

Mendelova univerzita v Brně
Agonomická fakulta
Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin



**SLEDOVÁNÍ ÚROVNĚ MIKROBIÁLNÍ KONTA-
MINACE VYBRANÝCH DRUHŮ ČAJŮ**

Diplomová práce

Vedoucí práce:
Ing. Libor Kalhotka, Ph.D.

Vypracoval:

Bc. Viktor Polášek

Brno 2016

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci:.....
vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 Autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity o tom, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

Podpis:.....

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Ing. Liboru Kalhotkovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, které mi při tvorbě této diplomové práce poskytl a také za pomoc při mikrobiologických rozborech. Můj dík patří také celému Ústavu agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin. Děkuji i svým rodičům za podporu a umožnění studia.

Abstrakt

Tato diplomová práce popisuje historii čaje, jeho charakteristiku, výrobu, chemické složení a vliv na lidský organismus a legislativní požadavky. Byly zde popsány mikroorganismy, které by mohly kontaminovat čaje, produkty jejich metabolismu, které mají negativní vliv na lidské zdraví (především mykotoxiny) a boj proti těmto mikroorganismům. V experimentální části práce byly stanoveny počty významných skupin mikroorganismů v suchých listech i v hotovém nálevu.

Klíčová slova:

čaj, plísně, *Aspergillus*, *Penicillium*

ABSTRACT

This Diploma thesis describes the history of tea, its characteristic, technologic processing, chemical structure and effect on human organism, as well as requirements of legislation. This is followed by characterization of microbes which contaminate teas, products of their metabolism which have negative effects on human health (especially mycotoxins) and struggle against these microbes. Experimental part is orientated on assignment of significant groups of microbes in samples of tea in draw leaves and prepared tea.

Key words:

tea, fungi, *Aspergillus*, *Penicillium*

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
2.1	Historie čaje	9
2.2	Charakteristika čaje	12
2.3	Sklizení čaje	13
2.4	Druhy čaje	14
2.5	Kvalita čaje	14
2.6	Technologické zpracování čaje	15
2.6.1	Černý čaj	15
2.6.2	Zelený čaj	17
2.6.3	Částečně fermentovaný čaj (oolong)	17
2.6.4	Bílý čaj	18
2.6.5	Pu-erh (červený čaj)	18
2.7	Skladování čaje	19
2.8	Legislativa	20
2.8.1	Mikrobiologické požadavky na čaje	21
2.9	Chemické složení a zdravotní účinky čaje	22
2.10	Mikroorganismy kontaminující čaje	25
2.10.1	Bakterie	25
2.10.1.1	<i>Bakterie, které by se mohly vyskytovat v čajích</i>	25
2.10.1.2	<i>Spory bakterií</i>	29
2.10.1.3	<i>Význam spor v potravinářském průmyslu</i>	30
2.10.2	Mikroskopické houby	30
2.10.2.1	<i>Metabolismus hub</i>	30
2.10.2.2	<i>Kvasinky, které by se mohly vyskytovat v čajích</i>	31
2.10.2.3	<i>Plísně</i>	32
2.10.2.4	<i>Plísně, které by se mohly vyskytovat v čajích</i>	32
2.10.2.5	<i>Mykotoxiny</i>	35
2.10.2.6	<i>Prevence výskytu mykotoxinů v potravinách</i>	37
2.11	Boj proti mikroorganismům	38
3	CÍL PRÁCE	39
4	MATERIÁL A METODY ZPRACOVÁNÍ	40
4.1	Charakteristika materiálu	40
4.2	Příprava laboratorních pomůcek	41
4.3	Použité chemikálie	41
4.4	Použité laboratorní pomůcky	42
4.5	Zpracování vzorku	42
4.5.1	Rozbor suchých listů	42
4.5.2	Rozbor hotového nálevu	43
4.6	Složení a příprava živných půd	45
4.7	Složení živných půd	45

4.8	Způsob vyhodnocení výsledků	47
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	48
6	ZÁVĚR	56
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	57
8	SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ	60
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	61

1 ÚVOD

Čaj, ačkoliv u nás je dosud brán jako okrajová komodita, má ve světě status po vodě nejdůležitějšího nápoje, co se týče jeho konzumovaného množství. Rostlina *Camelia sinensis* (čajovník čínský), je znám v jihovýchodní Asii již minimálně pět tisíc let a jeho konzumace v těchto oblastech má tedy dlouhou a významnou tradici. V posledním tisíciletí se čaj rozšířil prakticky na všechny kontinenty. (THOMOVÁ, et al. 2002)

Celosvětová roční produkce představuje přibližně 3,5 milionu tun, přičemž největšími producenty jsou Čína, Indie, Srí Lanka, Keňa nebo Turecko. Při tak velkém objemu této suroviny lze říci, že má celosvětově velký ekonomický význam. (WACHENDORF, 2008)

Čaj je produkován v nejrůznějších třídách jakosti a zpracováván do podoby různých druhů, odlišujících se vzhledem, chutí i chemickým složením. Ve všech případech (pokud se jedná dle české legislativy o „pravý čaj“) se však vychází ze stejné suroviny – čajovníku čínského, případně čajovníku ázámského nebo variant kombinujících tyto dva rostlinné druhy. (THOMOVÁ, et al. 2002)

V České republice se prodají každý rok přibližně 4000 tun čaje nejrůznější kvality i druhů (což odpovídá obratu kolem dvou miliard korun). Je to asi desetkrát méně, než kávy, která se v České republice pije mnohem déle. Průměrný Čech spotřebuje ročně 270 – 280 g čaje a roční spotřeba neustále roste.

Čaj se k nám dostal poměrně nedávno. Na konci osmdesátých let, kdy lidé mohli začít cestovat do nejrůznějších států, sem začali také sypané čaje dovážet a rozšiřovalo se povědomí o tomto nápoji. Do té doby byl u nás znám pouze čaj v nálevových sáčkích, který se k nám dodával z Ruska. Tehdy sovětský svaz zásobovaly Gruzínské plantáže, které byly časem ve velkém rušeny. V poslední době se čaj v Gruzii začíná ve větším objemu opět pěstovat a dodává se i k nám ve vysoké kvalitě.

Češi mají v oblíbenosti především čaje ovocné a černé. Bylinné a zelené čaje zaostávají, avšak jejich oblíbenost v posledních letech roste.

Zájem o čaje vyšší kvality, především sypané, u nás v posledních desetiletích stoupá. Proto je dnes možné v některých čajovnách nebo specializovaných obchodech narazit na produkty, doprovázené poměrně podrobnými informacemi o jejich původu, způsobu zpracování a dalšími informacemi, jako je například pořadí sklizně, ze které daný čaj pochází. Tyto informace doprovázely čaje donedávna spíše vzácně. O zájmu o kvalitní

čaje svědčí i počet čajoven, kterých je v České republice přibližně 300. To z nás činí malou čajovnovou velmoc, avšak v pití čaje zaostáváme za některými evropskými státy, kde má pití čaje mnohem delší tradici, než je tomu u nás. K těmto státům patří například Velká Británie nebo Turecko (které je však zároveň jedním z největších světových producentů). I přes vzrůstající spotřebu kvalitních sypaných čajů u nás stále převládá zájem o levnější sáčkové varianty, z nichž některé nabízejí v poslední době také vysokou kvalitu.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Historie čaje

Čaj je jako nápoj a lék v zemi svého původu, za kterou je považována Čína, známý nejméně od doby 2500 let př.n.l. Za tak dlouhou dobu se zde stal neodmyslitelnou součástí kultury, rozšířil se mezi veškeré obyvatelstvo a je s Čínou zákonitě asociován. Název pro tento nápoj, připravený z horké vody a listů rostliny *Camelia sinensis*, případně *Camelia assamica* nebo jejich variant, je odvozen také z čínštiny. (THOMOVÁ, et al. 2002)

Historický původ čaje literatura přesně neobjasňuje, objevují se v ní však nejrůznější legendy popisující objevení tohoto nápoje. Nejslavnější z nich připisuje objevení čaje a jeho účinků na lidský organismus bájnému císaři Šen-nungovi, jenž byl jedním ze tří bájných císařů, který naučil Číňany zemědělství a léčivým účinkům mnoha bylin. Podle legendy si Šen-nung vždy převařoval vodu, kterou se chystal pít, protože zjistil, že je to velmi účinná prevence mnoha chorob. Jednou mu vítr zavál do kotlíku s vroucí vodou větvičku z čajovníku. Božský oráč (jak se mu také přezdívá) byl nadšený z chuti a osvěžujících a blahodárných účinků této rostliny a pití čaje si osvojil. Mělo to být někdy kolem roku 2700 př.n.l. (THOMOVÁ, et al. 2002)

Druhá neznámější, mnohem mladší legenda pochází z Japonska a vypráví příběh o zvěstovateli zen-budhismu, indickému mnichovi Bódhidharmovi. Ten po roce 520 n.l. přišel do Číny z Indie, aby zde předvedl účinky meditace. Po devítiletém meditování přepadl Bódhidharmu spánek. To ho natolik rozhořčilo, že aby se podobný incident už nemohl opakovat, odříznul si obě oční víčka a zahodil je na zem. Z jeho víček potom vyrostly dva čajovníky. Tato legenda poukazuje na povzbuzující účinky čaje, pro které je známý. (SKÁCEL, 2006)

Pěstování čaje jako kulturní plodiny je datováno přibližně 2500 let nazpět. Využíván byl zpočátku především jako léčivá rostlina. Později se začal konzumovat ve velkém a na císařský dvůr byla jako daň odváděna značná část produkce. V pátém století se s čajem začalo obchodovat a v té době se začal používat taktéž jako platidlo. Čaj slisovaný do cihlíček se směňoval za cokoliv. Nikolaj Michajlovič Prževalský, slavný ruský cestovatel ve svých poznámkách ze tříleté cesty po Mongolsku, Číně a Tibetu podává

svědectví o tom, že „mezi mongolskými kmeny se čaj místo peněz používal ještě na sklonku 19. století“. (THOMOVÁ, et al., 2002)

Masivního rozšíření se čaj v Číně dočkal v 10. století, kdy bylo nutné z hygienických důvodů vodu vždy převařit. Protože čaj chutná lépe, než samotná převařená voda, zvykli si zde lidé pít čaj denně a stala se z něj neodmyslitelná součást každodenního života.

Do Japonska se čaj dostal někdy mezi lety 520 až 800 n.l. Přinesli ho buddhističtí mniši, kteří do Japonska putovali. Ti měli už dlouho čaj v oblibě a používali ho jak pro jeho zdravotní účinky, tak i k udržení fyzické a psychické kondice na svých dlouhých cestách. (WACHENDORF, 2008)

V Japonsku si novinku velmi oblíbil císař Saga a nechal čajovníky vysázet v několika provinciích poblíž hlavního města. Pití čaje se tak rychle stalo součástí života Japonců. Spojením zen-budhismu, taoismu a čajové kultury vznikl v Japonsku unikátní rituál chanoyu. Čaj se při něm připravoval způsobem, jakým se v Číně připravoval za dynastie Tchangů (618 – 907 n.l.). Tato příprava spočívá v našlehání husté pěny z práškového čaje. Stalo se to uměním zvaným Chado – cesta čaje. V Číně byl tento způsob přípravy zapomenut, v Japonsku se praktikuje dodnes a existují školy, které tomuto umění učí. (CHOW, KRAMER, 1998)

Postupně se čaj rozšířil do všech okolních zemí, jako je Thai-wan, Indie, Vietnam, Mongolsko, Tibet. Mongolové a Tibetané si bez čaje život nedovedou představit. Pijí ho celý den a vypijí ho neuvěřitelné množství. Tento nápoj jim pomáhá přežít v nehostinných horách. Zdrojem výživy těchto lidí jsou jejich jačí stáda. V jejich stravě je tedy přirozeně zastoupeno tučné maso a mléčné výrobky, které jim pomáhá strávit právě slisovaný čaj, ke kterému se přidává sůl a hodně žluklé jačí máslo. Takto připravený čaj obsahuje hodně energie a je zdrojem vitamínu C, což je důležité pro lidi, kteří vedou těžký život v chladných horách. Lisovaný čaj se využíval pro export do Tibetu. V lisované podobě je skladnější a trvanlivější, což usnadňovalo jeho převážení na velké vzdálenosti. (THOMOVÁ, et al, 2002)

Indie má také svou variantu čajovníku zvanou *Camelia assamica*. Je poněkud vyšší než čínská varianta *C. sinensis* a má značně mohutnější listy. V Indii je čaj známý velmi dlouho a od nepaměti je používán v indické medicíně ajurvédě, která využívá různých bylin rostoucích v okolí, živočišných výtažků, ale i jogínských cvičení. Ajurvéda je velice obsáhlé a staré umění a čaj, zde byl využíván jako medikament. Byl to dlouhou dobu jediný způsob využití čaje v Indii. S rozsáhlým zakládáním plantáží začali až Ang-

ličané, kteří zde profitovali díky Britské Východoindické společnosti. Angličané si čaj značně oblíbili a chtěli si zajistit vlastní produkci ve vhodných klimatických podmínkách. Indický čajový průmysl existuje teprve asi 180 let. (THOMOVÁ, et al., 2002)

Od 16. století se čaj díky námořníkům a misionářům dostává do Evropy. Obchod s čajem začal v Holandsku. Napřed se velmi draze prodával pouze v lékárnách a přisuzovaly se mu až zázračné účinky v boji proti řadě chorob. Měl však velký úspěch a za několik desítek let byl rozšířený natolik, že bylo možné ho koupit ve všech obchodech s potravinami, ale i v hospodách. Protože se zprvu pil jen zelený čaj, který rychle stárne a ztrácí na kvalitě, bylo velmi důležité dopravit čaj z orientu do Evropy co nejrychleji. Dokonce se pořádaly soutěže, která loď přiveze čaj nejdříve. Kapitán, který to dokázal, získal velké uznání a jeho náklad byl odkoupen jako nejčerstvější za nejvyšší cenu. (THOMOVÁ, et al., 2002)

Z Holandska se čaj dostal do dalších evropských zemí a hlavně v Británii získal neobyčejnou popularitu. Vždyť kdo by nikdy neslyšel o britské zvyklosti zvané „čaj o páté“? Stejně jako měl tento nápoj mnoho stoupenců, našli se i odpůrci, kteří šířili zvěsti o tom, že poškozuje zdraví.

Kolem roku 1650 přivezli holandsští námořníci čaj na americký kontinent. Jako první do Nového Amsterodamu (dnešní New York). 16. prosince 1773 se v Bostonu odehrál incident iniciovaný americkými osadníky jako vzpoura proti britské vládě, která zdaňovala všechno zboží přivážené do Ameriky. Několik se jich přestrojilo za indiány, naskákali do tří lodí Východoindické společnosti kotvících v bostonském přístavu a vyházeli z nich do moře náklad beden s čajem. To vyústilo v revoluci, po které o devět let později byla uznána nezávislost Spojených států amerických. Tato událost je známá jako Bostonské pití čaje. (WACHENDORF, 2008)

2.2 Charakteristika čaje

Čaj v České republice označuje nápoj vzniklý louhováním listů čajovníku, případně léčivých rostlin nebo sušeného ovoce. Česká legislativa proto zavedla pojem čaj pravý. Ten označuje nápoj nebo surovinu k jeho přípravě, vyrobený pouze z listů nebo stonků čajovníku čínského. V praxi se čaj vyrábí z čajovníku čínského (*Camellia sinensis*), čajovníku indického (*Camellia assamica*) nebo jejich kříženců. (THOMOVÁ, et al., 2002)

Čajovník čínský je stálezelená rostlina z rodu *Camellia* čeledi čajovníkovité, rostoucí v tropech a subtropích jihovýchodní Asie. *Camellia sinensis* je původně strom, avšak pěstovaný je ve formě keře zhruba jeden metr vysokého. Kulturně je čajovník pěstován v takové velikosti, která umožňuje snadný sběr lidem nebo strojům. Sklizeň je dnes již prakticky na všech větších plantážích prováděna strojově. Proces výroby je v dnešní době téměř zcela mechanizován, s ručním zpracováním se lze setkat většinou u malých výrobců nebo u čajů velmi vysoké kvality, které taktéž nebývají vyráběny v příliš velkých objemech. V přírodě dorůstá čajovník 3 – 4 metrů, výjimečně okolo deseti metrů. Pěstuje se v nadmořských výškách zpravidla od 600 do 2500 metrů nad mořem. Je to houževnatá rostlina, které nevadí ani vysokohorský chlad, ideální teplota pro pěstování je však mezi 18 a 28 °C. V nížinách se čaj pěstuje například v Indii v oblasti Assam. Rostlině vyhovuje dostatek slunečního světla. Ve vysokých horách, kde převládá oblačnost však mohou listy pomalu dozrávat do nejjemnějších chuťových detailů a tyto čaje pak bývají velmi ceněny. Nedostatek světla k vytvoření požadované chuti se využívá v Japonsku při výrobě čaje Gyokuro. Rostliny pro zpracování na tento čaj se na poslední 2 až 3 týdny před sklizní zastíňují rohožemi, aby se v listech vytvořilo více chlorofylu.

Druhý významný druh *Camellia assamica* (čajovník indický) roste v tropických oblastech Indie. Oproti čínské variantě se v přírodě vyskytuje jako strom s velkými listy, dorůstající 15 – 20 m, který také vyžaduje více tepla. Stejně jako čajovník čínský se pěstuje ve formě malého keře, vhodného pro sběr. (WACHENDORF, 2008)

Rozmnožování se v současnosti provádí hlavně řízkováním vybraných matečných rostlin. Dříve se čaj pěstoval ze semen nebo odnoží. Než je z rostliny možné sklízet listy pro výrobu suroviny, je nutné řízky během prvních tří let seřezávat. Teprve potom je možné provádět první sklizeň. (WACHENDORF, 2008)



Obr. č. 1: *Camellia sinensis* (<http://thepoisondiaries.tumblr.com>)

2.3 Sklizeň čaje

Sklizeň se provádí několikrát ročně, podle toho, jak dorůstají lístky. Ty jsou sbírány buď ručně nebo strojově. Ruční sběr je ve většině pěstitelských zemí prací žen. Je to náročná práce, která však umožňuje, na rozdíl od použití strojů, odlišování starších a mladších lístků, což je důležité pro zařazení do jakostních tříd.

První jarní sklizně některých odrůd začínají již v únoru. První čaje v roce bývají nejčerstvější, plné bílých ochmýřených výhonků.

Jako příklad označování sklizní podle pořadí v roce u čajů z oblasti Darjeeling:

- First Flush: probíhá od března do poloviny dubna.
- In between: od dubna do poloviny května.
- Second Flush: silně kořeněný čaj sklizený v létě od května až června.
- Autumnal: podzimní sklizeň probíhající v říjnu a listopadu poskytuje čaje, které nepatří mezi nejlepší, avšak mají dobrou, zakulacenou chuť.

Na Srí Lance nebo na Sumatře se čaj může sklízet celoročně. (WACHENDORF, 2008)

2.4 Druhy čaje

Základními druhy čaje jsou černý, zelený, oolong, a bílý. Všechny pocházejí z listů *Camelia sinensis*, *Camelia assamica* nebo jejich kříženců. Rozdíl mezi těmito čaji je způsoben odlišnými postupy zpracování jednotlivých druhů.

- **černý čaj** – fermentovaný (oxidovaný)
- **zelený čaj** – nefermentovaný
- **oolong** – částečně fermentovaný
- **bílý čaj** – tipsový čaj z nejmladších ochmýřených výhonků

Druhy se tedy liší hlavně tím, jestli u nich proběhla fermentace. Ve skutečnosti ale fermentace není správný název tohoto procesu, ačkoliv je často v literatuře používán. Ve skutečnosti se jedná o oxidaci polyfenolů vzdušným kyslíkem za přítomnosti enzymů obsažených v listové šťávě. Fermentace oproti tomu znamená kvašení mikroorganismy. Mikrobiálním zráním je známý pouze jeden druh čaje pocházející z Číny a tím je pu-erh. (THOMOVÁ, et al., 2002)

2.5 Kvalita čaje

Kvalitu určuje hlavně to, z jakých listů byl čaj vyroben. Záleží na celistvosti listu, jeho poloze na větvičce i pořadí sklizně, ze které pochází. Tyto informace se často vyskytují na obale v podobě zkratk.

Podle celistvosti se rozlišuje:

- **čaj listový (leavs)** – kvalitní čaj z celých neporušených listů,
- **čaj zlomkový (broken)** – méně kvalitní,
- **drt' (fanning)** – používá se v čajových směsích,
- **prach (dust)** – prodává se v nálevových sáčcích. (WACHENDORF, 2008)

Pořadí lístku na větvičce určuje z velké části kvalitu produktu. Sbírá se výhonek (tip) a dva až pět k němu přilehlých lístků. Ty se označují jako:

- **Flowery orange pekoe (FOP)** – tip a první list, vyrábí se z něj ty nejkvalitnější sorty.
- **Orange pekoe (OP)** – standardní čaj dobré kvality.
- **Pekoe (PEK)** – druhý lístek, čaje střední kvality.
- **Pekoe souchong (PS), Souchong (S) a Congo (C)** – třetí až pátý list, méně kvalitní čaje, které se často konzumují v pěstitelských zemích.

Pro výrobu kvalitních zelených a černých čajů se používá tip a první dva listy, dobré oolongy a pu-erh se dají vyrobit ze všech pěti listů. (THOMOVÁ, et al., 2002)

Podle sklizně:

- **First flush (FF)** – první sklizeň.
- **Second flush (SF)** – druhá sklizeň.
- **Third flush (TF)** – třetí sklizeň.

Někdy se vysoce kvalitní čaje označují jako **Finest (F)**, **Imperiál (I)** nebo **Extra (Ex.)**. Vysokoá kvalita čínských čajů bývá označována slovy **Mao feng**. (THOMOVÁ, et al., 2002)

2.6 Technologické zpracování čaje

2.6.1 Černý čaj

Na černém čaji lze demonstrovat výrobní proces, protože u tohoto druhu čaje zahrnuje výroba všechny technologické kroky, z nichž některé u jiných druhů výrobku chybí. Hlavní rozdíl mezi výrobou černého a zeleného čaje je krok oxidace, která má za následek ztmavnutí listů a zakulacení chuti. Ke zpracování méně kvalitních čajů se někdy používá metoda CTC (drcení, trhání, stočení). Čaj zpracovaný touto metodou mívá podobu malých kuliček a vyznačuje se zpravidla nízkou kvalitou. Ortodoxní výroba černého čaje zahrnuje tyto kroky: zavadnutí, rolování, fermentace, sušení a třídění. (THOMOVÁ, et al., 2002)

- **Zavadnutí**

První fáze technologického postupu je zavadnutí lístků, při kterém jsou listy ponechány na vzduchu a ztrácejí část vlhkosti, díky čemuž se s nimi dá následně pracovat. Zavadání trvá asi 10 hodin, po kterých jsou lístky vláčné a snesou rolování, aniž by se při něm rozdrtily. Podle doby, po kterou se nechávají listy zavadat rozeznáváme zavadání lehké, střední a těžké. (VALTER, 2010)

- **Rolování**

Rolování má za účel porušit buněčné stěny listů, ze kterých je uvolněna listová šťáva bohatá na polyfenoly. Je to předstupeň oxidace, podle potřeby se několikrát opakuje, aby následně mohla proběhnout dokonalá oxidace. Nedokonalá oxidace v důsledku nedostatečného rolování by měla negativní vliv na vzhled, chuť a tržnost hotového výrobku. Podobně jako u zavadání se i zde rozlišuje rolování lehké, střední a těžké. (VALTER, 2010)

- **Oxidace**

Tento krok se běžně označuje jako fermentace, avšak o kvašení mikroorganismy se zde nejedná. Jde o oxidaci polyfenolů obsažených v listech vzdušným kyslíkem. Reakce je podobná jako u hnědnutí rozkrojeného jablka. Antioxidanty jsou oxidovány a tmavnou. To způsobuje hnědou až černou barvu černého čaje. Oxidace je ukončena zahřevem listů, což má za následek inaktivaci enzymů, které oxidaci umožňují. Oxidace je typickým krokem pro výrobu černých čajů a její provedení má zásadní vliv na chuť a kvalitu výsledného čaje. (VALTER, 2010)

- **Sušení**

Čaj je potravina konzervovaná sušením, během kterého se obsah vody v listech sníží pod 3 %. To má zabránit mikrobiální zkažení. Listy se suší zpravidla horkým vzduchem (někdy na slunci). Část těkavých látek se během sušení z čaje vypaří. Během zahřívání horkým vzduchem se ve výrobku naopak tvoří některé specifické látky, které ovlivňují výslednou chuť. (VALTER, 2010)

- **Třídění**

Zpracovaný a usušený produkt se třídí proséváním na jednotlivé frakce podle celistvosti listů a vznikají tak jednotlivé třídy kvality. Výsledný vytříděný produkt se nakonec balí pro účely distribuce. (VALTER, 2010)

Některé druhy čajů se během zpracování tvarují do specifických tvarů, podle kterých se dá snadno poznat druh výrobku. Některé čaje se rolují do kuliček, jiné do podoby plochých nebo stočených listů. (THOMOVÁ, et al., 2002)

2.6.2 Zelený čaj

Na rozdíl od výroby černého čaje je u zeleného vynechán technologický krok oxidace. Listy se po zavradnutí zahřívají a díky působení vysoké teploty jsou inaktivovány enzymy, které oxidaci umožňují. Tento krok je specifický pro jednotlivé regiony. Zatímco v Číně se čaj zahřívá na velkých pánvích, v Japonsku se enzymy inaktivují horkou parou. Způsob inaktivace enzymů má podstatný vliv na chuť a podobu finálního výrobku a jedním ze zásadních rozdílů mezi japonskými a čínskými čaji. Oxidace u zeleného čaje tedy neprobíhá a polyfenoly jsou u něj ponechány v původní podobě. To se projevuje jak na chuti výrobku, tak hlavně na jeho zelené barvě. Obsah polyfenolů v zeleném čaji je tedy mnohem vyšší, než v čaji černém, což se projevuje také na jeho antioxidační kapacitě a potažmo na zdravotních účincích. Výroba zeleného čaje zahrnuje kroky zavradnutí, spaření, svinování, sušení, třídění. (VALTER, 2010)

2.6.3 Částečně fermentovaný čaj (Oolong)

Oolong je originální název pro čaj, u kterého proběhla jen částečná fermentace. Jedná se tedy o čaj, který je něco mezi zeleným a černým. Částečné oxidace je dosaženo tím, že se listy na rozdíl od černého čaje nerolují, ale natřepávají v koších nebo válcích a dojde k porušení listů pouze na jejich okraji, což lze pozorovat na konečném výrobku (okraje listů jsou tmavé, uprostřed list zůstává zelený). Kromě toho je oxidace ukončena dříve, než u černých čajů. Tyto čaje jsou vyhledávané především pro svou specifickou chuť. Dělí se do několika kategorií podle stupně oxidace, které byl čaj vystaven. Některé oolongy jsou oxidovány jen zlehka (např. Baozhong), jiné se mírou oxidace podobají spíše černým čajům (Bai Hao). Samozřejmě sem patří čaje s oxidací okolo 50 %. Tyto čaje jsou specifické pro Taiwan. (WACHENDORF, 2008)

2.6.4 Bílý čaj

Další specialitou mezi čaji je čaj bílý. Tyto čaje bývají jen lehce oxidovány, avšak hlavním prvkem odlišujícím od jiných čajů je obsah nejmladších výhonků, tzv. tipsů. Jsou to bílé ochmýřené pupeny, které se označují za nejkvalitnější z čajové sklizně. Vyznačují se velmi jemnými chuťovými tóny a bývají velmi ceněny. Díky nim mají tyto čaje zčásti bílou barvu. (WACHENDORF, 2008)

2.6.5 Pu-erh (červený čaj)

Čajová specialita, která má původ v jihočínské provincii Junan. Jedná se o zrající čaj záměrně naočkovaný určitými mikroorganismy, který zraje několik let. Během zrání jsou v tomto čaji přeměňovány chemické látky, které mu ve výsledku dávají specifickou chuť. Junanské čajovníky pro výrobu pu-erhů se vyznačují většími listy. Čerstvé pu-erhy mají říznější chuť, během zrání v průběhu let se chuť čaje zakulacuje. (THOMOVÁ, et al., 2002)

Často se tvrdí, že pu-erh je tím lepší, čím je starší, avšak vědecky tento fakt prokázán nebyl. Chuť čaje je individuální a zdravotní účinky závisí především na kvalitě výchozí suroviny. Kvalitní surovina pro výrobu kvalitních pu-erhů pochází ze starých čajových stromů (řádově stovky let stáří). (Li Wu, 1999)

O pu-erhu u nás koluje řada mýtů a v rámci tržní senzace mu bývají připisovány často zázračné zdravotní účinky. Faktem však je, že tyto účinky závisí na kvalitě konkrétního čaje, přičemž většina produkce jsou čaje mizerné kvality. Kvalitní pu-erhy bývají zpravidla dražší, nesou označení třídy kvality a bývají doprovázeny informacemi o původní surovině. (Li Wu, 1999)

Pu-erhy jsou specifické a na první pohled dobře rozeznatelné především svým vzhledem. Tyto čaje bývají zpravidla lisovány do různých tvarů. Nejčastější tvary lisovaných čajů jsou cihličky, koláče nebo misky. V Číně se tento čaj označuje jako červený. (THOMOVÁ, et al., 2002)



Obr. č. 2: Slisovaný Pu-erh (<http://www.teanaga.com>)

2.7 Skladování čaje

Požadavky na skladování čajů stanovuje Vyhláška 330/1997 Sb., dle které má čaj být skladován na suchém místě při vlhkosti do 75 % a teplotě kolem 25 °C. Pokud by byl čaj skladován v podmínkách s vyšší vlhkostí, mohl by navlhnout a začít plesnivět. (RŮŽIČKOVÁ, 2009)

Možností, jak snížit počty MO v hotovém výrobku, u kterého byla zjištěna vyšší, než přípustná kontaminace mikroorganismy, je ošetření čaje ozářením. Firmy se však k tomuto kroku uchylují spíše výjimečně, neboť by tato skutečnost musela být uvedena na obale a v důsledku by tak snížila prodejnost výrobku. (KOBŘLOVÁ, 2007) Podle indické studie zkoumající účinnost gama záření při mikrobiální dekontaminaci čaje má dostatečný efekt dávka ozáření 5 kGy, přičemž není snížen obsah polyfenolů, ani jiných živin. (Mishra, et al., 2006) Mikrobiální čistota produktů se zajišťuje dodržováním hygienických a sanitačních předpisů a dodržováním správné hygienické a výrobní praxe. (KOBŘLOVÁ, 2007)

2.8 Legislativa

Uvádění čaje do oběhu v České republice stanovuje zákon č. 110/1997 Sb., což je zákon o potravinách a tabákových výrobcích. Konkrétní požadavky vztahující se k čaji upravuje vyhláška č. 330/1997 Sb., která byla novelizována vyhláškou č. 91/2000 Sb.

Vyhláška definuje tyto termíny:

- **čaj** - výrobek rostlinného původu sloužící k přípravě nápoje určeného k přímé spotřebě nebo nápoj připravený z tohoto výrobku
- **čaj pravý** - čaj vyrobený z výhonků, listů, pupenů, nebo jemných částí zdřevnatělých stonků čajovníku *Camellia sinensis (Linnaeus) O. Kunze*, popřípadě jejich kombinací
- **zelený čaj** - čaj pravý, ve kterém neproběhla fermentace
- **polofermentovaný čaj (oolong)** - čaj pravý, ve kterém proběhla částečná fermentace
- **černý čaj** - čaj pravý, ve kterém proběhla plná fermentace
- **čajový extrakt** - výrobek získaný vodní extrakcí čaje sloužící po rozpuštění ve vodě k přípravě nápoje
- **instantní čaj** - instantní výrobek, obsahující čajový extrakt a jiné složky, určený k přípravě nápojů rozpuštěním ve vodě
- **ovoněný čaj** - čaj, který absorboval požadované vůně a pachy
- **ochucený čaj** - směs čaje pravého s ochucujícími částmi rostlin uvedenými v příloze č. 2, jejichž obsah nepřesahuje 50 % hmotnosti směsi
- **aromatizovaný čaj** - čaj, který obsahuje látky určené k aromatizaci
- **bylinný čaj** - čaj z částí bylin nebo jejich směsí uvedených v příloze č. 2 nebo bylin s pravým čajem nebo jejich směsí s ovocem, přičemž obsah bylin musí činit minimálně 50 % hmotnosti
- **ovocný čaj** - čaj ze sušeného ovoce a částí sušených rostlin uvedených v příloze č. 2, kde podíl sušeného ovoce je vyšší než 50 % hmotnosti

Vyhláška dělí čaj do druhů a skupin a stanovuje podrobnější pravidla pro označování čaje. Musí být označeno zda se jedná o čaj černý, zelený, polofermentovaný, ochucený, bylinný nebo ovocný. V případě, že je čaj aromatizovaný, musí být to být uvedeno na

obale.

Na obale ovocných a bylinných čajů a výrobků z nich vyrobených musí být upozornění na obsah kofeinu, pokud ho tyto výrobky obsahují. Pokud je v čaji obsažena třezalka, pohanka a římský kmín musí být na obale upozornění, že u citlivých osob může vyvolat fotosenzibilizaci.

V příloze č. 2 vyhlášky jsou uvedeny rostliny a jejich části, které lze použít k výrobě ovocných a bylinných čajů bez omezení (např. artyčok, borůvka, čajovník, dobromysl, fenykl, heřmánek, hluchavka, ibišek, jahoda, lípa, máta, mateřídouška, rooibos, růže, šípek, rybíz atd.), které do výše 30 % hmotnosti (např. bříza, chmel, citron, černý bez, kopřiva, vřes atd.) a které do výše 5 % hmotnosti (andělíka, bazalka, brusinka, cola, celer, hořec, chrpa, kurkuma, lopuch, olivovník atd.).

Ve vyhlášce jsou uvedeny i přípustné záporné hmotnostní odchylky a smyslové, fyzikální a chemické požadavky na jakost čaje. (BUREŠOVÁ, 2002)

2.8.1 Mikrobiologické požadavky na čaje

Požadavky na čaje nejsou legislativně podrobně definovány. Od roku 2008 je k dispozici norma ČSN 56 9609, která stanovuje pravidla správné výrobní praxe a kritéria pro čaje, co se týče mikroorganismů, není však závazná.

Tab. 1 Tabulka přípustných limitů mikroorganismů pro ovocné a bylinné čaje a pro zelený čaj (ČSN 56 9609, B.5.2.15)

Čaj zelený, bylinné a ovocné čaje a jejich směsi	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>m</i>	<i>M</i>
<i>Escherichia coli</i>	5	2	102	103
<i>Salmonella</i> spp.	5	0	0/10	-
Potenciálně toxikogenní plísňe <i>Aspergillus flavus</i>	5	2	103	5.10 ³

n počet vzorků určený k vyšetření, jehož účelem je rozhodnout, zda posuzovaná šarže výrobku nebo její část bude posouzena jako vyhovující nebo nevyhovující stanovených MB požadavků

m je množství MO, které se připouští u všech vzorků výběru *n*

M je množství MO, které se ještě připouští u počtu vzorků, který je nižší nebo se rovná c je rozhodnuté číslo, jímž se rozumí počet vzorků z výběru n , u nichž se připouští hodnota M

Pokud se u všech vzorků z výběru n připouští pouze hodnota m (M se nepřipouští), je hodnota c vyjádřena nulou a hodnota M proškrtnutím

2.9 Chemické složení a zdravotní účinky čaje

Léčivé účinky čaje pro lidské zdraví jsou v zemích jeho původního rozšíření známé od starověku. Byl používán jako prostředek k udržení zdraví a dobré duševní formy. Od té doby mu bylo přisuzováno množství blahodárných účinků. O těch bylo napsána řada knih a moderní vědecké výzkumy tyto dávné domněnky v mnoha případech potvrdily. (DOLBY, 2002)

Významná vlastnost čaje je, že zahání únavu. Mohou za to alkaloidy kofein, theobromin a theofylin. Příznivě ovlivňují centrální nervovou soustavu, svalový tonus, činnost plic. To všechno má za následek lepší koncentraci, zvýšený tělesný výkon, rychlejší reakce i zlepšení nálady. (THOMOVÁ, et al., 2002)

Látky, které jsou za zdraví prospěšné účinky čaje zodpovědné z velké části jsou polyfenoly. Ty tvoří zhruba třetinový podíl sušiny listů a mají antioxidační vlastnosti. Tím působí v těle jako neutralizátor volných radikálů, které se do něj dostávají z okolního prostředí i z potravy. Volné radikály jsou vysoce reaktivní molekuly, které mohou porušit buněčnou membránu a další segmenty buněk a podílet se tak na vzniku degenerativních nemocnění jako jsou rakovina, choroby srdce a cév, předčasné stárnutí a další. Polyfenoly s těmito látkami vytvářejí neškodné komplexy, které nejsou schopné v těle reagovat. Působí tedy především preventivně. Nejvyšší obsah polyfenolů má čaj zelený, kde byly v průběhu technologického procesu ponechány v přírodní formě. Oproti tomu čaj černý jich obsahuje mnohem méně. To proto, že při zpracování byly čajové lístky vystaveny oxidaci, která způsobila úbytek polyfenolů, ale také zapříčinila vznik typické barvy a chuti. (DOLBY, 2002)

Na chuť a vůni čaje mají vliv také pryskyřičné látky (3 %) a silice (0,005 %). Jejich obsah je sice nízký, ale pro čajomilce je jejich úloha nezastupitelná, neboť jsou nositeli nepřehledného množství nejjemnějších chutí a vůní. V čaji jich bylo objeveno přes pět

set. K těm nejslavnějším patří muškátelové (muškátové) aroma, jímž se vyznačují ty nejvíce jakostní čaje z himalajské oblasti Darjeeling. (VALTER, 2010)

Kromě toho čaj obsahuje řadu vitamínů, především C a E, které pročišťují tělo a posilují imunitu, vitamíny B1, B2 a B6 a vitamín P. Vedle nich také obsahuje řadu prospěšných minerálů. Jsou to draslík, hliník, hořčík, vápník, zinek, železo, fosfor, sodík, fluor a mangan. Jejich rozsah je široký, avšak i při větší konzumaci čaj poskytne jen část jejich denní potřeby. (THOMOVÁ, et al., 2002)

Díky obsahu fluoru posiluje sklovinu a působí jako prevence vzniku zubního kazu. K tomu desinfikuje ústní dutinu a je tak vhodný ke kloktání. (WACHENDORF, 2008)

Antimikrobiální účinky se dají využít mnohým způsobem. Jeho popíjení k jídlu může zabránit škodlivému účinku patogenním mikroorganismům v potravě. V Číně nebo Japonsku se pije ke každému jídlu. Lidé zde čaj používají jako aperitiv díky jeho působení v trávicím traktu. Způsobuje vylučování většího množství žaludečních šťáv a má tak dobrý vliv na trávení. (THOMOVÁ, et al., 2002)

V prevenci vysokého krevního tlaku a kornatění cév má čaj také podstatný význam. Vědecké studie napovídají, že lidé holdující čaji trpí méně často infarkty i mrtvicemi. Jeden z důvodů je jeho působení v tenkém střevě, kde zabraňuje části cholesterolu ze stravy se vstřebat. (WACHENDORF, 2008)

Někdy se čaji říká elixír života a jeho vliv na dlouhověkost je také předmětem mnoha vědeckých studií. Jedna z nich zkoumala vliv pití čaje na délku života. V této studii bylo po dobu devíti let sledováno 380 japonských žen, které se učily japonskému čajovému obřadu, jehož základní složkou je zelený čaj. Těmto ženám bylo 50 let a více. Byla zaznamenána smrt každé z nich v letech 1980 – 1988 a výsledek byl porovnáván s úmrtností ostatních žen v Japonsku. Japonci pijí obecně hodně čaje, avšak u těchto žen se předpokládala jeho nadměrná konzumace. Vědci zjistili, že z uvedené skupiny za oněch 9 let zemřelo méně žen, než je běžné. Dá se tedy předpokládat, že čaj skutečně prodlužuje život díky tomu, že je prevencí řady smrtelných chorob. (DOLBY, 2002)

Vychytávání volných radikálů, snížení vstřebatelnosti cholesterolu ze stravy, pročišťování organismu a další účinky jsou vhodnou prevencí, avšak nedá se zase říct, že čaj je všelék. Jeho pozitivní účinky se projevují při pravidelné konzumaci většího množství. Občasné nebo nízké dávky nemají velký efekt. (www.teatao.cz)

Výhodné je, že nemá téměř žádné negativní vedlejší účinky. Ty se mohou projevovat až při nemírném pití silného čaje. Patří mezi ně hlavně nespavost a chronické poruchy

spánku vyvolané předávkováním kofeinem. Akutní předávkování může vyvolat třes, roztěkanost, nervozitu. Existují vědecké studie, podle kterých může kofein způsobovat deformace plodu při těhotenství. Proto se těhotným ženám nedoporučuje pít velké množství čaje. Také lidé se srdeční arytmií by si měli na konzumaci velkého množství čaje kvůli účinkům kofeinu dát pozor.

Říká se, že některé druhy čaje, jako je pu-erh nebo oolong snižují množství podkožního tuku. Používají se proto při redukčních dietách. (THOMOVÁ, et al., 2002)

Zajímavé je, že obsah kofeinu v suchých listech čaje lze ovlivnit fermentací určitými MO. V jedné čínské studii zkoumali tento efekt u jednotlivých druhů MO a došli k závěru, že největší nárůst kofeinu v čaji byl indikován po fermentaci s přidavkem kultury *Aspergillus niger* van Tieghem. Za 16 dní sledovali nárůst obsahu kofeinu o 177,5 % z původních 3,47 % na 9,63 %. Naopak kvasinky obsah kofeinu snižovaly. (Xiaogang, et al., 2007)

Tab.2.: Složení černého čaje a jeho extraktu (% v sušině)(<http://web.vscht.cz>)

	Černý čaj	Čajový nálev
Fenolové látky původní	5	4,5
Fenolové látky oxidované	25	15
Bílkoviny	15	-
Aminokyseliny	1-4	1-3
Kofein	4	3,2
Sacharidy	7	4
Lipidy	7	-
Pigmenty	2	-
Těkavé látky	0,1	0,1
Vláknina	26	-
Popel	5	4,5

2.10 Mikroorganismy kontaminující čaje

2.10.1 Bakterie

2.10.1.1 Bakterie, které by se mohly vyskytovat v čajích

Rod *Acetobacter*

Vlastnosti a růst: Bakterie rodu *Acetobacter* mají většinou podobu gramnegativních koků nebo tyčinek. Oxidují ethanol na kyselinu octovou, acetát a laktát na CO₂ a H₂O. Při poklesu koncentrace etanolu oxidují vzniklou kyselinu octovou na až na oxid uhličitý a vodu. Jako zdroj uhlíku využívají glukózu. Rostou při teplotě 5 až 42 °C, optimum je 25 až 30 °C. Optimální pH je 5,4 až 6,3. Pod pH 4,3 nerostou.

Výskyt: Na ovoci, částech rostlin, v nápojích. Podílejí se na kažení nápojů, jako je pivo, víno nebo nealkoholické neperlivé nápoje. Využívají se k výrobě octa a kyseliny L-askorbové. (GÖRNER, VALÍK, 2004)

Významným zástupcem je např. *Acetobacter aceti*. V přírodě je to nejrozšířenější druh a využívá se k výrobě octa. (ŠILHÁNKOVÁ, 2002)

Kromě octa se využívají k výrobě vitamínu C. Jejich negativní význam v potravinářství je především octovatění piva a vína, kterému lze zabránit zamezením přístupu kyslíku k nápojům, neboť jsou striktně aerobní. (VLKOVÁ, et al., 2009)



Obr. č. 3: *Acetobacter* (<http://fineartamerica.com>)

Rod *Pseudomonas*

Vlastnosti a růst: Jsou to gramnegativní, striktně aerobní, pohyblivé tyčinky. K pohybu využívají polárních bičíků. Některé tvoří žlutozelené, modrozelené nebo zelené pigmenty. Mohou být patogenní pro lidi i pro zvířata. (VLKOVÁ, et al., 2009)

Na výživu a prostředí nejsou náročné, většinou jsou mezofilní nebo psychrotrofní. Ideální teplota je 37 až 42 °C, minimální hodnota pH je 4,5.

Výskyt: Vyskytují se ve vodě a v potravinách bohatých na bílkoviny. Kazí maso, mléko, drůbež, ryby nebo vejce, obecně tedy potraviny živočišného původu pro své proteolytické vlastnosti. Významnými druhy jsou *P. aeruginosa* nebo *P. fluorescens*. (GÖRNER, VALÍK, 2004)



Obr. č.4: *Pseudomonas* (<http://sonmucid.wordpress.com>)

Rod *Bacillus*

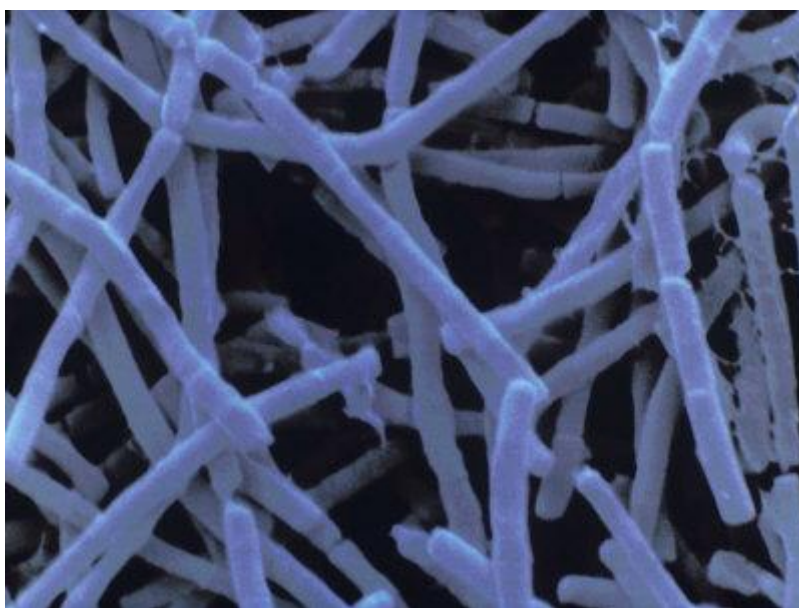
Vlastnosti a růst: Tvarem delší tyčinky, které se mohou spojovat do řetízků, schopné tvořit spory za nepříznivých podmínek. Jsou to bakterie grampozitivní, gramlabilní až gramnegativní, aerobní nebo fakultativně anaerobní. Štěpí bílkoviny za vzniku amoniaku. Fermentují sacharidy s ne příliš výraznou tvorbou kyselin a některé i s tvorbou plynu. Mají poměrně široké rozpětí pro růst vhodných podmínek. Optimální teploty a pH se velmi liší mezi jednotlivými druhy. Rostou v prostředí s pH 5,5 až 8,5. (GÖRNER, VALÍK, 2004)

Výskyt: Jedná se o rozsáhlý rod, značně rozšířený v přírodním prostředí, zejména v půdě a vodě. Odtud se mohou zejména spory dostávat do ovzduší. (KLABAN, 1999)

V potravinách se vyskytují především v tepelně upravených jídlech, které nebyly dostatečně zchladlé, nebo v dlouho skladovaném pasterovaném mléce. V konzervářství mají velký negativní význam spory termofilních druhů, které kazí nakyslé konzervy, přičemž produkují plyny. Mezi nejvýznamnější zástupce patří druhy? *B. cereus*, *B. coagulans* nebo *B. subtilis* (VLKOVÁ, et al., 2009)

Druh: *Bacillus cereus*

Je významným zástupcem tohoto rodu. Grampozitivní tyčinky mají průměr 1 μm a délku 3 až 5 μm . Roste při 10 až 48 °C. Některé kmeny vytvářejí velmi odolné spory snášející vysoké teploty a dávky ionizujícího záření. (GÖRNER, VALÍK, 2004)



Obr.č. 5: *Bacillus cereus* (<http://www.postersguide.com>)

Rod *Clostridium*

Vlastnosti a růst: Jsou to grampozitivní, anaerobní, sporulující tyčinky. Tvoří spory větší, než je šířka vegetativních buněk. Některé druhy mají silnou vlastnost rozkládat bílkoviny za nepřístupu vzduchu. Jiné druhy jsou silně sacharolytické a produkují větší množství CO_2 a H_2O . Tvorba těchto plynů se projevuje v sýrařství, kde způsobují duření sýrů (*Cl. butyricum* a *Cl. tyrobutyricum*). *Cl. butyricum* štěpí jak laktózu, tak laktáty a způsobuje proto včasné i pozdní duření sýrů, *Cl. tyrobutyricum* štěpí pouze laktáty a je zodpovědné za pozdní duření sýrů. V potravinářství má negativní význam termofilní

druh *Cl. thermosaccharolyticum*, jehož spory přežívají teploty při sterilaci kyselých konzerv, které potom kazí. Některé druhy způsobují otravy z jídla, např. *Cl. botulinum* a *Cl. perfringens*. *Cl. botulinum* produkuje nebezpečné termolabilní botulotoxiny (neurotoxiny), které však lze snadno inaktivovat varem. (VLKOVÁ, et al., 2009)

Cl. botulinum inhibuje pH 8,5 a 6,5 % NaCl. (GÖRNER, VALÍK, 2004)

Výskyt: Zástupci tohoto rodu se vyskytují v přírodě, zejména v půdě a mohou kontaminovat potraviny. *C. acetobutylicum* se průmyslově využívá k fermentační výrobě butanolu a acetonu. (GÖRNER, VALÍK, 2004)



Obr.č. 6: *Clostridium* (<http://bionews-tx.com>)

Rod *Listeria*

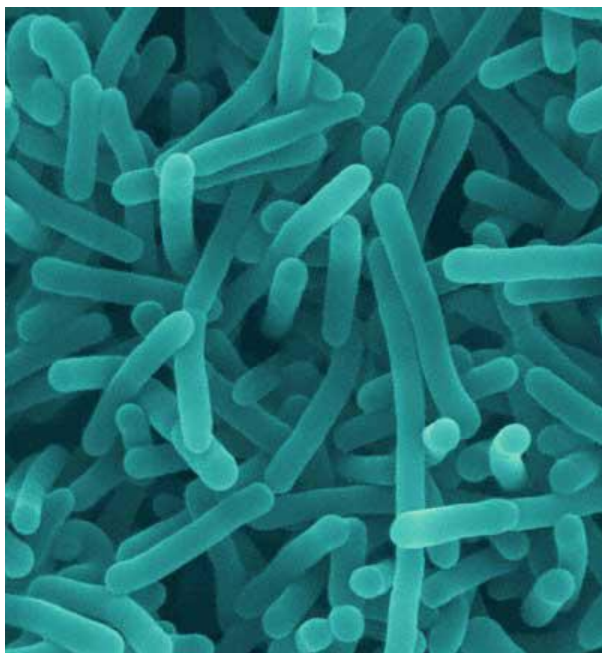
Druh *Listeria monocytogenes*

Vlastnosti a růst: Grampozitivní, fakultativně anaerobní pohyblivé tyčinky. Vyskytují se buď izolované nebo v řetízcích. Fermentují glukózu za tvorby kyselin.

Ideální teplota pro růst je 37 °C, ale roste i při 2,5 °C. Toleruje 20 % NaCl při 4 °C osm týdnů. Devitalizace trvá 10 minut při 58 až 59 °C, takže pasterační teploty pravděpodobně nepřežívá. (GÖRNER, VALÍK, 2004)

Výskyt: Nachází se na nejrůznějších místech v přírodě, ve vodě, bahně, půdě, odpadových vodách, na rostlinách, ve výkalech zvířat a lidí. Z potravin se vyskytuje především v mase a masných výrobcích. (GÖRNER, VALÍK, 2004)

Jako nemoc listerióza se vyskytuje především u starších lidí, těhotných žen a lidí se sníženou obranyschopností organismu. Toto onemocnění vykazuje poměrně velkou mortalitu, patogenní jsou však pouze některé serovary *L. monocytogenes*. Minimální infekční dávka je u rizikových skupin populace nízká (10^3), u většiny obyvatelstva je však poměrně vysoká (10^7). (KOMPRDA, 2007)



Obr.č. 7: *Listeria* (<http://www.sflorg.com>)

2.10.1.2 Spory bakterií

Když ke konci růstu klesne koncentrace živin v prostředí pod určitou hladinu, vytvoří se uvnitř buněk některých druhů bakterií válcovité až kulovité tělíčko zvané spora, vyznačující se vysokou odolností k nepříznivým podmínkám, především k vysokým teplotám a jedům. Tyto spory se tvoří u anaerobních rodů *Clostridium* a *Desulfotomaculum*, u aerobního a fakultativně anaerobního rodu *Bacillus* a malých rodů *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina* a *Oscillospira*. Takové spory vydrží až několikahodinový var. (ŠILHÁNKOVÁ, 2002)

Spora se nachází buď uprostřed buňky, na konci nebo excentricky. U některých druhů se tvoří spory, které mají větší šířku než vegetativní buňka, která pak následkem toho má se sporou vřetenovitý nebo paličkovitý tvar. To je typické pro rod *Clostridium*.

Klíčení bakteriálních spor je přeměna ve vegetativní buňku, která je opět schopna se rozmnožovat. Klíčení proběhne, pokud je spora přenesena do vhodných podmínek, mezi které patří dostatek vody a živin, vhodné pH a teplota prostředí. Klíčení spor je zcela zabráněno, pokud má pH hodnotu 4,0 nebo nižší. Toho se využívá v konzervářském průmyslu. (ŠILHÁNKOVÁ, 2002)

2.10.1.3 Význam spor v potravinářství

Schopnost přežívat extrémně nepříznivé podmínky prostředí, která je sporám vlastní, má velký negativní význam v potravinářství i kvasném průmyslu. Spory jsou termorezistentní do takové míry, že jsou usmrceny až při působení teplot 115 – 120 °C po 15 – 30-ti minutách. Při likvidaci spor záhřevem se tedy využívá skutečnosti, že kyselé prostředí snižuje jejich odolnost vůči vysokým teplotám. Naopak přítomnost základních živin, jako jsou lipidy, bílkoviny a vyšší koncentrace cukrů spory před záhřevem chrání a zvyšuje jejich odolnost. V praxi se tedy potraviny o vyšším pH, než 4, sterilují teplotami vyššími, než 100 °C. Při sterilaci výrazně kyselých potravin stačí použít teplotu 85 – 100 °C, protože v kyselém prostředí nemohou spory vyklíčit ve vegetativní buňku, pomnožit se a znehodnotit potravinu. (CEMPÍRKOVÁ, et al., 1997)

2.10.2 Mikroskopické houby

Některé druhy se významně uplatňují v potravinářském průmyslu při výrobě potravin a nápojů (pivo, víno, plísňové sýry). Jiné druhy způsobují onemocnění kůže (mykózy), sliznic a vnitřních orgánů u zvířat i lidí.

Vedle možnosti jejich využití při výrobě potravin představují v potravinářském průmyslu také značné riziko, protože mohou za vhodných podmínek znehodnotit velké množství potravinářských surovin či krmiv při skladování. (VLKOVÁ, et al., 2009)

2.10.2.1 Metabolismus hub

Mikroskopické houby jsou chemoheterotrofní organismy. energii a převážnou část stavebního materiálu získávají z látek organického původu. K přijímání živin nemají uzpůsoben žádný zvláštní aparát, látky získávají z prostředí absorpcí. Proto je pro ně důležitá produkce extracelulárních enzymů, které jim k získávání živin napomáhají.

Kromě primárního metabolismu houby produkují a vylučují do prostředí řadu různorodých chemických látek. Tyto látky jsou produkty sekundárního metabolismu. Mezi nejvýznamnější z nich patří mykotoxiny. Ty způsobují člověku celosvětově nesmírné zdravotní i materiální škody.

Ve vztahu ke kyslíku je většina hub striktně aerobní, některé jsou fakultativně anaerobní. Pro kvasinky je typická schopnost fermentace. Člověk této vlastnosti využívá odpradávně k výrobě řady potravin a nápojů (alkoholové kvašení). (MALÍŘ, OSTRÝ, 2003)

2.10.2.2 *Kvasinky, které by se mohly vyskytovat v čajích*

Rod: *Sacharomyces*

Rozmnožují se vegetativně multilaterálním pučením, přičemž netvoří pravé mycelium. Diploidní buňky se bezprostředně mění na asky.

Druh: *Sacharomyces cerevisiae*

Označuje se jako pивní, vinná, lihovarnická a pekařská kvasinka. Zkvašuje glukózu, galaktózu, sacharózu, maltózu a rafinózu. Pro jednotlivé operace se v potravinářství používají speciální kmeny, vyšlechtěné pro daný účel. Tvar je kulovitý až protáhlý, se zřetelně ohraničenou vakuolou. Buňka má rozměry 6 až 7 x 7,5 až 8,5 μm. Rozmnožují se pučením a tvoří v kapalině sediment, kterému se říká kvasnice. Jejich nejvýznamnější vlastností je anaerobní zkvašování hexózy na ethanol a CO₂. (MALÍŘ, OSTRÝ, 2003)

Rod: *Candida*

Kvasinky rodu *Candida* se rozmnožují multilaterálním pučením. Vytvářejí výrazné pseudomycelium. Některé druhy mají schopnost fermentace.

Druh: *Candida tropicalis*

Je tvořen oválnými buňkami o rozměrech 4 až 6 x 8 až 10 μm. Má silně redukční vlastnosti, může způsobovat světlání mladiny. Zkvašuje maltózu a sacharózu. Vyskytuje se na ovoci a zemědělských produktech, ale i v pivu, mléku, a mléčných výrobcích.

Druh: *Candida utilis*

Jako minerální droždí se používá ke krmným účelům. Je škůdcem při pěstování pekařských kvasnic. (MALÍŘ, OSTRÝ, 2003)

2.10.2.3 Plísně

Jsou tvořeny stélkou (thalus), jejíž základní jednotkou je hyfa. Hyfa je duté vlákno, které může být opatřeno přehrádkou (septum) nebo může být bez přehrádek. Hyfy rostou vrcholovým (apikálním) růstem a většinou se splétají a tvoří podhoubí (mycelium). Některé hyfy mají specifickou funkci. K pohlavnímu rozmnožování slouží specializované hyfy, zvané sporofory, na kterých se tvoří spory (výtrusy). Spory se rozdělují na pohlavní – meiospory a nepohlavní – mitospory, a dále podle místa vzniku na exospory a endospory. (MALÍŘ, OSTRÝ, 2003)

2.10.2.4 Plísně, které by se mohly vyskytovat v čajích

Rod: *Aspergillus*

Jednotlivé druhy se vyskytují v půdě, ve vodě, v ovzduší a kontaminují nejrůznější potraviny. Je možné je nalézt po celém světě, hojněji jsou zastoupeny v subtropických a tropických oblastech.

Pro tento rod je charakteristické hlavičkové zakončení konidioforů, které se na vrcholu rozšiřují a vytvářejí tzv. měchýřek kulovitého až elipsoidního tvaru. Tyto plísně se v půdě podílejí na rozkladu odumřelých organismů, jsou tedy saprofyty. Některé druhy žijí parazitickým způsobem života a mohou způsobovat mykotická onemocnění lidí a zvířat. Určité druhy produkují mykotoxiny a představují tak závažné zdravotní riziko pro lidi. (KLABAN, 2001)

Druh: *Aspergillus flavus*

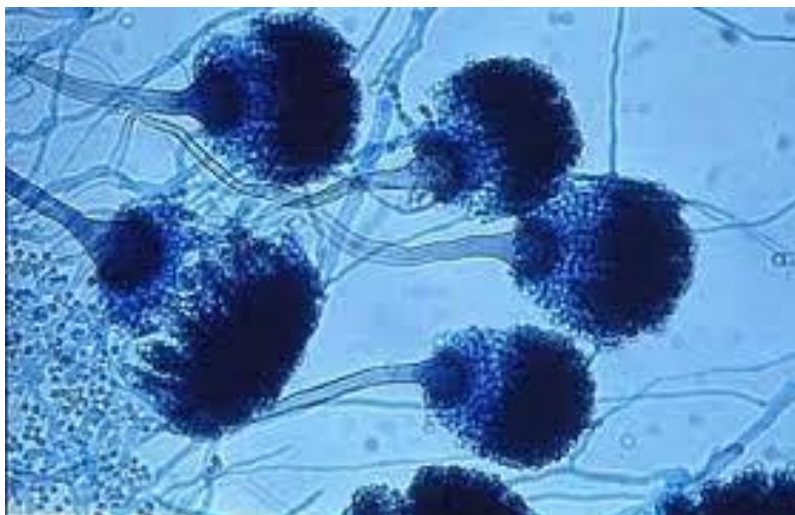
Tento druh je patogenní pro člověka i zvířata. Může vyvolat mykózy, kromě toho ale také produkuje velmi nebezpečné mykotoxiny zvané aflatoxiny. Vyskytuje se na potravinách i krmivech, má žlutou barvu.

Druh: *Aspergillus niger*

Tvoří tmavé až černé kolonie. Průmyslově se využívá k výrobě kyseliny citrónové a k přípravě enzymů. Je producentem mykotoxinů a je hojně rozšířený v přírodě i na potravinách.

Druh: *Aspergillus fumigatus*

Je původcem závažných mykóz uší, plic, pohrudnice, ale i infekce ledvin. Kromě lidí napadá hospodářská zvířata a drůbež. Produkuje toxické látky, zejména fumigaklavin A, B, C a D, spirulosin a tremorgenní mykotoxiny. Patří mezi termofilní a termotolerantní plísňe, může růst i při 50 °C. (KLABAN, 2001)



Obr. č. 8: *Aspergillus* (<http://bioweb.uwlax.edu>)

Rod: *Penicillium*

Podle morfologického uspořádání se dělí do čtyř sekcí:

- **1, Monoverticillata** – má štěteček tvořený jediným svazkem sterigmat, neboli fialid.
- **2, Biverticillata-Asymmetrica** – druhy s asymetricky utvářeným štětečkem konidioforů.
- **3, Biverticillata-Symmetrica** – mají na konci konidioforu symetricky uspořádané válcové buňky, tzv. metuly. Z každé metuly vyrůstá svazek sterigmat, které nesou konidie.
- **4, Polyverticillata** – mají konidiofory opakovaně větvené a štěteček je tvořen ze tří a více přeslenů nad sebou. Zahrnuje pouze druh *P. albicans*.

Druh: *Penicillium marnefei*

Je jediným striktně patogenním druhem, který způsobuje endemická onemocnění hlavně v Jihovýchodní Asii.

Druh: *Penicillium expansum*

Vyskytuje se hojně v přírodě a na organických zbytcích. Způsobuje hnilobu jablek.
(KLABAN, 2001)



Obr. č. 9: *Penicillium roqueforti* (<http://enfo.agt.bme.hu>)

Rod: *Fusarium*

Zástupci tohoto rodu jsou součástí půdního ekosystému, kde rozkládají organickou hmotu. Řada druhů parazituje na rostlinách, některé jsou patogeny živočichů, včetně člověka. Patří mezi významné potenciálně patogenní „polní“ plísně. (MALÍŘ, OST-
RÝ, 2003)



Obr. č. 10: *Fusarium* (<https://www.apsnet.org>)

Rod: *Cladosporium*

Plísně vyskytující se v půdě, na potravinách, skladované zelenině a obilí. Parazitují na mnoha rostlinách. (KLABAN, 2001)

2.10.2.5 *Mykotoxiny*

Mykotoxiny jsou produkovány některými plísněmi. Vyskytují se především v potravinách rostlinného původu. Do potravin se mohou dostávat několika způsoby: jako sekundární metabolity plísní, které kazí potraviny, zpracováním zaplísňených surovin s obsahem mykotoxinů, zkrmováním zaplísňených krmiv, z nichž se mohou mykotoxiny dostávat do mléka hospodářských zvířat a s tím následně i do mléčných výrobků. Kontaminace mykotoxiny je možná také použitím plísní, produkujících mykotoxiny, k výrobě potravin. (VLKOVÁ, et al. 2009)

Po bakteriální kontaminaci potravin patří mezi nejvýznamnější rizikové faktory v potravinách. Největší význam má z hygienického hlediska těchto 5 skupin mykotoxinů:

Kumarinové aflatoxiny a ochratoxiny, nivalenol (patří mezi trichoteceny), zearalenon a fumonisiny, které jsou předmětem sledování v poslední době.

Mykotoxiny se vyskytují především v cereáliích, tedy v cereálních výrobcích a v rostlinných krmivech, ze kterých se mohou dostávat sekundárně do živočišných produktů.

Podle výskytu lze mykotoxiny produkující plísně obecně rozdělit do těchto skupin:

- 1, **Plísně polní**, kterými jsou kontaminována zrna již před sklizní. Mezi nejvýznamnější zástupce polních plísní patří rod *Fusarium*.
- 2, **Plísně skladištní**, které se množí a produkují mykotoxiny v již uskladněném zrně při teplotách 10 – 50 °C a při vlhkosti zrna 13 – 18 %. Nejvýznamnějším rodem této skupiny je rod *Aspergillus*
- 3, **Plísně polní i skladištní**, které se vyskytují v zrně jak na poli, tak v uskladněné komoditě a patří sem zejména rod *Penicillium*. (KOMPRDA, 2000)

Mykotoxiny jsou po chemické a strukturní stránce velmi rozmanitou skupinou organických látek nebiłkovinné povahy. Plísně je produkují pravděpodobně jako způsob boje o přežití. Jsou toxické pro zvířata i pro člověka. V současné době je známo přes 300 mykotoxinů a objevují se další. Produkují je jak patogenní druhy, tak některé druhy kulturní mikroflóry. Tvorba mykotoxinů závisí na těchto biologických, fyzikálních a chemických

kých faktorech: vlhkost, teplota, délka skladování, poškození obalu zrna, přítomnost kyslíku, oxidu uhličitého, složení substrátu, mykologický profil plísní, sporulace, mikrobiální interakce a přítomnost hmyzu. (MALÍŘ, OSTRÝ, 2002)

Mezi nejvýznamnější mykotoxiny patří tyto zástupci:

Aflatoxiny

Aflatoxiny jsou historicky první objevenou skupinou mykotoxinů. Vyskytují se především v kukuřici, podzemnici olejné a bavlněném semeni, jsou-li tyto suroviny nevhodně skladovány při vyšší teplotě a vlhkosti. Do této skupiny patří 6 toxinů: aflatoxin B₁, aflatoxin B₂, aflatoxin M₁, aflatoxin M₂, aflatoxin G₁, aflatoxin G₂. Tyto mykotoxiny byly izolovány z mléka. Jsou termorezistentní, běžné teploty úpravy potravin přežívají. Je možné je částečně inaktivovat sterilací nebo mražením potravin.

Aflatoxiny mají chronické účinky, nezpůsobují akutní otravy. Mají karcinogenní účinky, způsobují zejména rakovinu jater, také cirhózy a fibrózy. Mohou způsobit deformaci plodu, případně potraty. Toxické jsou velmi malé dávky (tvorba tumoru již od 1 ppm). Podle zákona je sledován pouze jeden, a sice aflatoxin B₁. (Vlková, et al., 2009)

Aflatoxiny jsou produkovány rodem *Aspergillus*, především druhy *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*. (MALÍŘ, OSTRÝ, 2003)

Ochratoxin A

Je nejvýznamnější a nejtoxičtější z řady ochratoxinů. Vyskytuje se především v kukuřici, kakau, bobu, sójových bobech nebo ječmeni. Limit pro Ochratoxin A je 1 ppm. Stejně jako ostatní mykotoxiny je termorezistentní a běžný var ho nezničí. (VLKOVÁ, et al. 2009)

U ochratoxinu dochází, na rozdíl od aflatoxinů, k masivnímu přenosu z krmiva do živočišných tkání prasat a drůbeže. U skotu dochází k rychlé degradaci v předžaludku. (KOMPRDA, 2000)

Hlavní toxické účinky ochratoxinu A jsou nefrotoxicita, imunotoxicita, mutagenita, karcinogenita, teratogenita a neurotoxicita.

Ochratoxin A inhibuje syntézu proteinů. Vyskytuje se v cereáliích, vepřovém masu, krvi, vnitřnostech, kávě, koření a v zeleném čaji.

Je produkován rody *Aspergillus* a *Penicillium*, především druhem *Aspergillus ochraceus*. (MALÍŘ, OSTRÝ, 2003)

Patulin

Vyskytuje se na plesnivém pečivu, v párcích, v ovoci (jablka, hrozny, pomeranče, banány), ovocných džusech a moštech. Je karcinogenní, způsobuje gastrointestinální poruchy, otoky a krvácení orgánů. (VLKOVÁ, et al. 2009)

Je produkován především rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* a *Byssochlamys*. (MALÍŘ, OSTRÝ, 2003)

Fumonisin

Fumonisin jsou produkovány plísněmi rodu *Fusarium*. Nejčastěji se vyskytují na zrních, jako je kukuřice, rýže, proso. Jsou hepatotoxické a neurotoxické a způsobují rakovinu jícnu. Zatímco potraviny bývají kontaminovány velmi málo, krmiva pro hospodářská zvířata obsahují zpravidla velké dávky fumonisinů. (VLKOVÁ, et al., 2009)

Asorpce fumonisinů z trávicího traktu je nízká, proto se u skotu do mléka dostává pouze v nízké koncentraci. U prasat jsou po příjmu kontaminovaného krmiva cílovým orgánem játra a ledviny. (KOMPRDA, 2000)

Zearalenon

Jsou produkovány plísněmi rodu *Fusarium*. Množí se zejména na obilí za deštivého a vlhkého počasí. Objevují se na pšenici, ovsu, kukuřici, ječmenu nebo sezamu. Fumonisin mají estrogenní vlastnosti. U prasnic a myši vyvolávají ovulaci. (VLKOVÁ, et al., 2009)

2.10.2.6 Prevence výskytu mykotoxinů v potravinách

Účinný způsob eliminace mykotoxinů, které se již vyskytují v potravinách, dosud neexistuje. Byly testovány některé způsoby dekontaminace krmiv, potravin se to však netýká. Jedna z možností je ošetření krmiva amoniakem za vysoké teploty a tlaku. Obsah aflatoxinů lze snížit přidávkem sorbentů, např. aktivovaného uhlí.

Protože je eliminace těchto látek v potravinách prakticky nemožná, je nutno předejít jejich samotnému vzniku. Účinné metody prevence je omezení rozvoje plísní na zemědělských produktech, rychlé vysušení a správné skladování rostlinných produktů, zpracování pouze nezaplísňených surovin, devitalizace plísní v meziproduktech a hotových produktech sterilací nebo použitím konzervačních látek, které rozvoj plísní omezují. Samozřejmě je nutnost zabránění sekundární kontaminace potravin.

Obecně platí, že by pro výživu lidí a zvířat by neměly být použity žádné plesnivé suroviny. (VLKOVÁ, et al., 2009)

2.11 BOJ PROTI MIKROORGANISMŮM

Většina potravin, surovin a meziproduktů je vhodným substrátem pro růst a množení mikroorganismů. Musí se proto před mikroorganismy dostatečně chránit. Aby nedošlo k ohrožení zdraví konzumenta, používají se ke konzervaci potravin různé fyzikální i chemické prostředky. Způsoby se často kombinují. Kromě těchto prostředků je nutné dodržovat důslednou osobní hygienu a zabránit případné sekundární kontaminaci. Mezi fyzikální prostředky patří ošetření vysokými teplotami, skladování při nízkých teplotách, snížení aktivity vody sušením nebo odpařováním, ozáření potravin ionizujícím nebo ultrafialovým zářením. K chemickým prostředkům patří použití kyselin, zásad (změna pH), solí, dále pak ozon nebo peroxid vodíku. (ŠILHÁNKOVÁ, 2002)

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo napsat literární rešerši o čaji, zaměřit se a charakterizovat mikroorganismy kontaminující čaje, významné produkty jejich metabolismu a jejich negativní vliv na lidské zdraví. Vedle nežádoucích mikroorganismů byly také zkoumány mikroorganismy, které pozitivně ovlivňují chuť a vůni některých zrajících čajů, do kterých jsou přidávány v průběhu zpracování. Čerpáno bylo z dostupné literatury, vědeckých článků a studií. Cílem práce bylo také navrhnout opatření v boji proti těmto nežádoucím mikroorganismům a experimentálně stanovit významné skupiny mikroorganismů ve vybraných výrobcích, výsledky zpracovat a porovnat s údaji v literatuře.

4 MATERIÁL A METODY ZPRACOVÁNÍ

4.1 Charakteristika materiálu

Byl proveden rozbor mikrobiální kontaminace u těchto vzorků čaje:

- **Vzorek č. 1** – SNR – Zelený čaj jemný čínský, sypaný. Datum minimální trvanlivosti: 14.3.2015
- **Vzorek č. 2** – JP čaj černý, sáčkový. Datum minimální trvanlivosti: 25.8.2015
Hmotnost čaje v sáčku: 1,5 g
- **Vzorek č. 3** – ATL – sáčkový černý čaj. Datum minimální trvanlivosti: 12.5.2015 Hmotnost v sáčku sáčku: 2 g
- **Vzorek č. 4** – RAMIZ (2013) – Gruzínský černý čaj, sypaný. Datum minimální trvanlivosti: 15.12.2015
- **Vzorek č. 5** – ZLATÉ DRÁTKY (2011) – Gruzínský černý čaj, sypaný.
Datum minimální trvanlivosti: 15.6.2013
- **Vzorek č. 6** - ZLATÉ DRÁTKY (2011) – Gruzínský černý čaj, sypaný. Datum minimální trvanlivosti: 15.6.2013 Tento vzorek po napaření pro potřeby lisování zplesnivěl. Slouží tedy také jako referenční vzorek, silně kontaminován mikroorganismy.
- **Vzorek č. 7** – Tkibuli (2013) - Gruzínský černý čaj, sypaný. Datum minimální trvanlivosti: 12.5.2015 Pokus o úpravu chuti čaje inkubací s čajem vyšší kvality. Neškolený – výchozí čaj pro tento pokus. Pokus o úpravu chuti byl proveden amatérským experimentátorem.
- **Vzorek č. 8** – PPS - Gruzínský černý čaj, sypaný. Pokus o úpravu chuti čaje inkubací s čajem vyšší kvality. Školený za sucha.
- **Vzorek č. 9** – PPV - Gruzínský černý čaj, sypaný. Pokus o úpravu chuti čaje inkubací s čajem vyšší kvality. Školený za zvýšené vlhkosti.
- **Vzorek č. 10** – CNNP –Sheng Puer, čínský zelený čaj, lisovaný. Čaj ošetřený žlutou plísní, zrající. Datum minimální trvanlivosti: čaj určený k delšímu zrání.
- **Vzorek č. 11** – Liuan (2004) – čínský zelený čaj, sypaný. Lisovaný do bambusového košíku, zrající. Čaj ošetřený žlutou plísní, pravděpodobně stejnou, jako vzorek č. 10. Datum minimální trvanlivosti: čaj určený k delšímu zrání



Obr. č. 11: Vzorky čaje k analýze (zleva vzorek č. 1, 4, 5, 6)

4.2 Příprava laboratorních pomůcek

Laboratorní sklo použité při analýze bylo sterilizováno v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 165 °C po dobu 60 minut. Erlenmayerovy baňky s živnými půdami a zkumavky s fyziologickým roztokem byly sterilizovány v parním sterilizátoru při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Byly použity Erlenmayerovy baňky o objemu 500 ml a 1 l , odměrné válce o objemech 200 ml a 1000 ml, zkumavky s 9 ml fyziologického roztoku, pipety a váženky.

4.3 Použité chemikálie

- Kyselina octová
- Hydroxid sodný
- Destilovaná voda
- Chlorid sodný

4.4 Použité laboratorní pomůcky

Bakteriologické zkumavky, pipety o objemu 10 ml, mikropipety, špičky, sterilní Petriho misky, Erlenmayerovy baňky o objemu 500 ml, kádinky o objemu 400 ml, odměrný válec o objemu 11 a 100 ml, sterilní alobalové váženky.

4.5 Zpracování vzorku

4.5.1 Rozbor suchých listů

- **Vzorek č. 1** – 2 g sypaného zeleného čaje SNR bylo vytřepáno na třepačce 1 minutu ve 100 ml fyziologického roztoku.
- **Vzorek č. 2** – ze sáčku černého čaje JP byl odstřížen provázek s lístkem a sáček o celkové hmotnosti 1,607 g (hmotnost čaje v sáčku byla 1,5 g) byl vytřepán na třepačce 1 minutu ve 100 ml fyziologického roztoku.
- **Vzorek č. 3** – ze sáčku černého čaje ATL byl odstřížen provázek s lístkem a sáček o celkové hmotnosti 2,265 g (hmotnost čaje v sáčku byla 2 g) byl vytřepán na třepačce 1 minutu ve 100 ml fyziologického roztoku.
- **Vzorek č. 4** – 2 g sypaného černého čaje RAMIZ (2013) bylo vytřepáno na třepačce 1 minutu ve 100 ml fyziologického roztoku.
- **Vzorek č. 5** – 2 g sypaného černého čaje ZLATÉ DRÁTKY (2011) bylo vytřepáno na třepačce 1 minutu ve 100 ml fyziologického roztoku.
- **Vzorek č. 6** - 2 g plesnivého sypaného černého čaje ZLATÉ DRÁTKY (2011) bylo vytřepáno na třepačce 1 minutu ve 100 ml fyziologického roztoku. Tento vzorek byl použit jako výchozí surovina pro výrobu lisovaného čaje prodejcem. Vzorek po napaření pro potřeby lisování zplesnivěl. Slouží tedy také jako referenční vzorek, silně kontaminován mikroorganismy.
- **Vzorek č. 7** – 2 g sypaného černého čaje PPN - Gruzínský černý čaj, sypaný (pokus o úpravu chuti čaje inkubací s čajem vyšší kvality; neškolený – výchozí čaj pro tento pokus) - bylo vytřepáno na třepačce 1 minutu ve 100 ml fyziologického roztoku.

- **Vzorek č. 8** – 2 g sypaného černého čaje PPS - Gruzínský černý čaj, sypaný (pokus o úpravu chuti čaje inkubací s čajem vyšší kvality; školený za sucha) - bylo vytřepáno na třepačce 1 minutu ve 100 ml fyziologického roztoku.
- **Vzorek č. 9** – 2 g sypaného černého čaje PPV - Gruzínský černý čaj, sypaný (pokus o úpravu chuti čaje inkubací s čajem vyšší kvality; školený za zvýšené vlhkosti) - bylo vytřepáno na třepačce 1 minutu ve 100 ml fyziologického roztoku.
- **Vzorek č. 10** – 2 g lisovaného zeleného čaje CNNP –Sheng Puer (ošetřeného žlutou plísní) bylo vytřepáno na třepačce 1 minutu ve 100 ml fyziologického roztoku.
- **Vzorek č. 11** – 2 g sypaného zeleného čaje LIUAN (ošetřeného žlutou plísní) bylo vytřepáno na třepačce 1 minutu ve 100 ml fyziologického roztoku.



Obr. č. 12: Vzorky čaje Zlaté drátky, vpravo je zaplísňený vzorek

4.5.2 Rozbor hotového nálevu

- **Vzorek č. 12** – navážka 2 g zeleného sypaného čaje SNR byla zalita 200 ml horké vody a ponechána 3 minuty louhovat.
- **Vzorek č. 13** – sáček černého čaje JP (hmotnost čaje 1,5 g, sáček bez provázku a papírového lístku 1,607 g) byl zalit 200 ml horké vody a ponechán 3 minuty louhovat.

- **Vzorek č. 14** – sáček černého čaje ATL (hmotnost čaje 2 g, sáček bez provázku a papírového lístku 2,265 g) byl zalit 200 ml horké vody a ponechán 3 minuty louhovat.
- **Vzorek č. 15** – navážka 2 g černého sypaného čaje RAMIZ (2013) byla zalita 200 ml horké vody a ponechána 3 minuty louhovat.
- **Vzorek č. 16** – navážka 2 g černého sypaného čaje ZLATÉ DRÁTKY (2011) byla zalita 200 ml horké vody a ponechána 3 minuty louhovat.
- **Vzorek č. 17** - navážka 2 g plesnivého černého sypaného čaje ZLATÉ DRÁTKY (2011) byla zalita 200 ml horké vody a ponechána 3 minuty louhovat. Tento vzorek po napaření pro potřeby lisování zplesnivěl. Slouží tedy také jako referenční vzorek, silně kontaminován mikroorganismy.
- **Vzorek č. 18** – navážka 2 g černého sypaného čaje PPN byla zalita 200 ml horké vody a ponechána 3 minuty louhovat.
- **Vzorek č. 19** – navážka 2 g černého sypaného čaje PPS byla zalita 200 ml horké vody a ponechána 3 minuty louhovat.
- **Vzorek č. 20** – navážka 2 g černého sypaného čaje PPV byla zalita 200 ml horké vody a ponechána 3 minuty louhovat.
- **Vzorek č. 21** – navážka 2 g zeleného lisovaného čaje CNNP –Sheng Puer byla zalita 200 ml horké vody a ponechána 3 minuty louhovat.
- **Vzorek č. 22** – navážka 2 g zeleného sypaného čaje LIUAN byla zalita 200 ml horké vody a ponechána 3 minuty louhovat



Obr. č. 13: Žlutá plíseň na vzorku čaje Liuan 2004

U všech vzorků bylo po zpracování vzorku provedeno desetinné ředění. 1 ml inokula byl naočkován na sterilní Petriho misky a zalit živnou půdou o teplotě zhruba 40 °C. Inokulum s živnou půdou bylo v miskách rozmícháno a směs se v miskách nechala zatuhnout na vodorovné ploše.

Při stanovení sporulujících mikroorganismů byl nejprve proveden záhřev na teplotu 85 °C po dobu 10 minut. Tím byly eliminovány vegetativní formy mikroorganismů a přežily pouze termorezistentní mikroorganismy a spory. Po zchlazení bylo inokulum naočkováno na Petriho misky, zalito živnou půdou, rozmícháno a ponecháno zatuhnout.

Po zatuhnutí směsi živných půd s inokulem byly Petriho misky inkubovány v termostatu při specifických teplotách a časech pro jednotlivé skupiny mikroorganismů.

4.6 Složení a příprava živných půd

Živné půdy byly připraveny podle návodu rozmícháním navážky půdy v destilované vodě v Erlenmayerových baňkách o objemu 500 ml. Následně bylo upraveno pH kyselinou octovou. Agar se nechal při laboratorní teplotě nabobtnat a poté byl rozvařen ve vodní lázni o teplotě 100 °C. Následovala sterilizace při 121 °C po dobu 15 minut. Připravené půdy byly uloženy v lednici a před vlastním rozborem rozvařeny v autoklávu asi 10 minut a ochlazeny na 40 °C.

Živná půda VRBL byla připravena vždy těsně před analýzou. Navážka půdy byla rozmíchána v destilované vodě, v Erlenmayerově baňce o objemu 500 ml. Bylo upraveno pH a půda byla rozvařena na vodní lázni o teplotě 100 °C po dobu asi 10 minut. Poté byla zchlazena na asi 40 °C.

4.7 Složení živných půd

Plate Count Agar (PCA) (Plate count agar).

Složení:

Trypton	5g
Kvasničný extrakt	2,5g
Glukóza	1g
Agar	12g

Navážka 20,5 gramů půdy se rozpustí v 1 000 ml destilované vody, upraví se pH $7 \pm 0,2$ při 25°C. Živná půda se sterilizuje v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut.

Výrobce: Biokar Diagnostics, France

Složení půdy dle ČSN ISO 4833.

Agar s kvasničním extraktem, glukózou a chloramfenikolem (Chloramphenicol Glucose Agar)

Složení:

Kvasničný extrakt	5g
Glukóza	20g
Chloramfenikol	0,1g
Agar	15g

Navážka 40,1 g se rozpustí v 1 000 ml destilované vody, upraví se pH $6,6 \pm 0,2$ při 25 °C. Půda se sterilizuje v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut.

Výrobce: Biokar Diagnostics, France

Složení půdy dle ČSN ISO 4833.

Agar VRBL (agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučovými solemi a laktózou)

Složení:

Masový pepton	7 g
Kvasničný extrakt	3 g
Žlučové soli	1,5 g
Laktóza	10 g
Chlorid sodný	5 g
Agar	12 g
Neutrální červeně	30 mg
Krystalová violet	2 mg

Navážka 35,5 g se rozpustí v 1 000 ml destilované vody, upraví se pH $7,4 \pm 0,2$ při 25°C. Půda se rozvaří na vodní lázni při 100 °C 10 minut. Tato půda se musí ihned spotřebovat.

Výrobce: Biokar Diagnostics, France

Složení půdy dle ČSN ISO 4833.

4.8 Způsob vyhodnocení výsledků

Byly stanovovány tyto skupiny mikroorganismů:

- **Celkový počet mikroorganismů** na živné půdě **PCA** (Plate Count Agar)
Inkubace v termostatu **při 30 °C po dobu 72 hodin.**
- **Plísně a kvasinky** na agaru s kvasničným extraktem, glukózou a chloramfenikolem (Chloramphenicol Glukose Agar). Inkubováno v termostatu **při 25 °C po dobu 120 hodin.**
- **Sporulující a termorezistentní mikroorganismy** na živné půdě **PCA** (Plate Count Agar). Inkubováno v termostatu **při 30 °C po dobu 72 hodin.**
- **Koliformní bakterie** na živné půdě **VRBL** (agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučovými solemi a laktózou). Inkubováno v termostatu **při 37 °C po dobu 24 hodin.**

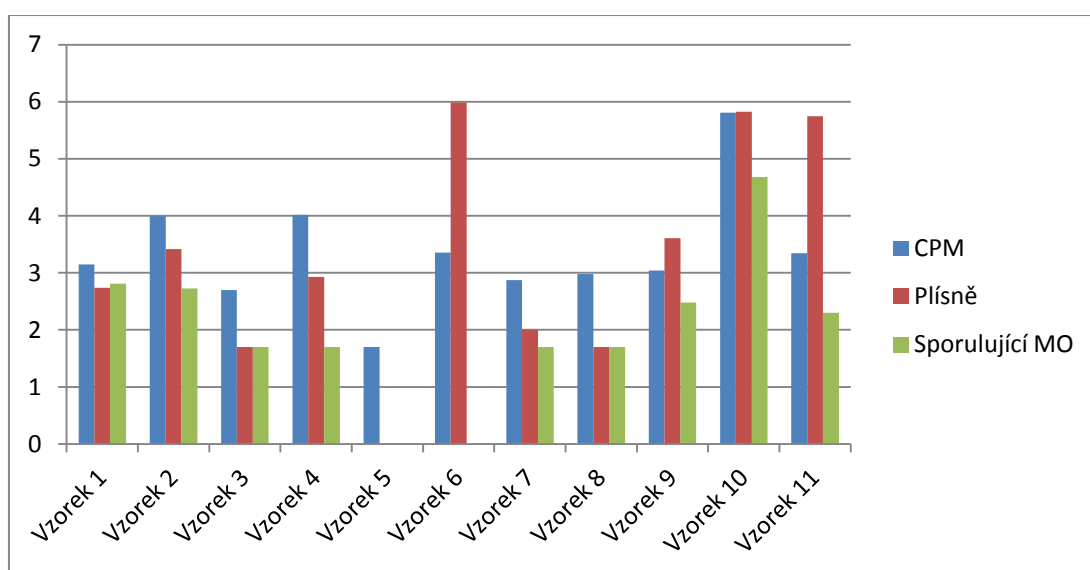
Jednotlivé skupiny mikroorganismů byly kultivovány v termostatu při určitých teplotách a časech a následně spočítány kolonie mikroorganismů na jednotlivých Petriho miskách. Konečný výsledek je vyjádřen v KTJ / g, tedy jako kolonie tvořící jednotky na 1 gram suchého materiálu, v případě nálevů jako KTJ/ 1ml hotového nápoje. Příložena je také tabulka, vyjadřující počty KTJ/ šálek (200 ml) hotového nápoje.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V tabulkách jsou uvedeny průměrné počty jednotlivých skupin mikroorganismů nalezených ve vybraných výrobcích. U každého vzorku byl proveden rozbor suchých listů i hotového nálevu ihned po přípravě, dále po 4 hodinách stání a po 24 hodinách stání. Od každého ředění byla provedena dvě opakování a výsledky jsou vyjádřeny jako KTJ.g⁻¹ u suchých listů a KTJ.ml⁻¹ u hotových nálevů.

Tab. č. 3: Vyhodnocení počtu mikroorganismů v KTJ.g⁻¹ suchých listů

	CPM	Plísňě	Sporulující MO	Koliformní MO
Vzorek 1	$1,4 \cdot 10^3$	$5,5 \cdot 10^2$	$6,5 \cdot 10^2$	negativní
Vzorek 2	$9,9 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^3$	$5,3 \cdot 10^2$	negativní
Vzorek 3	$5 \cdot 10^2$	5.10	5.10	negativní
Vzorek 4	$1,1 \cdot 10^4$	$8,5 \cdot 10^2$	5.10	negativní
Vzorek 5	5.10	negativní	negativní	negativní
Vzorek 6	$2,3 \cdot 10^3$	$9,7 \cdot 10^5$	negativní	negativní
Vzorek 7	$7,5 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$	5.10	negativní
Vzorek 8	$9,5 \cdot 10^2$	5.10	5.10	negativní
Vzorek 9	$1,1 \cdot 10^3$	$4,1 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^2$	negativní
Vzorek 10	$6,4 \cdot 10^5$	$6,7 \cdot 10^5$	$4,8 \cdot 10^4$	negativní
Vzorek 11	$2,2 \cdot 10^3$	$5,5 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^2$	negativní



Obr. č. 14 Graf srovnání log KTJ.g⁻¹ suchých listů

Osa x: jednotlivé skupiny mikroorganismů u daných vzorků

Osa y: logaritmus počtu KTJ.g⁻¹

Tato analýza srovnává počty mikroorganismů v suchých listech jednotlivých vzorků čajů.

Na první pohled je z tabulky patrné, že se v žádném ze vzorků nevyskytovaly koliformní mikroorganismy. Nebyly detekovány ani v suchých listech, ani v hotovém nálevu žádného ze vzorků. Lze proto usuzovat, že výrobky nebyly sekundárně kontaminovány fekálním znečištěním.

Při srovnání počtů mikroorganismů s normou ČSN ISO 56 9609 lze konstatovat, že v čajích nebyly detekovány vysoké počty mikroorganismů. Naopak ve většině vzorků byly detekovány velmi nízké počty mikroorganismů.

Nejméně ze všech byl kontaminován vzorek č. 5 gruzínský černý sypaný čaj Zlaté drátky ročník 2011. Nižší počty MO v tomto čaji lze vysvětlit jeho stářím. Jak uvádí HRUBÝ, 2000, počty mikroorganismů ve skladovaném čaji, jakožto v sušených potravinách, klesají spolu s dobou jeho skladování. Sušení potravin má tedy mikrobiostatický až mikrobicidní efekt. Jako u jediného ze vzorků zde nebyly detekovány žádné sporující mikroorganismy.

Z čajů ne starších než 1 rok byl nejméně kontaminovaný gruzínský černý sypaný čaj Tkibuli.

Z testovaných vzorků byly dva čaje sáčkové, a sice JP čaj černý a ATL černý. Z těchto dvou čajů byl více kontaminován JP čaj.

Nejvyšší počty plísní byly naměřeny u vzorků č. 6, 10 a 11. Vzorek č. 6 byl čaj Zlaté drátky (2011), který zplesnivěl po napaření pro potřeby lisování (amatérský pokus o výrobu lisovaného čaje).

Relativně vysoké počty plísní byly naměřeny taktéž u vzorků zrajících čajů Pu-erh a Liuan, ve kterých byly stanoveny mnohonásobně vyšší počty mikroorganismů, než u většiny ostatních čajů. THOMOVÁ, et al. (2002) uvádějí, že jsou to čaje zrající za přítomnosti mikroorganismů, jejichž činností je v nich přeměňována řada chemických látek, což jim dává specifickou chuť a vůni. Vyšší počty mikroorganismů tedy byly u těchto vzorků předpokládány. Z plísní byli identifikováni zástupci rodů *Aspergillus* a *Penicillium*. Kvasinky vizuálně detekovány nebyly.

Podle studie Bacterial and Fungal Communities in Pu'er Tea Samples of Different Ages (JIANQING, Tian, et al. (2013), zkoumající mikroflóru čajů pe-erh v závislosti na

době skladování autoři zjistili, že u zeleného i tmavého typu pu-erhu s časem klesá počet bakterií, zatímco počty plísní rostou v průběhu prvních 60 měsíců skladování, poté klesají. Z jednotlivých mikroorganismů obsažených v těchto čajích autoři jmenují bakterie rodů *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Sporosarcina* a *Bacillus*. Z plísní autoři jmenují *Aspergillus* a *Penicillium*. Tyto plísně byly vizuálně detekovány i u vzorků analyzovaných v této diplomové práci. Vzorek č. 11 byl zrající čaj z roku 2004, tedy s dobou zrání cca 120 měsíců. Dá se tedy předpokládat, že v minulých letech byl obsah bakterií i plísní v tomto čaji nižší. Autoři ve zmíněné studii zkoumali vzorky čajů pomocí metody PCR-DGGE.

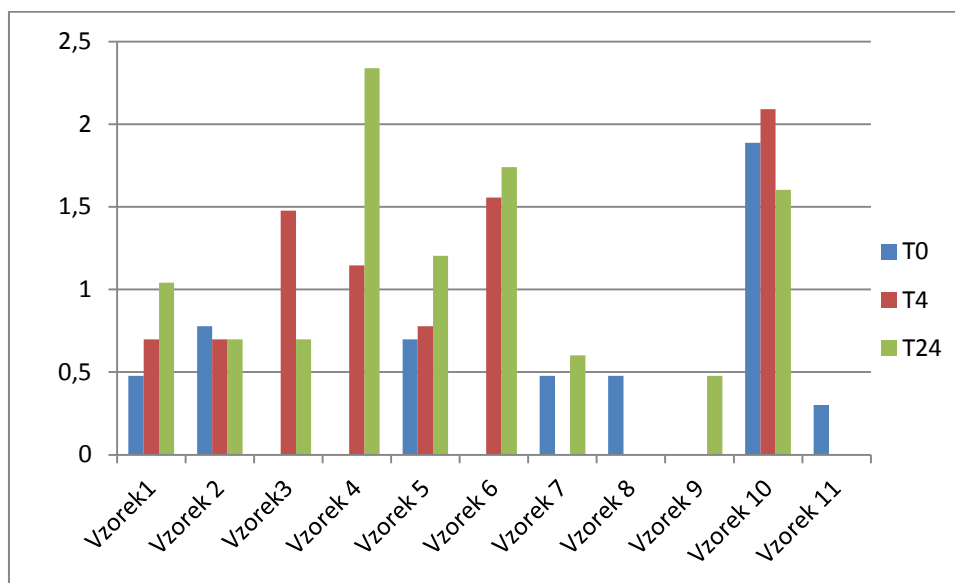
Tab. č. 4: Vyhodnocení počtů mikroorganismů v KTJ.ml⁻¹ hotového nálevu

	CPM			Plísně			Koliformní MO
	T ₀	T ₄	T ₂₄	T ₀	T ₄	T ₂₄	
Vzorek1	3	5	1,1.10	negativní	negativní	4	negativní
Vzorek 2	6	5	5	negativní	negativní	4	negativní
Vzorek3	negativní	3.10	5	5	negativní	3	negativní
Vzorek 4	1	1,4.10	2,2.10 ²	negativní	negativní	3,8.10 ²	negativní
Vzorek 5	5	6	1,6.10	negativní	negativní	7	negativní
Vzorek 6	negativní	3,6.10	5,5.10	3.10	negativní	5,9.10	negativní
Vzorek 7	3	1	4	7	negativní	negativní	negativní
Vzorek 8	3	negativní	1	1.10	negativní	1	negativní
Vzorek 9	negativní	1	3	1,4.10	negativní	negativní	negativní
Vzorek 10	7,7.10	1,2.10 ²	4.10	1,2.10 ²	7,9.10	5,3.10	negativní
Vzorek 11	2	negativní	1	7	1	negativní	negativní

Z tabulky vyplývá, že oproti počtům MO v suchých listech jsou počty MO v hotovém nálevu minimální. Bylo to pravděpodobně způsobeno třiminutovým vystavením vysoké teplotě horké vody (95 °C), která vegetativní formy devitalizuje. Po srov-

nání s normou ČSN 56 9609 lze konstatovat, že ve vzorcích hotových nálevů byly detekovány velmi nízké počty mikroorganismů. Koliformní mikroorganismy nebyly detekovány v žádném ze vzorků.

V závěrečné práci Mikrobiální kontaminace ovocných čajů uvádí KONEČNÁ (2009) naměřené hodnoty pro oslazený vychladlý bylinný čaj maximálně $1,35 \cdot 10^2$ KTJ.ml⁻¹ pro CPM. Vliv cukru zde byl zanedbatelný. Moje výsledky se přibližně shodují s těmito hodnotami, přesahuje je pouze vzorek č. 4 po 24 hodinách stání hodnotou $2,2 \cdot 10^2$, což není nijak velký rozdíl. U plísni autorka práce naměřila v ovocných čajích hodnoty kolem $1,8 \cdot 10^3$. Ve vzorcích v mé práci byly naměřeny nižší hodnoty, většinou nebyly plísně detekovány nebo byly detekovány v řádu jednotek KTJ.ml⁻¹, což jsou podle ČSN 56 9609 hodnoty minimální. Koliformní bakterie detekovány nebyly, což se shoduje s výsledky KONEČNÉ (2009).



Obr. č. 15 Graf srovnání log KTJ.ml⁻¹ v závislosti na čase pro CPM

Osa x: jednotlivé skupiny mikroorganismů u daných vzorků

Osa y: logaritmus počtu KTJ.ml⁻¹

T₀ – rozbor nálevu ihned po přípravě

T₄ – rozbor nálevu po čtyřech hodinách stání

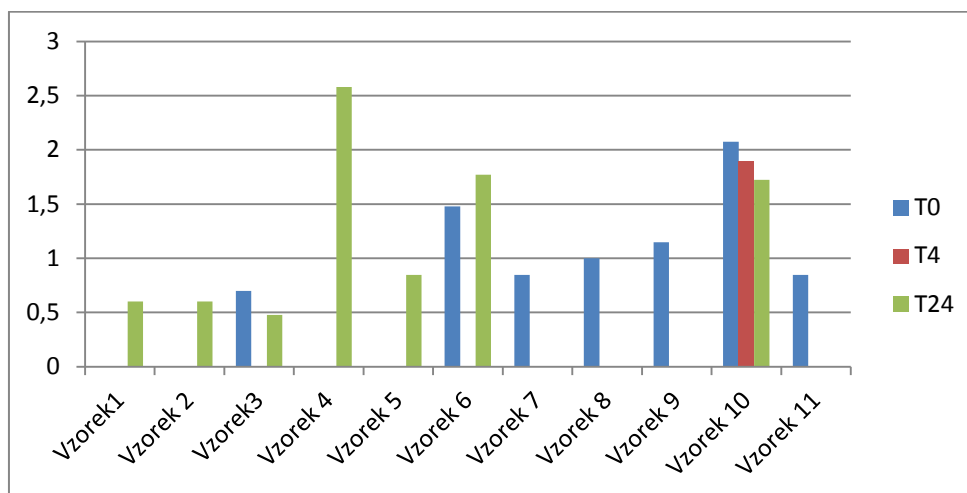
T₂₄ – rozbor nálevu po 24 hodinách stání

Předpokládal jsem, že se celkové počty mikroorganismů v hotovém nálevu budou zvyšovat spolu s časem, jaký čaj stojí. Této hypotéze však odpovídají výsledky pouze u pěti vzorků, tedy méně, než poloviny z celkového počtu vzorků a tato hypotéza se tedy nepotvrdila.

U vzorku č. 7 je zajímavý nárůst CPM v čase, avšak s absencí CPM v čase T_4 . Mohlo by to být způsobeno klíčením spor, které dle ŠILHÁNKOVÉ (2002) jsou rezistentní vůči vysokým teplotám, které přežívají a mohou vyklíčit, když se podmínky okolí stanou příhodnějšími (pokles teploty).

Z grafu je patrné, že pouze u jednoho vzorku (vzorek č. 7 – pu erh, čaj se žlutou plísní) byly detekovány plísně po čtyřech hodinách od zalití. U ostatních vzorků byly plísně detekovány pouze ihned po přípravě nebo narostly až 24 hodin po zalití. Zajímavý je průběh počtu plísní v závislosti na čase u vzorku č. 3 (ATL – sáčkový černý čaj), kdy počet plísní v čase klesá, avšak v čase T_4 nejsou detekovány žádné plísně a u vzorku č. 6 (plesnivý čaj ZLATÉ DRÁTKY), ve kterém počet plísní s časem stoupá, avšak v čase T_4 opět žádné plísně detekovány nebyly. To mohlo být způsobeno delším působením vysoké teploty, než v čase T_0 , která mohla ještě dodatečně zlikvidovat plísně v nálevu a následně, po několika hodinách vyklíčily spory, které se projeví až v čase T_{24} , tedy 24 hodin po zalití.

Celkový počet mikroorganismů u bylinných čajů zkoumala např. německá studie, dle které se hodnoty KTJ.ml^{-1} pohybovaly mezi 10^3 a 10^6 . (WILSON, et al., 2004) Mnou naměřené hodnoty u čajů pravých této hladiny nedosahují ani po 24 hodinách stání. Nejvíce CPM v hotovém nálevu bylo u našich vzorků naměřeno u vzorku č. 4, a sice $2,2 \cdot 10^2 \text{ KTJ.ml}^{-1}$.



Obr. č. 16 Graf srovnání log KTJ.ml⁻¹ v závislosti na čase pro plísně

Osa x: časy měření po zalití čaje u jednotlivých vzorků

Osa y: logaritmus počtu KTJ.ml⁻¹ pro plísně

Plísně mají podle ŠILHÁNKOVÁ (2002) vysokou toleranci ke sníženému obsahu vody v prostředí a mohou zde přežívat a množit se i při velmi nízkých a_w okolo 0,62 – 0,85. Hodnota a_w u čajů se pohybuje právě okolo 0,6 – 0,8. Plísně mohou být potenciálně producenty mykotoxinů, jak uvádí VALÍK (2004) např. některé kmeny *Aspergillus flavus*. Proto je nutné zabránit jejich přílišné kontaminaci, aby nedošlo k ohrožení zdraví lidí. Dříve platná vyhláška 132/2004 Sb. O mikrobiálních požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení, bylo možné aby se v 1 g suchých listů čaje vyskytovaly plísně v množství 10^4 KTJ. Podle nyní platné normy ČSN 56 9609 je pro potenciálně toxikogenní plísně *Aspergillus flavus* v zeleném čaji limit 10^3 KTJ.g⁻¹ u pěti vzorků z jedné šarže, přičemž u dvou vzorků je tolerován výskyt 10^4 KTJ.g⁻¹.

Z tab. 1 vidíme, že u většiny vzorků celkový počet KTJ plísni na gram suchých listů nepřesahuje normou ani vyhláškou stanovené limity. Pouze vzorky 6, 10 a 11 přesahovaly limit a jejich hodnoty se blížily 10^6 KTJ.g⁻¹. Vzorek č. 6 byl plesnivý čaj, vzorky 10 a 11 zrající čaje typu pu-erh ošetřené plísní, u kterých lze podle THOMOVÉ (2002) zvýšený výskyt plísni očekávat.

Tab. č. 5: Vyhodnocení počtů mikroorganismů v KTJ/ šálek (200 ml)

	CPM			Plísně			Koliformní MO
	T ₀	T ₄	T ₂₄	T ₀	T ₄	T ₂₄	
Vzorek1	6.10 ²	1.10 ³	2,2.10 ³	negativní	negativní	8.10 ²	negativní
Vzorek 2	1,2.10 ³	1.10 ³	1.10 ³	negativní	negativní	8.10 ²	negativní
Vzorek 3	negativní	6.10 ³	1.10 ³	1.10 ³	negativní	6.10 ²	negativní
Vzorek 4	2.10 ²	2,8.10 ³	4,4.10 ⁴	negativní	negativní	7,6.10 ⁴	negativní
Vzorek 5	1.10 ³	1,2.10 ³	3,2.10 ³	negativní	negativní	1,4.10 ³	negativní
Vzorek 6	negativní	7,2.10 ³	1,1.10 ⁴	6.10 ³	negativní	1,2.10 ⁴	negativní
Vzorek 7	6.10 ²	2.10 ²	8.10 ²	1,4.10 ³	negativní	negativní	negativní
Vzorek 8	6.10 ²	negativní	2.10 ²	2.10 ³	negativní	2.10 ²	negativní
Vzorek 9	negativní	2.10 ²	6.10 ²	2,8.10 ³	negativní	negativní	negativní
Vzorek 10	1,5.10 ⁴	2,5.10 ⁴	8.10 ³	2,4.10 ⁴	1,6.10 ⁴	1,1.10 ⁴	negativní
Vzorek 11	4.10 ²	negativní	2.10 ²	1,4.10 ³	2.10 ²	negativní	negativní

Doplňující tabulka, zobrazující počty MO jako KTJ/ šálek čaje (200 ml).

Výsledky ukazují, že vzorky čaje byly kontaminovány velmi nízkými počty mikroorganismů. Nejméně jich bylo stanoveno ve vzorku černého gruzínského čaje Zlaté drátky, pravděpodobně proto, že v suchém prostředí listů za dlouhou dobu skladování mikroorganismy vymřely.

Nejvíce kontaminován mikroorganismy byl vzorek č. 10. Tento vzorek představoval zrající čaj pu erh se žlutou plísní.

Nejvíce plísní bylo detekováno u vzorku č. 6, což byl plesnivý čaj, silně kontaminovaný.

Vzorky č. 7 – 9 byly součástí pokusu o ovlivnění chuti a vůně inkubací výchozího čaje Tkibuli (vzorek č. 7) s čajem vyšší sensorické kvality. Tyto čaje byly podrobeny základní sensorické analýze, která měla za úkol detekovat rozdíl v chuti a vůni těchto vzorků (jednalo se o stejný čaj, ve dvou případech však inkubovaný s kvalitnějším čajem – jednou za sucha, podruhé za zvýšené vlhkosti). Všichni hodnotitelé (3 subjekty) indikovali zvýraznění a zlepšení chuti a především vůně u vzorku č. 9, tedy vzorku upravovanému za zvýšené vlhkosti. U tohoto vzorku došlo v důsledku inkubace za zvý-

šené vlhkosti k nárůstu počtu plísní. Listy tohoto vzorku měly také poddajnější konzistenci (byly více ohebné a méně lámavé), čaj měl tedy větší vlhkost, než výchozí čaj a čaj školený za sucha. Je otázkou, zda zvýraznění a zlepšení chuti a vůně bylo následkem přejmutí vůně dražšího čaje, změnou mikrobiální skladby nebo pouze zvýšením vlhkosti tohoto vzorku, případně kombinací těchto faktorů. Tuto otázku by mohla zodpovědět důkladnější analýza.

6 ZÁVĚR

Bylo analyzováno celkem 11 vzorků čaje, nejprve byl proveden rozbor suchých listů, poté rozbor hotového nálevu a následně zchladlého nálevu, stojícího delší dobu (4 hodiny a 24 hodin). Byly stanovovány celkové počty mikroorganismů, termorezistentní a sporulující mikroorganismy, plísňe a kvasinky a koliformní mikroorganismy.

Legislativa týkající se potravinářství vychází z nařízení Komise Evropského společenství č. 2073/2005. Mikrobiologické požadavky pro čaje nejsou blíže specifikovány. Výsledky byly srovnávány s normou ČSN 56 9609, dříve platnou vyhláškou MZe 132/2004 Sb. a nalezenými studiiemi a články.

Ve vzorcích čajů byly detekovány velmi nízké počty mikroorganismů, neboť čaj je produkt konzervovaný sušením, kvůli čemuž není vhodným prostředím pro růst a množení mikroorganismů. Vegetativní formy v nálevu byly radikálně potlačeny působením horké vody, které přežívají termorezistentní a sporulující mikroorganismy. Ty by mohly představovat riziko při pití zchladlého, dlouho stojícího čaje, pokud by se zde vyskytovaly toxikogenní plísňe a pokud by došlo k jejich rozvoji.

Čaje se skladují na suchém a čistém místě s vlhkostí do 75 % a teplotou okolo 25 °C. Při nevhodném skladování může dojít ke kontaminaci plísněmi, což může představovat riziko pro zdraví lidí, neboť některé plísňe jsou producenty nebezpečných mykotoxinů.

Předpoklady mikrobiální čistoty výrobků jsou dodržování správné výrobní a hygienické praxe, sklizení jen suchých nepoškozených listů a včasné provedení všech technologických operací bez zbytečného odkladu. Samozřejmostí je skladování výrobku za vhodných podmínek, aby nedošlo k rozvoji plísní a znehodnocení výrobku nebo poškození zdraví lidí. Nutno je také zabránit sekundární kontaminaci výrobku, především fekáliemi lidí a zvířat (výskyt *E. coli*, *Salmonella*).

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

BUREŠOVÁ, Pavla, 2002: *Co všechno se skrývá v šálku čaje* [online], [cit. 2011-3-15]. Dostupný z WWW:

<<http://www.szpi.gov.cz/cze/dokumenty/article.asp?id=55133&cat=2165&ts=6ec96>>.

CHOW, Kit, KRAMER, Ione, 1998: *Všechny čaje Číny*, 2. vyd., DharmaGaia, Praha, 286 s. ISBN 80-85905-54-X.

CEMPÍRKOVÁ, Růžena, LUKÁŠOVÁ, Jindra, HEJLOVÁ, Šárka, 1997 *Mikrobiologie potravin*. Jihočeská univerzita, České Budějovice, 165s. ISBN 80-7040-254-7.

DOLBY, Victoria, 2002: *O zeleném čaji*, Pragma, Praha, 95 s. ISBN: 80-7205-892-4.

HRUBÝ, Stanislav, 2000: Sušení jako šetrný způsob konzervace. *Výživa a potraviny*, 2000, č. 2, s. 23

KLABAN, Vladimír, 2001: *Svět mikrobů (Ilustrovaný lexikon mikrobiologie životního prostředí)*, 2. vyd., Gaudeamus, Hradec Králové, 416 s. ISBN 80-7041-687-4.

KOMPRDA, Tomáš, 2000: *Hygiena potravin*, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 171s. ISBN I-03476/2000.

KOMPRDA, Tomáš, *Obecná hygiena potravin*, 1.vyd. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 171s. ISBN 80-7157757-7.

MALÍŘ, František, OSTRÝ, Vladimír, 2003: *Vláknité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*, 1. vyd., Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotních oborů, Brno, 349 s. ISBN 80-7013-395-3.

MISHRA, B.B., GAUTAM, S., SHARMA, A., 2006: Microbial Decontamination Of Tea (*Camellia sinensis*) by Gamma Radiation, *Journal of food science*, vol. 71.

ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila, 2002: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*, 3. opravené a doplněné vyd., Academia, Praha, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.

JIANQING, Tian, ZIXIANG, Zhu, BING, Wu, LIN, Wang, and XINGZHONG, Liu, 2013: Bacterial and Fungal Communities in Pu'er Tea Samples of Different Ages, *Journal of food science*, vol. 78

THOMOVÁ Soňa, THOMA Zdeněk, THOMA Michal, 2002: *Příběh čaje*, 1. vyd., Argo, Praha, 400 s. ISBN 80-7203-447-2.

SKÁCEL, Jaromír, 2006, Čaj. *Potravinářská revue*, č. 3, s. 16 - 20

VALÍK, Lubomír, GÖRNER, Fridrich, 2004: *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*, 1. vyd., Malé centrum, Bratislava, 528 s. ISBN 80-967064-9-7.

VALTER, Karel, 2010: *Vše o čaji pro čajomily*, 6. přepracované vyd., Granid, Praha, 208 s. ISBN 978-80-7296-072-9.

VOTAVA, Miroslav, 2001: *Lékařská mikrobiologie obecná*, Neptun, Brno, ISBN 80-902896-2-2.

WACHENDORF, Viola von, 2008: *Čaj*, 1. vyd., Slovart, Praha, 96 s. ISBN 80-7209-922-1.

WANG, Xiaogang, WAN, Xiaochun, HU, Shuxia, Pan, Caiyuan, 2007: Study on the increase mechanism of the caffeine content during the fermentation of tea with microorganisms, *Food Chemistry*, vol. 107.

WILSON, Ch., DETTENKOFER, M, JONAS, D, et al., 2004: Pathogen growth in herbal teas used in clinical settings: a possible source of nosocomial infection?, *American Journal of Infection Control*, vol. 32, s. 117 – 119.

Nařízení komise č. 2073/2005, o mikrobiologických kritériích pro potraviny.

Vyhláška Ministerstva Zemědělství č. 330/1997, kterou se provádí § 18 zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro čaj, kávu a kávoviny.

Vyhláška Ministerstva Zdravotnictví č. 132/2004 o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení.

ČSN 56 9609, která stanovuje pravidla správné výrobní praxe a mikrobiologická kritéria pro potraviny a principy stanovení a aplikace

Čaj jako mocný lék [online]. 2011 [cit. 2014-4-2], Dostupný z WWW:
<<http://www.teatao.cz/caj-a-zdravi/caj-jako-mocny-lek>>.

Čajová kultura v České republice [online]. 2014 [cit. 2014-2-3], Dostupný z WWW:
<<http://www.oxalis.cz/cajova-kultura-v-ceske-republice/cz/t-189/>>

Čaj [online]. 2014 [cit. 2014-2-2], Dostupný z WWW:
<www.foodnet.cz>

Spotřeba čaje [online]. 2014 [cit. 2014-4-2], Dostupný z WWW:
<www.ekonomika.idnes.cz>

8 SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ

Tabulky

Tab. 1 *Tabulka přípustných limitů MO dle ČSN56 9609*

Tab. 2 *Složení černého čaje a jeho extraktu (% v sušině)*

Tab. č. 3 *Vyhodnocení počtu mikroorganismů v KTJ/1 g suchých listů*

Tab. č. 4 *Vyhodnocení počtů mikroorganismů v KTJ/1 ml hotového nálevu*

Tab. č. 5 *Vyhodnocení počtů mikroorganismů v KTJ/ šálek čaje*

Obrázky

Obr. č. 1 *Camellia sinensis*

Obr. č. 2 Slisovaný Pu-erh

Obr. č. 3 *Acetobacter*

Obr. č. 4 *Pseudomonas*

Obr. č. 5 *Bacillus cereus*

Obr. č. 6 *Clostridium*

Obr. č. 7 *Listeria*

Obr. č. 8 *Aspergillus*

Obr. č. 9 *Penicillium roquorti*

Obr. č. 10 *Fusarium*

Obr. č. 11 Vzorky čaje k analýze (zleva vzorek č. 1, 4, 5, 6)

Obr. č. 12 Vzorky čaje Zlaté drátky, vpravo je zaplísněný vzorek

Obr. č. 13 Žlutá plíseň na vzorku čaje Liuan 2004

Obr. č. 14 Graf srovnání KTJ.g^{-1} suchých listů

Obr. č. 15 Graf srovnání $\log \text{KTJ.ml}^{-1}$ v závislosti na čase pro CPM

Obr. č. 16 Graf srovnání $\log \text{KTJ.ml}^{-1}$ v závislosti na čase pro plísně

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

a_w	vodní aktivita
CPM	celkový počet mikroorganismů
ČR	Česká republika
ČSN	Česká technická norma
ES	Evropské společenství
KTJ (CUF)	kolonie tvořící jednotka (colony forming unit)
MO	mikroorganismy
Mze	Ministerstvo zemědělství