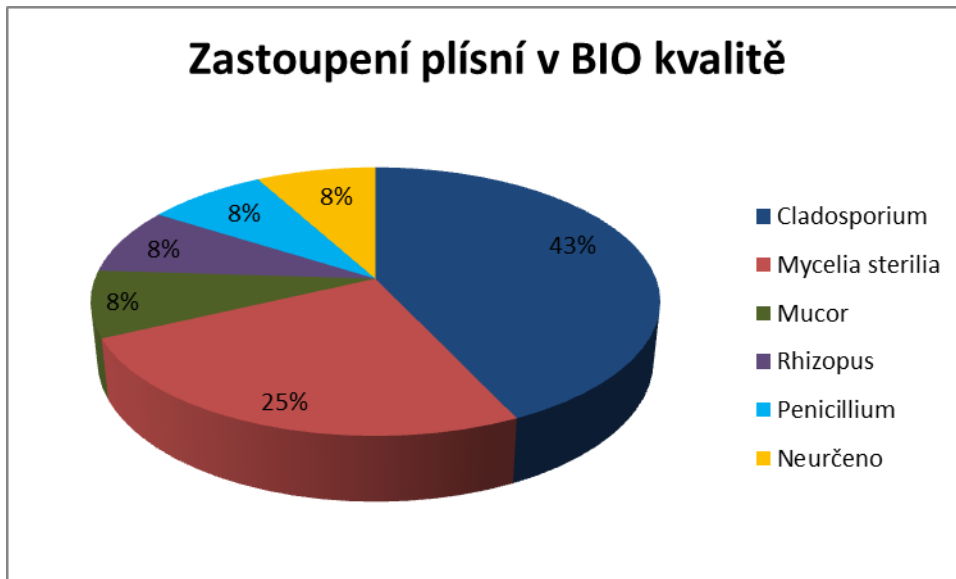
Graf 3 znázorňuje zastoupení plísní v baleném chlebu. Jak tedy z grafu 3 vyplývá, největší zastoupení měl rod *Cladosporium* a to 42 % ze všech pozitivních balených vzorků chleba. Nejméně byl zastoupen rod *Penicillium* a *Rhizopus* a to v 8 %. U 17 % pozitivních balených vzorků se nepodařilo určit rod.

Graf 4 Zastoupení plísní v nebaleném chlebu



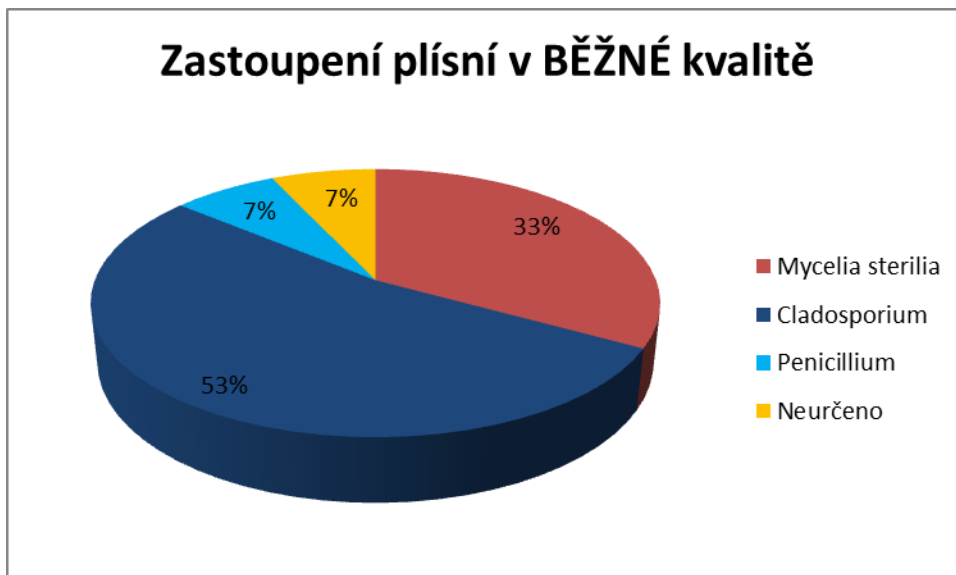
Zastoupení plísní v nebaleném chlebu bylo oproti balenému chlebu méně rozmanité. Nejvyšší hodnoty 53 % vykazoval opět rod *Cladosporium*, jak vyplývá z grafu 4. Naopak nejmenší hodnoty vykazoval rod *Mucor* a *Penicillium* a to 7 %.

Graf 5 Zastoupení plísní v BIO kvalitě



Graf 5 znázorňuje zastoupení plísní v chlebu z ekologického zemědělství. Největší zastoupení 43 % měl rod *Cladosporium*. Druhé nejvyšší zastoupení 25 % měla *Mycelia sterilia*. Nejnižší zastoupení 8 % patřilo rodům *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*.

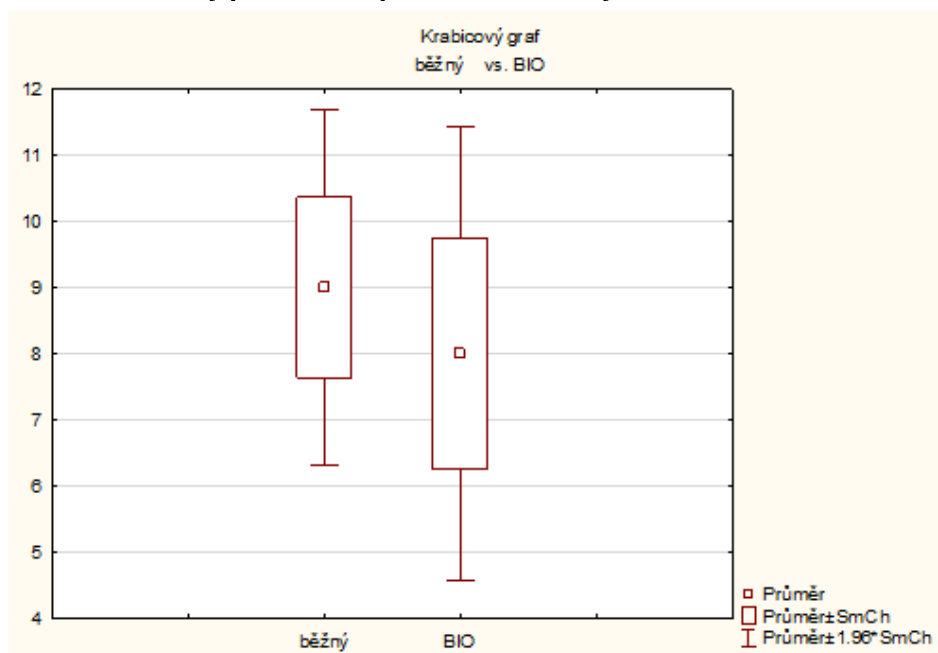
Graf 6 Zastoupení plísní v BĚŽNÉ, konvenční kvalitě



Graf 6 ukazuje zastoupení plísní v běžném chlebu z konvenčního zemědělství. Z 53 % byl tento chléb kontaminován rodem *Cladosporium*. Nejméně zastoupeným kontaminantem byl rod *Penicillium*. Oba rody se vyskytly v 7 % pozitivních vzorků.

Pro statistické hodnocení byl sledován vztah mezi běžným a BIO chlebem. Zastoupení plísní v běžné a BIO kvalitě zobrazují grafy 5 a 6, ale jak vyplývá z grafu 7, vliv kvality produkce na přítomnost mikromycet nebyl prokázán.

Graf 7 Vliv kvality produkce na přítomnost mikromycet

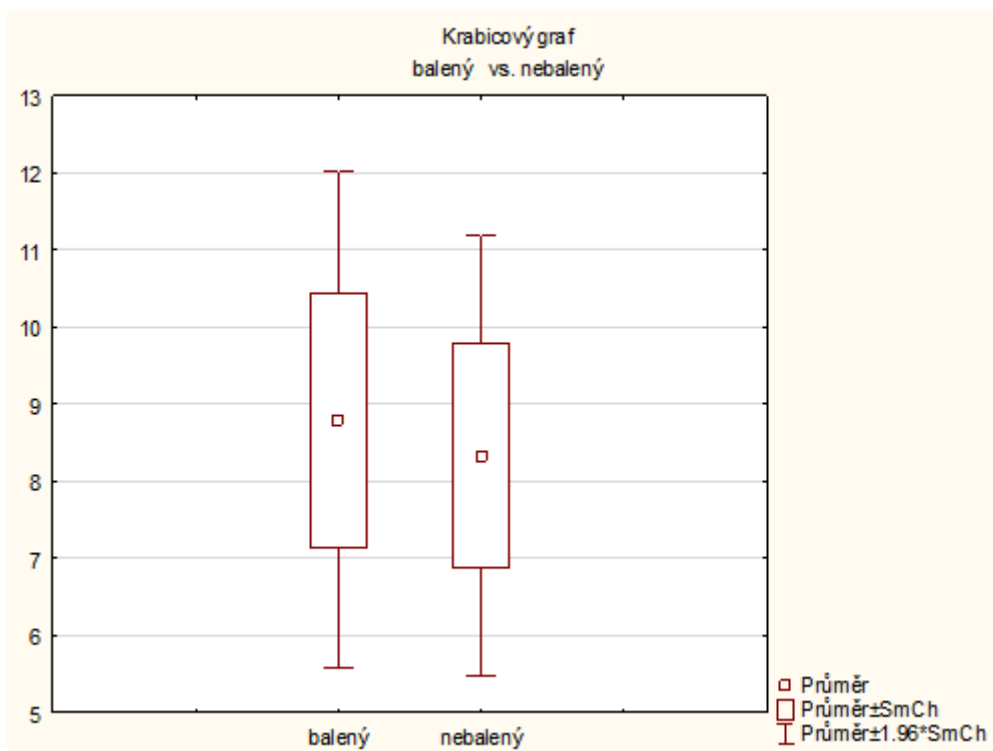


Data byla statisticky vyhodnocena na hladině významnosti α 0,05. P hodnota se rovnala hodnotě 0,6519. Ke statistickému vyhodnocení byl použit dvouvýběrový F-test.

Mezi chlebem z konvenčního a ekologického zemědělství není průkazný statisticky významný rozdíl, neboť p - hodnota je větší než hladina významnosti.

Další graf č. 8 znázorňuje statistické hodnocení vlivu balení na mykologickou kvalitu chleba.

Graf 8 Vliv balení na přítomnost mikromycet



Mezi baleným a nebaleným chlebem nebyl prokázán statisticky významný rozdíl, protože p – hodnota byla vyšší než hladina významnosti. P - hodnota se rovnala hodnotě 0,8336 a hladina významnosti α se rovnala 0,05.

Ke statistickému vyhodnocení byl použit program Statistica 12 podle dvouvýběrového F-testu.

6 Diskuze

Chléb je běžnou potravinou, která je základní složkou našeho každodenního jídelníčku. Dle české legislativy není chléb považován za mikrobiologicky rizikovou potravinu, která může působit zdravotní obtíže. Proto nejsou stanovené žádné limity pro mikroorganismy znehodnocující chléb.

V diplomové práci byl zkoumán výskyt nežádoucích mikromycet u chleba z ekologického a konvenčního zemědělství jak v balené formě, tak i v nebalené formě. Výskyt mikromycet nebyl výrazně vysoký. Dále byl sledován vliv složení výrobku na přítomnost mikromycet v chlebu.

Samapundoa et al. (2016) uvádějí, že ihned po upečení pekařské výrobky neobsahují životaschopné plísňe a kontaminace většinou probíhá z ovzduší. Pokud dojde ke kontaminaci, tak Santos et al. (2016) uvádějí, že výskyt plísní v chlebu je zastoupen zejména rody *Penicillium* a *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*. Na základě jejich studie celozrnné pšeničné mouky, celozrnné kukuřičné mouky a zrní bylo zjištěno, že v celozrnné pšeničné mouce převládaly rody *Penicillium*, *Aspergillus* a *Eurotium* a v celozrnné mouce z kukuřice převládaly rody *Penicillium* a *Fusarium*. Naopak v zrnech převládal rod *Aspergillus* a *Penicillium*. Na základě těchto údajů je možné tvrdit, že tyto plísňe se mohou promítnout do kontaminace chleba, který bude právě vyroben z celozrnné mouky jak pšeničné, tak i kukuřičné.

Z testování chlebových vzorků Tančinová et al. (2012) uvádějí, že mykologické znehodnocení je způsobeno rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* a *Rhizopus*. Tančinová et al. (2012) dále uvádějí, že rody *Aspergillus* a *Penicillium* byly testovány na schopnost produkce mykotoxinů pomocí TLC metody (chromatografie na tenké vrstvě) in vitro a bylo zjištěno, že tyto rody jsou schopny produkce kyseliny cyklopiazonové, penitremu A a roquefortinu C. Dále dodávají, že kontaminace chleba plísněmi nezpůsobuje riziko pouze požitím, ale i inhalací nebo kontaktem se znehodnoceným chlebem.

Ve vzorcích zkoumaných v diplomové práci byla zjištěna významná přítomnost plísně *Cladosporium*, která se objevila ve 48 % všech pozitivních vzorků.

Plísňe se neobjevily převážně v balených chlebech s obsahem celozrnné mouky s přídavkem malého množství semínek, nebo s obsahem naklíčeného obilí. Chléb žitný celozrnný v BIO kvalitě, nezabalený, vykazoval největší nárůst plísní *Cladosporium* a *Mycelia sterilia* a to v počtu 22 KTJ/g.

Další druh chleba, který vykazoval vyšší hodnoty, byl chléb *Psyllium* Dr. Popov Arizona (pšeničný-žitný). Chléb byl zabalen a došlo k nárůstu plísně *Mycelia sterilia* v počtu 20 KTJ/g. Důvodem kontaminace chleba může být přítomnost zrníček v jeho obsahu a na jeho povrchu. Zároveň se jednalo o krájený chléb, takže mohlo dojít ke kontaminaci již během výroby.

Dle výzkumu Ravimannana et al. (2016) dochází k růstu mikromycet již po 4 dni. Čím déle byly vzorky inkubovány, tím vyšší byl nárůst plísní. Izolovány byly rody *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium* a *Aspergillus*. Podobné rodové složení bylo zjištěno v diplomové práci, kdy byl potvrzen výskyt rodů *Cladosporium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* a *Mycelia sterilia*. Přítomnost rodu *Aspergillus* se neprokázala, což je velmi pozitivní fakt. *Aspergillus* totiž tvoří velmi nebezpečné mykotoxiny, které negativně působí i na lidské zdraví.

Na základě studie Filipović et al. (2009) se zjistilo, že kvalita chleba se s časem zhoršuje, bez ohledu na druh balení, ale balicí materiál pozitivně prodlužuje kvalitu zabaleného chleba. Trvanlivost nebaleného chleba je pouze 3 dny, pak dochází ke zhoršení jeho kvality. Balený chléb vydrží beze změn 5 až 7 dní. Balicí materiál má větší vliv na trvanlivost, než balení samotné. Nejvhodnějšími materiály jsou PET / PE, které prodlužují trvanlivost výrobku.

Dle Nguyen Van Long et al. (2016) bylo provedeno mnoho výzkumů zabývajících se antimikrobiálním balením potravin, a to i za použití fungicidních látek, které však při aplikaci tohoto aktivního balení neprokázaly výrazný vliv na snížení plísňového znehodnocení.

Obvykle se trvanlivost pekařských výrobků prodlužuje pomocí konzervantů a v některých případech se dle Samapundoa et al. (2016) do balení přidává modifikovaná atmosféra. Marin et al. (2002) zjistili, že kalciový propionát je velice účinný proti druhu *Aspergillus niger* a také vůči některým druhům *Eurotium*. Samapundoa et al. (2016) ale popisují, že mykologická aktivita je snížena pomocí fermentů (kultivovaný kukuřičný sirup a kyselina citronová, kultivované pšeničné pevné látky, kultivovaná dextróza), které snižují pH média. Jen některé druhy *Penicillium* byly odolnější vůči těmto látkám a byly schopné růstu v chlebu. Z toho lze tedy vyvodit, že tyto fermenty mohou být použity jako konzervační látky, které by nahradily běžné látky, jako například zmíněné propionáty.

Khoshakhlaha et al. (2014) zkoumali možnosti zlepšení trvanlivosti pekárenských výrobků za použití balení s modifikovanou atmosférou. Modifikovaná atmosféra se využívá hlavně pro rychle se kazící potraviny, kde složení atmosféry je jiné než vzduch. V pekárenském průmyslu se využívá oxidu uhličitého a dusíku. Dle Khoshakhlaha et al. (2014) byl účinek oxidu uhličitého (CO₂) velmi významný pro potlačení

růstu plísní, ale také i bakterií. Ale vzhledem k jeho vysoké rozpustnosti ve vodě a v lipidech má negativní dopad na balení. Naopak dusík (N₂) neprokázal antimikrobiální aktivitu, ale alespoň inhiboval rozvoj aerobního kažení díky vytvoření anaerobních podmínek. Vytvoření CO₂/N₂ atmosféry je nejlepším řešením jak předejít kažení a zároveň i zkáze balení. Další výhodou je i udržení čerstvosti chleba.

Nguyen Van Long et al. (2016) zjistili, že nanoemulze esenciálního oleje z hřebíčkového poupěte a oregana redukuje kvasinky a snižuje počet plísní v krájeném chlebu. Cinnamaldehyd se ukázal jako účinný konzervant chleba.

Jak vyplynulo z výsledků diplomové práce, rozdíl v přítomnosti mikromycet mezi balenými a nebalenými chleby nebyl významný. Statisticky nebyl prokázán vliv balení.

Dále se nepodařil prokázat statisticky významný rozdíl mezi BIO a běžným chlebem.

Co se týká složení výrobku, z 22 pozitivních vzorků obsahovalo 14 ve svém složení semínka, které mohly být zdrojem kontaminace. Dalším zdrojem kontaminace mohlo být použití celozrnné mouky, která byla součástí 15 pozitivních vzorků. 11 pozitivních vzorků obsahovalo současně celozrnnou mouku a semínka.

Na závěr lze tedy říci, že se jednalo o pozitivní zjištění. Rozmanitost mikromycet nebyla příliš vysoká a jejich množství ve vzorcích nebylo též významné. Mezi kontaminanty nebyla žádná plíseň, která by působila karcinogenně, a výskyt *Aspergillus* také nebyl prokázán. Byly identifikovány tyto rody: *Cladosporium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* a *Mycelia sterilia*. *Cladosporium* a *Penicillium* způsobují hlavně alergické reakce u citlivějších osob.

7 Závěr

Ačkoli je chléb považován za nerizikovou potravinu, bylo na základě zkoumání zjištěno, že tato komodita může obsahovat i menší podíl zdraví škodlivých plísní.

Ve zkoumaných vzorcích bylo identifikováno množství plísní maximálně do 22 KTJ/g.

Rodové zastoupení plísní nebylo příliš rozmanité; identifikovány byly rody *Cladosporium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* a *Mycelia sterilia*.

Plísně se vyskytovaly v obou druzích způsobu produkce, jak v BIO kvalitě, tak i v běžné kvalitě, s nepatrným rozdílem v přítomnosti druhu plísní. BIO kvalita navíc obsahovala rody *Mucor* a *Rhizopus*.

Z celkových 40 vzorků bylo pozitivní na plísně právě 22; 12 z konvenčního zemědělství a 10 z ekologického zemědělství. Vliv balení hrál jen nepatrnou roli v přítomnosti mikromycet.

Kontaminovaný chléb obsahoval převážně semínka jak na svém povrchu, tak i uvnitř svého složení. Lze tedy tvrdit, že hypotéza byla prokázána. Složení chleba má vliv na kvalitu výrobku.

8 Seznam použité literatury

- Banwart, G., J. 1989. Basic Food Microbiology. Chapman & Hall book NY. New York. p. 772. ISBN 9781468464535.
- Barad, S., Sionov, E., Prusky, D. 2016. Role of patulin in post-harvest diseases. Fungal biology reviews. Vol. 30 (1). 24 - 32.
- Barberán, J., García-Pérez, F., J., Villena, V., Fernández-Villar, A., Malmierca, E., Salas, C., Giménez, M., J., Granizo, J., J., Aguilar, L. 2017. Development of Aspergillosis in a cohort of non-neutropenic, non-transplant patients colonised by *Aspergillus* spp. BMC Infectious Diseases. 2017 (1). Online.
- Beranová, M. 2005. Jídlo a pití v pravěku a ve středověku. Academia. Praha. 345 s. ISBN: 8020013407.
- Bowman, S., Free, S. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. Bioessays. Vol. 28 (8). 799 – 808.
- Carlile, M., Watkinson, S., Gooday, G. 2001. The Fungi. Gulf Professional Publishing. p. 588. ISBN: 9780127384467.
- Dijksterhuis, J. Samson, R. 2007. Food Mycology – A multifaceted approach to fungi and food. Boca Raton. CRC Press. p. 403. ISBN: 9780849398186.
- Filipović, N., Lazić, V., Filipović, J., Simović-Šoronja, D. 2009. Influence of packaging material characteristics on shelf-life and quality of mixed corn bread. Food Processing, Quality and Safety. Vol. 3-4. 65-68.
- Görner, F., Valík, Ľ. 2004. Aplikovaná mikrobiológia požívatin. Malé centrum. Bratislava. 528 s. ISBN: 8096706497.
- Hampl, B., Šilhánková, L. 1957. Klíč k určování technicky důležitých plísní. Státní nakladatelství technické literatury. Praha. 130 s.
- Jesenská, Z. 1987. Mikroskopické huby v požívatinách a v krmivách. Alfa. Bratislava. 319 s.

- Kalhotka, L. 2014. Mikromycety – vláknité mikromycety (plísňe) a kvasinky – v prostředí člověka. Mendelova univerzita v Brně. 78 s. ISBN: 9788073759438.
- Khoshakhlaha, K., Hamdamia, N., Shahedia, M, Le-Bailc, A. 2014. Quality and microbial characteristics of part-baked Sangak bread packaged in modified atmosphere during storage. *Journal of cereal science*. Vol. 60 (1). 42 – 47.
- Legan, J., D. 1993. Mould spoilage of bread: The problem and some solutions. *International biodeterioration and biodegradation*. Vol. 32. 35-53.
- 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.
- Marin, S., Guynot, M., E., Neira, P., Bernadó, M., Sanchis, V., Ramos, A., J. 2002. Risk assessment of the use of sub-optimal levels of weak-acid preservatives in the control of mould growth on bakery products *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 79 (3). 203–211.
- Montville, T., J., Matthews, K., R. 2008. *Food microbiology: An introduction*. ASM Press. Washington, DC. p. 428. ISBN: 9781555813963.
- Murphy, A., P., Hendrich, S., Landgren, C., Bryant, C., M. 2006. Food Mycotoxins: An Update. *Journal of food science*. Vol. 71 (5). 51 – 65.
- Nguyen Van Long, N., Joly, C., Dantigny, P. 2016. Active packaging with antifungal activities. *International journal of food microbiology*. Vol. 220. 73 – 90.
- Ogórek, R., Lejman, A., Pusz, W., Miłuch, A., Miodyńska, P. 2012. Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi. *Mikologia Lekarska*. Vol. 19 (2). 80 – 85. ISSN: 1232-986X.
- Olsen, M., Magan, N. 2004. *Mycotoxins in food: detection and control*. Woodhead Publishing Ltd. Cambridge England. p. 471. ISBN: 1855737337.
- Ostrý, V. 1998. Vlákňité mikroskopické houby (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. Státní zdravotní ústav. Praha. 20 s. ISBN: 8070711027.

- Prugar, J. (ed). 2008. Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský. Praha. 327 s. ISBN: 9788086576282.
- Příhoda, J., Humpolíková, P., Novotná, D. 2003. Základy pekárenské technologie. Pekař a cukrář s.r.o. Praha. 363 s. ISBN: 8090292216.
- Ravimannan, N., Sevel, P., Saarutharshan, S. 2016. Study on fungi associated with spoilage of bread. International journal of advanced research in biological sciences. Vol. 3 (4). 165-167. ISSN: 23488069.
- Samapundoa, S., Devliegherea, F., Vromanb, A., Eeckhouta, M. 2016. Antifungal activity of fermentates and their potential to replace propionate in bread. LWT - Food Science and Technology. Vol 76 (A). 101–107.
- Santos, J., L., P., Bernardi, A., O., Morassi, L., L., P., Silva, B., S., Copetti, M., V., Sant'Ana, A., S. 2016. Incidence, populations and diversity of fungi from raw materials, final products and air of processing environment of multigrain whole meal bread. Food Research International, Vol. 87. 103–108.
- Saranraj, P., Geetha, M. 2012. Microbial spoilage of bakery products and its control by preservatives. International journal of pharmaceutical & biological archives. Vol. 3 (1). 38-48. ISSN: 09763333.
- 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. Vol. 1. 813-818.
- 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.

Weeks, B., S., Alcamo, I., E. 2008. Microbes and society. Jones and Bartlett Publishers, Inc. Sudbury, MA. p. 462. ISBN: 9780763746490.

Zain., M., E. 2010. Impact of mycotoxins on humans and animals. Journal of Saudi chemical society. Vol. 2011 (15). 129 – 144.

Zavřelová, M. 2014. Složení zrna ječmene z hlediska potravinářského využití. Kvasný Průmysl. Vol. 60 (5). 127 – 130.

INTERNETOVÉ ZDROJE:

Dřížal, J. 2010. Chléb v proměnách staletí. Tisková zpráva PSPaC v ČR. Konference ke světovému dni chleba (online). [cit. 9.2.2017]. 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>.

Faměra, O., Hrušková, M. 2000. Hodnocení mlynářské jakosti odrůd ozimé pšenice. Agris (online). [Citováno dne 27.2.2017] Dostupné z <<http://www.agris.cz/clanek/107621/hodnoceni-mlynarske-jakosti-odrud-ozime-psenice>>.

Hamr, K. Chléb – jeho druhy a hlavní vady [online]. Státní zemědělská a potravinářská inspekce. 15.7.2015 [cit. 2016-10-10]. Dostupné z <<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1000770&docType=ART&nid=11342>>.

IFOAM (online). [Citováno dne 18.12.2016] Dostupné z <<https://www.ifoam.bio/en>>.

Mikulášová, J. 2011. Czech Republic: Organic (online). United States Department of Agriculture, Foreign Agriculture Service. [Citováno dne 18.12.2016]. Dostupné z <http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Organic_Prague_Czech%20Republic_4-21-2011.pdf>.

Suková, I. 2012a. Metody snižování mikrobiální kontaminace mouky. Agronavigátor (online). [Citováno dne 18.12.2016] <<http://www.agronavigator.cz/service.asp?act=print&val=121916>>.

Suková, I. 2012b. Nová pravidla pro označování biopotravin. Bezpečnost potravin A-Z (online). [Citováno dne 18.12.2016] Dostupné z <<http://www.bezpecnostpotravin.cz/nova-pravidla-pro-oznacovani-biopotravin.aspx>>.