

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Mikrobiologická kvalita vybraných surovin v pekárenské výrobě

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Prof. Ing. Karel Voříšek, CSc.

Autor práce: Ivana Mozerová

© 2010

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Mikrobiologická kvalita vybraných surovin v pekárenské výrobě vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne: ...15.4.2010...

Podpis:.....

Poděkování:

Děkuji Prof. Ing. Karlu Voříškovi, CSc. za odborné vedení při zpracování bakalářské práce a zaměstnancům Střední průmyslové školy potravinářských technologií v Praze 2 za umožnění zpracování vzorků ve školní laboratoři.

Souhrn

Cílem bakalářské práce je posoudit mikrobiologickou kvalitu vybraných surovin používaných v pekárenské výrobě. K základním surovinám patří mouka, voda, droždí a sůl. Mezi ostatní přísady patří cukr, tuk, vejce, mléko a nejrůznější zlepšující přísady. V této práci se zabývám sledováním výskytu nežádoucích mikroorganismů, které mohou způsobovat technologické vady, ale i poškodit zdraví konzumenta. Konkrétně se jednalo o směsi na výrobu chleba a pečiva, zlepšující přípravky pro výrobu jemného pečiva a ovocné náplně. U těchto surovin byl zjišťován celkový počet mikroorganismů, celkový počet bakterií, dále přítomnost sporulujících bakterií, enterokoků a koliformních bakterií. Nejlépe byl hodnocen vzorek Selského chleba, který nevykazoval přítomnost nežádoucích mikroorganismů. Naopak nejvíce mikroorganismů obsahovaly vzorky Diapolu a Cerealu.

Ke kontaminaci surovin a následně hotových výrobků může dojít již během sklizně, nedodržováním hygieny a sanitace při zpracování, či použitím závadných surovin. Další příčinou může být špatné skladování (příliš vysoká teplota, vysoká vlhkost, nedostatečné proudění vzduchu apod.). Nositeli kontaminace mohou být též stroje a zařízení, pomůcky, oděvy a v neposlední řadě i pracovníci.

Během růstu, sklizně a skladování se na obilí nejčastěji vyskytují plísňe. Velká část mikroflóry obilí může přecházet do mouky. Čištěním obilí se částečně sníží počet mikroorganismů. Během mlecího procesu dochází k odstranění povrchových vrstev zrna. Mouky výše vymleté (zadní) obsahují větší počet obalových částic a tím i větší počet mikroorganismů než světlejší (přední) mouky vymleté málo. Žitné mouky většinou obsahují vyšší počet mikroorganismů, protože mají větší podíl rozpustných látek než pšeničné mouky.

Během pečení dochází k usmrcení většiny mikroorganismů, tzn., že po upečení jsou výrobky na povrchu sterilní. Výjimku tvoří sporulující bakterie, které přežívají pečicí teplotu. Kladen je též důraz na manipulaci s výrobky po upečení, protože u všech pekařských výrobků hrozí nebezpečí druhotné kontaminace, nejčastěji sporami plísní, které se nacházejí ve vzduchu, na obalových materiálech, popř. na znečištěných plochách a nádobí. Dalším nebezpečím jsou řezací a balící stroje, které mohou obsahovat ulpělé drobečky po předchozích výrobcích, či jiné nečistoty, které nebyly odstraněny. Výrobky musí být zabaleny až po vychladnutí, jinak by mohlo dojít k zapaření výrobků a tím k pomnožení mikroorganismů v uzavřeném obalu.

Klíčová slova: plísňe, bakterie, kvasinky, kontaminace, pekařské suroviny, mouka

Summary

The aim of the bachelor thesis is to evaluate the microbiological quality of selected raw materials used to make bakery products. Starting materials include flour, water, yeast and salt. Other ingredients are sugar, fat, eggs, milk and different improving stuff. This work deals with the study of undesired microorganisms that may cause technological defects or be harmful to the consumer's health. Particular attention has been drawn to mixtures to make bread and rolls, ingredients for making pastry, and fruit filling. For these ingredients a total number of microorganisms, a total number of bacteria, presence of sporeformers, enterococci, and coliform bacteria were studied. The best result was found in the sample of Farmer's bread, which had no undesired microorganisms. On the other hand, samples of Diapol and Cereal showed the highest amount of microorganisms.

Basic stuff and final products may be contaminated already during harvest, as a result of bad hygiene and sanitation during processing or by using unhealthy substances. Other causes may include bad storage conditions (too high temperature, high humidity, insufficient ventilation, etc.). Contamination carriers may also include machines, equipment, clothes and last but not least the workers themselves.

Fungi occur mostly during the corn harvest and storage. Lots of corn microflora can go into flour. The number of microorganisms can be partly lowered by corn cleaning. Surface corn layers are removed in the course of milling. More ground-out flours (back) contain more envelope particles and so more micro organisms than lighter (front) flours which are less ground out. Rye flour has generally more microorganisms than wheat flour as the former has more soluble substances.

During baking most microorganisms are killed, which means that when baked the product surface is germ free, except for sporulating bacteria, which can survive the baking temperature. Handling of final bakery products is also important because of secondary contamination risk, due to mainly spore mould that is present in the air, on packs, or dirty surfaces and vessels. Other risks include cutting and packing machines that may contain sticking tiny crumbs or impurities from the past that had not been removed. The final articles should be packed only after they have cooled down or they might get musty, causing the microorganisms to proliferate in the package.

Key words: mould, bacteria, yeast, contamination, bakery ingredients, flour

Obsah

1	Úvod	1
2	Suroviny používané v pekárenské výrobě	2
2.1	Mouka	2
2.2	Voda	3
2.3	Droždí.....	3
2.4	Sůl	3
2.5	Cukr.....	3
2.6	Tuk	4
2.7	Mléko	4
2.8	Vejce	4
2.9	Ovoce a ovocné polotovary.....	4
2.10	Aditivní látky	5
2.11	Zlepšující prostředky.....	5
3	Mikroorganismy nacházející se v surovinách a výrobcích.....	8
3.1	Plísně.....	8
3.1.1	Výskyt plísní	9
3.1.2	Metabolické produkty plísní	11
3.1.3	Mykotoxiny v potravinách.....	12
3.1.4	Prevence výskytu mykotoxinů.....	13
3.1.5	Změny vznikající na skladovaném obilí činností plísní.....	13
3.2	Kvasinky	14
3.2.1	Technologicky užitečné kvasinky.....	14
3.2.2	Osmofilní kvasinky.....	14
3.2.3	Patogenní kvasinky	15
3.3	Bakterie	15
3.3.1	Technologicky užitečné bakterie	16

3.3.2	Technologicky škodlivé bakterie	16
3.3.3	Patogenní a toxinogenní bakterie.....	16
3.4	Faktory ovlivňující výskyt mikroorganismů v potravinách	17
3.4.1	Vnitřní faktory	17
3.4.2	Vnější faktory	20
3.5	Mikrobiální změny v surovinách	21
3.6	Boj proti nežádoucím mikroorganismům v potravinářském průmyslu.....	23
3.7	Vady pekařských výrobků vzniklé působením mikroorganismů.....	24
4	Metodika.....	26
4.1	Odběr vzorků.....	26
4.2	Příprava pomůcek a vzorků.....	26
4.3	Ředění vzorků	27
4.4	Očkování vzorků	27
4.5	Vybrané suroviny	28
5	Výsledky.....	29
6	Závěr.....	36
7	Použitá literatura.....	37
8	Použité zkratky	39
9	Přílohy	40

1 Úvod

Historie pekárenství

Přesné věcné nebo písemné nálezy o tom, kde se upekl první kvašený chléb, nebyly nalezeny. Všeobecně se předpokládá, že se tak stalo asi před šesti tisíci lety ve starém Egyptě. Z Egypta se chléb rozšířil do dalších částí světa. Například v Mezopotámii vyspělé obilnářství přispělo k vysoké kultuře tehdejších měst. Již v předsumerské době zde byly velmi rozšířeným pokrmem obilné kaše a chléb. Zajímavostí byly sladké datlové koláče. Dále pivní chleby, které po upražení byly rozemlety a používaly se spolu se sladem k výrobě piva. V Řecku se pekly placky zvané „máza,“ které se zhotovovaly z pšeničné nebo ječné mouky smísené s vodou. V době asi 4000 let př. Kr. se chléb stal základní potravinou. Na rozdíl od Řeků považovali Římané zemědělství za nejdůležitější odvětví. Z rozemleté špaldy, pšenice, ječmene, soli a vody vyráběli obilné kaše, až později začali připravovat chléb.

V Čechách se objevily první zmínky o pekařích již v 11. a 12. století v Kosmově kronice. Počet pekařů ve středověkých městech stále narůstal, tak vznikly zájmové organizace sdružující místní řemeslníky - cechy. K pekařům patřili také perníkáři. Tehdy se pekli především chléb bílý a režný, žemle, koláče, mazance a perník. Od druhé poloviny 19. století nastal rozvoj pekařské výroby, kdy došlo k zavádění racionálnějšího zpracování těsta při kynutí a pečení, zaváděním nových pecí a dalších technických novinek. Ruční práce se postupně přeměňovaly na práce strojové (Broncová, 2001).

V současných průmyslových pekárnách jsou kontinuálně mechanizované linky s průběžnými pecemi na výrobu chleba a pečiva. Z hlediska mechanizace je výroba rozčleněna do třech skupin, z nichž je každá na jiné úrovni a má jinou technologickou funkci. Jedná se o výrobu chleba, běžného pečiva a výrobu jemného pečiva (Drdák a kol., 1996).

2 Suroviny používané v pekárenské výrobě

Základní surovinou pro pekárenskou výrobu je mouka. Dalšími hlavními složkami jsou voda, droždí a sůl. Mezi ostatní přísady zahrnujeme cukr, tuk, mléko, vejce, chemická kypřidla aj. V současné technologii se používá celá řada zlepšovacích přísad: kyselina askorbová, emulgátory, látky vážící vodu (hydrokoloidy a modifikované škroby), enzymy, ochucovací, aromatizující látky a barviva (Příhoda a kol., 2003).

Druhy obilovin

Obiloviny jsou nepostradatelnou složkou lidské výživy a důležitou surovinou potravinářského průmyslu. Tyto potraviny obsahují potřebné rostlinné bílkoviny, polysacharidy a vlákninu. Hlavní obiloviny používané pro výrobu chleba jsou pšenice a žito. V mlýnech se také zpracovává rýže, kukuřice, ječmen, oves, pohanka aj. Pšenice se dělí na jarní a ozimou, dále podle obsahu lepku na tvrdou a měkkou. Tvrdá pšenice se používá především k výrobě těstovin a měkká k výrobě pečiva. Při zpracování je velmi důležitá technologická jakost pšenice, která zahrnuje tyto vlastnosti: objemová hmotnost, sklovitost, obsah mokrého lepku atd. (Drdák a kol., 1996).

2.1 Mouka

Pro pekárenské účely používáme hlavně pšeničnou a žitnou mouku s různým stupněm vymletí. Mouky se stupněm vymletím do 70 % se nazývají přední mouky a s obsahem popela 1 % jsou chlebové. Z čerstvě rozemleté mouky se nedá dosáhnout dobrých pekařských výsledků, proto se mouka musí nechat 3 až 4 týdny odležet, aby dostatečně vyzrála. Výrobky z takto vyzrálé mouky mají velký objem, jsou klenuté, střída je pružná a rovnoměrně pórovitá.

Mezi vlastnosti pšeničné mouky patří:

- 1) schopnost tvorby plynu, tzn. vytvoření dostatečného množství CO_2 při kynutí
- 2) síla mouky, tj. schopnost zadržet v pórech těsta vzniklý CO_2
- 3) barva mouky a náchylnost na tmavnutí, která ovlivňuje barvu střídy při pečení.

Pro průběh kvašení v těstě je důležité, aby mouka měla dostatečný enzymový komplex a vhodnou cukrotvornou schopnost. Jedná se o přítomnost α -amylázy a β -amylázy, které štěpí škrob na dextríny a maltózu, která je přístupná kvasinkám. Čím je mouka více vymletá,

tím více jsou poškozená škrobová zrna mletím, tím vyšší je cukrotvorná schopnost. U pšeničné mouky se hodnotí kvalita a jakost lepku. U žitné mouky je hodnocen sacharido-amyloázový komplex, jehož součásti jsou slizové látky (pentosany) a bílkovino-proteinázový komplex, který zajišťuje tvar a objem výrobku (Drdák a kol., 1996).

2.2 Voda

Obsah vody je nejdůležitějším omezujícím faktorem pro trvanlivost potravin, protože vytváří prostředí pro většinu procesů, které způsobují kažení. Voda, sloužící k přípravě těsta musí splňovat kvalitu pitné vody. Pitná voda nesmí obsahovat choroboplodné bakterie, jejichž přítomnost je indikována nálezem koliformních bakterií a enterokoků, které poukazují na fekální znečištění z výkalů, půdní vrstvy nebo znečištěním z povrchu půdy (Drdák a kol., 1996).

2.3 Droždí

Skoupil (1994) uvádí, že podstatou droždí jsou lisované kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae* Rees Meyen, rasy droždářské, vyrobené lihovým kvašením sladin připravených z melasy, přiměřeného množství dusíkatých a fosforečných živin a za intenzivního působení vzdušného kyslíku.

2.4 Sůl

Sůl má důležitý technologický význam. Ovlivňuje chuť, průběh kynutí a při pečení zlepšuje hnědnutí kůrky. Ve vyšším množství omezuje činnost kvasinek, těsto pomalu kyne, je vlhké a výrobky jsou přesolené (Szemes a Mainitz, 1999).

2.5 Cukr

Po stránce sensorické přidavek cukru ovlivňuje chuťové vlastnosti. Při pečení pak zbarvení kůrky pečiva. Z technologického hlediska má význam především při kvasných procesech. Vyšší dávky cukru působí negativně na činnost kvasinek a omezují bobtnání moučných bílkovin.

2.6 Tuk

Tuky a zejména fosfolipidy při mísení a zrání těsta vytvářejí komplex s lepem a ovlivňují jeho bobtnavost. Vyššími dávkami tuku je zpomalován proces zrání. Tenké tukové filmy obalují kvasničné buňky, čímž omezují fyziologickou činnost kvasinek. Výrobky s vyšším obsahem tuku méně vysychají, zůstávají déle vláčnější.

2.7 Mléko

Mléko a mléčné výrobky zvyšují nutriční hodnotu pekařských výrobků, protože jsou zdrojem cenných bílkovin, tuků, cukru, minerálních látek a termostabilních vitamínů. Při pečení se mění ve velmi cenné barevné, aromatické a chuťové látky. Mléčné výrobky používané v pekařských výrobcích jsou smetana, máslo, tvaroh, sýry, podmáslí a syrovátka (Skoupil, 1994).

2.8 Vejce

V pekárenské výrobě je povoleno používat pouze vejce slepičí. Technologický význam spočívá ve schopnosti bílku vytvářet pěnu, a tím zvyšovat pórovitost pečiva. Důležitý je i emulgační efekt lecitinu ve žloutku, který umožňuje vázání vodní fáze těsta a pečiva na emulzi s tukem. Tím je omezeno vypařování vody z výrobků a jeho stárnutí. Význam vajec v pečivu z hlediska jakosti spočívá především ve zlepšení organoleptických vlastností, tj. barva, vůně a chuť.

2.9 Ovoce a ovocné polotovary

V průmyslové výrobě se používají výhradně ovocné polotovary připravené konzervací ovocných plodů nebo jejich částí (ovocné kompoty, řezy, marmelády, džemy, apod.). V pekařské výrobě se ovocné komponenty používají pouze při výrobě jemného pečiva, kde zlepšují organoleptické vlastnosti, především chuť. Dále zvyšují biologickou hodnotu. Tepelnou úpravou klesá obsah vitamínu C. Vitamíny skupiny B a vitamín A jsou termostabilní, tudíž se tepelnou úpravou neničí. Z cukrů jsou přítomny glukóza a fruktóza. Dále jsou zde přítomny organické kyseliny (jablečná, citrónová a vinná), pektin, aromatické látky a barviva (Skoupil, 1994).

2.10 Aditivní látky

Využívají se záměrně z technologických důvodů při přípravě, výrobě, zpracování, balení, transportu a skladování výrobků. Jedná se o koření, potravinářské kyseliny, aróma, esence a esenciální látky (vitamíny, stopové prvky), konzervační látky, stabilizátory a barviva. Mezi potravinářské kyseliny patří kyselina askorbová, mléčná, octová, citrónová, vinná a jablečná. Kromě svých chuťových vlastností zabraňují růstu bakterií (Drdák a kol., 1996).

2.11 Zlepšující prostředky

Obsah proteinů, kvalita škrobu, lepku a aktivita moučných enzymů podléhá určitým výkyvům. Mlýny vyrovnávají kvalitativně rozdíly cíleným nákupem pšenice různé kvality nebo přidávají zlepšující prostředky, jako je např. kyselina askorbová.

Pekařské přípravky jsou určeny:

- k vyrovnávání měnících se technologických surovin, především mouky,
- ke zjednodušení technologické výroby pekařských výrobků,
- ke zlepšování kvality pekařských výrobků.

Pekařské přípravky mohou mít různé vlastnosti. Mohou např. zlepšovat zpracování těsta a kvalitu hotových výrobků, urychlovat kynutí, optimalizovat kyselost těsta, ovlivňovat barvu střídy a kůrky výrobků, zvyšovat množství vody do těsta a její lepší vázání (Szemes a Mainitz, 1999).

Rozdělení pekařských přípravků:

- pro pšenično-žitný a žitný chléb,
- pro pšeničný chléb, sendviče a běžné pečivo,
- pro pečivo jemné a plundrové,
- k prodloužení trvanlivosti,
- konzervační prostředky.

Složení pekařských přípravků

Pekařské přípravky jsou složeny z komponentů, které ovlivňují některé technologické vlastnosti nebo technologický průběh. Například místo několikasupňové přípravy žitného

kvasu, který trvá 12-16 hodin, je možné vyrobit kvalitní chléb s použitím vhodného přípravku již za 2-3 hodiny.

Běžnou součástí přípravků může být sušené mléko, modifikované škroby, aromatické látky, pražená žitná mouka jako barvivo apod. Většina přípravků se dodává v práškové podobě, ale některé přípravky mohou být v kašovitě, tekuté, či pastovité formě, pro zjednodušení technologie výroby (Szemes a Mainitz, 1999).

Rozdělení zlepšujících přípravků dle specifické přísady:

- enzymatické látky
- fortifikační látky
- povrchově aktivní látky
- oxidačně-redukční činidla
- konzervační látky.

Enzymatické látky

Enzymy jsou specifické biochemické katalyzátory bílkovinné povahy, které jsou schopny urychlovat biochemické procesy. Z hlediska výroby pečiva mají význam především diastatické, kvasné a proteolytické enzymy. Podstatou působení diastatických přípravků je činnost diastatických enzymů (α - a β - amylázy). První z nich štěpí amylozu až na maltózu, případně na glukózu. Maltóza a glukóza jsou dobře zkvasitelné cukry, což podporuje činnost kvasinek a vznik objemného pečiva (Skoupil, 1994).

Fortifikační látky

Fortifikace je obohacování potravin vitamíny, minerálními látkami, bílkovinami, vlákninou aj. Fortifikaci mouk vitamíny lze dosáhnout přidáním thiaminu, riboflavinu, vitamínu skupiny A, též vyšším vymletím, protože obalové vrstvy jsou na tyto látky bohatší. Přirozené fortifikace pečiva minerálními látkami lze dosáhnout používáním více vymletých mouk nebo celozrnných mouk. Přichází v úvahu i fortifikace umělá, a to především obohacování mouk biogenními prvky (Ca, P, Fe, Mg aj.). Většina pekařských výrobků nemá dostatek esenciálních aminokyselin, jde zejména o nedostatek lysinu. Nejčastěji se používá sušená syrovátka, tvaroh, sušené inaktivované droždí, bílkovinné koncentráty z mlýnských odpadů.

Látky povrchově aktivní - emulgátory

Dle Skoupila (1994) u výrobků kynutých droždím se jako hlavní funkce emulgátorů uvádí:

- schopnost vytvářet komplex s amylózou,
- schopnost vytvářet komplex s pšeničnou bílkovinou,
- schopnost rovnoměrně dispergovat tuk v těstě.

Emulgátory, které tvoří komplexy s pšeničnou bílkovinou, přispívají k optimálnímu vývinu lepku, zlepšuje se jeho schopnost zadržet vlhkost a kvasné plyny v těstě. Výsledkem působení emulgátorů je větší objem pečiva, rovnoměrnější pórovitost střídy a zpomalení stárnutí pečiva.

Potravinářské emulgátory lze rozdělit do těchto hlavních skupin:

- monoacylglyceroly a jejich deriváty,
- soli mastných kyselin,
- sojové lecitiny,
- soli fosfatidových kyselin.

Látky oxidačně – redukční

Tyto látky výrazně zasahují do technologických procesů působením na strukturu pšeničné bílkoviny. Předávkování oxidačními látkami má za následek zvýšenou lepivost těsta, tuhost těsta, zhoršení struktury a barvy střídky výrobků. Z oxidačních látek je nejvhodnější kyselina askorbová, která má široký rozsah použití. Reaguje rychle při obvyklých teplotách technologického procesu a snadno se dávkuje. Nejvhodnější z látek redukčního typu je cystein (Skoupil, 1994).

Konzervační látky

V pekárenské technologii je nutné u některých výrobků s delší trvanlivostí použít konzervační látky. Konzervanty jsou látky antimikrobní, používají se k ochraně proti nežádoucím mikroorganismům. Způsob jejich použití se řídí typem potraviny, požadovanou dobou minimální trvanlivosti, způsobem zabalení a v neposlední řadě vyhláškou 53/2002 Sb. ve znění pozdějších předpisů. Dle této vyhlášky je povolena kyselina sorbová, oxid siřičitý a jeho sloučeniny, kyselina propionová a její soli. Dále je třeba zdůraznit, že na zajištění požadované trvanlivosti výrobků má velký vliv celková hygiena výroby, i osobní hygiena pracovníků.

Pekařské směsi

Výběr typu pekařské směsi závisí na požadavcích pekárny. Výrobci nabízejí různé směsi pro různé typy výrobků:

Kompletní směsi – obsahují všechny suché příměsi včetně mouky; tyto směsi jsou vhodné pro menší pekárny.

Zakoncentrované kompletní směsi – obsahují všechny suché příměsi s minimálním obsahem mouky; tyto směsi jsou vhodné pro větší pekárny.

Premixy – obsahují různý podíl složek a pro přípravu určitého výrobku se v pekárně přidává směs (premix) v různých koncentracích a další suroviny.

Hotové směsi či premixy jsou nejčastěji používány na výrobu koblih, šlehaných hmot, celozrnného a vícezrnného pečiva, běžného pečiva a chleba (Příhoda a kol., 2003).

Výhody a nevýhody zlepšujících přípravků

Moderní pekařské prostředky ulehčují a zlepšují výrobu chleba, běžného i jemného pečiva, ale vždy nepřinášejí jen výhody. Velmi vzdušné a objemné žemle ztrácí oproti normálním chuťové vlastnosti. Kvůli větší ploše uvnitř rychleji stárnou. Okyselovací prostředky mají za následek ztrátu chuti žitných chlebů. Používání pekařských prostředků musí být promyšlené a jejich dávkování opatrné. Směrodatným důvodem by neměla být jen velikost pečiva či zkrácení pracovních postupů, ale i technologické požadavky (Szemes a Mainitz, 1999).

3 Mikroorganismy nacházející se v surovinách a výrobcích

3.1 Plísně

Plísně jsou mikroorganismy, které vytvářejí chomáčkované, barevné povlaky na různých substrátech. Botanicky patří mezi houby (*Mycota*). Obecně používaný pojem plísně ve skutečnosti zahrnuje jednak plísně pravé (řád *Mucorales*), jednak vláknité houby nedokonalé (třída *Deuteromycetes*). Dále budou všechny vláknité mikroorganismy nazývány botanicky nepřesným, avšak obecně vžitým označením - plísně. Základní morfologický útvar plísni je vlákno – hyfa. Hyfy jsou buď bez přehrádek, nebo jsou pravidelně či nepravidelně článkované. Jednotlivá vlákna se větví i nevětví. Vzájemně se proplétají a tím vytvářejí spleť vláken, kterou nazýváme mycelium. Rozeznáváme mycelium substrátové (prorůstá

substrátem, na němž se plíseň pomnožuje) a vzdušné, které je často bohaté a vystupuje až několik cm nad substrát (Tichá, 1988).

3.1.1 Výskyt plísní

Dle Tiché (1988) se s plísněmi setkáváme prakticky všude. Jsou přítomny v půdě, ve vzduchu, ve vodě, na rostlinách, surovinách a výrobcích. Některé druhy za určitých podmínek produkují do substrátu toxické metabolity- mykotoxiny.

Plísně jsou aerobní mikroorganismy, které se rozmnožují jak na povrchu, tak i uvnitř napadeného materiálu. Plísně mají široké enzymové vybavení, dokáží rozkládat kůže, tkaniny, papíry, barviva, apod. Dále mají schopnost využívat vzdušnou vlhkost. Napadají ty materiály, které jsou ve vlhkém prostředí. Plísně jsou schopny se rozmnožovat i za poměrně nízké vodní aktivity, kde napadají povrch džemů, marmelád, chleba, pečiva, mouky, skladovaného obilí apod. Řada plísní se v napadených výrobcích či surovinách rozvíjí ještě při 15 % obsahu vody, zatímco většina kvasinek a bakterií potřebuje alespoň 30 % obsahu vody. Plísně jsou schopny napadat i neporušená rostlinná pletiva zeleniny, ovoce, obilí, cukrovky.

Přítomnost plísní v mouce a obilí se projevuje zatuchlým pachem, který nelze odstranit. Takto napadená mouka a obilí se dále nedají zpracovávat. Plísně se dokáží rozmnožovat jak při nízkých teplotách (až – 10 °C), tak i při nízkém pH (kyselé šťávy). Vegetativní buňky jsou citlivé na vyšší teploty, spory přežívají i několikahodinový var.

Jejich negativní vlastností je tvorba mykotoxinů. Některé plísně jsou patogenní, jiné mohou vyvolávat alergické reakce. Jejich pozitivní význam je v produkci antibiotik, enzymů a organických kyselin (citronová, fumarová, glukonová, šťavelová) (Šilhánková, 2002).

Jednoznačně převažující mikroflórou na obilí během růstu, sklizně a skladování jsou plísně. Složení kontaminující mikroflóry je ovlivněno fyziologií zrna a vnějšími podmínkami. Plísně bývají přítomny v epidermální vrstvě, vzácněji v aleuronových buňkách, endospermu, klíčku a u pšenice v rýze. Obecně můžeme rozdělit plísně na tzv. polní a skladištní (Vaňátová, 2002).

Polní plísně se dokáží velmi přizpůsobit změnám způsobeným stárnutím rostlinného materiálu na poli. Pro svůj růst vyžadují relativně vysokou vodní aktivitu. Výjimku však tvoří r. *Cladosporium*, r. *Alternaria*, a r. *Epicoccum*, které jsou schopny přežít rychlé změny podmínek. *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* způsobují hnilobu stonku a sněť klasu pšenice i ječmene na poli. Tyto polní infekce se po sklizni mohou intenzivně rozvinout, jestliže se obilí skladuje při příliš vysoké vodní aktivitě. *F. graminearum* způsobuje přímou otravu. Mezi další rody polních plísní patří r. *Chaetomium*, r. *Trichoderma*, r. *Trichothecium*,

r. *Helminthosporium*, r. *Botrytis*, r. *Aureobasidium*. Tyto plísně mohou negativně ovlivňovat chuť, zabarvení zrna a snižovat klíčivost. Za přítomnosti toxinogenních druhů plísní může dojít k produkci mykotoxinů do zrna.

Skladištní plísně jsou přizpůsobeny stabilnějším podmínkám při skladování a obecně rostou při nízké vodní aktivitě. Mezi hlavní plísně zahrnujeme r. *Penicillium* a r. *Aspergillus*, ačkoliv i některé druhy rodu *Fusarium* mohou napadnout i navlhlá zrna. Z penicilií se na skladovaném obilí mohou vyskytovat druhy *P. expansum*, *P. cyclopium*, *P. notatum*, *P. frequentans*, *P. spinulosum*, *P. brevicompactum* aj. Z druhů rodu *Aspergillus* je to především *A. glaucus*, *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. fumigatus* (Vaňátová, 2002).

Müller (1986) uvádí, že plísně vyskytující se na obilí můžeme rozdělit do dvou skupin, plísně šedé a plísně barevné. Plísně šedé jsou reprezentovány především rody *Rhizopus* a *Mucor*. Považují se za málo škodlivé. Plísně barevné jsou nejčastěji zelené a černé formy rodů *Aspergillus* a *Penicillium*. Jsou nositeli neodstranitelného zatuchlého pachu a některé druhy mohou být toxické. Z dalších plísní je třeba jmenovat r. *Alternaria*, r. *Cladosporium*, r. *Fusarium*, r. *Trichoderma* a r. *Absidia*.

Rozmnožování plísní

Plísně se rozmnožují vegetativně, tedy rozpadem vlákna, kdy z každého fragmentu vlákna může vyrůst nový jedinec. Dále pohlavními nebo nepohlavními sporami. Nepohlavní spory vznikají jak na vegetativních hyfách, tak ve fruktifikačních orgánech během nedokonalého stádia vývoje hub. Spory nacházející se vně orgánu se nazývají exospory nebo konidie a vznikají odškrabáním, pučením nebo rozpadem mycelia. Nepohlavní spory vznikají u některých rodů ve speciálním vakovitém útvaru, který se nazývá sporangium. Zde se jedná o endospory. Jedním z identifikačních znaků plísní jsou právě fruktifikační orgány, které jsou rodově specifické. Pohlavní spory vznikají po spájení dvou buněk (Vlková a kol., 2009).

Fyzikálně-chemické podmínky pro růst a množení plísní

Plísně jsou velmi tolerantní k různým, často i extrémním podmínkám vnějšího prostředí. Jsou schopny růst a množit se při teplotě od -8 až do +90°C. Rozlišujeme druhy psychrofilní (rostou při nízkých teplotách), mezofilní (rostou při středních teplotách) a termofilní, které rostou při vyšších teplotách (Tichá, 1988).

Tab. 1. Minimální, optimální a maximální teploty pro různé druhy plísní. (Vaňátová, 2002)

Plísně	Teplota (°C)		
	Minimální	Optimální	Maximální
Psychrofilní	-8 - 0	10 - 20	25 - 30
Mezofilní	5 - 10	20 - 40	40 - 45
Termofilní	25 - 40	50 - 60	70 - 80

Většina plísní kontaminující pekařské výrobky patří mezi mezofilní. Psychrofilní jsou druhy z rodů *Fusarium*, *Botrytis*, *Cladosporium* a *Alternaria* (Tichá, 1988). Mezi termofilní plísně patří např. *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium emersonii* a *Mucor pumillus* aj. (Sharma, 2005.) Dle požadavků na relativní vlhkost se plísně rozdělují na hydrofyty (vyžadují vysokou relativní vlhkost), mezofyty (průměrnou vlhkost) a xerofyty (nízkou relativní vlhkost). Mikroorganismy obsahují 70 až 90 % hmotnostních vody (Tichá, 1988).

3.1.2 Metabolické produkty plísní

Plísně produkují do substrátu široké spektrum metabolitů. Některé jsou pro člověka užitečné, jako jsou enzymy (proteolytické, lipolytické, amylolytické, pektolytické a celulolytické), antibiotika (penicilin, fumigatin), organické kyseliny (citronová, glukonová, gallová, šťavelová). Mezi ty nežádoucí patří mykotoxiny (aflatoxiny, ochratoxiny, zearalenon, patulin, aj.). Mykotoxiny jsou sekundární metabolity plísní. Výskyt některých mykotoxinů byl prokázán v obilovinách, chlebu, pečivu i v těstovinách. Zdrojem kontaminace může být použitá mouka vyrobená z plesnivého obilí nebo zplesnivělá mouka či samotný výrobek. Toto platí pouze u výrobků s několikadenní trvanlivostí. Plíseň tvoří mykotoxin až po ukončení růstové fáze. Pro vzklíčení spory, vytvoření mycelia a sporulaci je potřeba několik dnů a teprve poté dochází k produkci mykotoxinů (Tichá, 1988).

Výskyt toxinogenních plísní v potravinách nemusí nutně znamenat i přítomnost mykotoxinů. Závisí to na typu potravin, způsobu skladování, přítomnosti konzervačních látek apod. Nebezpečnost toxinogenních plísní spočívá v nespolehlivém rozpoznání zaplísnění pouhým okem, zvláště v počátečních dnech růstu. Růst plísní bývá někdy zaměňován za pomoučení, či nemusí být okem viditelné. Někdy je produkován plísněvý zápach, který signalizuje zaplísnění potravin (Vaňátová, 2001).

3.1.3 Mykotoxiny v potravinách

Aflatoxiny

Aflatoxiny jsou mykotoxiny produkované plísněmi *Aspergillus flavus* a *A. parasiticus*. Vyskytují se zejména v obilovinách a produktech z nich, v kukuřici, kořeni, sóji, burských oříšcích, apod. Rozeznáváme šest hlavních typů aflatoxinů. B₁, B₂, G₁, G₂ (podle barvy fluorescence v UV světle, B = blue, modrá, G = green, zelená), M₁ a M₂, které byly izolovány z mléka. Aflatoxiny jsou termorezistentní.

Ochratoxiny

Ochratoxiny jsou hlavně produkty plísně *Aspergillus ochraceum*, dále pak *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. mellus* a dalšími. Mezi nejtoxičtější patří ochratoxin A, který je produkován také plísněmi *Penicillium viridicatum*, *P. cyclopium*, *P. variable*. Vyskytují se v kukuřici, ječmeni, ovsu, sójových bobech, apod. Mají hepatotoxické a nefrotoxické účinky (Vlková a kol., 2009).

Patulin

Patulin je produkován plísněmi *Penicillium claviforme*, *P. expansum*, *P. patulum*, *Aspergillus clavatus*, *A. terreus*, *Byssochlamys nivea* a *By. fulva*. Minimum pro růst *P. expansum* a *P. patulum* je a_w 0,83 – 0,81. Nejznámější je výskyt v jablečných či jiných ovocných výrobcích a pečivu (Jay, 1992).

Citrinin

Jedná se o mykotoxin produkovaný plísněmi *Penicillium citrinum* a *P. viridicatum*, ale i dalšími plísněmi. Nachází se v rýži, plesnivém chlebu, pšenici a ovsu. Působí jako karcinogen.

Fumosin

Fumosiny jsou produkované plísněmi *Fusarium moniliforme* a *F. proliferatum*. Mohou se vyskytovat na kukuřici a ostatních zrninách. Mají hepatotoxické a neurotoxické účinky a způsobují rakovinu jícnu (Vlková a kol., 2009).

Zearalenon

Zearalenony jsou produkovány zástupci rodu *Fusarium*, zejména *Fusarium graminearum* a *F. tricinctum*. Vyskytují se hlavně v pšenici, ovsu, ječmeni, kukuřici a sezamu. V UV světle fluoreskují zeleně (Jay, 1992).

Trichoteceny

Mezi producenty trichotecenů patří plísně rodu *Fusarium*. Nacházejí se zejména v kukuřici, pšenici, sóje a v semenech olejnin. Nejznámějšími typy jsou T₂ toxin a vomitoxin (Vlková a kol., 2009).

Alternaria toxiny

Mezi producenty toxických látek patří *Alternaria citri*, *Al. alternata*, *Al. solani* a *Al. tenuissima*. Nacházejí se v ovoci a zelenině. *Al. alternata* produkuje stemphyltoxin III. (Jay, 1992).

3.1.4 Prevence výskytu mykotoxinů

Odstranit mykotoxiny z potravin a krmiv je téměř nemožné, ale nezbytné je zabránit jejich samotnému vzniku. Mezi preventivní opatření patří především omezení rozvoje plísní rostoucích na zemědělských plodinách, rychlé vysušení, správné skladování, zpracování pouze surovin nenapadených plísněmi, devitalizace plísní sterilací nebo pasterací, použití konzervačních látek a zabránění sekundární kontaminaci potravin (Vlková a kol., 2009).

3.1.5 Změny vznikající na skladovaném obilí činností plísní

Tichá (1988) uvádí, že vlivem většího pomnožení plísní na skladovaném obilí dochází k určitým změnám, které můžeme rozdělit na změny: senzorické, biochemické, biologické a toxikologické.

Senzorické změny

Následkem pomnožení plísní na obilí dochází ke změnám organoleptických vlastností. Obilí dostává nepříjemný, zatuchlý pach, který přechází i do mouky. Dochází ke změně barvy, zrno tmavne.

Biochemické změny

Při větším pomnožení plísní, např. při samozáhřevu, dochází k rozkladu vysokomolekulárních látek na nízkomolekulární, a tím dochází ke ztrátám sušiny. Někdy dochází ke snížení obsahu mokrého lepku a ke zhoršení jeho kvality.

Biologické změny

Plísně mají rozhodující vliv na snížení klíčivosti skladovaného obilí. Zárodečná pletiva (klíček, štítek), která mají nejvyšší obsah vody, jsou nejdříve napadána plísněmi.

Snížení klíčivosti závisí zejména na množství a druhovém zastoupení. Na snížení klíčivosti se podílejí tyto druhy: *Helminthosporium sativum*, *Aspergillus restrictus*, *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. ochraceum* a *Penicillium expansum* aj.

Toxikologické změny

Některé druhy plísní množících se na obilí mohou do obilí za vhodných podmínek (teplota, vlhkost) produkovat při skladování toxické metabolity – mykotoxiny (Tichá, 1988).

3.2 Kvasinky

Kvasinky se řadí mezi houby – Mycota. Jedná se o jednobuněčné houby, které se rozmnožují pučením. Vyskytují se prakticky všude. Nacházejí se v půdě, ve vzduchu, na nejrůznějších potravinách apod. Buňky kvasinek mohou být velmi rozmanitého tvaru. Mohou tvořit buňky vejčité (*Saccharomyces cerevisiae*), elipsoidní (*S. cerevisiae* var. *elipsoideus*), kulovité (r. *Torulopsis*), hruškovité (r. *Pichia*) nebo válečkovité (r. *Schizosaccharomyces*).

Rozmnožování kvasinek

Kvasinky se rozmnožují převážně vegetativně (nepohlavně) – pučením, méně často dělením či askosporami. Při pučení se na mateřské buňce vytváří buňka, která když doroste do velikosti mateřské buňky, tak se odškrucuje. Vznikne tak buňka dceřiná.

3.2.1 Technologicky užitečné kvasinky

V pekárenském průmyslu využíváme vlastností kvasinek druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasinky v těstě rozkládají přidaný cukr (sacharózu) na glukózu a fruktózu, které prokvášejí za přítomnosti O₂ na CO₂ a H₂O. V další fázi kvasného procesu zkvašují i maltózu. Uvolněný CO₂ významně ovlivňuje kvalitu výrobků, kypří těsto, ovlivňuje texturu střídky a objem výrobků (Tichá, 1988).

3.2.2 Osmofilní kvasinky

Jedná se o kvasinky, které optimálně rostou ve velmi koncentrovaných roztocích. Mezi kvasinky, které způsobují kažení potravinářských surovin a potravin se řadí druhy *Saccharomyces rouxii*, *S. bailii* var. *osmophilus*, *S. bisporus* var. *mellis*, *Torulopsis lactis-condensi*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Debaryomyces hansenii*, *T. candida*, *Pichia ohmeri*, *Hansenula anomala* var. *anomala* a další. Rozmnožují se v cukerných roztocích,

v koncentrovaných ovocných šťávách, v sirupech, džemech, v koncentrátech z ovoce, v marcipánu, v solených výrobcích, apod. Rozmnožují se při 0 až 40 °C, ale jejich optimální teplota je 27 °C. Příznaky kažení v těchto potravinách jsou kvašení, zákal, alkoholový nebo ovocný zápach, popř. změna barvy (Jesenská, 1987).

3.2.3 Patogenní kvasinky

Některé kvasinky mohou způsobovat onemocnění. Jedná se o kvasinku *Candida albicans*. Běžně se vyskytuje na kůži a sliznicích člověka a zvířat. Při oslabení organismu může dojít k přemnožení kvasinky r. *Candida* na sliznicích. Další kvasinka, která může způsobit vážná onemocnění je *Cryptococcus neoformans*. Tato kvasinka může proniknout do plic. Odtud se může šířit do centrální nervové soustavy a vyvolat zánět mozkových blan (Tichá, 1988).

3.3 Bakterie

Jedná se o prokaryotické organismy, které nemají oddělené jádro od cytoplazmy jadernou membránou. Dle tvaru se dělí na tři základní typy: koky, tyčinky a vláknité bakterie. Velikost koků se pohybuje od 0,5 do 1 µm, tyčinky mají délku od 1,5 do 3 µm, nejdelší mohou být 10 – 50 µm dlouhé (Vlková a kol., 2009).

Rozmnožování bakterií

Většina bakterií se rozmnožuje dělením, jen několik rodů pučením. Dělení je charakterizováno tím, že ve střední části buňky vyrůstá z cytoplazmatické membrány prstencovitá vychlípenina směřující dovnitř buňky, která vytváří přepážku rozdělující buňku na dvě zhruba stejně velké části. Přepážka se pak pokryje buněčnou stěnou. Z původní jedné buňky vzniknou dvě, které se od sebe buď oddělí, nebo zůstanou spojeny v řetězku (Šilhánková, 2002).

Dělení bakterií ve vztahu k člověku:

- technologicky užitečné
- technologicky škodlivé
- patogenní a toxinogenní

3.3.1 Technologicky užitečné bakterie

Mezi technologicky užitečné bakterie řadíme bakterie, které jsou využívány při výrobě mléčných výrobků, dále při přípravě žitných kvasů. Dominantní úlohu zde mají mléčné bakterie a kvasinky, které svými metabolity ovlivňují kvalitu kvasů, těst a finálních výrobků. Mléčné bakterie produkují kyselinu mléčnou, octovou a malé množství kyseliny mravenčí, vinné, citronové a jantarové. Tyto kyseliny snižují pH kvasu a ovlivňují průběh procesů. Jedná se o druhy *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. fermenti* a *L. delbrueckii*.

3.3.2 Technologicky škodlivé bakterie

Pekárenské výrobky s delší skladovatelností jsou za určitých podmínek ohroženy nitkovitostí, která je způsobena přemnožením aerobních sporotvorných bakterií z rodu *Bacillus*. Tyto bakterie jsou přítomny ve značných koncentracích v půdě a odtud se dostávají na obiloviny, do mouk a pekárenských výrobků. Během pečícího procesu nepřesahuje teplota uvnitř výrobku 95 °C, nedochází tedy k usmrcení těchto spor. Tyto spory za vhodných podmínek vyklíčí ve vegetativní buňky, které se dále množí. Nejvíce se ve výrobcích objevuje *Bacillus subtilis* (Tichá, 1988).

Bakterie z rodu *Bacillus* zkvašují cukry na organické kyseliny (octovou, mravenčí, jantarovou, mléčnou aj.), oxid uhličitý, vodík, etanol, aceton a 2,3-butandiol (Görner a Valík, 2004).

Některé spory snášejí několikahodinový var a ve vlhkém prostředí jsou účinně usmrcovány až při teplotách 115 – 120 °C, po 15 - 30 minutách. Tato doba je závislá na druhu sporulujících bakterií, ale i na pH a složení prostředí. Přítomnost lipidů, bílkovin a vyšších koncentrací sacharidů chrání spory a zvyšuje jejich odolnost. Naopak kyselé prostředí snižuje odolnost spor při zahřívání.

Bakterie z rodu *Leuconostoc* (*Le. mesenteroides*) v potravinách s vyšším obsahem sacharózy (marmelády, koncentráty ovocných šťáv) způsobují vznik slizovitých polymerů a kyseliny mléčné (Šilhánková, 2002).

3.3.3 Patogenní a toxinogenní bakterie

Přenašeči těchto mikroorganismů mohou být kontaminované suroviny, náradí, náčiní, obalový materiál, hmyz, hlodavci, infikovaný člověk, aj. Mikroorganismy, které ohrožují hygienickou kvalitu pekárenských výrobků, jsou patogenní bakterie (r. *Salmonella*), podmíněně patogenní bakterie (*E. coli*, r. *Citrobacter* aj.), toxiny produkující mikroorganismy (stafylokoky, plísně) a patogenní viry (virus hepatitidy) (Tichá, 1988).

Koliformní bakterie

Koliformní bakterie se nachází v trávicím traktu teplokrevných zvířat i člověka a jsou reprezentovány čtyřmi rody z čeledi *Enterobacteriaceae*: r. *Escherichia*, r. *Citrobacter*, r. *Enterobacter*, r. *Klebsiella*. Kmen *E. coli* 0157:H7 způsobuje gastroenteritidu u kojenců i dospělých. Mezi patogenní kmeny *E. coli* patří enteropatogenní (EPEC), enterotoxinogenní (ETEC), enteroinvazivní (EIEC), enterohemoragický (EHEC), fakultativně enteropatogenní (FEEC). Enterohemoragický kmen je reprezentován *E. coli* 0157:H7 (Jay, 1992). Tento druh produkuje toxiny, tzv. verotoxiny, které poškozují sliznici střeva. Způsobuje hemoragickou kolitidu, může dojít i k poškození ledvin. Infekční dávka je velmi nízká. Zdrojem infekce je např. nepasterizované mléko (Bartošová, Hanulíková, 2004).

r. *Salmonella*

Salmonella je považována za nejvýznamnější patogen na světě. Jedná se o gramnegativní tyčinky, pro které je optimální teplota růstu 37 °C. Tyto bakterie lze zničit při 72 °C po dobu 15 min. Způsobují onemocnění, tzv. salmonelózu, jejíž příznaky jsou nevolnost, žaludeční křeče, zvracení, horečka a průjem. Nejčastěji se vyskytující je druh *Salmonella enteritidis*. Mohou se vyskytovat v mléce, ve vejcích a vaječných produktech, v mase a v koření (International Commission, 2002).

3.4 Faktory ovlivňující výskyt mikroorganismů v potravinách

Tyto faktory rozdělujeme na vnitřní (složení a enzymová aktivita) a vnější (technologické procesy výroby, balení, skladování).

3.4.1 Vnitřní faktory

Mezi vnitřní faktory patří:

- pH
- vodní aktivita
- oxidačně-redukční potenciál
- obsah živin
- antimikrobiální látky
- biologické struktury

3.4.1.1 pH

Vlková a kol. (2009) uvádějí, že biologická aktivita mikroorganismů je silně ovlivněna koncentrací vodíkových iontů v prostředí. Každý mikrobiální druh se rozmnožuje v určitém rozmezí pH. Pro většinu mikroorganismů se hodnota pH pohybuje okolo 7 (6,6 – 7,5), ale některé druhy rostou i při pH 4 a méně. Pro většinu bakterií a kvasinek je rozmezí ideálních hodnot pH poměrně úzké, pro většinu plísní naopak široké. Extrémní hodnoty pH mohou na mikroorganismy působit jak pozastavením jejich množení, tak jejich usmrcením.

Většina bakterií roste při neutrálním nebo slabě kyselém pH. K bakteriím citlivým k nízkému pH patří zejména hnilobné a patogenní bakterie, čehož se využívá zejména při konzervování potravin. Pro růst kvasinek je optimální mírně kyselé prostředí, ve slabě alkalickém pH je jejich aktivita značně omezena. Optimální hodnota pH pro plísně je neutrální, ale jsou schopny růst i v extrémních podmínkách.

3.4.1.2 Vodní aktivita (a_w)

Mikroorganismy potřebují dostatečné množství vody na látkovou přeměnu. Voda tvoří 75 – 90 % jejich těla. Jelikož nedisociované molekuly vody mohou volně procházet přes cytoplazmatickou membránu, musí být voda v dostatečném množství přítomna i v okolním prostředí, tzn. v přístupné formě, tedy volná. Sůl, sacharidy nebo bílkoviny však mohou vodu vázat natolik, že se stane pro mikroorganismy nevyužitelná. Míra využitelnosti vody pro mikroorganismy se vyjadřuje jako vodní aktivita (a_w). Potravinu z hlediska náchylnosti k mikrobiálnímu kažení, dělíme na snadno kazitelné ($a_w > 0,95$, trvanlivost je několik dní), středně kazitelné ($a_w < 0,75$, trvanlivost do dvou měsíců), málo kazitelné ($a_w < 0,65$, trvanlivost do dvou let). Potravinu s hodnotou $a_w < 0,6$ mají prakticky neomezenou trvanlivost.

Snížení vodní aktivity prostředí, a tím zabránění činnosti mikroorganismů způsobující jejich kažení, je možno několika způsoby. Jedná se o odstranění vody sušením nebo odpařením (zahuštěním), dále zvýšením koncentrace rozpustných látek, jako je přídavek sacharózy nebo NaCl (Vlková a kol, 2009). Většina plísní roste v rozmezí vodní aktivity 0,85 – 1,00, ale existují i tzv. osmofilní plísně, které rostou i při a_w 0,6 (Vaňátová, 2002).

3.4.1.3 Oxidačně-redukční potenciál (E_h)

Dalším faktorem prostředí potravin, který ovlivňuje rozvoj mikroorganismů je oxidačně-redukční potenciál. Oxidačním procesem se rozumí odevzdání elektronů (sloučení s kyslíkem) a redukcí jejich příjem. Mezi oxidační činidla patří kyslík, dusičnany, železité ionty a peroxidy. K redukčním činidlům patří železnaté ionty, vodík, sloučeniny se sulfhydrilovou skupinou nebo reaktivními dvojnými vazbami. Pokud substrát elektrony odevzdává je oxidován, pokud je přijímá, je redukován. Oxidačně-redukční potenciál je dán složením, hodnotou atmosférického tlaku, pH a přístupem vzduchu k potravinač, mění se během technologického zpracování a skladování.

3.4.1.4 Obsah živin

Mikroorganismy potřebují pro svůj růst vodu, zdroj energie (zdroj uhlíku a dusíku), minerální látky, vitamíny, aj. Nejdříve mikroorganismy metabolizují jednodušší látky, poté z prostředí začínají využívat i komplexnější sloučeniny. Zdrojem energie pro mikroorganismy jsou zejména sacharidy, alkoholy a aminokyseliny. Primárním zdrojem dusíku jsou aminokyseliny a amoniak. Některé mikroorganismy využívají složitější dusíkaté látky (nukleotidy, peptidy a proteiny). Dále pro svůj růst vyžadují malé množství vitamínů skupiny B. Minerální látky využívají z anorganických solí, nebo je asimilují z organických látek, většinou bílkovin a aminokyselin.

3.4.1.5 Antimikrobní látky

Jedná se o sloučeniny, které mají specifické nepříznivé účinky na mikroorganismy. Buď pouze brzdí jejich rozmnožování, pak se nazývají mikrobistatické nebo buňky přímo usmrcují, pak se jedná o mikrobicidní látky. Antimikrobní látky jsou obsaženy např. v koření (hřebíček, skořice, oregáno), dále v česneku, podzemnici olejné, hroznovém vínu aj.

3.4.1.6 Biologické struktury

Přirozené obaly rostlinných a živočišných produktů (skořápky ořechů, obaly semen, slupky ovoce, skořápky vajec a další) poskytují ochranu proti pronikání mikroorganismů (Vlková a kol., 2009). Mají nízkou vodní aktivitu a nedostatek snadno dostupných živin. Fyzické poškození povrchové vrstvy umožňuje mikrobiální invazi. Proto je důležité, aby při sklizni a dopravě byly produkty zachovány neporušené v co největší míře (Adams, Moss, 2000).

Pokud jsou vejce skladována při vhodných podmínkách, tak skořápky a vnitřní membrány zabraňují pronikání téměř všech mikroorganismů (Vlková a kol., 2009).

3.4.2 Vnější faktory

Mezi vnější faktory patří:

- teplota skladování
- relativní vlhkost prostředí
- přítomnost plynů
- přítomnost a aktivita mikroorganismů

3.4.2.1 Teplota skladování

Mikroorganismy jsou schopny růst ve velmi širokém rozmezí teplot. Podle optimální teploty jejich růstu se dělí na psychrotrofní, psychrofilní, mezofilní, termofilní a pertermofilní.

Pro psychrofilní mikroorganismy je optimální teplota růstu nižší než 20 °C, množí se ještě při 0 - 5 °C. Z potravinářského hlediska patří mezi nejdůležitější psychrotrofní mikroorganismy, které mají optimum svého růstu 25 – 30 °C, ale jsou též schopny se množit i při chladírenských teplotách 0 – 10 °C. Patří sem bakterie, zejména druhy rodů *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Vibrio* a jiné. Dále kvasinky rodů *Candida*, *Saccharomyces* a *Rhodotorula*, z plísní jsou to druhy rodů *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Botrytis* a jiné.

Většina mikroorganismů se řadí do skupiny mezofilních. Jejich optimální teplota se pohybuje v rozmezí 30 – 40 °C (u intestinálních bakterií 37 °C, u řady běžných bakterií, kvasinek a plísní okolo 30 °C).

Termofilní mikroorganismy mají optimální teplotu růstu vyšší než 45 °C. Mezi termofilní bakterie patří druhy rodů *Bacillus*, *Clostridium* a *Lactobacillus*.

3.4.2.2 Relativní vlhkost prostředí

Relativní vlhkost prostředí se dá vyjádřit jako podíl aktuálního tlaku vodních par obsažených v prostředí, ku maximálnímu možnému tlaku vodních par za dané teploty (Vlková a kol., 2009). Relativní vlhkost skladovacího prostředí je důležitá jak z hlediska vodní aktivity, tak z hlediska růstu mikroorganismů na povrchu substrátu. Při vodní aktivitě, která je rovna 0,6, je důležité, aby potravina byla skladována za podmínek relativní vlhkosti,

kteře neumožňují zvýšení vlhkosti ze vzduchu. Když jsou potraviny s nízkou a_w umístěny do prostředí s vysokou relativní vlhkostí, zvýší vlhkost tak, až dojde k rovnováze. Obecně platí, že čím je vyšší teplota skladování, tím nižší musí být relativní vlhkost prostředí a naopak (Jay, 1992).

3.4.2.3 Přítomnost plynů

Plísně jsou striktní aeroby, tzn., že ke svému životu potřebují kyslík. Toho se využívá při skladování obilí v hermeticky uzavřených komorách, i při balení pekárenských výrobků do nepropustných obalů, plněných ochrannou atmosférou (Vaňátová, 2002).

Při tomto způsobu ochrany nedochází k ovlivnění organoleptických vlastností výrobků a ani ke změně vzhledu. Vzhledem k tomu, že plísně jsou striktně aerobní, zabraňuje atmosféra CO_2 a N_2 jejich rozvoji (Tichá, 1988).

3.4.2.4 Přítomnost a aktivita mikroorganismů

Některé mikroorganismy mají schopnost produkovat látky působící antagonisticky na jiné. Jde zejména o antibiotika, bakteriociny, peroxid vodíku a organické kyseliny (Vlková a kol., 2009).

3.5 Mikrobiální změny v surovinách

Mikrobiální změny obilí během skladování

V obilí se mohou nacházet mykotoxiny (zearalenon, trichoteceny, ochratoxin A, aflatoxiny). Plísně rodu *Fusarium* napadají obilné zrn již před sklizní. Stupeň napadení obilných zrn a tvorby toxinů je ovlivněn ve velké míře agronomickými podmínkami a vlivem počasí. Ve větším množství se na obilí vyskytují plísně rodu *Penicillium* a *Aspergillus* (Görner a Valík, 2004).

Faktory, které nejvíce ovlivňují rozvoj plísní při skladování, jsou teplota, relativní vlhkost, tenze O_2 a vodní aktivita. Dále se jedná o mechanické porušení zrna (zhoršení kvality během skladování), množství příměsí, přítomnost hmyzu. Škůdci mohou zanášet mikroorganismy do obilí z povrchu svého těla nebo přenášet mikroorganismy a spory z infikovaných ohnisek na místa dosud nekontaminovaná. Přítomnost škůdců vytváří mimořádně příznivé podmínky pro rozvoj plísní. Dochází nejen ke zvyšování vlhkosti obilné masy, ale také k porušení celistvosti zrn požerem.

Samozáhřev obilí vzniká následkem intenzivní biochemické činnosti pomnožujících se mikroorganismů, dýcháním obilí a biologickou činností hmyzu. Plísně mají hlavní úlohu při vzniku samozáhřevu. Vyznačují se schopností uvolňovat velké množství tepla, mají nízké teplotní minimum, jsou schopny žít při nízké vlhkosti.

K plesnivění obilí může docházet již na poli, dále během sklizně a nejvíce při skladování. Při dodržování určitých podmínek je možné jejich obsah snížit, např. skladováním obilí při vlhkosti 13,5 – 14 %, při nízké teplotě, při sníženém obsahu poškozených zrn, příměsí a nečistot, dále separací zdravého obilí od nezdravého (Tichá, 1988).

Mikrobiální změny v mouce

Obilí je vždy kontaminováno určitým množstvím plísní. Částečný podíl této kontaminace přechází do mouky, přestože je obilí během mlecího procesu upravováno a zbavováno nejvíce kontaminovaných obalových vrstev. Obsah mikroorganismů v mouce závisí na stupni kontaminace obilí, na způsobu ošetření zrna před mletím, na stupni vymletí mouky a úrovni hygieny ve mlýně (Tichá, 1988).

Mikrobiální změny ovocných náplní

Ovocné náplně jsou po stránce mikrobiální poměrně stálé, což je dáno anaerobním prostředím, vysokým osmotickým tlakem (vyvolán vysokou koncentrací cukrů), a v neposlední řadě i působením konzervačních činidel. Přesto však vlivem nedodržení technologických a hygienických předpisů se mohou na povrchu náplní objevit plísně. Mikrobiálně mohou být napadeny polotovary, ale častěji jde o napadení náplní, které přišly do styku s pracovníky, resp. s výrobním zařízením. Dále přídatné suroviny (kontaminované drobečky) mohou částečně přispívat k rozvoji nežádoucí mikroflóry. Jde především o plísně rodů *Aspergillus* a *Penicillium*. Kvašení je způsobeno kvasinkami, např. r. *Saccharomyces* aj. K mikrobiálnímu znehodnocení náplně může také dojít po náhlé změně teplot výrobků. Jestliže se studený výrobek rychle oteplí, orosí se a v místech zkondenzování vodní páry se vytvoří optimální podmínky pro rozvoj mikroorganismů (Skoupil, 1997).

Při výrobě je nezbytné používat nezávadné suroviny a pečlivě dodržovat hygienu. Je nutné dbát na dostatečnou tepelnou úpravu náplní, jejich správné uchovávání a manipulaci s nimi. Starší náplně se nesmí míchat s novými, jinak hrozí též kontaminace (Koudelka, 2009).

3.5.1.1 Působení mikroorganismů

Mikroorganismy se často nacházejí na povrchu nebo uvnitř pekařských výrobků, kde mají vhodné podmínky pro svou činnost. Na rozvoj mikroorganismů má rozhodující vliv vlhkost, teplota, doba uskladnění, ale i vhodný substrát pro mikroorganismy. Většina výrobků má tak krátkou životnost, že výrobky jsou zkonsumované dříve, než dojde k pomnožení mikroorganismů. U některých výrobků jsou často vytvořené skoro optimální podmínky pro rozvoj mikroorganismů, které v průběhu 24 - 36 hod. výrobky znehodnotí. Tyto výrobky se dále nedají konzumovat a u některých lidí mohou vyvolat zdravotní problémy (Szemes a Mainitz, 1999).

3.6 Boj proti nežádoucím mikroorganismům v potravinářském průmyslu

Potraviny nesmějí být nositeli patogenních ani toxinogenních mikroorganismů, které by mohly ohrožovat zdraví konzumenta. V boji proti činnosti nežádoucích mikroorganismů se používají fyzikální a chemické prostředky. Navíc je nutné dodržovat přísné hygienické zásady, aby nedošlo ke kontaminaci mikroorganismy. Pracovníci musí mít pokrývku hlavy, dbát na čistotu rukou a oděvu. Oděv a obuv je nutné vyměňovat v prostorách izolační předsíně. Dále jsou nutná vhodně umístěná umyvadla s proudící a teplou vodou.

Mechanické prostředky

K mechanickým prostředkům v boji proti mikroorganismům patří odstraňování prachu, nečistot a zbytků organického materiálu ze strojů, podlah, stěn, tak i z méně přístupných míst, kde by se mohla vytvořit ložiska pomnožujících se mikroorganismů. Mechanické zákroky se kombinují s fyzikálními a chemickými. K důležitému mechanickému prostředku patří ventilace provozních místností. Nejvhodnější je klimatizace, při níž do provozu přichází mikrobiologicky čistý vzduch. Vzduch je upraven na žádanou teplotu a vlhkost, za současného odsávání znečištěného vzduchu.

Fyzikální prostředky

Zde se nejvíce uplatňuje vlhké teplo do 100 °C (při pasteraci, tepelné konzervaci). Filtrace slouží především k odstranění mikroorganismů ze vzduchu používaného při klimatizaci, a také pro sterilaci. Vzduch může být také čištěn elektrostatickým srážením částic prachu a přítomných mikroorganismů. Ultrafialové záření se používá především pro povrchovou sterilaci a sterilaci prostorů. Mezi další fyzikální prostředky patří také snížení

vodní aktivity v potravinách a jejich surovinách sušením nebo odpařováním a dále také uchovávání potravin a surovin za nízkých teplot.

Chemické prostředky

Tyto prostředky v boji proti nežádoucím mikroorganismům nesmějí nepříznivě ovlivňovat chuť potravin, výrobní prostředí, zdraví zaměstnanců nebo konzumentů ani poškozovat výrobní zařízení. Jejich účinnost má mít široké spektrum a nemá klesat během uchovávání (Šilhánková, 2002).

3.7 Vady pekařských výrobků vzniklé působením mikroorganismů

Nitkovitost

Původcem této vady je *Bacillus mesentericus* a *Bacillus subtilis*. *B. mesentericus* se už v poslední době neuvádí jako samostatný druh, ale jako synonymum pro *B. subtilis* a *B. pumilus*. Jejich spory se vyskytují v půdě, v obilovinách a též v mouce. Dodržováním správných zásad technologie výroby nedochází k pomnožení těchto bakterií. Optimální teplota jejich rozmnožování je 36 – 40 °C. Způsobují rozklad lepku a škrobu za vzniku lepivých vláken. Střídka výrobku se stává lepivá, výrobek má nepříjemnou vůni. Ze střídky se po rozlomení vytahují tenká vlákna. Příznaky nitkovitosti se projevují 12 - 16 hod. po upečení. Pro vznik nitkovitosti je kritické období, kdy je vyšší teplota a relativní vlhkost vzduchu v pekárnách. Nitkovitost se nejčastěji projevuje u pšeničných a zřídka u žitných chlebů. Dále u pečiva, ale i u bábovek, vánoček apod.

Podmínky, při nichž se bakterie množí:

- mouka je neúměrně infikovaná bakteriemi způsobujícími nitkovitost
- kvas, těsto a syrové výrobky kynou při vyšších teplotách rychle a nevytvoří se dostatek kyselin
- chléb po upečení udržuje dlouho svou teplotu okolo 40 °C
- chléb má nízkou kyselost.

Plesnivění

Plesnivění patří k nejčastější příčině znehodnocení surovin a hotových výrobků. Vhodná teplota pro růst plísní na potravinách je v rozmezí teplot -15 °C až +45 °C. Spory mezofilních plísní jsou zničeny při pečení. Teplota na povrchu výrobků převyšuje teplotu 160 °C a ve střídce nad 90 °C. Plesnivost výrobků je většinou způsobena sekundární

kontaminací z prostředí pekárny. Hladká a celistvá kůrka brání usazování plísní, ale objevují se v trhlinách kůrky, kde je vyšší vlhkost. Z plísní vyskytujících se nejčastěji na chlebu jsou: *Rhizopus nigricans*, *Penicillium glaucum*, *Aspergillus glaucus*, *Mucor pusillus*, *M. spinosum*, *M. racemosus*, *M. piriformis*, *Neurospora sitophila*. Výskyt plísní je obrazem udržování hygieny v pekárně (Szemes a Mainitz, 1999).

Plesnivění je v dnešní době relativně rozšířenou chorobou chlebů (zejména balených). K tomuto plesnivění napomáhají různá porušení technologického postupu, mezi něž patří:

- nedostatečné propečení chleba, který má vlhkou, polosyrovou střídku
- vložení chleba nikoli bezprostředně po vytažení z pece, ale až po částečném vychladnutí, čímž se vložící voda neodpaří z povrchu chleba a naopak jej navlhčí
- zabalení nevychladlého chleba (Hamr, 2009).

Červenání

Tuto vadu způsobují bakterie *Serratia marcescens*, které vytvářejí červené barvivo prodiogiozín. Barvivo vytváří především na škrobnatých surovinách, kde roste v rozmezí teplot od 5 do 37 °C.. Tvoří okrouhlé červené kolonie. Netvoří spory. Jedná se o sekundární kontaminaci, protože bakterie jsou pečením zničeny. Červenání může způsobovat též *Neurospora sitophila*, *Oospora aurantiaca* a kvasinky rodu *Rhodotorula*, které vytváří slabě růžové kolonie. Pigmentaci mohou způsobovat bakterie r. *Micrococcus* a r. *Pediococcus*, které vytvářejí žluté kolonie (Müller, 1986).

Zbělení střídky chleba

Způsobeno kvasinkami *Endomycopsis fibuliger* a *Trichosporon variabilis*, které vytvářejí bílé skvrny na výrobcích. Dodržováním hygieny výrobních prostorů lze zabránit této vadě (Szemes a Mainitz, 1999).

Rozklad bílkovin

Činností proteolytických bakterií je způsoben rozklad bílkovin. Přítomnost většího počtu proteolytů v potravíně se může negativně projevit změnou sensorických vlastností, mění se vzhled, chuť, často vzniká i zápach. Rozkladem bílkovin se snižuje i nutriční hodnota. Z hygienického a zdravotního hlediska jsou nejdůležitější metabolické produkty mikrobiální proteolýzy, které mohou ohrožovat zdraví konzumentů. K proteolytům patří bakterie rodů *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* (Klaban, 2005).

4 Metodika

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo seznámit se s metodami mikrobiologických analýz vybraných surovin používaných v pekárenství. Rozsáhlejší analýzy jsou plánovány v budoucí diplomové práci.

Mikrobiologické vyšetření

V pekárensko-cukrářské výrobě se při mikrobiologickém vyšetření zjišťuje:

1. zdravotní nezávadnost výrobků
2. dodržení předepsaných technologických postupů
3. dodržení hygienických zásad při výrobě, přepravě, zpracování a skladování surovin a výrobků
4. jakost surovin určených k výrobě
5. skladovatelnost potravin

Bezpečnost a hygiena práce v mikrobiologické laboratoři

Při mikrobiologickém rozboru je důležité dbát na aseptické prostředí a aseptickou práci. Jen tak můžeme zamezit kontaminaci a zajistit dobrou úroveň mikrobiologických rozborů. Laboratorní zařízení musí být takové, aby se dalo snadno sanitovat (Müller, 1986).

4.1 Odběr vzorků

Důležitou podmínkou je zajistit aseptické prostředí při odběru a odebírat vzorek průměrný. Vzorky odebíráme do sterilních vzorkovnic, aby byla vyloučena sekundární kontaminace. Vzorky se přepravují do laboratoře tak, aby v průběhu přepravy nedošlo k pomnožení nebo usmrcení mikroorganismů (Müller, 1986).

4.2 Příprava pomůcek a vzorků

Mezi obvyklé vybavení laboratoře patří autokláv, termostaty, Petriho misky, pipety, zkumavky, baňky nebo lahve přiměřeného objemu a ne větší než 500 ml (ČSN EN ISO 4833). Veškeré pomůcky a nádobí, včetně živných půd a zředovacích roztoků musí být sterilizovány. Pomůcky a nádobí při teplotě 170 °C, 1 hod. Živné půdy se sterilizují v autoklávu 15 min. při 121 °C.

Veškeré vzorky se musí skladovat za předepsaných podmínek. Cílem je zajistit, aby prostředí, v němž se provádí mikrobiologický rozbor, neovlivnilo spolehlivost výsledků.

Před otevřením obsahu vzorku se okolí místa otevření desinfikuje 70 % etanolem (ČSN EN ISO 7218).

4.3 Ředění vzorků

Pro kultivační vyšetření je nutné vzorky ředit tak, aby vyrostlé kolonie byly izolované a daly se snadněji spočítat. Počet ředění je dán předpokládaným množstvím stanovovaných mikroorganismů ve vzorku. Nejdříve si připravujeme výchozí suspenzi, kdy odvážené množství vzorku smícháme s devítinásobným objemem ředícího fyziologického roztoku. Další desetinásobná ředění se provádí smícháním určeného objemu výchozí suspenze (1 ml) s devítinásobným množstvím ředícího roztoku (9 ml). Pro přípravu každého ředění se používá sterilní pipeta (ČSN EN ISO 6887-1).

4.4 Očkování vzorků

Z připraveného ředění pipetujeme 1 ml vzorku do Petriho misek. Inokulum se v každé misce přelije 15 ml agaru o teplotě 44 - 47 °C. Inokulum se s půdou pečlivě promíchá krouživými pohyby. Misky se nechají utuhnout a pak umístí do termostatu. Po určené době inkubace se spočítají kolonie vyrostlé na plotnách (ČSN EN ISO 4833). Sporulující bakterie od nesporelujících, byly rozlišovány mikroskopicky.

Při mikrobiologické kontrole vybraných surovin byly použity následující živné půdy (Oxoid, resp. Merck)

- pro stanovení celkového počtu mikroorganismů - Malt extract agar
- pro stanovení celkového počtu bakterií – Nutrient agar
- pro stanovení enterokoků – Chromocult
- pro stanovení sporulujících bakterií – WL nutrient
- pro stanovení koliformních bakterií – Mac Conkey agar

Tab. 2. Teploty a doby inkubace pro jednotlivá stanovení

	Teplota inkubace	Doba inkubace
Celkový počet mikroorganismů	30 °C	3 – 5 dní
Celkový počet bakterií	37 °C	24 - 48 hod.
Enterokoky	37 °C	24 – 48 hod.
Sporulujících bakterie	30 °C	24 – 48 hod.
Koliformní bakterie	37 °C	24 – 48 hod.

4.5 Vybrané suroviny

Ve vybraných surovinách byla sledována přítomnost mikroorganismů:

Povidla a jahodová náplň – jedná se o ovocné náplně, které se používají k plnění koláčů, listových a plundrových těst. Obsahují ovoce, cukr, často jsou obohacovány o vitamíny, zahušťovadla a aromatické látky. Pro zahuštění náplní se nejčastěji používají drobečky z piškotových hmot, které mohou být nositelem kontaminace výrobků (Skoupil, 1997).

Cereal (Ireks enzyma, s.r.o.) - jde o cereální směs, která obsahuje červenou pšenici ve formě hrubozrnného šrotu. Směs prodlužuje čerstvost výrobků. Je určena pro výrobu pečiva.

Vital soft (Ireks enzyma, s.r.o.) – speciální zlepšující přípravek pro balené jemné pečivo, prodlužuje čerstvost výrobků.

Diana - pro jemné pečivo (Ireks enzyma, s.r.o.) – surovina určená k výrobě jemného pečiva. Výrobky jsou vhodné pro diabetiky.

Diapol (Ireks enzyma, s.r.o.) – jedná se o sladový zlepšující přípravek, obsahuje sušené mléko a syrovátku. Je určen zejména pro výrobu jemného pečiva. Připravuje se z pšeničné mouky výběrové polohrubé, sladové moučky, Laktopolynolu 30 (povrchově aktivní látka), vitamínů (B₁ a B₂) a předem již zmíněného sušeného mléka a syrovátky. (Skoupil a Pelikán, 1999).

Selský chléb (Semix Pluso, spol. s.r.o.) – jde o sypkou směs, která je určena pro výrobu chleba. Obsahuje žitnou, pšeničnou a sojovou mouku, pšeničnou bílkovinu, zahušťovadla, regulátor kyselosti (kyselina citronová a mléčná), pekařský enzym.

5 Výsledky

Identifikaci kolonií na Petriho miskách jsem provedla pomocí Gramova barvení, mikroskopováním a určením dle zbarvení kolonií na selektivních živných půdách. K orientačnímu určování mikroorganismů jsem používala Školní atlas mikroorganismů (Tvrdoň, 1978).

Nejčastěji se ve vzorcích vyskytovaly tyto mikroorganismy:

r. *Acetobacter*

Jde o významný rod tzv. octových bakterií. Barví se gramnegativně, jsou striktně aerobní. Teplotní rozmezí růstu je 5 – 42 °C. Charakteristická je oxidace etylalkoholu na kyselinu octovou. V přírodě jsou hojně rozšířeny. Nejvýznamnějším druhem je *Acetobacter aceti*, který má značný význam v kvasném průmyslu (Tvrdoň, 1992). Používá se při výrobě octa. Nepříznivě se tyto bakterie uplatňují jako nežádoucí kontaminace při výrobě droždí (Šilhánková, 2002).

r. *Bacillus*

Jedná se o grampozitivní tyčinky, většinou pohyblivé, tvořící endospory. Produkuje katalázu, zkvašují cukry a rozkládají bílkoviny. Jsou technologicky škodlivé. Přežívají pasterační teploty a běžné způsoby dezinfekce (Müller, 1986).

Rostou při teplotě od -5 až do 75 °C. Při kvašení cukrů vznikají často kyseliny a plyn. Nacházejí se v půdě a ve vodě, následně se pak dostávají do potravin, které znehodnocují. (Tvrdoň, 1992). Při požití potravy, která obsahuje enterotoxin, dochází k průjemovým onemocněním, poškození střev, zvracení, křečovitým bolestem břicha (Vlková a kol., 2009).

r. *Enterococcus* (dříve rod *Streptococcus*)

Jedná se o grampozitivní bakterie, které se jsou fakultativně anaerobní a netvoří spory. Enterokoky pocházejí ze střevního traktu. Nejznámějším představitelem je *Enterococcus faecalis*. Vyskytuje se ve výkalech a v kontaminovaných potravinách (Müller, 1986).

Enterokoky se liší od koliformních bakterií tím, že jsou schopny růst v prostředí s vyšší koncentrací soli (6,5 % NaCl) a také jsou relativně odolné vůči mrazu. Některé enterokoky (*E. faecalis* a *E. faecium*) jsou poměrně odolné vůči teplu, mohou přežít obvyklé pasterizační teploty mléka. Mohou se usadit a přetrvávat na zařízení při procesu zpracování potravin po dlouhou dobu. Tato skutečnost poukazuje na použití špatných výrobních postupů (Doyle a Beuchat, 2007).

r. *Flavobacterium*

Je velmi rozšířen v půdě, vodě a potravinách, např. v mléce. Jedná se o aerobní, gramnegativní nepohyblivé tyčinky (Görner a Valík, 2004). Tvoří většinou žlutý (růžový) pigment. Rod *Flavobacterium* zahrnuje psychrofilní bakterie, které se projevují proteolytickou aktivitou (Klaban, 2005).

Koliformní bakterie

Jako koliformní bakterie označujeme všechny aerobní a fakultativně anaerobní gramnegativní nesporulující tyčinky, které zkvašují laktózu s tvorbou plynu během 48 hodin. Patří sem především *Escherichia coli*, r. *Citrobacter*, r. *Enterobacter* a r. *Klebsiella*. Při mikrobiologických kontrolách v potravinářském průmyslu slouží jako indikátor fekálního znečištění (Jay, 1992).

r. *Micrococcus*

Je rod grampozitivních, obligátně aerobních bakterií. Buňky mají kulovitý tvar a vyskytují se jednotlivě nebo ve shlucích. Optimální teplota růstu je 25 – 30 °C. Tvoří lesklé kolonie často zbarvené žlutě, oranžově nebo růžově. Způsobují pigmentaci pečiva (Tvrdoň, 1992).

r. *Mucor*

Je rozsáhlý rod, který zahrnuje přes 100 druhů. Vytváří bílé, světle nebo tmavěji zbarvené porosty několik mm až cm vysoké. Některé druhy obsahují proteolytické enzymy, jiné amylolytické či lipolytické. Některé druhy se vyznačují schopností vyvolávat v cukerných roztocích etanolové kvašení, jiné se vyznačují produkcí antibiotik. Jsou mezi nimi i patogenní druhy. Tvoří též mykotoxiny (Tvrdoň, 1992).

Ve vlhkém prostředí způsobuje kažení chleba, džemů, ovoce, zeleniny a dalších potravin. Některé druhy jako *Mucor mucedo*, *M. racemosus* způsobují kontaminaci vzduchu (Sharma, 2005).

r. *Penicillium*

Je to nejrozšířenější a nejrozsáhlejší rod, který zahrnuje až 150 druhů. Význam některých druhů je v produkci antibiotik, negativní význam je v produkci mykotoxinů. Dále může způsobit alergické reakce (Tvrdoň, 1992).

Je velmi rozšířen v přírodě, na nejrůznějších organických materiálech, surovinách a potravinách. Pro tento rod je typická štětičkovitá stavba konidioforu. Tvoří sametové nebo

vlnaté kolonie různých barev (modrozelená, šedozelená, žlutozelená, šedá, červenohnědá apod.) (Tichá, 1988).

r. *Proteus*

Jedná se o gramnegativní pohyblivé tyčinky fermentující glukózu. Optimální teplota růstu je 37 °C, na potravinách roste i při nižších teplotách. Způsobuje infekce močových cest (Görner a Valík, 2004). Je přítomen ve střevním traktu zvířat a člověka. Rozkládá bílkoviny za vzniku silného hnilobného pachu, který je způsoben hlavně tvorbou sirovodíku a indolu. Patří mezi nejrozšířenější hnilobné bakterie (Šilhánková, 2002).

Tab.3. Nálezy v jednotlivých vzorcích (KTJ/1g původního vzorku)

Vzorky	CPM	CPM log	Bakt.	Bakt. log	Enterokoky	Sporulující	Koliformní
Povidla	330	2,5	330	2,5	0	0	300
Jahodová náplň	1670	3,2	670	2,8	0	150	0
Cereal	3000	3,5	2667	3,4	680	930	260
Vital soft	330	2,5	330	2,5	0	0	0
Diana pro JP	3670	3,6	670	2,8	0	100	0
Diapol	17300	4,2	16670	4,2	7320	5120	0
Selský chléb	0		0		0	0	0

pozn. CPM – Celkový počet mikroorganismů

Bakt. – Celkový počet bakterií

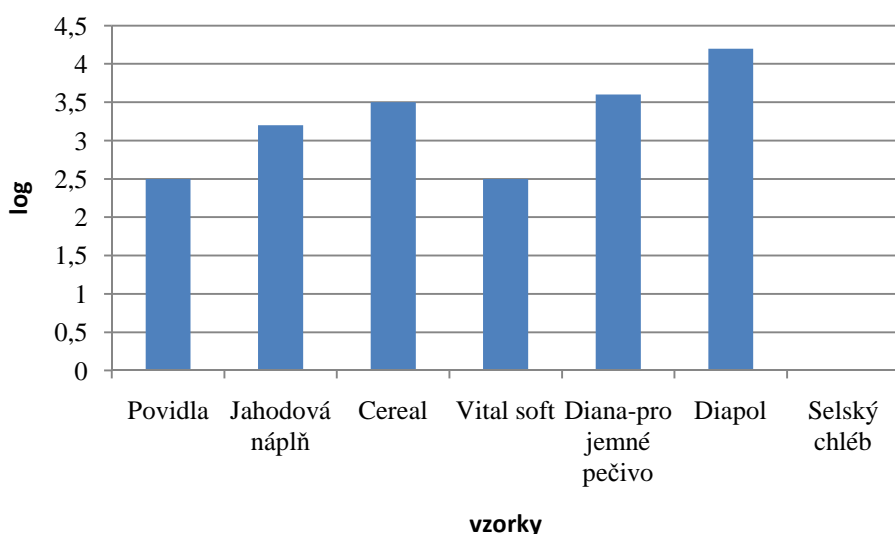
Enterokoky – Nárůst na enterokoky

Sporulující – Sporulující bakterie

Koliformní – Koliformní bakterie

JP – jemné pečivo

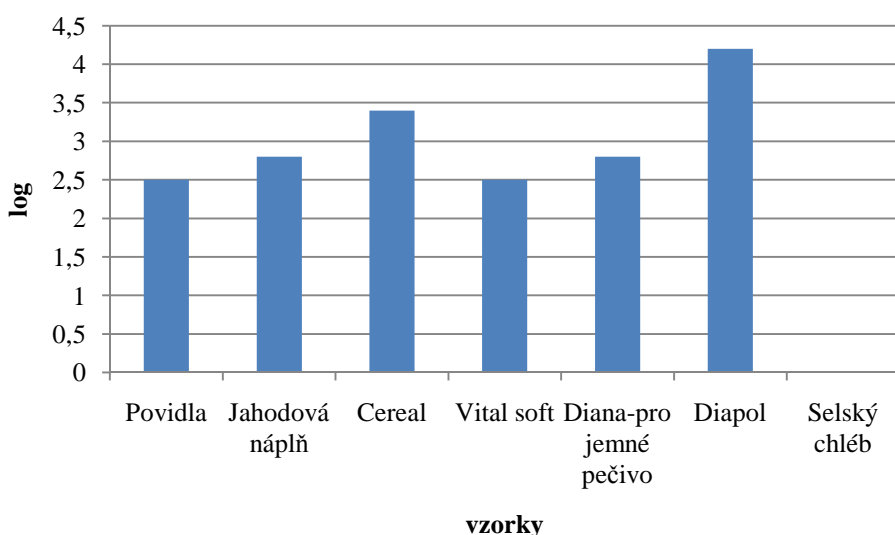
Graf 1. Celkový počet mikroorganismů (KTJ/1g původního vzorku)



Vzhledem k rozdílným nárůstům mikroorganismů v jednotlivých vzorcích byly výsledky mikrobiologického rozboru u stanovení celkového počtu mikroorganismů a stanovení celkového počtu bakterií zlogaritmovány. Vzorky byly stanovovány v původní sušině.

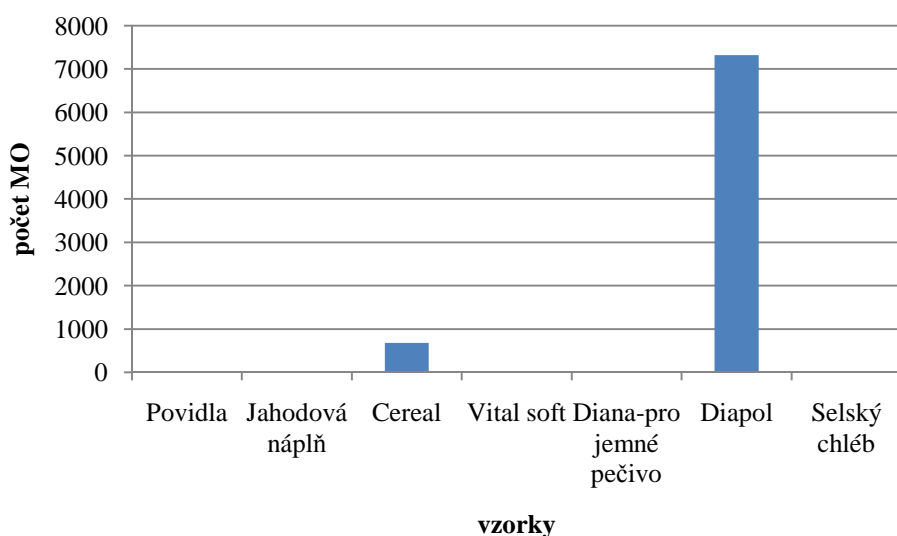
Z tohoto grafu vyplývá, že nejvyšší počet celkových mikroorganismů obsahoval zlepšující přípravek Diapol, naopak bez nálezu byl vzorek Selského chleba.

Graf 2. Celkový počet bakterií (KTJ/1g původního vzorku)



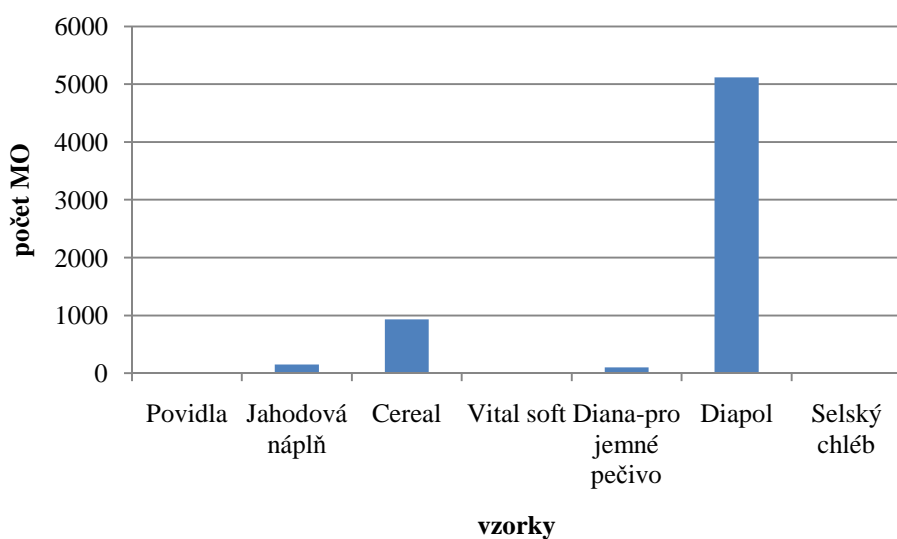
Z tohoto grafu je patrné, že největší výskyt bakterií byl u Diapolu, který obsahoval r. *Acetobacter*, r. *Micrococcus*, r. *Flavobacterium*, r. *Bacillus*, r. *Enterococcus*. U ostatních vzorků byl též prokázán výskyt bakterií. Selský chléb byl bez nálezu.

Graf 3. Enterokoky (KTJ/1g původního vzorku)



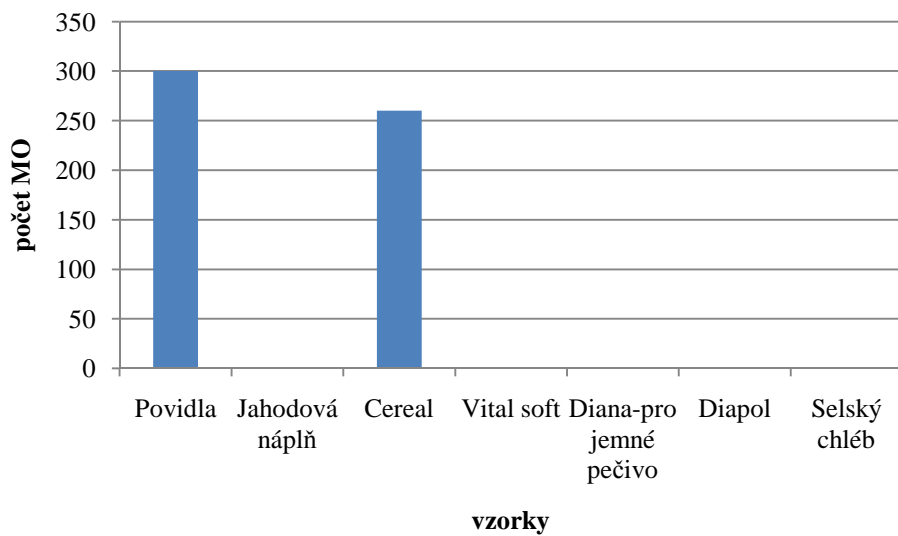
Enterokoky byly zaznamenány ve vzorku Diapolu, který obsahoval značný počet. U vzorku Cereal byl též zaznamenán jejich nárůst, ale ne v tak vysokém počtu. U ostatních vzorků nebyl prokázán výskyt těchto bakterií.

Graf 4. Sporulující bakterie (KTJ/1g původního vzorku)



Ve vzorku Diapolu se vyskytovalo značné množství sporulujících bakterií z rodu *Bacillus*. Dále byl zaznamenán výskyt v Cerealu, v menší míře ve vzorku Diana a v jahodové náplni. Kontaminace mohla být způsobena nedodržováním hygieny při výrobě těchto přípravků, či špatným skladováním. Rod *Bacillus* přežívá teplotu pečení. Jednak způsobuje technologickou vadu - nitkovitost, ale také může ohrožovat zdraví konzumenta.

Graf 5. Koliformní bakterie (KTJ/1g původního vzorku)



Nejvíce se koliformní bakterie vyskytovaly v povidlech. Cereal vykazoval též přítomnost těchto bakterií. Tyto výsledky poukazují na špatnou hygienu a sanitaci v provozu. Ostatní vzorky neprokázaly přítomnost koliformních bakterií.

Diskuze

Z mikrobiologického hlediska byl jako nejlépe hodnocen Selský chléb, který neobsahoval téměř žádnou mikroflóru. Z toho vyplývá, že byla dodržena odpovídající hygiena jak při výrobě, tak i při skladování. Dalším důvodem může být obsah konzervačních látek, které brání růstu mikroorganismů.

Nejvíce příhodné prostředí pro kontaminující mikroorganismy poskytuje Cereal, který vykazoval nálezy při všech stanoveních. Z toho vyplývá, že ke kontaminaci došlo pravděpodobně při výrobě, balení, či skladování.

Velmi vysoký výskyt byl shledán u Diapolu, zejména při stanovení celkového počtu mikroorganismů, celkového počtu bakterií. Významný byl i nárůst enterokoků a sporulujících bakterií. Pouze bez nálezu bylo stanovení na koliformní bakterie. Dále zde byly identifikovány rody *Micrococcus* a *Flavobacterium*, které mohou způsobovat pigmentaci pečiva, r. *Acetobacter*, který může způsobovat kyselost a *Enterococcus*, jehož zdrojem mohlo být sušené mléko, či špatná hygiena při výrobě apod.

Ve zlepšujícím přípravku Diana se nevyskytovaly indikátory fekálního znečištění. Vyskytovaly se zde sporulující bakterie způsobující nitkovitost, které se do výrobku mohly dostat ze vzduchu, či z půdy, nebo během procesů spojených s výrobou. Dále bakterie r. *Acetobacter*, způsobující okyselení, plísně r. *Mucor*, které se mohly dostat do suroviny z půdy nebo během skladování.

Vital soft neprokázal přítomnost na koliformní bakterie, enterokoky, ani na sporulující bakterie, ale obsahoval bakterie r. *Proteus*, které způsobují hnilobu.

Jahodová náplň obsahovala sporulující bakterie, způsobující nitkovitost, dále bakterie r. *Flavobacterium*, způsobující pigmentaci a plísně r. *Penicillium*. Některé druhy těchto plísní mohou být toxinogenní. Do náplně se tyto plísně mohly dostat vzduchem, nebo nevhodným skladováním.

Povidla obsahovala koliformní bakterie, které se mohly do vzorku dostat kontaminací při výrobě (použitím závadných surovin, či nedostatečnou tepelnou úpravou), nebo při skladování.

6 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo posoudit pomocí mikrobiologických rozborů kvalitu vybraných surovin, které se používají při výrobě chleba, běžného a jemného pečiva. V této práci byly zhodnoceny výsledky při jednotlivých stanoveních.

Součástí bakalářské práce bylo seznámit se s metodami mikrobiologických analýz vybraných surovin, které se v současné době používají v pekárnách.

Dále jsem se zabývala výskytem mikroorganismů, které se mohou nacházet v surovinách, případně i v hotových výrobcích. Z výsledků vyplývá, že tyto suroviny jsou vhodným substrátem pro řadu mikroorganismů. Především se v surovinách vyskytovaly bakterie, zvláště sporulující, které způsobují technologickou vadu nitkovitost. Tyto bakterie mohou ohrožovat zdraví konzumenta projevující se průjmovým onemocněním a zvracením. Dále byla zjištěna přítomnost plísní, které způsobují plesnivění. Některé z nich mohou být patogenní, či toxinogenní. Přítomnost kvasinek nebyla prokázána.

Při celkovém zhodnocení zkoumaných vzorků byl jako nejlépe hodnocen Selský chléb, který neprokázal výskyt mikroorganismů. Naopak nejvíce mikroorganismů se vyskytovalo ve vzorcích Cerealu a Diapolu. U vzorku Cereal byla prokázána přítomnost sporulujících bakterií, enterokoků i koliformních bakterií. U vzorku Diapol se vyskytovaly enterokoky, sporulující bakterie a bakterie rodů *Acetobacter*, *Micrococcus* a *Flavobacterium*.

Kontaminace surovin mohla být způsobena řadou faktorů, jako např. pracovními operacemi, znečištěným zařízením, závadnými komponenty (pro výrobu směsí, zlepšujících přísad a náplní), nedostatečnou hygienou a sanitací, případně vzduchem.

7 Použitá literatura

- Adams, M. R., Moss, M. O. 2000. Food mikrobiology. 2. vyd, The Royal Society of Chemistry, UK, 448 s. ISBN 0-85404-611-9
- Broncová, D. 2001. Historie pekárenství v Českých zemích. Milpo Media s.r.o., Praha, 271 s. ISBN: 80-86098-21-4
- Doyle, M. P., Beuchat, L. R. 2007. Food mikrobiology. ASM Press, Washington, D. C., 1038 s. ISBN-13: 978-1-55581-407-6
- Drdák, M., Studnický, J., Morová, E., Karovičová, J. 1996. Základy potravinářských technologií. 1. vyd., Malé centrum, Bratislava, 512 s. ISBN 80-967064-1-1
- Görner, F., Valík, L. 2004. Aplikovaná mikrobiológia potravín. 1. vyd, Malé centrum, Bratislava, 528 s. ISBN 80-967064-9-7
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 2002. Microorganisms in foods. Kluwer academic, New York, 362 s. ISBN 0-306-47262-7
- Jay, J., M. 1992. Modern food mikrobiology. An avi book, New York, 701 s. ISBN 0-442-00733-7
- Jesenská, Z. 1987. Mikroskopické huby v požívatinách a v krmivách. 1. vyd., Alfa, Bratislava, 320 s.
- Klaban, V. 2005. Ilustrovaný mikrobiologický slovník, 1. vyd, Galén, Praha, 654 s. ISBN 80-7262-341-9
- Müller, K. 1986. Biologie pro 3. ročník SPŠ potravinářské technologie, obor zpracování mouky. 1. vyd., SNTL, Praha, 180 s.
- Příhoda, J., Humpolíková, P., Novotná, D. 2003. Základy pekárenské technologie. 1. vyd., Pekař a cukrář s.r.o, Praha, 363 s. ISBN 80-902922-1-6
- Sharma, P. D. 2005. Fungi and Allied Organisms. Alpha Science International Ltd., Oxford, U. K., 545 s. ISBN 1-84265-277-X
- Skoupil, J. 1994. Suroviny na výrobu pečiva. Kora, Pardubice, 211 s. ISBN 80-85644-07-X
- Skoupil, J. 1997. Cukrářská výroba I. 1. vyd., Podnikatelský svaz pekařů a cukrářů v ČR, Praha, 137 s.
- Skoupil, J., Pelikán, M. 1999. Cukrářská výroba III. 1. vyd., Podnikatelský svaz pekařů a cukrářů v ČR, Praha, 224 s.

- Szemes, V., Mainitz, R. 1999. Technológia pekárskej výroby. 1. vyd., Gmbh & Co Bratislava, 159 s.
- Šilhánková, L. 2002. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 1. Vyd., Academia, Praha, 363 s. ISBN: 978-80-200-1703-1
- Tichá, J. 1988. Mikroorganismy a jiní škůdci v mlýnsko – pekárenském průmyslu a ochrana proti nim. 1.vyd., SNTL, Praha, 152 s.
- Tvrdoň, M. 1978. Školní atlas mikroorganismů. SNTL, Praha, 178 s.
- Tvrdoň, M. 1992. Mikrobiologický a biotechnologický lexikon. Credit, Praha, 187 s.
- Vaňátová, P. 2002. Plísně a mlýnsko – pekárenský průmysl. Ročenka pekaře a cukráře, 2002, 89 – 91 s.
- Vaňátová, P. 2001. Negativní působení plísní. Pekař, cukrář, 12/2001, 4 – 5 s.
- Vlková, E., Rada, V., Killer, J. 2009. Potravinářská mikrobiologie. 2. vyd, Česká zemědělská univerzita v Praze, 168 s. ISBN 978- 80-213-1988-2

Použité normy:

- ČSN EN ISO 4833: Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. 2003. Český normalizační institut, Praha, 16 s.
- ČSN EN ISO 6887 – 1: Mikrobiologie potravin a krmiv – Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinásobných ředění – Část 1: Všeobecné pokyny pro přípravu výchozí suspenze a desetinásobných ředění. 1999. Český normalizační institut, Praha, 12 s.
- ČSN EN ISO 7218 - Mikrobiologie potravin a krmiv – všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení. 2008. Český normalizační institut, Praha, 68 s.

Internetové zdroje

- Bartošová, L., Hanulíková, A. Mikrobiální původci alimentárních onemocnění [online]. Státní zemědělská a potravinářská inspekce. 24. února 2004 [cit. 2010-03-10]. Dostupné z <<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1000167&docType=ART&nid=11325&chnum=5>>
- Hamr, K. Chléb – jeho druhy a hlavní vady [online]. Státní zemědělská a potravinářská inspekce. 28. července 2009 [cit. 2010-04-03]. Dostupné z <<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1000770&docType=ART&nid=11327>>
- Koudelka, J. Potraviny v letním období. [online]. Státní zemědělská a potravinářská inspekce. 28. července 2009 [cit. 2010-04-03]. Dostupné z <<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?prn=1&baf=0&nid=11342&doctype=ART&docid=1001290&chnum=1&inqResults=11357>>

8 Použité zkratky

A.	<i>Aspergillus</i>
Al.	<i>Alternaria</i>
B.	<i>Bacillus</i>
By.	<i>Byssochlamys</i>
E.	<i>Escherichia</i>
F.	<i>Fusarium</i>
L.	<i>Lactobacillus</i>
Le.	<i>Leuconostoc</i>
M.	<i>Mucor</i>
P.	<i>Penicillium</i>
S.	<i>Saccharomyces</i>
T.	<i>Torulopsis</i>
a _w	vodní aktivita
MO	mikroorganismy

9 Přílohy

Seznam tabulek a grafů:

Tab. 1. Minimální, optimální a maximální teploty pro různé druhy plísní (Vaňátová, 2002)

Tab. 2. Teploty a doby inkubace pro jednotlivá stanovení

Tab. 3. Nálezy v jednotlivých vzorcích (KTJ/1g původního vzorku)

Graf 1. Celkový počet mikroorganismů (KTJ/1g původního vzorku)

Graf 2. Celkový počet bakterií (KTJ/1g původního vzorku)

Graf 3. Enterokoky (KTJ/1g původního vzorku)

Graf 4. Sporulující bakterie (KTJ/1g původního vzorku)

Graf 5. Koliformní bakterie (KTJ/1g původního vzorku)