

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Mikrobiologie džusových nápojů**

**Bakalářská práce**

**Barbora Zemanová**  
**Výživa a potraviny**

**Ing. Popelářová Eva Ph.D.**

© 2019 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Mikrobiologie džusových nápojů " jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Evě Popelářové Ph.D., za připomínky, lidský přístup a obrovskou míru shovívavosti při psaní mé bakalářské práce.

Také bych chtěla poděkovat svým rodičům za lásku, podporu a nekonečnou trpělivost během celého mého studia. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Zdeňkovi, bez jehož podpory bych práci nedokončila.

# Mikrobiologie džusových nápojů

## Souhrn

Záměrem této práce byl literární přehled mikrobiologie džusových nápojů. Širokou veřejností jsou za džusové nápoje považovány čerstvé 100% šťávy, šťávy z koncentrátu, čerstvě lisované šťávy, nápoje s různým zastoupením ovocného podílu a mnohé jiné nápoje. Tyto výrobky mají rozličné složení, především co se týče ovocného podílu, obsahu cukru a dalších látek (konzervanty, ochucující látky a vitamíny). Kontaminace džusových nápojů může být ovlivněna již během pěstování, sklizení, skladování, zpracování anebo také špatnou výrobní praxí. V každé fázi zpracovatelského procesu může dojít ke kontaminaci jiným způsobem, a tím pádem i jinými mikroorganismy. Nejzávažnějšími kontaminujícími mikroorganismy jsou sporulující bakterie, kvasinky a plísně.

a plísně způsobují kvašení anebo plesnivění nápojů, čehož se sice využívá při výrobě alkoholických nápojů (pivo, saké), ale při výrobě džusových nápojů jsou tyto děje nepřipustné. To také definuje vyhláška Ministerstva zemědělství, kdy je za nealkoholický nápoj považován produkt obsahující nejvýše 0,5 % etanolu.

Některé druhy těchto kontaminujících mikrobů jsou odstraněny během konzervace, ale druhy jako jsou termofilní acidofilní mikroorganismy (TAB) přežívají doby pasterace. Rod *Alicyclobacillus* je jejich hlavním zástupcem. Jedná se o nepatogenní druh, který má ve své buněčné membráně zabudovanou mastnou kyselinu,  $\omega$ -cyclohexanovu, která může být příčinou jejich termoresistence. Dále jejich metabolismus produkuje guajakol (2-methoxyfenol), který je silně zapáchající látkou, a tím alicyclobacily sensoricky poškozují jakost nápojů. Zástupci tohoto rodu byly objeveny v celkem nedávné době, po roce 1980, a momentálně se jedná o největší ekonomickou hrozbu v nápojářském průmyslu.

**Klíčová slova:** Džusové nápoje; pasterace; mikroorganismy; TAB; *Alicyclobacillus*.

# Microbiology of juice drinks

## Summary

The aim of this work was a literal review of microbiology of juice drinks. Juice drinks must include 100% juice, concentrate juices, freshly pressed juices, beverages with different proportions of fruit and many other beverages. All these products have different amount of fruit content, sugar content and other substances like preservatives, flavoring agents and vitamins.

Contamination of juice drinks can already be affected during cultivation, harvesting, storage, processing or poor manufacturing practices. The most serious contaminating microorganisms are sporulating bacteria, yeasts and fungi. Yeasts and molds cause fermentation or molding of beverages, which is used in the production of alcoholic beverages (beer, sake), but these processes are not permitted in the production of juice drinks. Some species of these contaminating microbes are removed during conservation, but species such as thermophilic acidophilic microorganisms (TABs) survive pasteurization times. The genus *Alicyclobacillus* is their main representative. It is a non-pathogenic species but they can produce guaiacol

(2-methoxyphenol), which is a strongly odorous substance, and thus genus *Alicyclobacillus* sensorically damage the quality of beverages. Representatives of this genus have been discovered recently, after 1980 and nowadays they are currently the biggest economic threat in the beverage industry.

**Keywords:** Juice drinks; pasteurization; microorganisms; TAB; *Alicyclobacillus*.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Literární přehled</b>	<b>10</b>
<b>3.1</b>	<b>Vybraná legislativa</b>	<b>10</b>
3.1.1	Definování pojmů z § 2 vyhlášky č. 248/2018 Sb.	10
3.1.2	Normy	11
<b>3.2</b>	<b>Význam ovocných nápojů ve výživě lidí</b>	<b>11</b>
3.2.1	Obsah hlavních nutrientů	12
3.2.1.1	Bílkoviny	12
3.2.1.2	Sacharidy	12
3.2.2	Obsah vitamínů	13
3.2.3	Minerální látky	14
3.2.4	Organické kyseliny a ostatní složky	15
3.2.5	Kontaminanty	16
3.2.6	Výživová doporučení	16
<b>3.3</b>	<b>Mikrobiální kontaminace v průběhu zpracování</b>	<b>16</b>
3.3.1	Pěstování a sklizeň	18
3.3.2	Skladování	18
3.3.3	Posklizňové úpravy	19
3.3.4	Zpracování suroviny	19
3.3.5	Výroba koncentrátu	19
3.3.6	Mikrobiologie vody	20
3.3.7	Plnění a balení	20
<b>3.4</b>	<b>Konzervace</b>	<b>21</b>
3.4.1	Podmínky ovlivňující růst mikroorganismů	21
3.4.2	Bariérový efekt	22
3.4.3	Pasterace a sterilace – konzervace vysokou teplotou	23
3.4.4	Osmoanabioza	23
3.4.5	Změna pH	23
<b>3.5</b>	<b>Přehled a charakteristika vybraných kontaminujících mikroorganismů</b>	<b>24</b>
3.5.1	Kvasinky a plísňe	24
3.5.1.1	Kvasinky	24
3.5.1.2	Plísňe	26
3.5.2	Bakterie	28
3.5.2.1	<i>Acetobacteraceae</i> – rod <i>Acetobacter</i>	29

3.5.2.2	Koliformní bakterie – řád <i>Enterobacteriales</i> .....	29
3.5.2.3	Bakterie mléčného kvašení – řád <i>Lactobacillales</i> .....	30
3.5.2.4	Sporotvorné bakterie .....	31
<b>4</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>37</b>

# 1 Úvod

Tato bakalářská se zabývá mikrobiologií ovocných džusových nápojů a možnostmi kontaminace.

Voda s rostlinnou složkou tvoří základ výsledných nápojů, které mohou být infikovány již v průběhu pěstování, sklizně, přepravy, sladování nebo až při jejich technologickém zpracování. Ovoce je ze své podstaty bohaté na živiny, a tudíž je vhodným zdrojem živin nejen pro nás lidi ale také pro mnoho mikroorganismů. Také je samo o sobě téměř vždy nesterilní a tím pádem podléhá rychleji zkáze, je proto na technologovi, jak danou surovinu při zpracování ošetří a tím prodlouží její vhodnost pro další zpracování nebo konečnou konzumaci.

Běžně jsou používány různé konzervační prostředky, jak mechanické, chemické nebo fyzikální. Mezi nejpoužívanější ošetření patří bezesporu pastérace. Takto ošetřená potravina (nápoj), by měla být dle technologie a platné české legislativy zdravotně nezávadná. Bohužel pokud dojde ke kontaminaci potraviny sporulujícími organismy, tak ne vždy dojde k úplnému zničení všech spor a může se vyskytnout zkažený výrobek.

Mezi takové sporotvorné organismy, které přežívají právě dobu pastérace, patří termofilní acidofilní bakterie. Tyto bakterie si libují v kyselém prostředí, které ovocné šťávy nabízejí, a které je pro mnoho jiných mikroorganismů inhibující. Dále mají zaručenou dostatečnou aktivitu vody a během přepravy či skladování může dojít ke zvýšení teplot, což může vést k vyklíčení spor.



## **2 Cíl práce**

Ovocné nápoje jsou oblíbené pro lahodnou chuť, obsah vitaminů a minerálních látek. Přestože jsou tyto nápoje ošetřeny různými konzervačními způsoby, mohou být napadeny nežádoucími mikroorganismy, které způsobí znehodnocení nápoje. Cílem této práce bylo zmapování možných rizik při technologické výrobě, kdy ke kontaminaci ovocných nápojů dochází a následně vybrané kontaminující mikroorganismy charakterizovat.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Vybraná legislativa

Legislativou v oblasti nealkoholických nápojů se zabývá vyhláška č. 248/2018 Sb. o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí. Tato vyhláška upravuje Potravinářský zákon z roku 1997 (č. 110/1997 Sb.). Za džusové nápoje široká veřejnost považuje takzvané šťávy, které definuje paragraf 2 vyhlášky 248/2018 (viz. dále) v bodě d) až k). Dále bod d) uvádí, že všechny šťávy (i ty z koncentrátu) ať už ovocné či zeleninové, pokud na obalu deklarují 100% podíl ovoce měly by ho také 100 % obsahovat, což odpovídá 100 g plodů na 100 g výrobku (dTest 2014; Ministerstvo zemědělství 2018).

#### 3.1.1 Definování pojmů z § 2 vyhlášky č. 248/2018 Sb.

- a) nealkoholickým nápojem nápoj obsahující nejvýše 0,5 % objemových etanolu měřených při teplotě 20 °C,
- b) koncentrátem k přípravě nealkoholických nápojů výrobek obsahující nejvýše 0,5 % objemových etanolu měřených při teplotě 20 °C,
- c) nápojovým koncentrátem zahuštěná směs jednotlivých surovin používaných k výrobě nealkoholických nápojů, určená k přípravě nápojů ředěním,
- d) ovocnou nebo zeleninovou šťávou zkvasitelný, ale nezkvašený výrobek získaný z jedlých částí zralého a zdravého, čerstvého, chlazeného nebo zmrazeného ovoce nebo zeleniny, a to jednoho nebo více druhů, s barvou, vůní a chutí, které jsou charakteristické pro šťávu pocházející z příslušného ovoce nebo zeleniny; aroma, dužnina a buňky získané vhodnými fyzikálními způsoby ze stejného druhu ovoce nebo zeleniny mohou být do šťávy vráceny; rajčata se pro účely této vyhlášky považují za ovoce,
- e) čerstvou nebo též fresh ovocnou, zeleninovou nebo ovocno-zeleninovou šťávou zkvasitelný, ale nezkvašený výrobek získaný z jedlých částí zralého, zdravého a čerstvého ovoce nebo zeleniny, a to jednoho nebo více druhů, s barvou, vůní a chutí, které jsou charakteristické pro šťávu pocházející z příslušného ovoce nebo zeleniny; do čerstvé nebo též fresh šťávy nelze přidat další složky s výjimkou bylin a semen rostlin a výrobek nesmí být dále ošetřený,
- f) přírodní ovocnou, zeleninovou nebo ovocno-zeleninovou šťávou zkvasitelný, ale nezkvašený výrobek uvedený v písmenu e), ošetřený pouze šetrnou metodou, k němuž nebyly přidány žádné další složky,

- g) ovocnou šťávou z citrusových plodů šťáva získaná z endokarpu jejich vnitřní části; limetková šťáva však může být získávána z celého plodu,
- h) ovocnou nebo zeleninovou šťávou z koncentrátu výrobek získaný z koncentrované ovocné nebo zeleninové šťávy opětovným doplněním takového podílu pitné vody, jaký byl odstraněn při koncentraci šťávy; aroma, dužnina a buňky získané vhodnými fyzikálními prostředky ze stejného druhu ovoce nebo zeleniny mohou být do šťávy vráceny,
- i) koncentrovanou ovocnou nebo zeleninovou šťávou výrobek získaný z ovocné nebo zeleninové šťávy jednoho nebo více druhů ovoce nebo zeleniny fyzikálním odstraněním specifického podílu obsahu vody; je-li výrobek určen ke konečné spotřebě, nesmí být snížení objemu menší než 50 %; aroma, dužnina a buňky získané vhodnými fyzikálními prostředky ze stejného druhu ovoce nebo zeleniny mohou být do koncentrované ovocné nebo zeleninové šťávy vráceny,
- j) ovocnou šťávou extrahovanou vodou výrobek získaný difúzí pomocí vody z celého dužnatého ovoce, z něž nelze šťávu odstranit fyzikálními prostředky, nebo z celého dehydratovaného ovoce,
- k) ovocným nebo zeleninovým nápojem ochucený nealkoholický nápoj, vyrobený z ovocných nebo zeleninových šťáv nebo jejich koncentrátů (Ministerstvo zemědělství 2018).

### **3.1.2 Normy**

Pokud je výrobek konzervovaný patří mezi takzvané nerizikové potraviny. Mikrobiologickou kvalitou se zabývají následující normy ČSN ISO 4833 (56 0083), ČSN ISO 7954 (56 0087), ČSN ISO 4832 (56 0085) a ČSN EN ISO 7899-1 (Kolářová 2010).

## **3.2 Význam ovocných nápojů ve výživě lidí**

Ovoce (i zelenina) je důležitou součástí našeho jídelníčku. Denně bychom měli přijímat zhruba 400 – 600 g ovoce a zeleniny, a to v poměru 1:2. Ovšem jak definuje legislativa, máme tři základní skupiny nealkoholických šťáv, které můžeme považovat za džusy. Záleží tedy na složení daného nápoje, zdali obsahuje ještě jiné látky (konzervanty, ochucující složky...) než jen přírodně vyskytující složky ovocné šťávy. Na jednu stranu můžou být aditivní látky jako je kyselina askorbová a cukry, které se v ovoci přirozeně vyskytují, ale na druhou stranu jde často o umělá konzervační činidla, ochucovačla, popřípadě barviva. Na základě tohoto složení pak můžeme považovat pití takových nápojů za zdraví prospěšné nebo naopak za zcela nevhodné.

Pokud budeme konzumovat kvalitní 100% ovocné či zeleninové šťávy, můžeme jimi nahradit jednu z pěti denních doporučených porcí ovoce a zeleniny a vhodně doplnit/obohatit náš pitný režim. Hrnčířová (2012) uvádí, že problémový ze zdravotního hlediska může být vysoký obsah cukrů v některých druzích ovoce, obsah organických kyselin a aromatických látek (Dostálová et al. 2012).

### **3.2.1 Obsah hlavních nutrientů**

Ovocné šťávy obsahují velké procento vody a poměrně malou část základních nutrientů. Na druhou stranu se v bezvodé části vyskytuje mnoho bioaktivních látek, jako jsou vitamíny, minerální látky a fytochemikálie.

Ovoce obecně obsahuje 75-96 % vody, okolo 10 % sacharidů, 0,2 -1,3 % bílkovin, méně než 0,5 % lipidů v hmotě. Zbylou část zaujímají zejména vitamíny, minerální látky, flavonoidy a fenolové kyseliny, které jsou mnohdy potřebné pro správné fungování lidského organismu a v případě nedostatku mohou způsobit závažné zdravotní problémy (Stinco et al. 2019).

Obsah lipidů je minoritní, proto nebude dále zmiňován (Sun 2009). Obsahy látek (tabulky 1-3) jsou převzaty z Francouzské národní agentury pro zdravotní bezpečnost potravin a životního prostředí (Ciquel 2017).

#### **3.2.1.1 Bílkoviny**

Bílkovinné látky se v ovoci vyskytují především ve formě enzymů a volných aminokyselin. Tyto enzymy hrají významnou roli při zpracování, neboť tvoří výsledný sensorický dojem z potraviny. Například v pomerančovém džusu se nejčastěji vyskytuje aminokyselina prolin, kdežto v jablečném se nejčastěji vyskytuje asparagin (Sun 2009).

#### **3.2.1.2 Sacharidy**

Sacharidy jsou z hlediska výživy jedním z hlavních zdrojů energie. V denním příjmu by měly zastupovat až 55 % z veškeré přijaté energie. V ovoci až 90 % sušiny tvoří sacharidy včetně vlákniny a pektinu. Nejvíce zastoupenými monosacharidy jsou fruktóza a glukóza. Pektin je důležitý v technologii pro jeho želírující vlastnosti (Sluková 2016).

Tabulka 1 - Obsah hlavních nutrientů; (Ciqual 2017) upraveno

Složení	Jablko		Pomeranč		Ovocný džus	
	100%	z koncent- rátu	100%	z koncent- rátu	průměr	z koncent- rátu průměr
Voda (g/100 g)	88,40	88,50	88,20	89,70	88,50	88,70
Bílkoviny (g/100 g)	0,17	0,24	0,61	0,63	0,53	0,54
Sacharidy (g/100 g)	9,79	10,10	9,58	7,83	9,19	9,40
Cukry (g/100 g)	9,36	9,66	9,58	7,83	8,90	9,22
Tuky (g/100 g)	0,14	0,10	0,11	0,13	0,14	0,13
Vláknina (g/100 g)	0,23	0,30	0,28	0,25	0,30	0,36
Popel (g/100 g)	0,68	0,20	0,36	0,50	0,37	0,36

### 3.2.2 Obsah vitamínů

Obsah vitamínů je nejen druhově specifický, ale záleží i na technologii zpracování, době a způsobu skladování džusu. Dalším faktorem je obsah ovocné složky v nápoji, aditiva nebo fortifikace konečného nápoje (dTest 2016; Katsa & Proestos 2019). Jak je uvedeno v tabulce 2, džusy nejčastěji obsahují vitamín C, vitamín B9, tokoferol a betakaroten (Sluková 2016; Stinco et al. 2019).

Vitamín C neboli kyselina L-askorbová je ve vodě rozpustná látka. Je důležitá pro správné fungování organismu, nejenže napomáhá vstřebávat minerální látky, ale také napomáhá hojení, působí protizánětlivě a v neposlední řadě je důležitým antioxidantem.

Ve 100 ml čerstvé pomerančové šťávy je přibližně 50 mg vitamínu C, jeho denní příjem by měl být okolo 80 mg s přídatkem 35 mg pro lidi, kteří kouří (Szeto et al. 2002; dTest 2016).

Winter (2009) dále uvádí, že ve zpracované šťávě z limetek (*Citrus Aurantifolia*) jsou pouze 2/3 vitamínu C než ve šťávě čerstvé.

Karotenoidy jsou přírodní barviva vyskytující se napříč rostlinnou i živočišnou říší, jejich roční syntéza se odhaduje na  $1 \times 10^8$  tun. Pro lidský organismus má důležitý význam hlavně skupina asi 50 takzvaných retinoidů, které jsou prekurzory vitamínu A – retinolu (Velíšek & Hajšlová 2009).

Tabulka 2 - Obsah vybraných vitaminů (Ciqal 2017) – upraveno

Složení	Jablko		Pomeranč		Ovocný džus	
	100%	z koncent-rátu	100%	z koncent-rátu	průměr	z koncent-rátu průměr
Beta-caroten ( $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ )	7	4,23	26,2	10,6	58,9	142
Vitamin E ( $\text{mg}/100 \text{ g}$ )	0,01	0,01	0,2	0,15	0,24	0,25
Vitamin C ( $\text{mg}/100 \text{ g}$ )	14,5	13,2	37	44,2	32,9	30,8
Vitamin B1 ( $\text{mg}/100 \text{ g}$ )	0,013	0,021	0,08	0,08	0,072	0,08
Vitamin B2 ( $\text{mg}/100 \text{ g}$ )	0,01	0,017	0,023	0,034	0,041	0,045
Vitamin B3 ( $\text{mg}/100 \text{ g}$ )	0,043	0,16	0,3	0,3	0,36	0,47
Vitamin B5 ( $\text{mg}/100 \text{ g}$ )	0,045	0,063	0,24	0,24	0,21	0,23
Vitamin B6 ( $\text{mg}/100 \text{ g}$ )	0,042	0,03	0,1	0,1	0,095	0,11
Vitamin B9 ( $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ )	6,75	4,95	30	30	24,1	23,6

### 3.2.3 Minerální látky

Minerální látky, které ovoce obsahuje, jsou hlavně draslík, hořčík, železo, mangan, měď, ale i zinek a jód. Jak uvádí tabulka 3, džusy obsahují největší množství sodíku. Obsahy jednotlivých minerálních látek jsou přímo závislé na daném druhu ovoce ale také na hnojení a složení půdy. Dalším podstatným faktorem, který ovlivňuje množství minerálních látek v plodu, je jeho zralost a technologické zpracování. Nejpodstatnější operací je loupání, neboť se nejvíce těchto látek vyskytuje právě ve slupkách (Hrnčířová et al. 2012; Sluková 2016).

Tabulka 3- Obsah minerálních látek; (Ciqal 2017) – upraveno

Složení	Jablko		Pomeranč		Ovocný džus	
	100%	z koncent-rátu	100%	z koncent-rátu	průměr	z koncent-rátu průměr
Sůl (g/100 g)	0,02	0,01	0,41	0,01	0,01	0,01
Vápník (mg/100 g)	4,32	6,45	0,02	7,25	5,28	8,77
Měď (mg/100 g)	< 0,1	0,01	0,07	0,02	0,03	0,03
Železo (mg/100 g)	0,30	0,09	0,70	0,08	0,12	0,10
Jód (μg/100 g)	1,00	0,70	0,07	0,40	2,09	3,58
Hořčík (mg/100 g)	4,56	7,07	10,00	10,90	9,23	9,75
Mangan (mg/100 g)	< 0,1	0,03	0,02	0,02	0,08	0,13
Fosfor (mg/100 g)	6,59	6,35	16,50	16,90	14,40	13,90
Draslík (mg/100 g)	113,00	128,00	165,00	154,00	153,00	147,00
Sodík (mg/100 g)	13,30	3,98	4,81	3,44	5,66	5,08
Zinek (mg/100 g)	< 0,1	0,01	0,05	0,02	0,04	0,03

### 3.2.4 Organické kyseliny a ostatní složky

Organické kyseliny jako jsou kyselina vinná, jablečná, citrónová, kávová a felurová, jsou přirozenou součástí ovocných šťáv. Běžně koncentrace těchto kyselin pohybuje až okolo 0,5-1,2 g/100 g, to je množství, které pH nápoje posune pod hodnotou 4. Až na výjimky, jako je *Alicyclobacillus* anebo bakterie mléčného kvašení, v tak kyselých podmínkách nemůže přežít většina bakterií (Velíšek & Hajšlová 2009; Goliáš 2014). Tohoto jevu se využívá při konzervaci, kde se právě proto se kyselina citrónová používá jako přírodní konzervační činidlo. Pro zajímavost se kyselina citrónová přidává kromě nápojů jako vychytávač pachutí u smažených hranolek a mimo jiné vychytává i stopy těžkých kovů (Winter 2009).

Další bioaktivní látky, které se přirozeně ve šťávách vyskytují, jsou antioxidanty a polyfenolové sloučeniny, jako jsou flavonoidy a fenolové sloučeniny. Je známo více než 8000 komplexních fenolových sloučenin, které se vyskytují napříč rostlinnou říší a můžeme je rozřadit až do 10 skupin. Příkladem může být úplně jednoduchá sloučenina fenolové kyseliny a na druhé straně složitá molekula tříslovin (Rodrick & Schmidt 2003; Velíšek & Hajšlová 2009).

Během zpracování lisováním často dochází k oxidaci fenolů na tmavé chinony (Kadlec et al. 2012). Flavonoidy jsou sekundárními metabolity rostlin a někdy se jim říká také vitamín P. Ve šťávách můžeme najít hesperidin, který je spojován s nižším výskytem demence v populaci (Panche et al. 2016).

### **3.2.5 Kontaminanty**

Kontaminanty potravin mohou být rezidua pesticidů, halogenované organické látky, těžké kovy, toxiny a v neposlední řadě i samotné mikroorganismy. Například nařízení č. 1881/2006/EC Evropské komise, redukuje množství toxinu patulinu, v jablečných šťávách na 50 mg/kg šťávy pro dospělé (Demnerová et al. 2008; dTest 2014; Matthews et al. 2017).

### **3.2.6 Výživová doporučení**

Spotřeba celkových sacharidů by měla být sice 55 % z celého denního příjmu energie, ale jejich primární zdroj by měl být z přirozeně se vyskytujících sacharidů, což 100% ovocné šťávy splňují. Dalším zajímavým faktem je, že i každá evropská země v rámci WHO má jiná výživová doporučení. Některé země jako jsou Estonsko, Irsko nebo Španělsko doporučují ovocné šťávy, jako jednu porci z možného denního příjmu ovoce.

Konečným faktem je, že se odborníci vesměs shodují, že denní příjem ovoce a zeleniny by měl činit 3-5 porcí (WHO 2003; Winter 2009; Sluková 2016).

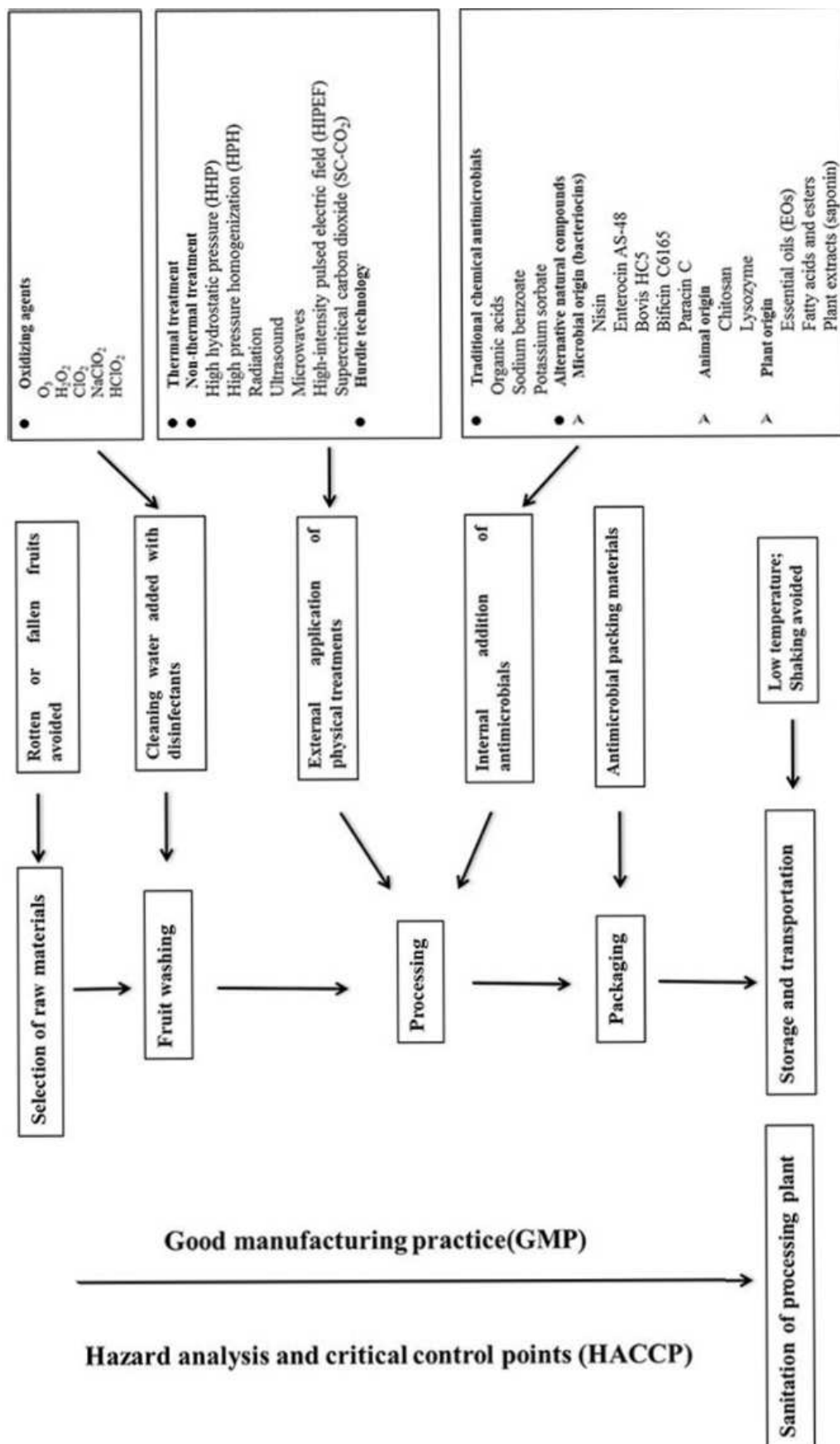
## **3.3 Mikrobiální kontaminace v průběhu zpracování**

Tím, že jsou mikroorganismy všudypřítomné, ohrožují nejen plod, ale i jednotlivé technologické kroky zpracování produktu. Ve výsledku to znamená, že ovlivní mikrobiální, hygienickou, senzoryckou, ale i nutriční kvalitu konečného produktu.

Dále četnost a různorodost mikrobů na povrchu anebo v dužině ovoce má vliv na výslednou účinnost konzervace. Proto je velmi důležité dbát na kvalitu v průběhu pěstování, sklizně, skladování a zpracování, a to nejen u biopotravin. Je totiž zřejmé, že pokud bude nekvalitní vstupní surovina, i sebelepší technologické zpracování lepší produkt nezaručí.

Dalším podstatným činitelem je vzduch a prach, mnoho mikroorganismů se vyskytuje voně ve vzduchu, a proto je potřeba zaručit minimální prašnost a dobrou filtraci vzduchu. V neposlední řadě, kdy dochází ke kontaminaci, je lidský faktor, a to nedůsledností při výrobě a nedodržování plánu HACCP (Kadlec et al. 2012; Goliáš 2014).





Obrázek 1 - Kritické body kontaminace (HACCP) a správná výrobní praxe (GMP) (Huang et al. 2015)

Obrázek 1 ukazuje obecné schéma technologie výroby ovocného výrobku s operacemi, kde jsou právě zahrnuty antimikrobiální opatření. Jsou zde znázorněny opatření, jako je odstranění shnitých částí, čištění a mytí s přídavkem oxidačních činidel. Dále schéma ukazuje možné způsoby konzervace, ať už fyzikální nebo chemické přídavkem antimikrobiálních látek jako jsou organické kyseliny, benzoát sodný, lysozym a další. V poslední části upozorňuje na antimikrobiálnost balení a vhodné skladování (Huang et al. 2015).

### 3.3.1 Pěstování a sklizeň

Již při pěstování a sklizni je potřeba dbát na správnou kvalitu. Na povrchu ovoce mohou být přítomné různé druhy i různé počty mikroorganismů. Jejich přítomnost záleží na mnoha faktorech, třeba jako na druhu pěstovaného ovoce (jahody, jablka) a environmentálních podmínkách. Rostliny, které jsou malého vzrůstu a plodí blízko u země, mohou být častěji kontaminovány půdními sporotvornými mikroorganismy, jako je *Alicyclobacillus*, anebo jsou plísňě. To se týká hlavně jahod, borůvek, ale i manga.

Také záleží na způsobu pěstování jako je použití postřiku, pěstování ve skleníku či použití geotextilie (Parish et al. 2015; Adams et al. 2016).

Různé metody sklizně mají také vliv na mikrobiální kvalitu (ruční sběr nebo sklizení technologií). Dalším důležitým faktorem je zralost. Plodiny je potřeba sklízet vždy v technologické zralosti tak, aby daná kvalita plodu (obsahy cukrů, pH, pevnost povrchových vrstev, loupateľnost ...) byla pro výslednou použitou zpracovatelskou technologii co nejlepší a nejvhodnější. Pokud není surovina ihned zpracována a bude ještě nějakou dobu skladována, je důležité se vyvarovat mechanickému poškození a následně již při sklizni vyřadit plody, které jsou jakkoliv mechanicky poškozené. Taková potlučená místa rychleji transpirují a bývají nejčastěji mikrobiálně napadena (Kadlec et al. 2012).

Nejen tropické dovážené ovoce se sklízí před fyziologickou zralostí a je dováženo na dlouhé vzdálenosti. V průběhu dopravy plody v řízené atmosféře nepřírozně dozrávají.

Po sklizni následuje doprava do skladu. Plodiny můžou být dopravovány všemi dostupnými prostředky, jako je automobilová, železniční, lodní nebo letecká doprava.

### 3.3.2 Skladování

Plody po sklizni přirozeně metabolizují. Prodýchávají sacharidy, odpařují vodu, a tím mění své technologické i sensorické vlastnosti. Tím, že metabolizují, vznikají jednodušší chemické sloučeniny, které jsou snáze dostupné mikroorganismům a stávají se jejich živnými substráty. Podle Goliáše (2014), prvotně dochází ke kontaminaci aerobními organismy, které

lze snadno vyloučit nedostatkem kyslíku. V závislosti na přítomném složení atmosféry skladu, vzdušné vlhkosti a okolní teplotě je možné prodloužit trvanlivost takových plodů – zpomalit jejich metabolické procesy anebo docílit jejich dozrání. Vzdušná vlhkost je obzvláště důležitá. Bude-li ji ve skladu málo, plody budou vysychat, bude-li tam vlhkosti hodně, dojde k vysrážení vody na povrchu potraviny a tím vznikne vhodné prostředí pro mikroorganismy. Mezi původce skládkových chorob jablek patří na příklad *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. (Kadlec et al. 2012).

### **3.3.3 Posklizňové úpravy**

Mezi nejzákladnější posklizňové úpravy bezesporu patří praní a čištění, a to proto, že se mechanicky odstraňuje povrchové mikrobioty a prachové částičky. Jak uvádí Matthews (2017), omytí plodu sníží mikroflóru na ovoci až na 3 log KTJ/g. Existuje několik druhů strojů na mytí, které se používají dle zašpinění a velikosti plodu. Příkladem mohou být sprchové, vzduchové anebo vibrační pračky. Poslední dobou je kladen čím dál větší důraz na ekologii, ekonomiku a celkovou udržitelnost výrobních procesů. Proto je v některých závodech během výrobního procesu voda recyklována. Především se jedná o kondenzovanou vodu, která byla odpařena v průběhu výroby ovocného koncentráту. Tato voda je dříve nebo později znečištěna životaschopnými mikroorganismy, a je proto důležité ji náležitě ošetřit. Takto recyklovaná voda může být kolonizována právě rodem *Alicyclobacillus* (Goliáš 2014; Parish et al. 2015).

### **3.3.4 Zpracování suroviny**

K další kontaminaci suroviny dochází při jejím zpracování, jelikož se na povrchu plodů vyskytují nejrůznější mikroby, které ani mytím a praním nejsou odstraněny. Největší hrozba nastává při kontaktu sterilní vnitřní části ovoce s vnějším nesterilním povrchem. To se děje konkrétně při loupání a krájení. Ke kontaminaci také dochází při dotyku se špinavým povrchem zařízení. Nejčastějšími kontaminanty jsou laktobacily (Rodrick & Schmidt 2003; Lima Tribst et al. 2009).

### **3.3.5 Výroba koncentráту**

Koncentrát je „sirup“ vzniklý zahuštěním surové ovocné šťávy. Voda se odstraní odpařením na odparkách za zvýšené teploty. Koncentrát by měl být husté konzistence, čirý s barvou a vůní po použitém ovoci. Jeho barva se v průběhu transportu a skladování může měnit v důsledku neenzymatického hnědnutí. Obsah kyselin by měl být 2-6 %, obsah rozpustné sušiny 65-70 % (Kadlec et al. 2012; dTest 2014, 2016).

Jak už bylo zmíněno, koncentrát se vyrábí za zvýšených teplot, které sice nesterilují, ale mohou odstranit velkou část vegetativních forem mikroorganismů. Tyto teploty dosahují až 100 °C. Ta část mikroorganismů, která se stihne vysporulovat po vysušení, tedy zahuštění ovocné šťávy, nemá vhodné podmínky pro opětovný růst. Výsledný koncentrát má hodnoty okolo 70 °Bx. Při tak vysoké koncentraci je aktivita nízká, navíc má výsledný koncentrát nízkou hodnotu pH, a proto je mikrobiologicky stabilní. Výjimečně během přepravy může dojít k zvýšení okolních teplot, ke kondenzaci zbylé vody, a tím je aktivita vody nad koncentrátem zvýšena. Proto jsou občas v komerčních pomerančových koncentrátech izolovány kvasinky (*Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*). Dále mohou být izolovány některé acidofilní bakterie, osmotolerantní plísňe. Každopádně tato mikroflóra by neměla překročit limit 5,0 log<sub>10</sub>. Běžná doba trvanlivosti koncentrátu je 10 měsíců (Kadlec et al. 2012; Goliáš 2014; Parish et al. 2015; Rajauria & Tiwari 2018).

Takto vzniklý koncentrát je posléze transportován ze země původu do celého světa. Výhodou tohoto transportu je ekologičnost a skladnost, neboť dopad dopravy celých pomerančů je vyšší než výroba koncentrátu a jeho následná přeprava (Kadlec et al. 2012).

### 3.3.6 Mikrobiologie vody

Tím, že se drtivá většina džusů v dnešní době vyrábí z koncentrátu rekonstitucí, je důležité dbát i na kontaminaci nápoje z nedostatečně ošetřené vody. V potravinářských provozech se z fyzikálních prostředků využívá bakteriocidních účinků ultrafialového záření, z chemických metod se využívá oxidační působení činidel na mikroorganismy (Kadlec et al. 2012).

### 3.3.7 Plnění a balení

Plnění probíhá do nápojových kartonů, plastových nebo skleněných lahví, ale také do bag-in-boxů (dTest 2016). Vratné skleněné lahve je potřeba ještě před znovunaplněním vymýt horkým louhem v myčce. Papírový nápojový obal Tetrapak je před plněním dezinfikován roztokem peroxidu vodíku. Peroxid vodíku je silné oxidační činidlo a působí na bílkoviny mikrobů tím, že reaguje s atomem síry v molekule bílkoviny. To vede ke změně neslučitelné se životem a tím dezinfikuje obal. Stejný mikrobicidní účinek má i kyselina peroctová.

Pokud je nápoj pasterován v průběhu přípravy sirupu za tepla a je stáčen ve sterilním prostředí aseptické linky, tak již není potřeba výsledný produkt znovu pasterovat (Šilhánková 2002; Kadlec et al. 2012).

## 3.4 Konzervace

Konzervací v opravdu širokém slova smyslu můžeme rozumět jakékoliv zpracování původního ovoce na výrobek nebo produkt, který si zachová alespoň část svých původních vlastností. V minulosti byly vyráběny hlavně mošty pro přímou spotřebu, popřípadě byly se šířeny. Dnes se přímo lisované ovocné šťávy ještě dále zpracovávají, viz výše. (Kadlec et al. 2012).

V mikrobiologickém slova smyslu se konzervací rozumí úmyslné souhrnné operace vedoucí ke zpomalení růstu nebo inaktivaci živých mikroorganismů či jejich zárodků, a tím k prodloužení původních vlastností potraviny. Konzervační metody se klasifikují dle účinku na mikroorganismy. Buď jde o vylučování mikroorganismů z prostředí nebo o abiosu či anabiosu (Šilhánková 2002).

### 3.4.1 Podmínky ovlivňující růst mikroorganismů

Pro růst mikroorganismů jsou důležité následující podmínky:

- dostupnost základních nutrientů
- teplota
- aktivita vody
- pH prostředí
- dostupnost molekulárního kyslíku.

Konkrétní hodnoty daných podmínek jsou velice rozmanité a záleží na druhu mikroorganismu, které konkrétní hodnoty jsou pro něj optimální.

Dostupnost základních nutrientů závisí nejen na druhu potraviny, ale také na konkrétní kultuře mikroorganismů. Pokud půjde o smíšenou kulturu, může se jednat o symbiotický, synergetický anebo antagonický způsob života.

Na základě optimální teploty růstu se mikroorganismy dělí na psychrotrofní (0-5 °C), psychrofilní (5-20 °C), mezofilní (10-45 °C) a termofilní (45-70 °C). Tím, jak danou potravinu skladujeme, můžeme ovlivnit růst vegetativních forem mikroorganismů (Kadlec et al. 2012).

Aktivita vody se rovná poměru vodních par nad potravinou ku poměru vodních par nad destilovanou vodou za stejných podmínek. Vodní aktivita tedy udává, kolik je vody v potravine k dispozici pro mikroorganismy. Jak vyplývá z definice, můžeme aktivitu vody ovlivnit poměrem rozpuštěných látek. Toho se využívá v přípravě koncentrátů, kdy je voda odpařena. Do nápojů se často přidává cukr, kterým lze aktivitu vody také ovlivnit. Aktivita vody je

důležitá k proudění iontů, a tím pádem k volnému pohybu nutrientů a živin (Šilhánková 2002; Goliáš 2014).

Hodnota pH je definována jako záporný dekadický logaritmus vodíkových iontů. A právě tyto vodíkové ionty jsou důležité pro různé biochemické procesy mikroorganismů. Optimální pH je pro většinu bakterií a kvasinek okolo 6, takže lehce kyselé prostředí. Pokud hodnota klesne pod přijatelnou mez, ustává metabolická aktivita buněk (Šilhánková 2002; Goliáš 2014).

Podle vztahu mikrobů k molekulárnímu kyslíku se organismy dělí na obligátně aerobní nebo obligátně anaerobní, fakultativně anaerobní, aerotolerantní a mikroaerofilní. Jednou z nepřímých konzervačních metod v nápojářském průmyslu může být syčení nápoje oxidem uhličitým. Tím totiž v nápoji poklesne oxidoredukční potenciál. I přesto bývají takové nápoje kontaminovány, a to hlavně kvasinkami jak jsou *Candida* a *Saccharomyces cerevisiae* (Bibek 2003; Rosypal 2003).

Tabulka 4 - Hodnoty aktivity vody v potravině ke vztahu k růstu mikroorganismů (Goliáš 2014) upraveno

Aktivita vody	Druh mikroorganismu	Druh potravin
1,0-0,95	kvasinky, spory	čerstvé potraviny
0,95-0,91	laktobacily	potraviny s 50 % cukru
0,91-0,86	kvasinky	džemy, marmelády
0,86-0,80	plísně	potraviny s 15–20 % vody
0,75-0,65	xerofilní plísně	ořechy
0,65-0,60	osmofilní kvasinky	sušené ovoce
<0,60	růst mikrobů je zastavený	sušené potraviny

### 3.4.2 Bariérový efekt

Bariérový efekt je kombinací více konzervačních metod, které mají synergický účinek na deaktivaci mikroorganismů. Bariérový efekt se dělí dle druhu účinku na fyzikální, chemicko-fyzikální a na mikrobiální metody působení na organismus. Výhodou takové kombinace metod je že každá samostatná metoda, operace, je použita v menší míře, než by musela být použita jako jedna samostatná, neboť se jejich účinek sčítá (Shah et al. 2019). Další velkou výhodou je menší změna organoleptických vlastností. Kotzekidou (2016) – ve své knize uvádí, i několik

studí ve kterých byla tato konzervační metoda použita. U džusů se hlavně jedná o kombinaci kyselého prostředí a vysoké teploty.

### **3.4.3 Pasterace a sterilace – konzervace vysokou teplotou**

Technologie tepelného ošetření džusů bývá velmi rozmanitá. Můžeme rozlišovat mezi sterilací a pasterací, kdy při sterilaci dojde k inaktivaci spor, kdežto u pasterace nikoli. Kvantitativně smrtící účinky vysokých teplot můžeme vyjádřit tzv. letální teplotou. To je teplota, při které je za určitý čas mikrob usmrčen. Efekt této teploty je závislý na dalších životních podmínkách mikroorganismu, a i životním stádiu. Faktory ovlivňující letální teplotu jsou: pH,  $a_w$ , čas, množství jedinců, druh obalu, ... (Goliáš 2014) Obecně tedy můžeme říci, že pasterace ovocných šťáv je tepelné ošetření, které zničí cílené mikroorganismy nebo inaktivuje jejich enzymy (Rajauria & Tiwari 2018). Teplota takového ošetření je mezi 60 - 100 °C, s tím, že daná teplota musí být dosažena ve středu konzervy, aby se mohl výrobek považovat za správně mikrobiologicky ošetřený (Matthews et al. 2017).

### **3.4.4 Osmoanabioza**

Osmoanabioza je proces konzervace, kdy dochází k zahušťování potraviny a zvýšení osmotického tlaku na buňky mikrobů. Volná voda může být odstraněna následujícími způsoby: sušením, zahušťováním v odparkách, odstraňováním vody ve formě krystalů ledu anebo přidáním osmoticky účinných látek, jako je třeba cukr. Osmoanabioza se při výrobě džusů využívá hlavně při odpařování vody z koncentráту. V takto vysušených, zahuštěných koncentrátech, jak již bylo zmíněno v kapitole 3.3.5, je malá aktivita vody, aby zde mohlo dojít ke kažení (Velíšek & Hajšlová 2009; Goliáš 2014; Parish et al. 2015).

### **3.4.5 Změna pH**

Zásadní rozdíl v konzervaci ovocných a zeleninových výrobků je v přirozené kyselosti zpracovávané suroviny mezní hodnota pH je okolo 4. Zatímco ovoce přirozeně obsahuje dostatečné množství kyselin, které ovlivní hodnotu pH tak, že zde nemůže růst většina běžně se vyskytujících bakterií, tak potraviny které, nejsou přirozeně kyselé se technologicky okyselují. Další výhodou kyselé konzervace je snižování odolnosti mikroorganismů (i bakteriálních spor) k dalším konzervačním faktorům (Kadlec et al. 2012; Goliáš 2014).

### 3.5 Přehled a charakteristika vybraných kontaminujících mikroorganismů

Hlavními kontaminanty ovoce a výrobků z nich jsou mikroskopické houby, kvasinky a plísňe. Bakterie obecně špatně snášejí kyselé prostředí, ale existuje několik acido- tolerantních výjimek, jako jsou třeba bakterie mléčného kvašení (Kotzekidou 2016).

Mikrobiální kažení produktu závisí jednak na jeho stávajících chemických a fyzikálních vlastnostech jako je vysoká vodní aktivita, nízké pH, teplota potraviny ale také závisí na technologii zpracování, která do té doby proběhla (Francis 2000; Lima Tribst et al. 2009; Parish et al. 2015).

#### 3.5.1 Kvasinky a plísňe

Kvasinky a plísňe jsou eukaryotické, mikroskopické organismy, které běžně mohou existovat za extrémních podmínek, za kterých bakteriální mikroorganismy již umírají. Proto jsou zásadními kontaminanty v mikrobiologii džusů. Mnohé druhy kvasinek i plísňí jsou využívány v potravinářství jako ušlechtilé mikroorganismy. Na příklad kvasinky zkvašují v mošttech cukry a produkují oxid uhličitý a alkohol, toho se využívá při výrobě vína, cidrů a piva. Plísňe se používají při fermentaci masných výrobků anebo sýrů (Kocková-Kratochvílová 1990; Bibek 2003; Lima Tribst et al. 2009; Calderone 2015).

##### 3.5.1.1 Kvasinky

Kvasinky jsou mikroorganismy zhruba o velikosti 15-30  $\mu\text{m}$ , které mají nízkou tepelnou odolnost, již při teplotě nad 40 °C umírají i jejich spory. Rostou při vysokém osmotickém tlaku a jejich optimální oblast růstu je 2,0-8,5 pH. Jsou to jednobuněčné mikroorganismy, které tvoří kolonie. Kolonie se skládají z kulovitých buněk a směrem od středu tvoří mycelium, které je složeno z hyf. Pokud jde o pravé mycelium, buňky hyf jsou přehrádkované, s póry a vícebuněčné. Pokud jde o mycelium nepravé, jedná se o pseudomycelium s jednotlivými buňkami, které mezi sebou nemají póry. Kvasinky se rozmnožují buď pohlavně tvorbou spor, anebo nepohlavně, pučením či dělením. V porovnání s bakteriemi se kvasinky rozmnožují pomaleji, takže pokud je současný výskyt obou kultur, dojde k přemnožení bakterii na úkor kvasinek. Na druhou stranu kvasinky mohou růst za podmínek, kdy bakterie již umírají (Kocková-Kratochvílová 1990; Šilhánková 2002).

Kvasinky se pro jejich sacharolytické schopnosti, nejčastěji vyskytují na ovoci nebo produktech s vysokým obsahem cukru. Nejčastějšími kontaminanty, jsou rody *Candida*, *Saccharomyces* a *Zygosaccharomyces* (Šilhánková 2002; Kotzekidou 2016).



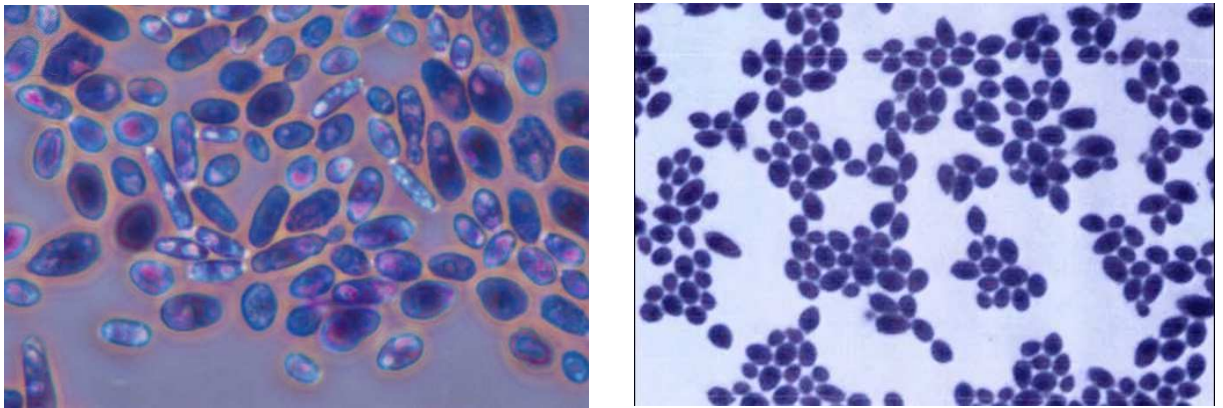
#### 3.5.1.1.1 *Candida*

Rod *Candida* je řazen mezi primitivní kvasinky, má jednobuněčné kulaté buňky, které tvoří pseudomycelium. Rozmnožuje se pučením. *Candida valida* napadá ovocné dřusy a mnohé druhy z tohoto rodu jsou patogeny pro příklad *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, a *C. krusei* (Calderone 2015).

#### 3.5.1.1.2 *Saccharomyces*

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* (pivovarská kvasinka) je nejdůležitějším druhem svého rodu. Jedná se o kulaté až oválné aerobní buňky. Rozmnožování probíhá spájením a vznikem odolných askospor. Zkvašují glukózu a další rostlinné cukry na alkohol a oxid uhličitý. Jedná se o hojně využívaný druh například při výrobě chleba, pekařského droždí, vína, potravinářského alkoholu a dalších odvětvích.

V pivovarnictví se *Saccharomyces cerevisiae* dělí na variety kvasinek horního kvašení a kvasinek spodního kvašení. Rozdělení vychází z faktu, že po prokvašení díla spodní kvasinky tvoří sediment, kdežto kvasinky horního kvašení plují při hladině. Mimo jiné mají obě variety rozdílnou optimální teplotu růstu a tím pádem i rychlost produkce oxidu uhličitého (Bibek 2003; Adams et al. 2016).



Obrázek 2: Vlevo *Saccharomyces* vpravo *Candida albicans*

[https://quest-eb-com.ezproxy.techlib.cz/images/139/139\\_1892/139\\_1892521-W.jpg](https://quest-eb-com.ezproxy.techlib.cz/images/139/139_1892/139_1892521-W.jpg)

<https://microbeonline.com/germ-tube-test-candida-principle-procedure-results-interpretation/>

#### 3.5.1.1.3 *Zygosaccharomyces*

Jedná se o osmofilní acidotolerantní rod zkvašující ovocné nápoje. *Zygosaccharomyces bailii* je druh odolný k běžně používaným chemickým prostředkům jako je třeba oxid siřičitý či kyselina benzoová. Svým metabolismem způsobuje bombáže koncentrátů ale i džusů (Adams et al. 2016).

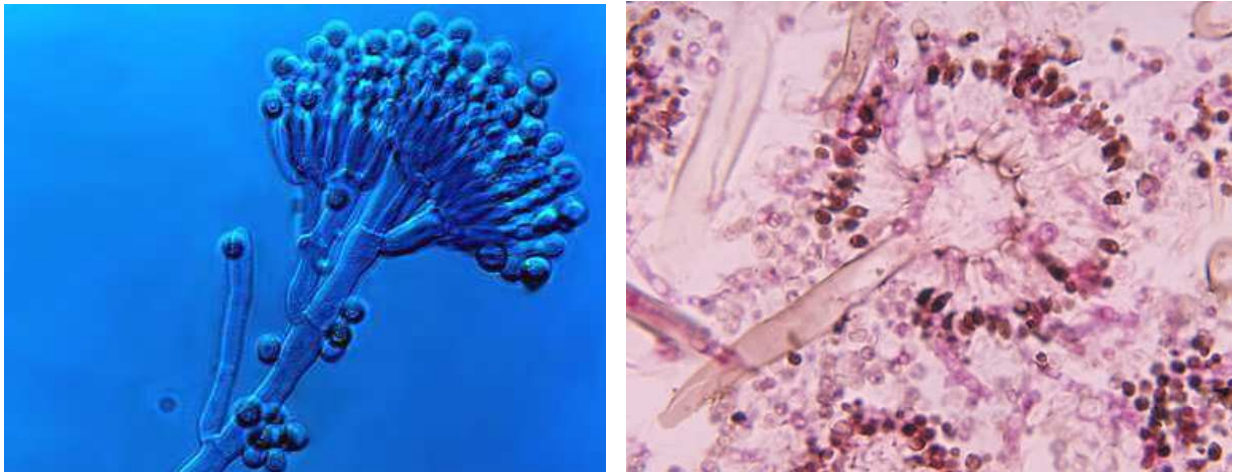
#### 3.5.1.2 Plísně

Plísně jsou většinou aerobní a přežívají v prostředí s nízkou hodnotou pH (1,9-9,0), s nízkou vodní aktivitou a v prostředí s vysokým osmotickým tlakem. Mohou to být jedno i vícebuněčné organismy, jejichž stélka je tvořena vlákny neboli hyfy. Mnohobuněčné druhy mají septovanou stélku, kde je v každé buňce uloženo jedno nebo více jader. Buňky dále obsahují endoplazmatické retikulum, mitochondrie, vakuoly. Hyfy se většinou větví v pravém uhlu a vytvářejí tzv. mycelium, které je možné vidět pouhým okem. Navíc některé druhy mohou produkovat plyn, takže pokud je mycelium dostatečně rozrostlé, tak napadený produkt značně zapáchá. Rozmnožování plísní je mnohem častěji nepohlavní pomocí konidioforů než pohlavní s tvorbou spor. Plísně jako kontaminanty džusů, můžeme rozdělit na tepelně citlivé (labilní) a tepelně odolné formy. Pozor si musíme dát u tepelně rezistentních askospor. V ekosystémech jsou plísně důležitými rozkladači, díky jejich enzymatickému vybavení. Mezi rody často kontaminující ovoce patří například *Aspergillus* a *Penicillium* (Lima Tribst et al. 2009; Kotzekidou 2016).

##### 3.5.1.2.1 *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* je hojně rozšířen častěji v subtropických oblastech, často kontaminuje ovoce, píci, krmivo a hotové potraviny. Kolonie jsou sametově hladké s konidii seřazenými v kruzích, jejichž barva je druhově specifická. Rozmnožuje se nepohlavně tvorbou spor, které jsou u některých druhů tepelně odolné (Lima Tribst et al. 2009).

Jde o bohatě enzymaticky vybavené druhy, některé druhy produkují antibiotika a toxiny. Toxicita těchto antibiotik je tak vysoká že nenašly v lékařství uplatnění. Aflatoxin je mykotoxin produkující druh *Aspergillus flavus* (viz obr 3) se žlutozelenými konidii. Druh *A. niger*, s černými konidii, je průmyslově využíván k výrobě kyseliny citrónové. (viz obr 3).



Obrázek 3 Vlevo *Aspergillus flavus* (Kubátová et al. n.d.), vpravo *A. niger*  
[https://quest-eb-com.ezproxy.techlib.cz/search/aspergillus-niger/1/139\\_1995568/Aspergillus-niger](https://quest-eb-com.ezproxy.techlib.cz/search/aspergillus-niger/1/139_1995568/Aspergillus-niger)

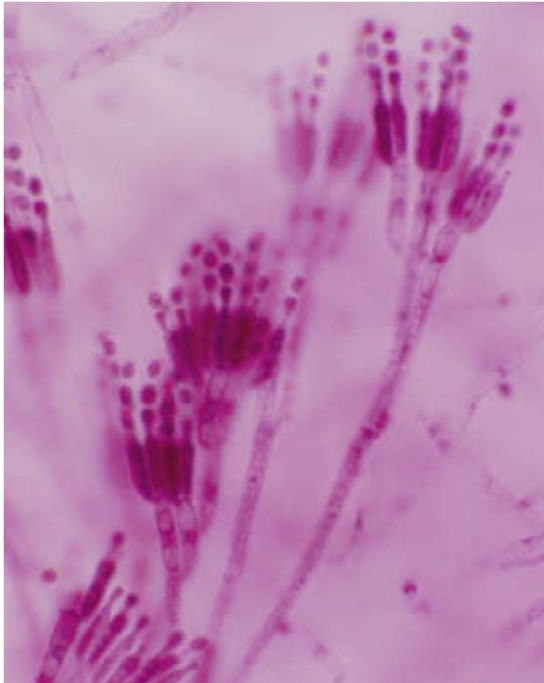
#### 3.5.1.2.2 *Penicillium*

Opět se jedná o velmi druhově bohatý rod, rozšířený napříč světem, který snáší nízkou aktivitu vody. *Penicillium* vytváří rychle rostoucí sametové kolonie. Barva mycelia je od bílé přes žlutozelenou až po tmavě zelenou s ohledem na daný druh (Kubátová et al. n.d.; Šilhánková 2002).

Rod obsahuje jak lidstvu prospěšné druhy, tak toxické. Příkladem může být *Penicillium roqueforti*, který se sice využívá pro výrobu sýru Roquefort, ale zároveň produkuje toxin roquefortin (Bibek 2003). V mikrobiologii džusu je důležitým kontaminantem *Penicillium expansum*, který napadá jablka a zároveň produkuje mykotoxin patulin. Patulin se teplem nerozkládá, a proto ho můžeme běžně nacházet v komerčních džusech. Dalším zajímavým zástupcem je *P. digitatum*, u kterého se v některých zemědělských oblastech vyvinula resistance na fungicid benomyl (Kubátová et al. n.d.; Šilhánková 2002; Lima Tribst et al. 2009).

#### 3.5.1.2.3 *Mucoraceae*

Čeleď zahrnuje přes 100 druhů plísní, vyskytujících se v půdách a nejrůznějších potravinách a dalších vlhkých stanovištích. Jedná se o rychle rostoucí šedobílou plíseň s 2-20 mm vysokými sporangii, rostoucí a sporulující při 5-20 °C, při teplotě do 30 °C sporuluje. Některé druhy (*Mucor javanicus*, *M. rouxii*) se využívají v Asii v tradiční kvasné technologii alkoholických nápojů ze sóji (Kubátová et al. n.d.; Šilhánková 2002).



3.5.1.2.4 *Obrázek 4 Vlevo Penicillium, vpravo Mucoraceae*

[https://quest-eb-com.ezproxy.techlib.cz/search/penicillium-sp./1/139\\_1881354/Penicillium-sp.-Conidia-LM](https://quest-eb-com.ezproxy.techlib.cz/search/penicillium-sp./1/139_1881354/Penicillium-sp.-Conidia-LM)

[https://quest-eb-com.ezproxy.techlib.cz/search/mucor/1/126\\_505307/Mold-of-the-genus-Mucor-Phycomycetes-seen-under-microscope](https://quest-eb-com.ezproxy.techlib.cz/search/mucor/1/126_505307/Mold-of-the-genus-Mucor-Phycomycetes-seen-under-microscope)

### 3.5.2 Bakterie

Bakterie jsou součástí jedné ze dvou domén prokaryotických organismů. Doména *Bacteria* se dále uměle dělí na tři podskupiny, a to podle přítomnosti a složení vnější buněčné stěny, tedy na: grampozitivní, gramnegativní a na bakterie bez buněčné stěny. Buněčná stěna bakterií je rigidní struktura tvořená peptidoglykany. Grampozitivní bakterie ve své buněčné stěně obsahují kovalentně vázanou kyselinu teichoovou anebo neutrální polysacharidy (Šilhánková 2002; Sedláček 2007).

Bakterie jsou jednobuněčné prokaryotické organismy nejčastěji 1-10  $\mu\text{m}$  velké, tvarem těla je můžeme rozdělit na koky, tyčky, bakterie se zakřiveným tělem a bakterie s větvičí se stélkou. Tyto skupiny se ještě dále dělí. Koky můžeme rozdělit dle způsobu uspořádání v prostoru, zakřivené bakterie se dělí dle způsobu zakřivení na spirily, spirochéty a vibria. Některé tyčky se v nepříznivých podmínkách zasporelují, a vytvoří odolnou strukturu. Dalším

rozdělujícím kritériem je právě tvorba spor, odolných „spících“ útvarů, ze kterých ve vhodném prostředí může znovu vyklíčit vegetativní buňka (Šilhánková 2002; Sedláček 2007; Kotzekidou 2016).

#### 3.5.2.1 *Acetobacteraceae* – rod *Acetobacter*

Bakterie tohoto rodu jsou peritrichální nebo atrichní tyčinky, které často tvoří nepravidelné tvary. Mikroorganismy jsou striktně aerobní, senzitivní na vyšší teploty a jsou schopny kvasit alkoholy na kyselinu octovou, to vede k tomu, že v ovocných nápojích způsobují octovou příchuť. Tyto bakterie se běžně vyskytují na povrchu ovoce a mohou způsobovat jeho kažení, příkladem může být druh *Acetobacter aceti* (Kubátová et al. n.d.; Šilhánková 2002; Lima Tribst et al. 2009).



Obrázek 5 *Acetobacter*

<https://www.gettyimages.com/detail/photo/acetobacter-aceti-acteria-are-a-widespread-high-res-stock-photography/128554982>

<https://www.gettyimages.co.uk/detail/photo/acetobacter-aceti-bacteria-gram-negative-high-res-stock-photography/vis25060>

#### 3.5.2.2 Koliformní bakterie – řád *Enterobacteriales*

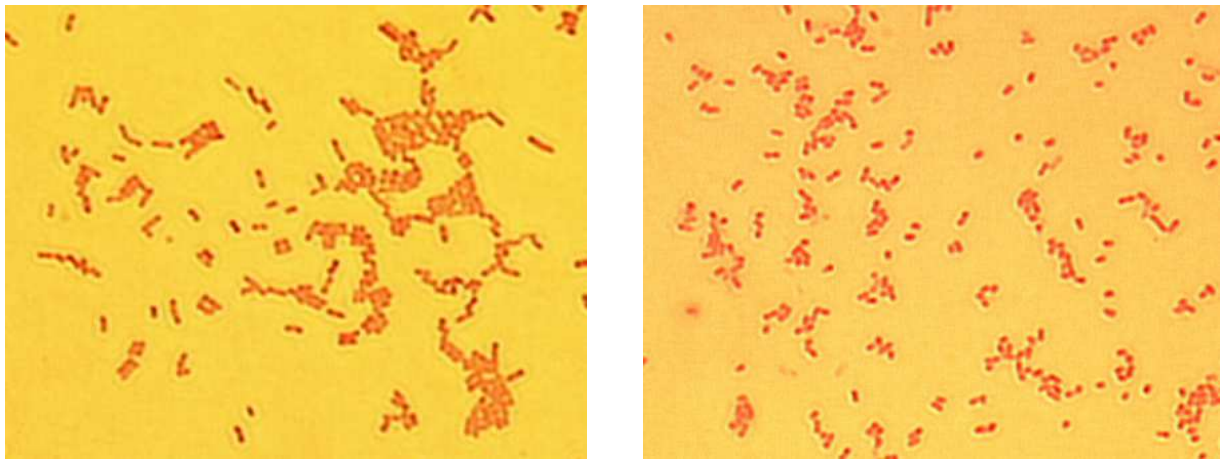
Koliformní bakterie jsou jednotlivé druhy patřící mezi čeleď *Enterobacteriaceae* s rody *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, a čeleď *Aeromonadaceae*.

Čeď *Enterobacteriaceae* jsou gramnegativní, fakultativně anaerobní, nesporotvorné, peritrichální tyčky. Jsou považovány za indikátory fekálního znečištění a v hygieně potravin jim je věnována velká pozornost. Mnohé druhy z těchto čeledí jsou lidskými i zvířecími

patogeny. Nicméně, v poslední době se ukazuje, že jejich označení jako indikátory fekálního znečištění není zcela přesné, neboť jsou hlavně enviromentálního původu (Leclerc et al. 2001; Martin et al. 2016).

Například, jak uvádí Bibek (2003), byly v kyselých potravinách, jako jsou právě džusy, nalezeny patogeny *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* a *Salmonella*, které způsobují alimentární onemocnění. Zpětné testování těchto patogenů ukázalo, že se u nich vyskytla odolnost vůči kyselému prostředí (běžně jsou citlivé už na hodnoty 4,5 pH).

*Escherichia coli* se nejen v potravinářské praxi stanovuje jako indikátor hygienické kvality vody. Je jedním z modelových organismů, některé kultivary jsou patogenní (Šilhánková 2002; Bibek 2003; Sedláček 2007).



Obrázek 6 Vlevo *Salmonella enterica*, vlevo, *Escherichia coli* vpravo.

Obojí (Kubátová et al. n.d.)

### 3.5.2.3 Bakterie mléčného kvašení – řád *Lactobacillales*

Za bakterie mléčného kvašení se považují ty druhy bakterií, které produkují svým metabolismem laktát. Často se v potravinářství používají jako přírodní konzervanty, neboť produkují kyselinu mléčnou (a další látky) a tou přirozeně okyselují okolní prostředí a tím z něj vylučují ostatní bakterie. V mikrobiologii kyselých ovocných nápojů, představují bakterie mléčného kvašení největší hrozbu během sanitací potravinářských provozů (Lima Tribst et al. 2009; Kotzekidou 2016).

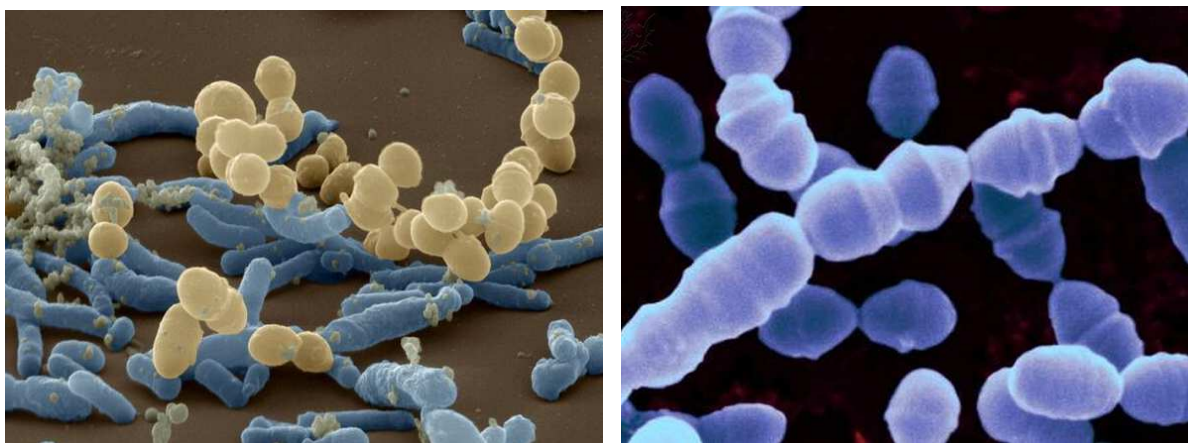
#### 3.5.2.3.1 Rod *Lactobacillus*

Fakultativně anaerobní, nesporulující, peritrichální tyčky s grampozitivní buněčnou stěnou. Organismy rodu *Lactobacillus* jsou chemoorganotrofního metabolismu, kterým

vyhovuje prostředí ovocných šťáv díky velkému množství živin. Podmínky optimálního růstu jsou: 30-40 °C a 5,5-6,2 pH. Hojně se vyskytují napříč světem, a jelikož nejsou termorezistentní, napadají hlavně tepelně neošetřené produkty. Pokud dojde k napadení (třeba pomerančového džusu) způsobují octovatění tím, že zkvašují přítomné sacharidy na diacetyl. Takový nápoj má pak “máslovou” a octovou příchuť. Bakterie bývají patogenní zcela výjimečně. Zástupci kontaminující džusy jsou *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* (Bibek 2003; Lima Tribst et al. 2009; Steyn et al. 2011; Matthews et al. 2017).

#### 3.5.2.3.2 Rod *Leuconostoc*

Grampozitivní nesporulující bakterie tyčkového tvaru s kulatými konci, někdy tvořící řetízky. Optimální teplota růstu je 20-30 °C. Homefermentativním metabolismem produkuje sloučeniny jako je laktát, oxid uhličitý nebo diacetyl, který je spojován s máslovou příchuť. Mezi zástupce patří *Leuconostoc mesenteroides* a *Leuconostoc dextranicum* (Lima Tribst et al. 2009; Adams et al. 2016).



Obrázek 7 vlevo *Lactobacillus*, vpravo *Leuconostoc*

[https://quest-eb-com.ezproxy.techlib.cz/search/lactobacillus/1/132\\_1330835/Coloured-SEM-of-Lactobacillus-bacteria](https://quest-eb-com.ezproxy.techlib.cz/search/lactobacillus/1/132_1330835/Coloured-SEM-of-Lactobacillus-bacteria)

[https://quest-eb-com.ezproxy.techlib.cz/search/leuconostoc/1/139\\_1935064/Leuconostoc-mesenteroides](https://quest-eb-com.ezproxy.techlib.cz/search/leuconostoc/1/139_1935064/Leuconostoc-mesenteroides)

#### 3.5.2.4 Sporotvorné bakterie

Spory, ať už bakteriální či kvasinek a plísní, jsou záchovnou strukturou, která odolává mnohým stresovým faktorům a může z ní vyklíčit nová plně funkční vegetativní buňka. U bakterií platí, že pokud koncentrace živin klesne pod určitou hodnotu, tak dojde nejprve k

zastavení rozmnožování a následně ke sporulaci. Obecně tento proces nastává při jakkoliv nepříznivých podmínkách.

Sporulace neboli tvoření spor je záchovný proces, kdy se vegetativní buňky přemění do klidového stádia odolných spor. Zvýší se jejich odolnost vůči teplu, chladu i hodnotě pH a dalším fyzikálně – chemickým jevům, takže bakteriální spory jsou schopné přežít v extrémně nepříznivých podmínkách. Pokud mají být takové spory zničeny, je potřeba překonat jejich rezistenci. Na druhou stranu – jestliže mají spory vyklíčit a znovu se z nich stát vegetativní životaschopné buňky, musí se v prostředí vytvořit opět vhodné podmínky pro růst dané kolonie. Tato situace kupříkladu nastává při nedbalé pasteraci, když se produkt nedostatečně zahřeje, tak je sice část vegetativních buněk zničena, nicméně část buněk vytvoří spory. Následně po obnovení optimálních podmínek pro růst daného mikroba začnou spory klíčit a propukne kažení potraviny.

Mezi sporotvorné bakterie, jak uvádí Matthews (2017), se řadí tyto rody: *Alicyclobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporolactobacillus* (Šilhánková 2002; Bibek 2003; Rosypal 2003).

#### 3.5.2.4.1 Rod *Bacillus*

Rod *Bacillus* je velmi obsáhlý a v přírodě hojně rozšířený. V potravinářském průmyslu, mohou druhy tohoto rodu způsobovat křížovou kontaminaci například při špatné osobní hygieně. Rod má grampozitivní, fakultativně, aerobní, peritrichiální tyčky. Při pasteraci konzerv je na termofilní druhy tohoto rodu brán velký zřetel, neboť tvoří termorezistentní spory. Spory těchto termorezistentních druhů v nekyselých konzervách (jako mohou být čisté zeleninové šťávy) přežívají tepelné ošetření, a to pak může vést ke zkáze výrobku. Bacily mají velkou enzymatickou výbavu, takže jsou hojnými rozkladači. Některé druhy produkují antibiotika polypeptidové povahy, jiné druhy tvoří slizová pouzdra, které jsou příčinou kažení pečiva. Pouze dva druhy, *B. cereus* a *B. anthracis* produkují toxiny a jsou původci alimentárních otrav lidí i zvířat (Rosypal 2003; Kotzekidou 2016; Matthews et al. 2017).

Mezi hlavní kontaminanty ovocných šťáv, při pH do 4,5, patří *Bacillus coagulans* a *Bacillus megaterium*. *B. coagulans* způsobuje plynu prosté kažení a může klíčit a množit se za nízké hodnoty pH (Šilhánková 2002; Steyn et al. 2011).



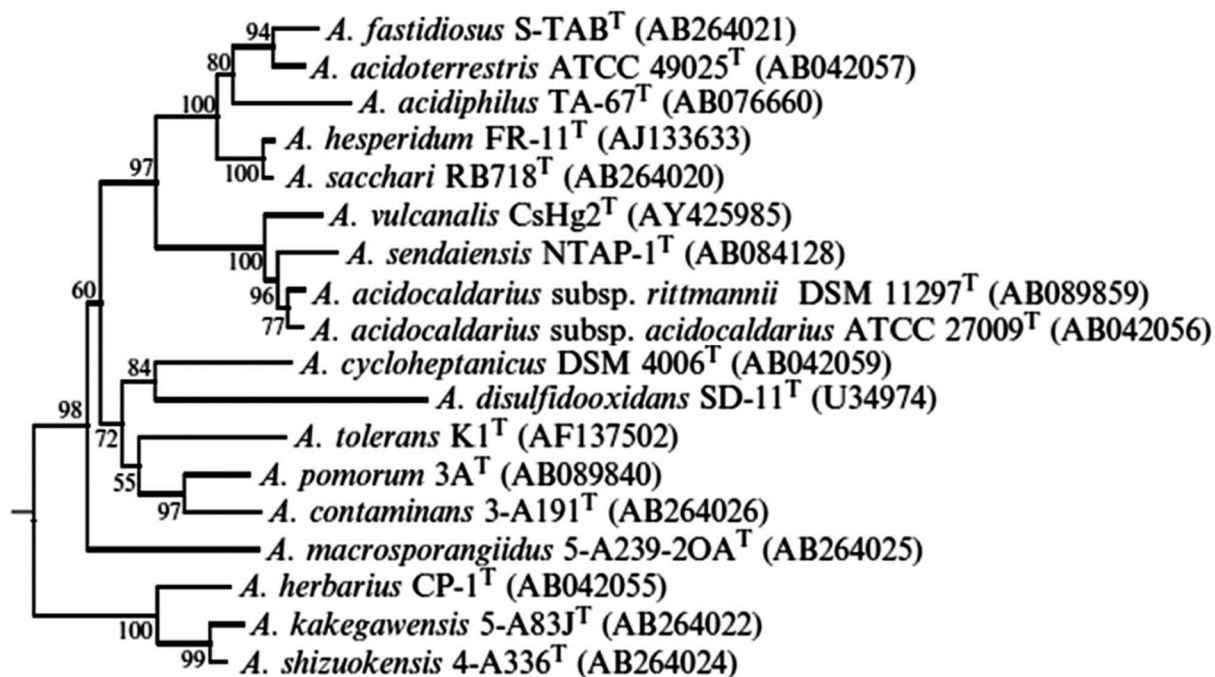
#### 3.5.2.4.2 Rod *Clostridium*

*Clostridium* je rod tyčkovitých bakterií vyskytující se napříč prostředím a v potravinářství je velmi důležitým rodem organismů.

Tyto bakterie jsou obligátně anaerobní, takže některé duhy jsou schopny za přístupu kyslíku přežít, kdežto jiné do 10 minut hynou. Většina druhů je alespoň v mládí gram pozitivní. Spory jsou klostridiálního tvaru, to znamená, že jsou uloženy uprostřed a že jsou širší, než je vegetativní buňka. Spory jsou zničeny po 15 minutách při 120 °C při vlhké pasteraci. Pokud jde o kyselou potravinu, jako jsou ovocné šťávy, stačí kratší doba i nižší teplota pasterace. Clostridia jsou totiž citlivá na kyselé prostředí (pH <4,0). Některé druhy produkují svým metabolismem plyn, čehož se využívá hlavně při výrobě sýru typu Ementál. Jiné druhy produkují kyselinu máselnou, která negativně ovlivňuje sensorickou jakost potraviny. Mezi další produkty metabolismu některých druhů, jako například *C. tetani* a *C. perfringens*, patří toxiny, které způsobují vážné otravy. Druh *C. botulinum* produkuje nejtoxičtější jed, botulotoxin. Tento jed způsobuje otravy zvané botulismus, kdy 1 mg je letální dávkou pro 16 000 lidí. Jelikož je botulotoxin bílkovinné povahy, může být inaktivován ohřevem na teplotu 121 °C po dobu 3 minut. Kažení ovocných džusů způsobují například druhy: *Clostridium pasteurianum*, *C. sporogenes*, *C. butyricum* (Šilhánková 2002; Rosypal 2003; Kotzekidou 2016; Matthews et al. 2017).

#### 3.5.2.4.3 Rod *Alicyclobacillus*

K utvoření tohoto rodu vedly tři na sobě nezávislé objevy mikroorganismů, v druhé polovině minulého století. Všechny tyto tři organismy byly původně řazeny pod rod *Bacillus* a jmenovaly se *Bacillus acidocaldarius*, *B. acidoterrestis* a *B. cycloheptanicus*. Po pozdějším důkladném prozkoumání byla utvořena nová taxonomická skupina *Alicyclobacillus* sp. a druhy se přejmenovaly na *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *A. acidoterrestis* a *A. cycloheptanicus*. Postupem času byly objeveny a popsány další druhy (viz obrázek 8), takže rod v roce 2010 čítal 20 druhů (Chang & Kang 2004; Steyn et al. 2011; Pornpukdeewattana et al. 2019).



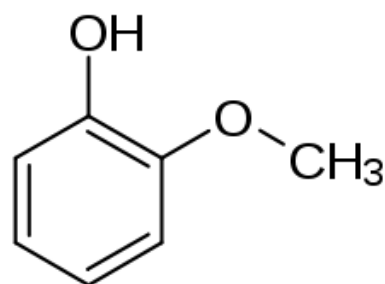
Obrázek 8: Druhy patřící do rodu *Alicyclobacillus*, obrázek z roku 2009 (Pornpukdeewattana et al. 2019)

Alicyklobacily jsou fakultativně aerobní nebo aerobní, termorezistentní, nepatogenní tyčinkové bakterie, které tvoří spory. Dále jsou acidofilními mikroorganismy a rostou při pH 2,0 – 6,0. Dále je rozmezí růstu od 20–70 °C, optimum růstu je od 42-60 °C a spory začínají klíčit při teplotě vyšší jak 20 °C. (Chang & Kang 2004; Pornpukdeewattana et al. 2019).

Buněčná stěna je grampozitivní se zabudovanou mastnou kyselinou  $\omega$ -cyclohexanovu a hopanoidy. Tato mastná kyselina je pro tento rod charakteristická a byl to také jeden z důvodů vyjmutí z rodu *Bacillus* (Shah et al. 2019). Dále Chang & Kang (2004) spekulují, že právě tato mastná kyselina je možnou příčinou jejich odolnosti vůči metodám konzervace.

V laboratořích se ke kultivaci používá BAT (Bacillus AcidoTerrestris) agar, který má hodnotu pH 2,0-4,0 (Witthuhn et al. 2011). Na plotnách se tvoří smetanově bílé, nepigmentované, ploché kolonie (Chang & Kang 2004). Následně se k detekci alicyklobacilů používá hned několik metod, pro příklad PCR, ELISA, HPCL, PECA anebo také senzorká analýza. Zajímavá a rychlá metoda je PECA (peroxidase enzyme colorimetric assay) neboli kolorimetrický test s peroxidázovým enzymem, jehož principem je oxidace guajakolu a vznik hnědé sraženiny (Huang et al. 2015).

Produkce guajakolu při kažení džusů je dalším rozlišovacím znakem tohoto druhu. Guajakol neboli 2 - methoxyfenol vzniká z neoxidační dekarboxylací kyseliny vanilinové, a právě ten je popisován jako medicínální, dezinfekční či kouřový zápach. K produkci sensoricky detekovatelného zápachu, stačí pouze  $10^5$ - $10^6$  buněk/ml pomerančového nebo jablečného džusového nápoje. To odpovídá koncentraci okolo 0,013 ppm vodného roztoku guajakolu. Takže při kažení potraviny, kdy ještě nejsou zřetelně vidět kolonie ani sediment, je cítit guajakol (Witthuhn et al. 2012; Matthews et al. 2017; Pornpukdeewattana et al. 2019).



Obrázek 9 vlevo *Alicyclobacillus*, vpravo molekula guajakolu

<https://render.fineartamerica.com/images/rendered/square-product/small/images-medium-large-5/1-alicyclobacillus-sp-rod-prokaryote-dennis-kunkel-microscopyscience-photo-library.jpg>

<https://de.wikipedia.org/wiki/Methoxyphenole#/media/File:2-Methoxyphenol.svg>

Nejčastějšími kontaminanty jsou rody *A. acidoterrestris*, *A. pomorum*, *A. herbarius*, a *A. acidiphillus* to potvrzuje i Durak (2010) nejčastějšími kontaminanty jsou *Alicyclobacillus acidoterrestris* (45 %), *A. acidocaldarius subsp. acidocaldarius* (30 %), a *A. acidocaldarius* (11 %). Dále uvádí, že nejčastěji byl napadený jablečný džus druhem *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Ağçam et al. 2018).

## 4 Závěr

- Ke kontaminaci džusových nápojů, může dojít v průběhu celého zpracování.
- Nejčastějšími kontaminanty jsou sporulující organismy, a to především ty, které přežívají i v kyselém anebo v nasyceném prostředí džusových nápojů.
- Kontaminující organismy rozkládají organické složky, které mají neblahý vliv na sensorickou jakost konečného produktu.
- Do budoucna by bylo zajímavé zaměřit se na krizové body kontaminace alicyklobacily.

## 5 Literatura

- Adams MR, Moss MO, McClure PJ. 2016. Food microbiology. Royal Society of Chemistry.
- Ağçam E, Akyıldız A, Dündar B. 2018. Thermal Pasteurization and Microbial Inactivation of Fruit Juices. Pages 309–339 Fruit Juices. Academic Press. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128022306000175> (accessed April 15, 2019).
- Bibek R. 2003. Fundamental Food Microbiology. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton.
- Calderone R. 2015. Candida. Access Science. McGraw-Hill Education. Available from <https://www-accessscience-com.ezproxy.techlib.cz/content/106050> (accessed April 9, 2019).
- Chang S-S, Kang D-H. 2004. Alicyclobacillus spp. in the Fruit Juice Industry: History, Characteristics, and Current Isolation/Detection Procedures. Critical Reviews in Microbiology **30**:55–74. Taylor & Francis. Available from <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408410490435089> (accessed March 17, 2019).
- Ciqual. 2017. Ciqual Table de composition nutritionnelle des aliments. Available from <https://ciqual.anses.fr/> (accessed March 24, 2019).
- Demnerová K, Karpíšková R, Pazlarová J. 2008. Mikrobiologická bezpečnost potravin: Listeria monocytogenes a Enterobacter sakazakii. Výživa a potraviny:9–10. Available from <http://www.spolvyziva.cz> (accessed March 22, 2019).
- Dostálová J, Dlouhý P, Tláškal P. 2012. Výživová doporučení pro obyvatelstvo České republiky – Společnost pro výživu. Available from <http://www.vyzivapol.cz/vyzivova-doporuceni-pro-obyvatelstvo-ceske-republiky/> (accessed March 22, 2019).
- dTest. 2014. Test jablečných džusů a moštů 2014. dTest **10**:25–28. Available from <https://www.dtest.cz/clanek-3828/test-jablecnych-dzusu-a-mostu-2014>.
- dTest. 2016. Test 100% pomerančových džusů 2016. dTest **7**. Available from <https://www.dtest.cz/clanek-5152/test-100-pomerancovych-dzusu-2016>.
- Durak MZ, Churey JJ, Danyluk MD, Worobo RW. 2010. Identification and haplotype distribution of Alicyclobacillus spp. from different juices and beverages. International Journal of Food Microbiology **142**:286–291. Elsevier. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160510003764?via%3Dihub> (accessed April 15, 2019).
- Francis FJ. 2000. Encyclopedia of food science and technology. 2nd ed. Wiley, New York. Available from <https://vufind.techlib.cz/Record/000908726> (accessed April 5, 2019).
- Goliáš J. 2014. Skladování a zpracování ovoce a zeleniny první. Mendelova univerzita v Brně Zemědělská 1, 613 00 Brno. Available from [https://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty/files/23/23-skladovani\\_a\\_zpracovani\\_ovoce\\_a\\_zeleniny\\_golias.pdf](https://web2.mendelu.cz/af_291_projekty/files/23/23-skladovani_a_zpracovani_ovoce_a_zeleniny_golias.pdf) (accessed March 12, 2019).
- Hrnčířová D, Rambousková J, Blahová A, Dlouhý P, Floriánková M. 2012. Výživa a zdraví. Ministerstvo zemědělství Odbor bezpečnosti potravin. Available from [www.eagri.cz](http://www.eagri.cz), (accessed March 20, 2019).
- Huang X-C, Yuan Y-H, Guo C-F, Gekas V, Yue T-L. 2015. Alicyclobacillus in the Fruit Juice Industry: Spoilage, Detection, and Prevention/Control. Food Reviews International

- 31:91–124. Taylor & Francis. Available from <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/87559129.2014.974266> (accessed April 16, 2019).
- Kadlec P, Melzoch K, Voldřich M. 2012. Přehled tradičních potravinářských výroby : technologie potravin. Key Publishing, Ostrava.
- Katsa M, Proestos C. 2019. Vitamin Analysis in Juices and Nonalcoholic Beverages. Pages 137–173 in A. M. Grumezescu and A. M. Holban, editors. Engineering tools in the beverage industry. Volume 3, The science of beverages.
- Kocková-Kratochvílová A. 1990. Taxonómia kvasiniek a kvasinkových mikroorganizmov. Page (Minárik E, Sláviková E, editors). Alfa, Bratislava.
- Kolářová M. 2010. Hodnocení kvality ovocných nápojů.
- Kotzekidou P. 2016. Food hygiene and toxicology in ready to eat foods. Elsevier.
- Kubátová A, Savická D, Němec M, Kotoučková L, Páčova Z, Chumchalová J. (n.d.). Miniatlask mikroorganismů. Available from <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlask/muc.htm> (accessed April 11, 2019).
- Leclerc H, Mossel DAA, Edberg SC, Struijk CB. 2001. Advances in the Bacteriology of the Coliform Group: Their Suitability as Markers of Microbial Water Safety. Annual Review of Microbiology 55:201–234. Available from <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.55.1.201> (accessed April 6, 2019).
- Lima Tribst AA, de Souza Sant'Ana A, de Massaguer PR. 2009. Review: Microbiological quality and safety of fruit juices—past, present and future perspectives. Critical Reviews in Microbiology 35:310–339. Taylor & Francis. Available from <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10408410903241428> (accessed April 5, 2019).
- Martin NH, Trmčić A, Hsieh T-H, Boor KJ, Wiedmann M. 2016. The Evolving Role of Coliforms As Indicators of Unhygienic Processing Conditions in Dairy Foods. Frontiers in Microbiology 7. Available from <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.01549/abstract> (accessed April 6, 2019).
- Matthews KR, Kniel KE, Montville TJ. 2017. Food microbiology : an introduction 4th editio. ASM Press, Washington DC.
- Ministerstvo zemědělství. 2018. Vyhláška č. 248/2018 Sb., o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí. © AION CS 2010-2019, Česko. Available from <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-248#p2>.
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. 2016. Flavonoids: an overview. Journal of nutritional science 5:e47. Cambridge University Press. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28620474> (accessed March 25, 2019).
- Parish ME, Worobo RW, Danyluk MD. 2015. Juices and Juice-containing Beverages. Page Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods. APHA Press. Available from [https://www.researchgate.net/publication/282890670\\_Juices\\_and\\_Juice-Containing\\_Beverages](https://www.researchgate.net/publication/282890670_Juices_and_Juice-Containing_Beverages).

- Pornpukdeewattana S, Jindaprasert A, Massa S. 2019. Alicyclobacillus spoilage and control - a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*:1–15. Taylor & Francis. Available from <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2018.1516190> (accessed April 15, 2019).
- Rajauria G, Tiwari BK. 2018. extraction, composition, quality and analysis. Page 910 in G. Rajauria and B. K. Tiwari, editors. *Fruit Juices*. Academic Press. Available from <https://www-sciencedirect-com.infozdroje.czu.cz/book/9780128022306/fruit-juices#book-info> (accessed March 24, 2019).
- Rodrick GE, Schmidt RH. 2003. *Food safety handbook* 1st ed. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J. Available from <https://vufind.techlib.cz/Record/000913669> (accessed April 6, 2019).
- Rosypal S. 2003. *Nový přehled biologie* 1. vyd. Scientia, Praha.
- Sedláček I. 2007. *Taxonomie prokaryot* 1. vyd. Masarykova univerzita, Brno. Available from <https://vufind.techlib.cz/Record/000938426> (accessed April 5, 2019).
- Shah S, Qazi IM, Qadri RWK, Farooq S, Amjad I, Islam B, Khan ZH, Khan ZU. 2019. Hurdle technology in mango juice processing : A preventive measure against. *Fresenius Environmental Bulletin* **28**:93–99. Available from <https://www.researchgate.net/publication/330506633>.
- Šilhánková L. 2002. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnolog* 3 rd ed. Academia, Praha.
- Sluková M. 2016. *Výroba potravin a nutriční hodnota*, 1st edition. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha.
- Steyn CE, Cameron M, Witthuhn RC. 2011. Occurrence of Alicyclobacillus in the fruit processing environment — A review. *International Journal of Food Microbiology* **147**:1–11. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160511001413>.
- Stinco CM, Pumilia G, Giuffrida D, Dugo G, Meléndez-Martínez AJ, Vicario IM. 2019. Bioaccessibility of carotenoids, vitamin A and  $\alpha$ -tocopherol, from commercial milk-fruit juice beverages: Contribution to the recommended daily intake. *Journal of Food Composition and Analysis* **78**:24–32. Available from <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.01.019> (accessed March 24, 2019).
- Sun D-W. 2009. *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*. Academic Press/Elsevier.
- Szeto YT, Tomlinson B, Benzie IFF. 2002. Total antioxidant and ascorbic acid content of fresh fruits and vegetables: implications for dietary planning and food preservation. *British Journal of Nutrition* **87**:55–59. Available from <https://doi.org/10.1079/BJN2001483> (accessed March 27, 2019).
- Velíšek J, Hajšlová J. 2009. *Chemie potravin*, 3rd edition. OSSIS, tábor.
- WHO. 2003. *Food based dietary guidelines in the WHO European Region Nutrition and Food Security Programme* WHO Regional Office for Europe. Available from <http://www.euro.who.int> (accessed March 20, 2019).
- Winter R. 2009. *A consumer's dictionary of food additives*. Three Rivers Press, New York. Available from [https://books.google.cz/books?id=-KanEB\\_ytFQC&pg=PA26&hl=cs&source=gbs\\_selected\\_pages&cad=3#v=onepage&q=citric acid &f=false](https://books.google.cz/books?id=-KanEB_ytFQC&pg=PA26&hl=cs&source=gbs_selected_pages&cad=3#v=onepage&q=citric acid &f=false) (accessed March 27, 2019).

- Witthuhn RC, Smit Y, Cameron Michelle, Venter Pierre. 2011. Isolation of *Alicyclobacillus* and the influence of different growth parameters. *International Journal of Food Microbiology* **146**:63–68. Available from [https://www.sciencedirect-com.infozdroje.czu.cz/science/article/pii/S0168160511000699](https://www.sciencedirect.com.infozdroje.czu.cz/science/article/pii/S0168160511000699).
- Witthuhn RC, Smit Y, Cameron Michelle, Venter Pierre. 2012. Guaiacol production from ferulic acid, vanillin and vanillic acid by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *International Journal of Food Microbiology* **157**:113–117.