

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta

**POTRAVINÁŘSKÁ MIKROBIOLOGIE PRO
ZAHRADNICKOU FAKULTU
Díl 2. Speciální část**

Libor Kalhotka

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta

**POTRAVINÁŘSKÁ MIKROBIOLOGIE PRO
ZAHRADNICKOU FAKULTU
Díl 2. Speciální část**

Ing. Libor Kalhotka, Ph.D.

Brno, 2014



esf evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Tato publikace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.

Byla vydána za podpory projektu OP VK CZ.1.07/2.2.00/28.0302 Inovace studijních programů AF a ZF MENDELU směřující k vytvoření mezioborové integrace.

Recenze: Mgr. Eva Šroubková, CSc.

© Libor Kalhotka, 2014

ISBN 978-80-7509-016-4

ISBN 978-80-7509-017-1 (soubor)

ISBN 978-80-7509-015-7 (I. díl)

Obsah

1 ÚVOD	7
2 BAKTERIE VÝZNAMNÉ V POTRAVINÁŘSTVÍ A SOUVISEJÍCÍCH OBORECH	8
2.1 Aerobní nebo mikroaerofilní G- bakterie spirálovitého nebo vibriovitého tvaru....	8
2.1.1 <i>Campylobacter</i> (řád <i>Campylobacteriales</i> , čeleď <i>Campylobacteraceae</i>)	8
2.2 G- aerobní tyčinky a koky	9
2.2.1 <i>Pseudomonas</i> (řád <i>Pseudomonadales</i> , čeleď <i>Pseudomonadaceae</i>).....	9
2.2.2 <i>Acetobacter</i> (řád <i>Rhodospirillales</i> , čeleď <i>Acetobacteraceae</i>).....	9
2.2.3 <i>Gluconobacter</i> (řád <i>Rhodospirillales</i> , čeleď <i>Acetobacteraceae</i>)	10
2.2.4 Další významné rody	10
2.3 G- fakultativně anaerobní tyčinky	11
2.3.1 <i>Escherichia</i> (řád <i>Enterobacteriales</i> , čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>).....	11
2.3.2 <i>Salmonella</i> (řád <i>Enterobacteriales</i> , čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>).....	13
2.3.3 <i>Enterobacter</i> (řád <i>Enterobacteriales</i> , čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>).....	15
2.3.4 <i>Shigella</i> (řád <i>Enterobacteriales</i> , čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>).....	15
2.3.5 <i>Yersinia</i> (řád <i>Enterobacteriales</i> , čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>).....	15
2.3.6 <i>Proteus</i> (řád <i>Enterobacteriales</i> , čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>)	16
2.3.7 <i>Serratia</i> (řád <i>Enterobacteriales</i> , čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>).....	16
2.3.8 <i>Vibrio</i> (řád <i>Vibrionales</i> , čeleď <i>Vibrionaceae</i>).....	16
2.4 G+ koky	16
2.4.1 <i>Micrococcus</i> (řád <i>Actinomycetales</i> , čeleď <i>Micrococcaceae</i>).....	17
2.4.2 <i>Kocuria</i> (řád <i>Actinomycetales</i> , čeleď <i>Micrococcaceae</i>)	17
2.4.2 <i>Enterococcus</i> (řád <i>Lactobacillales</i> , čeleď <i>Enterococcaceae</i>)	17
2.4.3 <i>Streptococcus</i> (řád <i>Lactobacillales</i> , čeleď <i>Streptococcaceae</i>).....	17
2.4.4 <i>Lactococcus</i> (řád <i>Lactobacillales</i> , čeleď <i>Streptococcaceae</i>)	18
2.4.5 <i>Leuconostoc</i> (řád <i>Lactobacillales</i> , čeleď <i>Leuconostocaceae</i>).....	19
2.4.6 <i>Oenococcus</i> (řád <i>Lactobacillales</i> , čeleď <i>Leuconostocaceae</i>)	19
2.4.7 <i>Pediococcus</i> (řád <i>Lactobacillales</i> , čeleď <i>Lactobacillaceae</i>).....	19
2.4.8 <i>Staphylococcus</i> (řád <i>Bacillales</i> , čeleď <i>Staphylococcaceae</i>).....	19
2.5 Sporotvorné tyčinky a koky	21
2.5.1 <i>Bacillus</i> (řád <i>Bacillales</i> , čeleď <i>Bacillaceae</i>)	21
2.5.2 <i>Clostridium</i> (řád <i>Clostridiales</i> , čeleď <i>Clostridiaceae</i>).....	22
2.5.3 <i>Desulfotomaculum</i> (řád <i>Clostridiales</i> , čeleď <i>Peptococcaceae</i>)	24
2.6 Pravidelné nesporulující G+ tyčinky	24
2.6.1 <i>Lactobacillus</i> (řád <i>Lactobacillales</i> , čeleď <i>Lactobacillaceae</i>)	24
2.6.2 <i>Listeria</i> (řád <i>Bacillales</i> , čeleď <i>Listeriaceae</i>).....	26
2.7 Nepravidelné nesporulující G+ tyčinky	27
2.7.1 <i>Corynebacterium</i> (řád <i>Actinomycetales</i> , čeleď <i>Corynebacteriaceae</i>)	27
2.7.2 <i>Brevibacterium</i> (řád <i>Actinomycetales</i> , čeleď <i>Brevibacteriaceae</i>).....	27
2.7.3 <i>Bifidobacterium</i> (řád <i>Bifidobacteriales</i> , čeleď <i>Bifidobacteriaceae</i>)	27
2.7.4 <i>Propionibacterium</i> (řád <i>Actinomycetales</i> , čeleď <i>Propionibacteriaceae</i>).....	28
2.7.5 <i>Mycobacterium</i> (řád <i>Actinomycetales</i> , čeleď <i>Mycobacteriaceae</i>)	28
2.8 Význam bakterií v potravinářském průmyslu	29
2.8.1 Úlohy a význam bakterií v potravinářství	29
2.8.2 Bakterie mléčného kvašení - BMK	29
2.8.3 Probiotické bakterie.....	30
2.8.4 Indikátorové a indexové bakterie	31
2.8.5 Mikrobiální kontaminace potravin	32
2.8.6 Biogenní aminy	35

3 MIKROMYCETY VÝZNAMNÉ V POTRAVINÁŘSTVÍ A SOUVISEJÍCÍCH OBORECH	38
3.1 Vlákenné mikromycety (plísňe).....	38
3.1.1 Třída <i>Zygomycetes</i>	38
3.1.1.1 Rod <i>Mucor</i>	38
3.1.1.2 Rod <i>Rhizopus</i>	39
3.1.2 Třída <i>Ascomycetes</i> a mikromycety, u nichž neznáme pohlavní rozmnožování.....	39
3.1.2.1 Rod <i>Penicillium</i>	40
3.1.2.2 Rod <i>Aspergillus</i>	43
3.1.2.4 Rod <i>Byssosclamyces</i>	45
3.1.2.5 Rod <i>Cladosporium</i>	45
3.1.2.6 Rod <i>Fusarium</i>	46
3.1.2.7 Rod <i>Alternaria</i>	47
3.1.2.8 Rod <i>Stachybotrys</i>	47
3.1.2.9 Rod <i>Trichoderma</i>	48
3.1.2.10 Rod <i>Monilia</i>	48
3.2 Významné kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy	49
3.2.1 Rody tvořící askospory.....	49
3.2.1.1 Rod <i>Saccharomyces</i>	49
3.2.1.2 Rod <i>Zygosaccharomyces</i>	51
3.2.1.3 Rod <i>Kluyveromyces</i>	51
3.2.1.4 Rod <i>Pichia</i>	51
3.2.2 Bazidiomycetní kvasinky.....	52
3.2.2.1 Rod <i>Filobasidiella</i>	52
4.2.3 Rody, u nichž není známa tvorba pohlavních spor.....	53
3.2.3.1 Rod <i>Candida</i>	53
3.2.3.2 Rod <i>Malassezia</i>	54
3.2.3.3 Rod <i>Rhodotorula</i>	54
3.2.3.4 Rod <i>Sporobolomyces</i>	54
3.2.3.5 Rod <i>Geotrichum</i>	55
3.3 Význam mikromycet.....	55
3.3.1 Negativní význam mikroskopických hub.....	55
3.3.1.1 Onemocnění vyvolaná mikromycetami.....	56
3.3.1.2 Mykotoxiny.....	57
3.3.1.3 Biokoroze – rozklad materiálů.....	65
3.3.1.4 Plísňe v budovách.....	65
3.3.1.5 Další příklady negativního působení mikromycet.....	66
3.3.1.6 Boj proti nežádoucím mikromycetám.....	67
3.3.2 Pozitivní význam mikroskopických hub.....	68
4 ZÁKLADY KINETIKY RŮSTU MIKROORGANISMŮ A TVORBY JEJICH PRODUKTŮ	70
4.1 Růst mikroorganismů	70
4.2 Jednorázová kultivace.....	71
4.2.1 Fáze růstové křivky.....	72
4.2.2 Způsoby průmyslové jednorázové kultivace.....	75
4.3 Kontinuální (průtoková) kultivace	76
4.4 Synchronizované kultury.....	78
4.5 Rozdělení fermentačních procesů.....	79
5 MĚŘENÍ KONCENTRACE MIKROORGANISMŮ	82

5.1 Počítání buněk	82
5.2 Kultivační stanovení mikroorganismů	82
5.3 Stanovení buněčné hmoty mikroorganismů	83
5.4 Zjištění přibližného počtu mikroorganismů na základě jejich biochemické činnosti	83
6 MIKROBIÁLNÍ TECHNOLOGIE.....	83
6.1 Výroba aminokyselin	83
6.2 Enzymy	85
6.2.1 Enzymové inženýrství	86
6.2.2 Lokalizace enzymů	86
6.2.3 Výroba enzymů	87
6.2.4 Stabilizace enzymů.....	88
6.2.4.1 Imobilizované enzymy	88
6.2.4.2 Imobilizované buňky	90
6.2.4.3 Enzymové micely	93
6.2.5 Využití průmyslově vyráběných enzymů.....	94
6.3 Výroba organických kyselin.....	94
6.3.1 Výroba kyseliny citronové	95
6.3.3 Kyselina mléčná	97
6.4 Výroba antibiotik	98
7 MIKROBIOLOGIE VZDUCHU, VODY A PŮDY	99
7.1 Vzduch.....	99
7.2 Voda.....	101
7.3 Půda	104
8 MIKROBIOLOGIE NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH POTRAVIN A POTRAVINOVÝCH SUROVIN	109
8.1 Maso a masné výrobky	109
8.1.1 Čerstvé maso	110
8.1.2 Chlazené maso.....	110
8.1.3 Mražené maso	111
8.1.4 Kažení masa způsobené mikroorganismy	112
8.1.5 Fermentované masné výrobky	113
8.2 Drůbež a výrobky z drůbežního masa	116
8.3 Ryby a plody moře	117
8.4 Mléko a mléčné výrobky	118
8.4.1 Mléko	118
8.4.2 Sýry	120
8.4.3 Tekuté fermentované (kysané) mléčné výrobky	127
8.4.4 Zahuštěné mléčné výrobky.....	129
8.4.5 Sušené mléko.....	130
8.4.6 Mražené výrobky.....	130
8.4.7 Smetana	131
8.4.8 Máslo.....	131
8.5 Mikrobiologie mouky, mikroorganismy v pekařství a cukrářství.....	131
8.5.1 Mouka.....	131
8.5.2 Pekařské kvasy	133
8.5.3 Chléb a pečivo	133
8.5.4 Trvanlivé pečivo.....	134
8.5.5 Cukrovinky.....	134

8.5.6 Měkké cukrářské výrobky	134
8.5.7 Čokoláda.....	135
8.6 Ovoce a zelenina	135
8.7 Mikrobiologie vajec a vaječných produktů	137
8.8 Alkoholické nápoje.....	139
8.8.1 Víno	139
8.8.2 Pivo.....	142
8.9 Koření.....	144
9 MIKROBIÁLNÍ KULTURY A PŘÍKLADY JEJICH VYUŽITÍ.....	146
10 OCHRANA PROTI ROZKLADNÉ ČINNOSTI MIKROORGANISMŮ	151
10.1 Faktory prostředí ovlivňující mikroorganismy	151
10.2 Ochrana proti rozkladné činnosti mikroorganismů	151
10.2.1 Vylučování mikroorganismů z prostředí	152
10.2.2 Přímá inaktivace mikroorganismů – sterilace	152
10.2.2.1 Fyzikální zákroky	153
10.2.2.2 Chemosterilace	155
10.2.3 Konzervace nepřímou metodou	156
10.2.3.1 Konzervace nepřímou inaktivací mikroorganismů	156
10.2.3.2 Chemická konzervace – chemonabioza	157
10.2.3.3 Konzervace biologickými zásahy.....	158
11 POUŽITÁ LITERATURA	159

1 ÚVOD

Potravinářská mikrobiologie je více méně samostatným oborem technické mikrobiologie, má ale na druhou stranu široký obsah. Zahrnuje **mikrobiologii potravin, předmětů denního užívání a potravinářských provozů**. Potravinářská mikrobiologie zkoumá a posuzuje vliv mikroorganismů na potraviny z hlediska jejich získávání, průmyslového opracování a zpracování, dopravy, skladování kulinární úpravy, konzumace v zařízeních společného stravování a v domácnostech. Zkoumá a posuzuje mikroorganismy předmětů denního užívání (obaly pro potraviny a materiály přicházející do styku s potravinami) a též i vzduchu, vody a půdy a potravinářských provozů. Na základě získaných poznatků učí vytvářet příznivé podmínky pro výrobu potravin a zabránění nepříznivého účinku mikroorganismů na potraviny a člověka. Speciálním aspektem potravinářské mikrobiologie, který se úzce dotýká technické mikrobiologie, je vývoj, příprava, zkoumání a vytváření podmínek pro **příznivý účinek kulturních mikroorganismů** na zušlechťování výrobků v mlékárenském, masném a konzervářském průmyslu, zemědělských technologiích apod.

Potravinářská mikrobiologie vychází z mikrobiologie obecné a úzce souvisí s dalšími odvětvími mikrobiologie, jako jsou mikrobiologie lékařská, veterinární, půdní, zemědělská, mikrobiologie vody a vzduchu a průmyslová (technická) mikrobiologie. Je spjata s vědními obory, jako jsou biologie, fyzika, biochemie, chemie a technologie potravin, výživa člověka, epidemiologie a hygiena potravin.

Předmětem potravinářské mikrobiologie jsou:

- Mikroorganismy využívané při výrobě potravin.
- Mikroorganismy znehodnocující, kazící potraviny a předměty denního užívání.
- Mikroorganismy přenášené potravinami z nemocného zvířete, člověka nebo bacilonosiče na vnímavého jedince (člověka).

2 BAKTERIE VÝZNAMNÉ V POTRAVINÁŘSTVÍ A SOUVISEJÍCÍCH OBORECH

V následující kapitole budou probrány významné bakterie z hlediska technického, ale především z hlediska potravinářského. Členění a zařazení mikroorganismů bude vycházet z tradičního členění do skupin podle typických společných vlastností.

2.1 Aerobní nebo mikroaerofilní G- bakterie spirálovitého nebo vibriovitého tvaru

Do této skupiny řadíme bakterie vyskytující se ve vodě, bahně, půdě ale i v potravinách. Některé jsou významnými patogeny. Z potravinářského hlediska je nejvýznamnější rod *Campylobacter*.

2.1.1 *Campylobacter* (řád *Campylobacterales*, čeleď *Campylobacteraceae*)

Jsou to G- štíhlé, mírně spirálovitě zakřivené tyčinky, ojediněle helikální (ve starších kulturách mohou být sférické), velké 0,2 - 0,5 x 0,5 - 5 (8) μm . Pohyblivé pomocí polárních bičíků, mají po jednom bičíku na jednom nebo obou pólech buňky. Jsou mikroaerofilní, některé druhy mohou růst i za striktně anaerobních podmínek. Jsou chemoorganotrofní, neoxidují ani nefermentují sacharidy, energii získávají z aminokyselin či tříuhlíkatých kyselin, oxidasa pozitivní a ureasa negativní. Některé druhy jsou patogenní pro člověka a zvířata. Vyskytují se v pohlavních orgánech, střevním traktu, ústní dutině člověka a zvířat.

V potravinářství jsou nejvýznamnější dva druhy *Campylobacter coli* a *C. jejuni* způsobující **kalpylobakteriózu**. Růstové optimum je 37 °C, inhibovány jsou při 1,5 % NaCl, jsou termofilní, málo odolné vůči záhřevu (nepřežívá 55 °C 1 - 3 min), vůči zmrazení (< -18) a pH < 5,0. Z dalších lze jmenovat např. *C. lari* (vyskytující se často u racků), *C. upsaliensis* (vyskytující se ve střevě psů a koček) i tyto dva druhy mohou způsobit průjemová onemocnění člověka, nebo *C. fetus* působící potraty u skotu a ovcí.

Patogenní kampylobaktery produkují enterotoxiny podobné cholerovému toxinu (u *C. jejuni*, *C. coli* a *C. lari*), dále pak cytotoxiny. Infekce nastává požitím infikované potravy (drůbeží maso, syrové mléko, vepřové a hovězí maso atd.) nebo vody, ale i kontaktem s nakaženými zvířaty (zoonóza) eventuálně sexuálním stykem. MID je poměrně nízká 10²/g. *C. jejuni* se množí v tenkém střevě, invaduje do epitelu, kde vyvolává zánět. Ve stolici se objevují erytrocyty a leukocyty. Infekční postižení může zůstat lokalizováno na tenké střevo nebo mikrob pronikne do krevního oběhu. Pak vzniká systémové horečnaté onemocnění. Onemocnění je provázeno bolestmi břicha, výrazným průjemem, někdy i krvavým, bolestmi

hlavy a horečkou. Průměrné onemocnění trvá 5 – 7 dní a může ustoupit i bez antibiotické terapie. **Prevence** spočívá v dodržování obecných zásad hygieny při výrobě a zpracování potravin a dostatečném tepelném ošetření potravin při výrobě nebo před konzumací (pasterace apod.).

2.2 G- aerobní tyčinky a koky

2.2.1 *Pseudomonas* (řád *Pseudomonadales*, čeleď *Pseudomonadaceae*)

Jsou to G- rovné nebo mírně zakřivené tyčinky 0,5 - 1 x 1,5 - 5 μm velké, monotrichní nebo lofotrichní. Pohyblivé pomocí jednoho nebo několika polárních bičíků. Jsou aerobní se striktně respiratorním typem metabolismu. Některé ale mohou růst i v anaerobních podmínkách díky schopnosti jako akceptor elektronů využít nitrát. Jsou oxidasa pozitivní nebo negativní a katalasa pozitivní. Jsou chemoorganotrovní, některé jsou fakultativně chemoautotrofní, bez kvasných schopností. Snášejí i nízké teploty, řadíme je mezi psychrotrofní mikroorganismy.

Na prostředí a živiny velmi jsou přizpůsobivé, mají široké enzymové vybavení (využití k průmyslovým oxidacím org. sloučenin při výrobě léků). U druhů využívajících jednoduhlíkaté sloučeniny (methanol) jako zdroj živin a energie byly konány pokusy pro získání krmných bílkovin.

Mají významný podíl na kažení potravin. Produkují barviva žlutá, zelená, modrá, červená, fluoreskující žlutozelené barvivo, která uvolňují do prostředí a mohou tak zbarvovat potraviny (červenání, modrání mléka). Určité druhy mohou vyvolávat v potravinách nežádoucí pachy (ovocné, rybí) a pachuti (mýdlová, hořká) Mají silné proteolytické a lipolytické schopnosti, podílí se na kažení masa, masných výrobků, mléka a tuků. Patří mezi nejpočetnější mikroorganismy na povrchu masa. Vyskytují se v půdě, vodě, na rostlinách a potravinách. Mezi významné zástupce patří *Pseudomonas aeruginosa*, která je patogenní pro člověka, produkuje termolabilní enterotoxin a může způsobovat gastroenteritidy a enterokolitidy, *P. fluorescens* vyskytující se v půdě, vodě, na potravinách, v klinickém materiálu. Některé kmeny jsou patogenní pro rostliny. Produkují fluoreskující barvivo fluorescein. Podílí se na kažení potravin. Z dalších je to např. *P. putida* apod.

2.2.2 *Acetobacter* (řád *Rhodospirillales*, čeleď *Acetobacteraceae*)

Jsou to elipsoidní, mírně zakřivené až rovné, G- (starší kultury mohou být G labilní), obligátně aerobní tyčinky, 0,6 - 0,8 x 1 - 4 μm velké. Jsou peritrichní nebo atrichní. Vyskytují se jednotlivě, v párech, v řetězcích. Často tvoří tzv. involuční formy – nepravidelné tvary

(zduřené až kulovité, zakřivené, vláknité aj.). Chemoorganotrofní, optimální teplota růstu je 25 - 30 °C, pH 5,4 - 6,3. Jsou katalasa pozitivní a oxidasa negativní. Nejsou patogenní.

Vyskytují se na květech, ovoci, v nápojích, škrobovém sirupu, v půdě a ve vodě. Mají výraznou schopnost oxidovat ethanol na kyselinu octovou (výroba octa). Působí octovatění piva, vína, a vyskytují se jako nežádoucí kontaminace při výrobě droždí, mohou také kazit fermentované masné výrobky. Některé druhy se používají na oxidaci organických sloučenin (sorbitol na sorbosu při výrobě vitamínu C).

Nejvýznamnějším druhem je *Acetobacter aceti*. *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* se využívá k výrobě octa, oxiduje i řadu cukrů (glukosa, manosa, galaktosa, atd.) na příslušné kyseliny s karboxylovou skupinou na prvním uhlíku. *A. aceti* subsp. *xylinum* vytváří silný kožovitý povlak na napadených kapalinách (pivo, víno). *Acetobacter orleanensis* využívá se při výrobě vinného octa (pomalá neboli francouzská metoda). Na povrchu tekutých živných půd tvoří jemný povlak (křís). Dalším druhem je pak např. *Acetobacter pasteurianus*.

2.2.3 *Gluconobacter* (řád *Rhodospirillales*, čeleď *Acetobacteraceae*)

Jsou to G-, striktně aerobní tyčinky, elipsoidní až tyčinkovité o velikosti 0,5 - 1,0 x 2,6 - 4,2 μm, bez bičíků nebo se svazkem bičíků (3 – 8) na pólu buňky, opt. teplota 25 - 30 °C, pH 5,5 - 6,0. Oxiduje ethanol na kyselinu octovou (kyselinu octovou tvoří při pH 4,0 - 4,5).

Na rozdíl od rodu *Acetobacter* upřednostňuje substráty obohacené cukrem. Vyskytuje se na ovoci, v nápojích, květním nektaru, na včelách. Může kontaminovat a kazit pivo, víno, droždí, ovoce. Lze ho využít k výrobě octa. Nejvýznamnějším zástupcem tohoto rodu je *Gluconobacter oxydans*.

2.2.4 Další významné rody

Do této skupiny patří celá řada rodů bakterií, jejichž zástupci jsou významnými patogeny zvířat a člověka, jiní se podílí na kažení potravin nebo mají význam v zemědělství jako fixátoři dusíku. *Flavobacterium* jsou G-, nepohyblivé tyčinky, 0,5 - 1 x 1 - 3 μm, mezofilní (některé druhy psychrofilní) optimální pH 7,0 - 7,5. Většina druhů tvoří žluté až oranžové kolonie. Vyskytují se ve vodě, půdě, potravinách. Kazí maso, ryby, mléko a zeleninu. *Azotobacter* jsou tyčinky, někdy koky až nepravidelného tvaru 1,5 - 2 μm velké, často se slizovým pouzdrem, rostou v rozmezí pH 4,8 - 8,5. Opt. pH pro fixaci vzdušného dusíku je 7-7,5. Vyskytují se v půdě, vodě, listí apod. Jsou to nesymbiotičtí fixátoři vzdušného dusíku. Zástupcem je např. *Azotobacter chroococcum*. *Rhizobium* jsou tyčinky 0,5 - 0,9 x 1,2 - 3 μm, optimální teplota 20 – 30 °C, pH 6 - 7. Jsou to půdní bakterie, které žijí v symbióze s

bobovitými rostlinami, fixují vzdušný dusík. Jsou také označovány jako hlízkové bakterie podle útvarů, ve kterých se nalézají na kořenech rostlin. Zástupci tohoto rodu jdou např. *Rhizobium trifolii*, *R. phaseolii*. **Brucella** jsou G-, striktně aerobní, nepohyblivé koky, kokobacily až tyčinky, 0,5 - 0,7 x 0,6 - 1,5 μm, opt. teplota 37 °C (rozmezí 20 – 40 °C), pH 6,6 - 7,4, devitalizace 59 – 60 °C. Vyskytuje se v syrovém mléce, krvi, moči infikovaných zvířat. Patogen *Brucella abortus* – způsobuje nakažlivé zmetání (potraty u hospodářských zvířat), u člověka dlouhodobé nepravidelné horečky. **Moraxella** (např. *Moraxella lacunata*) tyčinky tvoří podrod *Moraxella*, koky podrod *Branhamella*, kazí maso, ryby, některé druhy jsou patogeny člověka. **Shewanella** (dříve *Alteromonas putrefaciens* nyní *Shewanella putrefaciens*, ještě dříve *Pseudomonas putrefaciens*) působí kažení bílkovinných potravin, masa, mléka, ryb, vajec, způsobují rovněž rybí pachut'. **Acinetobacter** vyskytuje se v půdě a ve vodě, může kazit maso, vejce, ryby, způsobuje proteolýzu a lipolýzu (*Acinetobacter calcoaceticus*). **Xanthomonas** (*Xanthomonas campestris*) využívá se na výrobu polysacharidů – xanthanu. **Halomonas** snáší vysoké koncentrace NaCl (opt. 20 – 26 %) způsobuje rozklad solených potravin a tvoří červené skvrny na mase. **Francisella** (*Francisella tularensis*) patogen, způsobuje onemocnění tularemii – onemocnění přenosné i na člověka. **Legionella** (*Legionella pneumophila*) jsou tyčinky 0,2 - 0,9 x 2 - 20 μm, patogen člověka, který způsobuje onemocnění dýchacích cest až zápal plic, průjemy, zvracení, vyskytuje se v teplé vodě (např. na sprchování).

2.3 G- fakultativně anaerobní tyčinky

Tato skupina zahrnuje čeledi *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Pasteurellaceae* a další rody. Čeleď *Enterobacteriaceae* je významná z hygienického hlediska, jsou to nesporulující tyčinky, peritrichní nebo bez bičíků, chemoorganotrofní s respiračním i kvasným metabolismem. Tato čeleď zahrnuje jak nepatogenní druhy, tak i významné patogeny.

2.3.1 *Escherichia* (řád *Enterobacteriales*, čeleď *Enterobacteriaceae*)

Nejvýznamnějším zástupcem tohoto rodu je *Escherichia coli*. *E. coli* jsou G-, nesporulující tyčinky 1,1-1,5 x 2-6 μm velké, nacházející se ve střevě lidí a zvířat, komenzální kmeny indikují fekální znečištění, rostou v rozmezí 7 - 46 °C, pH 4,4 - 9,0, aw > 0,96, nesnáší 8,5 % NaCl, v mletém hovězím mase přežívá při -20 °C dlouhou dobu (9 měsíců). Zkvašuje cukry (glukosu, laktosu atd.) za intenzivní tvorby kyselin (mléčná, pyrohroznová, octová, mravenčí) a plynu.

E. coli je **indikátorem fekálního znečištění**, především vody, a **špatné nebo nedostatečné hygieny a sanitace**. Je však také **jedním z nejprozkoumanějších mikroorganismů**. Je využívána jako modelový mikroorganismus pro biochemické, genetické a fyziologické studie. Byla u ní jako u první pozorována a prostudována konjugace (spájení) a výměna genetického materiálu.

Patogenita a patogeneze: *E. coli* je běžnou součástí střevní mikroflóry zdravých lidí. Je komenzálem, částečně saprofytem a také symbiontem, neboť svým působením jednak znemožňuje průnik patogenů (produkuje tzv. koliciny, které jsou pro některé jiné bakterie toxické), jednak je makroorganismu prospěšná i přímo – podílí se na tvorbě některých vitaminů, především K. *E. coli* kmen **Nissle 1917** je využíván jako **probiotikum**. Jde ale o podmíněně patogenního mikroba, který může způsobovat i chorobné stavy. Ve střevě je to možné jen tehdy, když je kmen vybaven specifickými faktory virulence; mimo střevo je *E. coli* téměř vždy patogenní. Může způsobovat celou řadu onemocnění i mimo střevní trakt, v intestinálním traktu způsobuje infekce provázené průjmy.

Intraintestinální kmeny *E. coli* jsou následující:

EPEC (enteropatogenní, dyspeptická *E. coli*) způsobují kojenecké průjmy (novorozenecké průjmy). V patogenezi se uplatňuje adheze na střevní sliznici. Jsou to diarhogenní (průjmové) *E. coli*, jejichž patogenní mechanismus ale prokazatelně nesouvisel buď s enterotoxiny, nebo *Shigella*-like invazivitou.

STEC (VTEC, **EHEC**) jsou nejzávažnější, dnes se propaguje název STEC – shiga-like toxigenní *E. coli*, neboť struktura toxinu i průběh infekce jsou velmi podobné situaci u některých kmenů shigel. Dříve byly tyto kmeny nazývány verotoxigenní (VTEC). Pojem EHEC souvisí s jednou jejich vlastností – vyvolávají krvácení ve střevě (enterohemorhagické *E. coli*). v každém případě těžké průjmy s hemoragií bývají jen počátkem jen počátkem infekce. Zpravidla dojde k systemizaci infekce a vzniku hemolyticko-uremického syndromu. Tím se tato skupina poněkud vymyká definici „střevního působení“. Nejběžnějším sérotypem, patřícím mezi STEC, je O157:H7, avšak sérotypů vyvolávajících tyto příznaky je více. Zdrojem infekce je hovězí dobytek, vehikulem je většinou maso. Riziko zvyšuje nízká infekční dávka – udává se, že k vyvolání infekce stačí deset bakterií. Problematická je i léčba – antibiotická terapie vede k uvolnění toxinů z bakterie, takže její použití nelze doporučit.

Kmeny EHEC jsou pro zdravotní nezávadnost mléka a mléčných výrobků ze všech EEC nejrizikovější, protože jejich přirozený rezervoár je hovězí dobytek. Ačkoli hovězí dobytek je myšlen jako hlavním zdrojem STEC v potravinovém řetězci, STEC byly také izolovány z ostatních domácích a volně žijících zvířat, jako jsou ovce, kozy, jeleni, psi, koně, prasata a

kočky. Virulenční faktory EHEC jsou verotoxiny VT-1 a VT-2 (označované také SLT Shiga-like toxins). VT-1 je intracelulární toxin, imunologicky nerozlišený od shigelového verotoxinu. VT-2 se vylučuje do prostředí, není neutralizovatelný antisérem proti shigelovému toxinu. Některé kmeny EEC při kultivaci v tekutých médiích nebo v mléce vylučují toxiny do prostředí a mohou tedy kromě infekcí způsobovat i alimentární intoxikace.

ETEC (enterotoxigenní *E. coli*) produkují dva typy enterotoxinů termostabilní (ST) a LT (termolabilní). Jsou nejčastější příčinou dětských průjmů v rozvojových zemích a „cestovatelských průjmů“.

EIEC (enteroinvazivní *E. coli*) kmeny *E. coli* působící nekrvavé průjmy a průjmy podobné dysenterii způsobené *Shigella* spp. napadením a pomnožením v epiteliálních buňkách tlustého střeva. Virulenční faktory jsou shigelové verotoxiny SLT I a SLT II.

AEC (difusně adherentní *E. coli*) kmeny, které bývají spojovány s průjmy především u malých dětí, které jsou starší než kojenci. Relativní riziko roste s věkem od 1 do 5 roků. Základ (důvod) s tímto věkem souvisejících infekcí není znám. Typické příznaky infekce jsou mírné průjmy bez krve nebo leukocytů ve stolici.

EAEc (EAggEC) enteroagregativní *E. coli*, byly zjištěny především u dětí jako patogeny působící vodnaté, často přetrvávající průjmy. Váží se na enterocyty tenkého střeva a spojují se obvykle dohromady, aby vytvořily agregáty. Škodí tím, že tvoří zvláštní toxin (EAST I), který je podobný tepelně stabilnímu enterotoxinu ETEC.

Epidemiologie - mikrob se přenáší fekálně orálně; je přitom jasné, že řada mimostřevních infekcí je endogenního původu. Vzhledem k tomu, že je *E. coli* poměrně odolná, je možný i přenos kontaktem. Vyskytuje se poměrně běžně v potravinách. Minimální infekční dávky se odhadují pro EPEC $10^6 - 10^{10}$, ETEC $10^8 - 10^{10}$, EIEC $10^6 - 10^8$, EHEC $10^2 - 10^3$ buněk. Literatura uvádí, že k vyvolání infekce kmeny STEC (EHEC - O157:H7) stačí deset bakterií. **Prevence** spočívá v důsledném dodržování hygieny při výrobě, zpracování, úpravě potravin a jejich distribuci, v dodržování osobní hygieny a uchováváním rizikových potravinových surovin a potravin při nízké teplotě (pod 5 °C).

2.3.2 *Salmonella* (řád *Enterobacteriales*, čeleď *Enterobacteriaceae*)

Salmonella spp. jsou 0,7 - 1,5 x 2 - 5 μm, G-, fakultativně anaerobní tyčinky. Optimální teplota 37 °C, nepřežívá 60 °C 20 min, inhibičně působí pH pod 4,0 a nad 8,0. Salmonely jsou poměrně odolné vůči vysychání. Za hraniční aktivitu vody, umožňující růst *Salmonella* spp., se považuje u médií s neutrálním pH hodnota 0,94. S poklesem pH k růstovému minimu se minimální aktivita vody nutná pro růst zvyšuje. Při aktivitě vody nižší než 0,93 se bakterie

sice nemnoží, ale dobře přežívá. Růst salmonel je obecně inhibován koncentrací NaCl 3 – 4 %, třebaže tolerance k soli stoupá se stoupající teplotou v rozmezí 10 – 30 °C.

V současné době jsou platná pouze dvě druhová jména, *S. bongori* a *S. enterica* se šesti poddruhy a více jak 2500 sérovary. Další dva druhy salmonel byly navrženy v posledních letech. Nomenklatura je ale stále diskutována. Pro rutinní diagnostické laboratoře bylo doporučeno a povoleno používat označení sérovarů místo druhového jména.

S. enterica subsp. enterica sv. Enteritidis je ve většině států Evropy nejčastější salmonela způsobující gastroenteritidy u člověka, často i u zvířat (v ČR přesahuje 96 % z cca desetitisíc hlášených případů salmonelóz). *S. enterica subsp. enterica sv. Typhimurium* je druhá nejčastější salmonela způsobující gastroenteritidy u člověka, často i u zvířat. *S. enterica subsp. enterica sv. Typhi* je patogenní pouze pro člověka, k přenosu dochází hlavně vodou a potravinami kontaminovanými lidskou stolicí. Je to původce břišního tyfu. *S. enterica subsp. enterica sv. Choleraesuis* je patogenní pro člověka a zvířata. Způsobuje salmonelózy s lokální manifestací, charakter onemocnění je hnisavý (v kloubech, v kostech, apod.) jindy vyvolává tyfoidní formu salmonelózy.

Salmonely způsobují enteritidy trvající 8 – 28 dní, inkubační doba je 12 h až 5 dní, nejčastěji 24 až 48 h. Charakteristické jsou průjmy s velkou frekvencí stolic, ale bez přítomnosti krve ve stolici, doprovázené abdominálními křečemi a horečkou. Někdy bývá zvracení. Většina sérovarů vyvolává pouze lokální zánětlivý proces. U malých dětí a též starších a oslabených osob hrozí salmonelová sepe, která bývá nezřídka smrtelná. Systematické infekce působí jen některé vysoce virulentní sérovary (*S. typhi*, *S. choleraesuis*, *S. dublin*). Po vniknutí infikované potraviny do střevního traktu hostitele začíná invazivní proces připoutáním salmonel ke stěně střevního epitelu a pokračuje internalizací salmonel do endozomů epiteliálních buněk. Infikované endozomy se přemístí do bazální epiteliální membrány, kde jsou salmonely uvolněny z buněk exocytózou a mohou začít další infekční cyklus. K infekci je nutná poměrně vysoká infekční dávka – uvádí se 10^5 až 10^8 bakterií podle stavu makroorganismu.

Salmonely produkují větší počet virulenčních faktorů, které jsou z části kódovány v chromozomu, z části na plasmidech různých rozměrů (30- 60 MDa). Hlavní virulenční (diarhogenní) faktor je enterotoxin, termolabilní protein, který je vylučován do cytoplazmy napadených buněk a do intestinálního prostoru, kde způsobuje uvolňování kapalin. Většina sérotypů salmonel produkuje také cytotoxin s účinky podobnými shigelovému toxinu a některé další endotoxiny, které kromě erytrocytů mohou napadat i jiná cílová místa.

Salmonelóza se téměř výhradně přenáší fekálně – orální cestou, pomocí potravy nebo pitné vody, kontaminované infikovanými fekáliemi. Jen výjimečně dochází k přímé infekci stykem s infikovaným hostitelem. **Prevence** spočívá především ve vyloučení bacilonosičů z veškerého kontaktu s potravinami, provádění důsledné kontroly, dodržováním hygieny při zpracování, distribuci a přípravě potravin, zamezení křížové kontaminace, důkladném tepelném ošetření potravin, skladování potravin v chladničkách, dodržování osobní hygieny.

2.3.3 *Enterobacter* (řád *Enterobacteriales*, čeleď *Enterobacteriaceae*)

Bakterie tohoto rodu jsou pohyblivé, peritrichní tyčinky, 0,6 - 1,0 x 1,2 - 3,0 µm, fakultativně anaerobní, opt. teplota 30 - 37 °C. Ze sacharidů tvoří plyny CO₂ a H₂. Patří mezi koliformní mikroorganismy. Jsou široce rozšířeny v prostředí, vyskytují se ve vodě, půdě, střevním traktu, na rostlinách, sekundárně např. v syrovém mléce. K významným zástupcům patří *Enterobacter aerogenes* a *Enterobacter cloacae*.

2.3.4 *Shigella* (řád *Enterobacteriales*, čeleď *Enterobacteriaceae*)

Bakterie rodu *Shigella* jsou G-, štíhlé nepohyblivé tyčinky, které mají respiratorní i fermentativní metabolismus, jsou citlivá na zevní prostředí zejména na vyschnutí a běžně užívanou desinfekci, optimální teplota růstu je 37 °C, v potravinách rostou při teplotě místnosti. Vyskytují se ve výkalech, vodě, půdě, znečištěných potravinách atd. Z významných zástupců – původců **shigelózy – bacilární úplavice** lze jmenovat *Sh. dysenteriae*, *Sh. flexneri*, *Sh. boydii*, *Sh. sonnei* (90 % shigelóz u nás). Všechny tvoří termolabilní toxiny kromě *Sh. dysenteriae*, která tvoří termostabilní a nejsilnější toxin – shigatoxin. Shigelóza je výlučně lidské onemocnění zdrojem je nemocný člověk. Přenos je fekálně-orální - onemocnění špinavých rukou, nebo alimentární – mléko, voda. Inkubační doba je 1 - 3 dny, event. 1 - 5 dní. Shigelóza je akutní, velice nakažlivé onemocnění, projevující se teplotami, bolestmi břicha, vodnatými průjmy s hlenem a krví, nebezpečí je v rychlé dehydrataci a možnosti perforace střeva.

2.3.5 *Yersinia* (řád *Enterobacteriales*, čeleď *Enterobacteriaceae*)

Yersinie jsou tyčinky 0,5 - 0,8 x 1 - 3 µm, v mladé kultuře kokoidní při 20 - 25 °C, ve starší při 37 °C pleomorfní buňky, pohyblivé i nepohyblivé. Z potravinářského hlediska je významná *Yersinia enterocolitica*. Optimální teplota růstu je 30 - 37 °C, ale snáší i chladírenské teploty, méně snáší zmrazení (-18 °C), devitalizuje jí teplota 60 °C působící několik minut, rozmezí pH optimálně 4,6 - 9. Vyskytuje se ve výkalech zvířat, vodě, odtud se

může dostat do mléka, ml. výrobků, na ryby, vyskytnout se může i ve výrobcích studené kuchyně. Způsobuje alimentární onemocnění nazývané **yersinióza**, které se projevuje bolestmi břicha, teplotami a zvracením. Významným a daleko známějším zástupcem je *Y. pestis*, původce moru.

2.3.6 *Proteus* (řád *Enterobacteriales*, čeleď *Enterobacteriaceae*)

Tyto bakterie mohou mít proměnlivý tvar buněk, obvykle 0,4 - 0,8 x 1 - 3 μm, jsou peritrichní, při 25 °C pohyblivé, vytváří kolonie s výběžky. Při 37 °C jsou nepohyblivé a tvoří malé kolonie. Místem výskytu je půda, voda, střevní trakt. Oxidativní deaminací tvoří amoniak a ketokyseliny. Podílí se na kažení bílkovinných potravin provázeném hnilobným pachem, který způsobuje především indol a H₂S. Jsou to typické hnilobné bakterie. K významným druhům patří *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*. Některé druhy mohou být patogenní (infekce močových cest).

2.3.7 *Serratia* (řád *Enterobacteriales*, čeleď *Enterobacteriaceae*)

Bakterie rodu *Serratia* jsou pohyblivé tyčinky, peritrichní, o velikosti 0,5 - 0,8 x 0,9 - 2,0 μm, optimální teplota růstu je 25 - 30 °C. Vyskytují se v půdě, na rostlinách, ve střevním traktu hmyzu. Mohou se podílet na kažení potravin. Významným zástupcem je *Serratia marcescens*, která při 12 – 36 °C produkuje červené barvivo (prodigiosin). V minulosti byla příčinou tzv. krvavých hostíí.

2.3.8 *Vibrio* (řád *Vibrionales*, čeleď *Vibrionaceae*)

Vibria tvoří zahnuté tyčinky o velikosti 0,5 - 0,8 x 1,4 - 2,6 μm, jsou pohyblivé, anaerobní, rostou podle druhu při teplotách 18 – 37 °C a pH 6 - 9. *Vibrio parahaemolyticus* způsobuje otravy potravinami eventuelně méně často infekce ran. *Vibrio alginolyticus* může být součástí láku při nakládání masa. *Vibrio cholerae* tvoří termolabilní enterotoxin cholergen. Je původcem cholery - těžkého střevního onemocnění přenášeného výkaly, znečištěnou vodou, potravinami a kontaktem.

2.4 G+ koky

Tato skupina zahrnuje aerobní, fakultativně anaerobní i anaerobní chemoorganotrofní rody, které vesměs vyžadují řadu růstových látek (vitaminy, aminokyseliny) pro svůj růst. Patří sem jak rody, jejichž zástupci se podílí na kažení potravin, tak i alimentární patogeny. Některé rody patří k bakteriím mléčného kvašení a mají pozitivní význam v potravinářském průmyslu.

2.4.1 *Micrococcus* (řád *Actinomycetales*, čeleď *Micrococcaceae*)

Mikrokoky jsou G+, striktně aerobní, nesporulující, 0,5 - 2,0 µm velké. Tvoří balíčky, tetrády až shluky, nevyskytují se v řetízcích. Mohou produkovat barviva (karotenoidy) – žluté, oranžové, jež slouží jako ochrana před UV. Optimální teplota růstu je 25 – 37 °C, rostou však i při 10 °C, nerostou při 45 °C, nesnáší kyselé prostředí, jsou halotolerantní (10 i 15 % NaCl). Vyskytují se jako běžná vzdušná kontaminace, v solených potravinách, mléce a mléčných výrobcích. Charakteristickým zástupcem je *Micrococcus luteus*, tvořící žluté kolonie.

2.4.2 *Kocuria* (řád *Actinomycetales*, čeleď *Micrococcaceae*)

Tento rod se vyštěpil z rodu *Micrococcus*, pojmenování dostal podle brněnského mikrobiologa Miloše Kocura. Zástupcem je *Kocuria rosea*, který tvoří růžovočervené kolonie.

2.4.2 *Enterococcus* (řád *Lactobacillales*, čeleď *Enterococcaceae*)

Jsou to G+ koky, někdy mírně oválné o velikosti 0,6 - 2 x 0,6 - 2,5µm, nesporulující, fakultativně anaerobní s optimální teplotou růstu 37 °C, snáší vyšší koncentraci NaCl, odolné i vůči nízké a_w , přežívají 60 °C 30 minut. Charakteristickými zástupci jsou *Enterococcus faecalis* a *E. faecium*.

Význam enterokoků v potravinářství je na první pohled protichůdný. Původní stanoviště je intestinální trakt zvířat a lidí (10^7 /g stolice). Mohou tedy sloužit jako **indikátor fekálního znečištění** nebo **špatné či nedostatečné sanitace**. Vzhledem ke svým vlastnostem mohou přežívat pasterační zákroky. Sekundárně se vyskytují v mléce a mléčných výrobcích, v potravinách s vyšším obsahem soli. Potraviny často po fermentaci obsahují velké množství enterokoků jako složky přírodního společenstva (v tomto případě je milné je považovat za indikátor fekálního znečištění), ve fermentovaných potravinách se enterokoky podílejí na tvorbě sensoricky aktivních látek (chuť a vůně výrobku). Patří mezi bakterie mléčného kvašení. Patří však také mezi závažné podmíněné patogeny, uplatňující se jako jediné agens nebo jako účastníci polymikrobiální infekce. Způsobují infekce močových a žlučových cest, pooperační infekce dutiny břišní, gynekologické záněty atd.

2.4.3 *Streptococcus* (řád *Lactobacillales*, čeleď *Streptococcaceae*)

Streptokoky jsou G+, nesporulující koky (o velikosti < 2µm) až oválné nebo vejčité buňky vyskytující se po dvojicích nebo v řetízcích. Fakultativně anaerobní. Optimální teplota je 37 °C a nižší mimo *S. salivarius ssp. thermophilus*. Homofermentativní, fermentují laktosu

na L(+)-kyselinu mléčnou, v alkalickém prostředí produkují z glukosy významné množství ethanolu, kyseliny octové a mravenčí.

Streptokoky můžeme rozdělit do tří skupin:

Pyogenní streptokoky - kam patří např. *Streptococcus pyogenes* mající primární afinitu k lidskému organismu. Způsobuje anginy, spálu, zápalý horních cest dýchacích, nebo *Streptococcus agalactiae* původce mastitid či nebezpečných infekcí novorozenců.

Orální streptokoky - vyskytující se v ústní dutině a horních cestách dýchacích lidí a zvířat. Patří sem např. *Streptococcus mutans* a *Streptococcus anginosus*, jež mohou působit bakterémie a endokarditidy. *S. mutans* se podílí na vzniku zubního kazu tím, že spoluvytváří plak a poškozují sklovinu kyselými metabolity.

Ostatní streptokoky - do této skupiny patří v podstatě jediný potravinářsky významný streptokokus *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* (*S. thermophilus*). Buňky jsou 0,7 - 0,9 µm velké, ovoidní, G+. Fermentuje glukosu, laktosu, manosu a fruktosu, některé kmeny i sacharosu. Opt. teplota růstu je 40 - 45 °C, min. 21 - 19 °C, max. 52 °C, roste dobře i při 37 °C, některé kmeny přežívají 60 °C 30 minut. Vyskytuje se v mléce a ml. výrobcích přirozeně i jako složka čistých mlékařských kultur (ČMK) používaných k výrobě jogurtů, tvarohů, sýrů. Může se vyskytovat jako nežádoucí kontaminace výměníků tepla pasterů a odparek na mléko. Divoké kmeny působí chyby při zrání sýrů.

2.4.4 Lactococcus (řád Lactobacillales, čeleď Streptococcaceae)

Tento rod se vyštěpil z rodu *Streptococcus*. Jsou to G+, fakultativně anaerobní, ovoidní buňky 0,5 - 1,2 x 0,5 - 1,5 µm velké, vyskytující se v párech nebo v řetízcích, optimální teplota růstu je 30 °C. Jsou to homofermentativní bakterie mléčného kvašení. Jsou součástí čistých mlékařských kultur (ČMK) při výrobě smetany, kysaného mléka, tvarohů a sýrů. Nejvýznamnějším zástupcem je rod *Lactococcus lactis* s několika poddruhy. *L. lactis* ssp. *lactis* o velikosti 0,5 - 1µm, opt. teplota 30 °C, některé kmeny tvoří bakteriocin **nisin**. *L. lactis* ssp. *lactis biovar diacetylactis* je významný tvorbou diacetylu, jenž se významně podílí na typickém aroma kysaných mléčných výrobků. Za přítomnosti fruktosy vytváří hlavně CO₂ a kyselinu octovou, štěpí kyselinu citronovou, přičemž se ve značné míře tvoří acetoin, z něj se oxidací vzdušným kyslíkem tvoří diacetyl. *L. lactis* ssp. *cremoris* tvoří větší buňky a delší řetězky, fermentuje glukosu a laktosu zřídka maltosu a sacharosu.

2.4.5 *Leuconostoc* (řád *Lactobacillales*, čeleď *Leuconostocaceae*)

Leukonostoky jsou heterofermentativní G⁺ koky o velikosti 0,5 - 0,7 x 0,7 - 1,5 μm, jsou nesporulující, fakultativně anaerobní, vyskytují se v párech a v řetězcích, optimální teplota růstu je 20 – 30 °C. Využívají se v mlékárenském průmyslu, jsou přítomny např. i v kysaném zelí, jsou významnou složkou mikroflóry masa a masných výrobků. *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* tvoří dextranový sliz, ve slizech snáší záhřev až 80 - 85 °C, může působit problémy v cukrovarnickém průmyslu, působí také např. rosolovatění slazených vod. *L. mesenteroides* ssp. *cremoris* je využíván jako složka ČMK (smetanové kultury) pro tvorbu diacetylu (aroma), ze sacharosy netvoří sliz. *L. mesenteroides* ssp. *dextranicum* se využívá k výrobě dextransu, je složkou smetanové kultury. Dalším druhem je například *L. lactis*.

2.4.6 *Oenococcus* (řád *Lactobacillales*, čeleď *Leuconostocaceae*)

Jsou to G⁺ elipsoidní až kokovité bakterie, vyskytující se po dvou nebo v řetězcích, jsou nepohyblivé, nesporulující, fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní, katalasa a oxidasa negativní, neproteolytické, acidofilní. Rostou při pH 3,5 - 4,8 a v přítomnosti 10 % ethanolu. Optimální teplota růstu je 22 °C (20 - 30 °C). Jsou pomalu rostoucí, vyžadují bohatá média s růstovými faktory a aminokyselinami. Glukosu fermentují na kyselinu D(-)-mléčnou, CO₂, ethanol nebo acetát. Mohou produkovat i extracelulární polysacharidy. Tento rod je tvořen jediným druhem *O. oeni* (dříve *Leuconostoc oenos*) nacházejícím se v hroznovém moštu a ve víně. Při výrobě vína se uplatňuje v procesu jablečno-mléčného kvašení.

2.4.7 *Pediococcus* (řád *Lactobacillales*, čeleď *Lactobacillaceae*)

Pediokoky jsou G⁺ koky 1,0 - 2,0 μm velké, vyskytující se v párech nebo tetradách, jsou homofermentativní, halotolerantní, rostou při 30 °C, optimální teplota růstu je 25 – 40 °C, jsou fakultativně anaerobní. V potravinářském průmyslu jsou složkou mlékařských kultur a startovacích kultur pro výrobu fermentovaných masných výrobků. Jedná se především o rody *P. acidilactici* a *P. pentosaceus*. *P. damnosus* (dříve *P. cerevisiae*) označovaný ve starší pivovarské literatuře též jako pivní sarcina působí kažení piva, masných výrobků a výrobků studené kuchyně. *P. halophilus*, který snáší až 15 % NaCl (opt. 6 – 8 %) se uplatňuje v Japonsku při výrobě sýra miso ze sojové mouky.

2.4.8 *Staphylococcus* (řád *Bacillales*, čeleď *Staphylococcaceae*)

Stafylokoky jsou G⁺, nesporulující, nepohyblivé, fakultativně anaerobní koky 0,5 - 1,5 μm, které mají respiratorní i fermentativní metabolismus, jsou katalasa pozitivní, halotolerantní

(i 10 % NaCl), optimální teplota růstu je 30 - 37 °C, při teplotě pod 10 °C netvoří toxin. *Staphylococcus carnosus* a *Staphylococcus xylosus* jsou využívány jako složky startovacích kultur pro výrobu fermentovaných salámů.

Staphylococcus aureus je G+, nesporeující koagulasa pozitivní kok, velmi odolný na zevní prostředí. Roste v teplotním rozmezí 7 až 48,5 °C s teplotním optimem 30 - 37 °C. Rozmezí pH pro růst je mezi 4,5 – 9,3, optimum pak 7 – 7,5. Je tolerantní k vysoké hladině soli (může růst v prostředí se 7 – 10 %, některé kmeny až 20 % soli), k nízké a_w (je schopen růst za ideálních podmínek i při a_w až 0,83, obecně uznávanou minimální hodnotou a_w v potravinách je a_w 0,86) a je rezistentní k dusičnanům. Tepelná odolnost velmi závisí na druhu potraviny, ve které je organismus zahříván. Ve většině případů je však organismus tepelně senzitivní a bude zničen pasterací. V mléce, je D-hodnota při 60 °C 1 - 6 minut, se Z-hodnotou 7 - 9 °C.

S. aureus produkuje mnoho enzymů a toxinů. *S. aureus* je oportunistický patogen, který způsobuje zánětlivá onemocnění u lidí i zvířat. Pro hygienu potravinářské výroby jsou důležité dva typy těchto zánětlivých onemocnění: mastitidy dojníc a hnisavé záněty drobných poranění na lidských rukách. *S. aureus* produkuje termostabilní enterotoxin (snese 20 minutový var), který způsobuje stafylokokovou enterotoxikózu (alimentární otrava). Aby došlo k alimentárnímu onemocnění, musí být *S. aureus* přítomen v množství, které vyprodukuje dostatečné množství enterotoxinu. K projevům stafylokokové otravy jídlem může dojít, pokud jsou přijaty potraviny obsahující přibližně 10^5 až 10^8 buněk v gramu nebo mililitru nebo 100 ng enterotoxinu nebo jak uvádí jiné literární zdroje po dávce asi 0,4 µg/kg tělesné hmotnosti.

Rezervoárem bývá často člověk s hnisavými kožními ložisky, nebo ložisky v nosohltanu. Může to být ale také skot resp. dojnice s mastitidou (zánětem mléčné žlázy). Pak může dojít ke kontaminaci syrového mléka. **Přenos** se děje alimentárně, rizikové jsou smetanové omáčky, uzeniny, sekaná, cukrářské výrobky atd. **Příznaky** jsou: náhlý počátek do 1- 6 h, výrazná nauzea, křeče, zvracení, průjem, teplota. Onemocnění má dramatický průběh a rychle odeznívá (24 – 48 h), většinou během jednoho dne. **Prevence** spočívá v omezení ručního zpracování na minimum, ve školení pracovníků, v udržování potraviny v předepsaných teplotách (nad 60 °C nebo pod 4 °C), ve vyloučení nemocných lidí z pracovního procesu.

2.5 Sporotvorné tyčinky a koky

Do této skupiny patří rody tvořící v buňce jednu sporu, která je odolná k vysokým teplotám, jedům, záření a jiným nepříznivým podmínkám.

2.5.1 *Bacillus* (řád *Bacillales*, čeleď *Bacillaceae*)

Jsou to aerobní nebo fakultativně anaerobní G⁺, peritrichní tyčinky o velikosti 0,5 - 2,5 x 1,2 - 10 μm. Jde o velmi rozšířený rod s bohatým enzymovým vybavením. Velmi aktivní jsou zvláště amylytické, pektolytické a proteolytické enzymy. Řada druhů tohoto rodu produkuje antibiotika, jiné druhy tvoří slizovitá pouzdra polysacharidové povahy (levany, dextransy) a způsobují nežádoucí nitkovitost pečiva.

Podle nároků na teplotu můžeme tento rod rozdělit na 3 skupiny: psychrotolerantní (rostou při 0 °C ne při 30 °C) *Bacillus insolitus*, mezofilní *Bacillus cereus*, *B. megatherium*, *B. thuringiensis* a termofilní *B. stearothermophilus* (dnes *Geobacillus stearothermophilus*), *B. coagulans*. Ovšem i některé kmeny mezofilních bacilů jak je tomu např. u *B. cereus* mohou být psychrotrofní.

Mezi významné zástupce rodu *Bacillus* patří *Bacillus subtilis* je všudypřítomný, peritrichní o velikosti 0,7 x 2-3 μm. Produkuje polypeptidová antibiotika, je původcem nitkovitosti pečiva. *Bacillus macerans* disponuje silnými pektolytickými enzymy a proto má význam při máčení lnu. Významným patogenem je *Bacillus anthracis* způsobující sněž slezinnou – antrax. *Bacillus stearothermophilus* (dnes *Geobacillus stearothermophilus*) je schopen růst za nepřístupu kyslíku, bývá příčinou plynuprostého kysnutí nekyselých konzerv, tvoří velké množství kyselin. Roste při pH 4,8 a teplotách 55 - 65 °C (min. 44 - 45 °C), některé kmeny i při 75 °C. Snížení teploty jej devitalizuje, účinnou ochranou je zchlazování konzerv ihned po sterilaci. *Bacillus coagulans* má opt. teplotu růstu při 45 – 55 °C (min. 15 - 25 °C), pH 4,0 - 5,0. Způsobuje rovněž plynuprosté kysnutí nekyselých konzerv. *Bacillus polymyxa* se využívá ke kvasné výrobě 2,3-butandiolu. *Bacillus thuringiensis* je využíván k výrobě mikrobiálního pesticidu (bacitracin), produkuje čtyři různé toxiny bílkovinné povahy účinné proti hmyzu. (Toxiny se tvoří ve stádiu sporulace jako tzv. parasporové tělíčko vedle spory). Genetická informace kódující tvorbu těchto toxinů byla vložena do genomu kukuřice, čímž byl vytvořen geneticky modifikovaný organismus - BT kukuřice.

Bacillus cereus je z potravinářského hlediska nejvýznamnějším druhem. Jsou to aerobní až fakultativně anaerobní G⁺, sporulující tyčinky, 1 x 3 - 10 μm velké. Roste při 10 - 48 °C, opt. 28 - 35 °C, produkuje řadu toxinů a enzymů: např. fosfolipasu C, hemolysiny, cereolysin. Způsobuje enterotoxikózy, nebezpečné infekce oka aj.

Rezervoárem této bakterie je půda, prach, vzduch, je to všudypřítomný (ubikvitární) mikroorganismus. **Přenos** se děje požitím kontaminované potraviny, která byla nevhodně skladovaná, často to je rýže, těstoviny, zelenina, mléko, masné výrobky atd. Za vznik enterotoxikóz jsou zodpovědné enterotoxiny: průjmový a emetický toxin. K otravám dochází při pomnožení v potravíně na $10^7/g$ (u dětí $10^5/g$).

Otravy se projevují ve dvou formách: **Syndrom průjmu** (termolabilní toxin, citlivý na proteolytické enzymy) s inkubací 8 – 16 h, s bolestí břicha a vodnatými průjmy, trvání 6 – 24 h. Rizikovými potravinami jsou hlavně masné výrobky a omáčky. **Syndrom zvracení** (emetický toxin – termostabilní snáší 126 °C 90 min., odolný vůči proteolytickým enzymům a nízkému pH) s krátkou inkubací 1 – 5 h, s nauseou a zvracením obvykle bez průjmu, trvání i déle jak 24 h. Rizikové potraviny jsou hlavně škrobnaté potraviny jako rýže či těstoviny. **Prevence** spočívá především v důsledném dodržování hygieny, správném skladování potravin, správné sanitaci. Léčba je symptomatická.

2.5.2 *Clostridium* (řád *Clostridiales*, čeleď *Clostridiaceae*)

Tento rod je rozsáhlý a zahrnuje velmi významné druhy. Jsou to peritrichní většinou G⁺ tyčinky, o velikosti 0,3 - 2,0 x 1,5 - 20,0 μm, obligátně anaerobní, Kyslík inhibuje jejich růst a po 5 – 10 minutách usmrcuje vegetativní buňky většiny druhů. Některé druhy se ale pomalu množí i za přítomnosti O₂. Některé druhy mají silné proteolytické enzymy (*C. sporogenes* – anaerobní rozklad bílkovin), jiné sacharolytické (některá klostridia štěpí i celulosu). Při anaerobní oxidaci tvoří velké množství plynu (CO₂ a H₂) a způsobují například pozdní duření sýrů či bombáže konzerv. Klostridia při fermentaci produkují nepříjemně páchnoucí kyselinu máselnou a znehodnocují tak potraviny a krmiva (viz 1. Díl). Z významných zástupců tohoto rodu lze jmenovat *Clostridium acetobutylicum*, které se využívá ke kvasné výrobě kyseliny máselné, butanolu a acetonu. Obdobně se využívá také *C. butyricum*, v sýraštví je však příčinou pozdního duření sýrů. *C. tetani* je patogen vyskytující se v půdě, prachu apod., v hlubokých ranách, které může infikovat, dochází k produkci neurotoxinu. Onemocnění se nazývá tetanus a není-li léčeno, je 100 % úmrtnost. *C. thermosaccharolyticum* jeho optimální teplota růstu je 55 - 62 °C, vytváří velmi termorezistentní spory. Je příčinou bombáží konzerv, ale pouze při skladování v teple (nad 30 °C), pod 30 °C se nemnoží.

C. perfringens je nepohyblivá, G⁺, anaerobní ale značně aerotolerantní (snáší až 5 % kyslíku) tyčinka o rozměrech 0,2 – 1,9 x 2 – 10 μm. Roste v rozmezí teplot 15 – 50 °C s optimem 43 – 45 °C. V optimálních podmínkách může mít velice krátkou generační dobu (7-12 min.). Je to významný patogen kromě enterotoxikózy způsobuje i jiná vážná i smrtelná

onemocnění. Známe 5 typů A – E těchto klostridií v závislosti na přítomnosti produkovaných toxinů. Alimentární enterotoxikózu způsobuje převážně typ A. *Cl. perfringens* je ubikvitární bakterie vyskytující se v půdě, ve vodě ve střevním traktu zvířat a člověka. Ke kontaminaci potravin dochází kontaminovanou vodou nebo fekáliemi. Lze ho izolovat ze syrového i vařeného masa, syrového mléka, omáček, zeleniny, atd. Pokud není uvařená potravina (maso) rychle vychlazená a uchovávána v chladu může dojít k rychlému pomnožení. K vyvolání toxoinfekce stačí přijmout v potravě dávku bakterií $10^6/g$. Ve střevním traktu se bakterie ještě pomnoží a začínají sporulovat a produkovat enterotoxin. Toxin zvyšuje permeabilitu kapilár, zamezuje transportu tekutin a iontů přes membránu enterocytů, což způsobuje nahromadění tekutin ve střevních kličkách a průjem s bolestivými křečemi v žaludku, většinou bez zvracení. Inkubační doba je krátká 8 - 24 h, onemocnění má bouřlivý průběh a zpravidla odezní za 24 –36 h. K zabránění vzniku onemocnění je nutné potraviny resp. hotové pokrmy uchovávat při teplotě 4 °C nebo 60 °C. Před podáváním se pak pokrm musí důkladně prohřát (toxin je tepelně labilní).

C. botulinum je G+, anaerobní, sporulující tyčinka, o velikosti 0,5 – 2,4 x 1,7 - 22 μm, která se vyskytuje ve střevním traktu zvířat, především vepřů a lidí. Opt. teplota růstu je 30 - 40 °C, inhibice pH pod 4,5 nebo nad 8,5 a 6,5 % NaCl. Proteolytické kmeny tvoří poměrně termorezistentní spory a tolerují nízkou a_w (0,94), kazí potraviny (produkují páchnoucí plyny H₂S, amoniak aj.). Neproteolytické kmeny jsou citlivější vůči vyšším teplotám a nižší a_w , ale mohou růst a tvořit toxin i za nižších teplot (i pod 10 °C).

Stolicí se dostává do půdy. Za anaerobních podmínek a v nižším pH produkuje neurotoxin. Botulotoxin je termolabilní bílkovina, ničí se několikaminutovým varem. Spory *Cl. botulinum* jsou ničeny při 121 °C za 3 minut. Známe několik typů toxinů A – G. Intoxikace u lidí způsobují typy A, B, E a F, Evropě nejčastěji B (převážně masné výrobky), A USA a Čína (ovoce a zelenina), E hlavně ryby a vodní živočichové. **Rezervoárem** je půda, voda, střevo zvířat včetně ryb. **Přenos** se děje alimentárně, potravinami obsahujícími *C. botulinum*, konzumovanými za studena bez povaření – zvláště domácí výroby (klobásy, šunka, konzervy i zeleninové a ovocné). **Inkubace:** za 12 - 36 hodin až několik dní po požití potravy s botulotoxinem. **Příznaky:** postižení nervového systému, dvojité vidění, obrna měkkého patra, sucho v ústech, zácpa vlivem zástavy peristaltiky střev, zástava močení, obrna dýchacích svalů. Letální dávka toxinu A při orálním příjmu je 0,1-1μg. (Votava 2006: přibližně 0,1 ng/kg živé váhy – tedy 39 g botulotoxinu na vyhubení druhu *Homo sapiens*). **Prevence:** Hygiena a správný výrobní postup, vyřazení bombážových konzerv, provaření potravin (10 -15 min.) před požitím.

2.5.3 *Desulfotomaculum* (řád *Clostridiales*, čeleď *Peptococcaceae*)

Tento rod se vyštěpil z rodu *Clostridium*. Buňky se barví gramnegativně, ale buněčná stěna je grampozitivního typu, Jsou to 0,3 - 1,5 x 3 - 9 μm velké, anaerobní, chemoorganotrofní, pohyblivé tyčinky. Využívá kyslík síranů a siřičitanů pro anaerobní oxidaci organických sloučenin a tím produkuje velké množství H₂S. V potravinářství je významný druh ***D. nigrificans***, který je termofilní roste v rozmezí teplot 45 – 70 °C, optimální teplota je 55 °C, spory jsou silně termorezistentní, přežívají i v nekyselých konzervách sterilovaných teplem. Klíčení spor a množení vegetativních buněk probíhá velmi pomalu i při 30 – 37 °C. Je příčinou černání konzerv v důsledku tvorby siřičků (především siřičků železa), bombáže většinou netvoří.

2.6 Pravidelné nesporulující G+ tyčinky

Tato skupina zahrnuje asi 8 rodů, z nichž některé jsou mikroaerofilní a energii získávají mléčným kvašením, zbývající jsou bez kvasných schopností. Tvoří poměrně dlouhé tyčinky a vesměs vyžadují na živiny bohatá média. Z významných zástupců je to především rod *Lactobacillus* reprezentující bakterie mléčného kvašení a rod *Listeria* zahrnující významné patogeny.

2.6.1 *Lactobacillus* (řád *Lactobacillales*, čeleď *Lactobacillaceae*)

Laktobacily jsou fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní, nepohyblivé tyčinkovité bakterie. G+, o velikosti 0,5 - 1,2 x 1 - 10 μm, nesporulující. Hlavním metabolitem je kyselina mléčná, ale některé druhy mohou produkovat i kyselinu octovou, ethanol a CO₂. Všeobecně jsou acidotolerantní až acidofilní, pH snižují až pod 4,0, tím působí inhibičně až mikrobicidně (zvláště málo disociované kyseliny mléčná a octová). Z hlediska produkce hlavních metabolitů při mléčném kvašení můžeme laktobacily rozdělit do tří skupin viz tab. 1 až 3.

Tab. 1: Skupina I obligátně homofermentativní (Görner, Valík 2004) upraveno

Druh, subsp.	Prostředí, ve kterém se převážně vyskytuje a jiné charakteristiky
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	Rostlinný materiál fermentovaný při vyšších teplotách (40 - 53 °C)
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Jogurt a sýry
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Kyselé mléko, sýry, lisované kvasnice, obilní zápary
<i>L. helveticus</i>	Ementálská kultura, tvrdé sýry (ementálský typ), kyselé mléko, maximum při 50 - 52 °C
<i>L. acidophilus</i>	Intestinální trakt lidí a zvířat, ústní dutina lidí
<i>L. farciminis</i>	Masné výrobky (tepelně neošetřené), pekárenský kvas, snáší 10 - 12 % NaCl
<i>L. salivarius</i>	Ústní dutina a intestinální trakt lidí a zvířat

Tab. 2: Skupina II fakultativně heterofermentativní (Görner, Valík 2004) upraveno

Druh, subsp.	Prostředí, ve kterém se převážně vyskytuje a jiné charakteristiky
<i>L. bavaricus</i> (<i>L. sakei</i>)	Kysané zelí, růst mezi 2 - 37 °C
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	Mléko, sýry, ml. výrobky, pekařský kvásek, kravský hnůj, siláž, intestinální trakt a ústní dutina lidí
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	Dtto
<i>L. curvatus</i>	Mléko, masné výrobky, kysané zelí, kravský hnůj, pekařský kvásek
<i>L. plantarum</i>	Mléčné výrobky, siláž, kysané zelí a jiná zelenina, pekařský kvásek, intestinální trakt a ústní dutina lidí, kravský hnůj
<i>L. sakei</i> (<i>L. bavaricus</i>)	Kysané zelí a jiné ferm. rostlinné produkty, masné výrobky, pekařský kvásek, původně izolován z kvasnic na výrobu japonského saké, roste i při 2 - 4 °C

Tab. 3: Skupina III obligátně heterofermentativní (Görner, Valík 2004) upraveno

Druh, subsp.	Prostředí, ve kterém se převážně vyskytuje a jiné charakteristiky
<i>L. brevis</i>	Mléko, sýry, kysané zelí, pek. kvas, intestinální trakt a ústní dutina lidí
<i>L. buchneri</i>	Mléko, sýry, fermentovaný rostlinný materiál, ústní dutina lidí
<i>L. fermentum</i>	Kvasnice, mléčné výrobky, pekařský kvásek, fermentovaný rostlinný materiál, kravský hnůj, intestinální trakt a ústní dutina lidí
<i>L. kefir</i>	Kefírová zrna a kefir
<i>L. reuteri</i>	Masné výrobky, lidské a zvířecí fekálie

2.6.2 *Listeria* (řád *Bacillales*, čeleď *Listeriaceae*)

Listerie jsou pravidelné krátké tyčinky 0,4 - 0,5 x 0,5 - 2,0 μm velké, G+, nesporulující, optimální teplota růstu je 30 - 37 °C, jsou pohyblivé, peritrichní, mají fermentativní metabolismus, jsou fakultativně anaerobní. Nejvýznamnější a nejobávanější je patogenní *Listeria monocytogenes*. Jsou to G+ tyčinky, fakultativně anaerobní až aerobní, nesporulující, rostoucí v teplotním rozmezí při 5 - 45 °C a snášejí i 0 °C, snášejí také vyšší obsah NaCl – 10 % (20 %) v prostředí, pH 5 - 10, devitalizuje ji teplota 58 - 59 °C 10 min, uzavřená v buňkách je ale rezistentnější, běžné pasterační teploty mléka by ji měly likvidovat. **Rezervoárem** je člověk, domácí i divocí savci, přežívá v půdě, píci, vodě. **Přenos** se děje potravou – mléko, sýry, zelenina, před konzumací tepelně neošetřené potraviny např. paštika, může docházet k neonatální infekci – přenos z matky na plod. **MID** je poměrně nízká 10²/g. **Inkubační doba** může být i velmi dlouhá, pohybuje se v rozmezí 3 - 70 dní (nejčastěji 3 týdny). **Příznaky** onemocnění mohou být různé v závislosti na formě onemocnění. **Lehká forma** je provázena průjmami, zvracením, horečkou. **Těžká forma** - invazivní listerióza – má úmrtnost až 30 %, postihuje nervový systém a vnitřní orgány - encefalitida, sepse, artritida, meningitida, endokarditida, hepatitida. K závažným problémům může docházet u těhotných žen – mrtvě narozené děti, potraty, sepse a záněty mozku u novorozenců. **Prevence** spočívá v přísném dodržování hygieny, sanitace a testování potravin a prostředí v potravinářských provozech.

2.7 Nepravidelné nesporeující G+ tyčinky

Tato skupina zahrnuje fyziologicky rozdílné bakterie (aerobní i anaerobní) nepravidelného tvaru. Patří sem řada potravinářsky významných mikroorganismů i patogenů. Dříve byly označovány jako koryneformní bakterie (rod *Corynebacterium*) – tvorba krátkých rovných nebo zakřivených tyčinek, často kyjovitě rozšířených a seskupených do pravoúhlých útvarů nebo palisádovitě – seskupení vzniká posunutím buněk při buněčném dělení – též označovány jako difteroidní (podle *Corynebacterium diphtheriae*).

2.7.1 *Corynebacterium* (řád *Actinomycetales*, čeleď *Corynebacteriaceae*)

Jsou to G+, nepohyblivé tyčinky o velikosti 0,3 - 0,8 x 1,5 - 8 μm, mohou to být živočišné i lidské patogeny. Z významných zástupců lze jmenovat *Corynebacterium diphtheriae*, které způsobuje záškrt a *Corynebacterium glutamicum*, které se využívá k výrobě kyseliny glutamové nebo lysinu.

2.7.2 *Brevibacterium* (řád *Actinomycetales*, čeleď *Brevibacteriaceae*)

Jsou to aerobní, G+ tyčinky o velikosti 0,6-1,2 x 1,5-6μm, opt. teplota růstu je 20 – 25 °C, vytváří oranžové kolonie. Vyskytují se na pokožce, aerobně zrajících sýrech, rybách. *B. linens* je hlavní součástí mazových kultur používaných v sýrařství (oranžové zbarvení) k výrobě sýrů zrajících pod mazem (Romadúr, tvarůžky apod.).

2.7.3 *Bifidobacterium* (řád *Bifidobacteriales*, čeleď *Bifidobacteriaceae*)

Jsou to nepravidelné, často se větvící, G+, striktně anaerobní, nesporeující, 0,5 - 1,3 x 1,5 – 8 μm velké tyčinky, vyskytující se jednotlivě, v řetízcích nebo v hvězdicovitém, palisádovitém či nepravidelném uspořádání. Optimální teplota růstu 37 – 41 °C, teplotní rozpětí pro růst pak 25 - 45 °C, pH 6,5 - 7,0. Některé druhy tolerují O₂ v přítomnosti CO₂, a v mléce, když rostou spolu s přirozeným střevním partnerem *Lactobacillus acidophilus*. Ze 2 molů hexosy produkují 3 moly kys. octové a 2 moly kys. mléčné. Tvoří přirozenou součást střevní mikroflóry savců včetně člověka. Vyskytují se ve stolici kojenců krmených mateřským mlékem (bifidus faktor), kde mohou tvořit až 90 % střevní mikroflóry. Antagonisté nežádoucích střevních bakterií, využívají se jako probiotikum. Zamezují adhezi patogenů k buňkám střevního epitelu. Inhibují růst nežádoucích bakterií produkcí kyselin. Významná je produkce lipofilního faktoru ireverzibilně inaktivujícího bakterie, jako jsou salmonely, *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus*. Mohou také produkovat bakteriocin bifidocin, který inhibuje bakterie rodů *Bacillus*, *Enterococcus*, *Listeria* a

Pediococcus. K nejznámnějším zástupcům patří ***Bifidobacterium longum***, ***B. adolescentis***, ***B. infantis***, ***B. bifidum***.

2.7.4 *Propionibacterium* (řád *Actinomycetales*, čeleď *Propionibacteriaceae*)

Morfologicky proměnlivé (pleomorfní), někdy větvené (X, Y) tyčinky, nesporulující, G+, 0,5 - 0,8 x 1 - 5 μm velké, anaerobní až aerotolerantní, optimální teplota růstu je 30 - 32 °C, kožní 36 - 37 °C. Sacharidy fermentují za produkce kyseliny propionové, CO₂ a H₂O a menšího množství ostatních kyselin (mléčné, mravenčí...). Byly navrženy na přípravu vitamínu B₁₂, který exkretují do prostředí. ***P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii*** a ***P. freudenreichii* ssp. *schermanii*** se uplatňují při výrobě sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou (Ementál) kde svou činností vytváří typická oka v těstě a podílí se na typických sensorických vlastnostech těchto sýrů. ***P. acidipropionici*** se využívá na výrobu kyseliny propionové. ***P. jensenii*** a ***P. thoenii*** mohou kontaminovat sýry a tvořit na nich hnědočervené skvrny. ***P. acnes*** (dříve *Corynebacterium acnes*) se vyskytuje na pokožce, je původcem akné, vyskytuje se i v intestinálním traktu.

2.7.5 *Mycobacterium* (řád *Actinomycetales*, čeleď *Mycobacteriaceae*)

Jsou to G+, 0,2 - 0,7 x 1 - 10 μm velké buňky. Optimální teplota růstu 37 °C (30 - 45 °C), pH 6,4 - 6,7. V buněčné stěně mají vysoký obsah lipidů, včetně vosků, obsahujících mykologickou kyselinu o velmi dlouhých větvených řetězcích (60 - 90 uhlíků). Buňky jsou rovné nebo zakřivené tyčinky, mohou tvořit větvená vlákna až mycelium (snadno rozpadavé v tyčinky až kokovité buňky). Tvoří růžové, oranžové, žluté kolonie. **Acidorezistentní barvení** – buňky obarvené karbolfuchsinem se neodbarví kyselým ethanolem nebo kyselinami (způsobeno vosky v buněčné stěně). Jsou odolné vůči mnoha faktorům vnějšího prostředí např. k vyschnutí nebo působení kyselých látek. Množí se velmi pomalu. Mykobakteria se nachází v půdě, ve vodě, na rostlinách, u lidí i zvířat. Patří sem významné patogeny. ***Mycobacterium tuberculosis*** způsobuje tuberkulosu člověka, ***M. bovis*** způsobuje tuberkulosu skotu přenosnou i na člověka, ***M. avium*** tuberkulosu ptáků, ***M. avium* subsp. *paratuberculosis*** způsobuje paratuberkulózu skotu a dává se do souvislosti s Crohnovou nemocí u člověka, ***M. leprae*** je původcem lepry – malomocenství.

Mycobacterium bovis je G+, nepohyblivá, rovná nebo zakřivená tyčinka o velikosti 1 - 4 x 3 - 6 μm. Opt. teplota 37 °C, neroste při 25 a 45 °C. Nepřežívá krátkodobou vysokou pasteraci. U dobytka způsobuje tuberkulózu (v ČR je utlumena od roku 1968) přenosnou na člověka pitím mléka nemocných zvířat. Hlavním infekčním zdrojem pro člověka je mléko

z tuberkulózních mastitid, ve kterém se *M. bovis* vylučuje v množství až 5×10^5 KTJ/ml. V mléce se nepomnožuje, ale zůstává dosti dlouho životaschopná. Bovinní tuberkulóza se projevuje jako plicní častěji jako extrapulmonární (urogenitální, střevní, kostní, meningiální nebo kožní) pomalé progresivní horečnaté onemocnění s inkubací 1 měsíc až několik let. Bez adekvátní terapie jde o smrtelné onemocnění.

2.8 Význam bakterií v potravinářském průmyslu

2.8.1 Úlohy a význam bakterií v potravinářství

Bakterie, které se nacházejí v potravinách, můžeme podle jejich rozdělit do tří základních skupin:

- bakterie s pozitivní rolí jako výrobní prostředky při výrobě fermentovaných potravin,
- bakterie s negativním účinkem při kažení potravin (nežádoucí kvašení, hnití), přitom mohou vznikat látky ohrožující zdraví člověka,
- bakterie patogenní - potraviny a voda mohou být nosičem patogenních mikroorganismů ze zdroje nákazy na vnímavého jedince.

Mezi prvními dvěma skupinami není ostrá hranice. Bakterie se mohou vyskytovat v příslušné skupině podle vlastností a účinku v dané potravine. Zjednodušeně řečeno v jedné potravine je daná bakterie nezbytná a žádoucí a v druhé je naopak nežádoucí a může se podílet na kažení potraviny.

2.8.2 Bakterie mléčného kvašení - BMK

Tato skupina je tvořena rody grampozitivních bakterií *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*. Právě bakterie mléčného kvašení tvoří velkou přirozenou skupinu nepohyblivých, nesporelujících G+ koků a tyčinek, které fermentují sacharidy za fakultativně anaerobních (mikroaerofilních) podmínek a tvoří přitom hlavně kyselinu mléčnou. Orla-Jensen 1919 – Tato definice je ve své podstatě dosud platná.

Bakterie mléčného kvašení se vyskytují v přírodě na rostlinách, ve střevě a na sliznici zvířat a člověka a samozřejmě ve fermentovaných potravinách (ml. výrobky, masné výrobky, zelenina apod.).

Význam bakterií mléčného kvašení v potravinářském průmyslu spočívá především v tvorbě kyseliny mléčné, v produkci antimikrobiálních látek a v tvorbě látek senzorycky aktivních. Podle výsledného produktu fermentace sacharidů lze bakterie mléčného kvašení

rozdělit do dvou skupin na **homofermentativní** a **heterofermentativní**. V homofermentativní dráze jsou hexosy metabolizovány enzymy EMP dráhy za vzniku 2 molů pyruvátu a 2 molů ATP z 1 molu hexosy. Pyruvát je následně redukován na laktát laktátdehydrogenasou. Takto je více jak 90 % výchozího materiálu (glukosa) přeměněno na kyselinu mléčnou. V heterofermentativním metabolismu jsou hexosy katabolizovány fosfoketolasovou dráhou, která má za výsledek přibližně equimolární produkci laktátu (min 50 %), acetátu, ethanolu a CO₂. Pak vzniká z hexosy jen 1 mol ATP. Kyselina mléčná zejména nedisociovaná působí v kyselém prostředí na některé bakterie bakteriostaticky až baktericidně. Antagonistický efekt BMK je založen na nízkých hodnotách pH prostředí (následkem tvorby kyseliny mléčné). BMK produkují také mikrobiální inhibitory nekyselinové povahy. Ty zahrnují peroxid vodíku, CO₂, nízkomolekulární uhlíkaté inhibiční látky a bakteriociny (nisin, pediocin aj.). Svou činností tedy prodlužují údržnost potravin a významně se podílejí na jejich typických sensorických vlastnostech (chuť, vůně, vzhled).

Při výrobě potravin se BMK používají ve formě čistých mlékařských kultur, startovacích kultur, zákysů apod. Jde o směsné mnohdy vícedruhové kultury, v nichž každý mikrobiální druh nebo kmen má svou funkci a účel.

Bakterie mléčného kvašení ale mohou být na druhou stranu příčinou kažení potravin, ve kterých je jejich přítomnost nežádoucí například konzumní mléko, pivo, masné výrobky (šunka apod.) a mnohé jiné.

2.8.3 Probiotické bakterie

Termín probiotikum pochází ze dvou řeckých slov pro a bios a znamená tedy pro život. **Probiotikum se rozumí živé mikroorganismy, které aplikovány v přiměřeném množství příznivě ovlivňují zdravotní stav hostitele.** Probiotické bakterie mohou svými vlastnostmi přispívat k mikrobiální rovnováze v gastrointestinálním traktu (GIT). Působí proti patogenním mikroorganismům, podporují střevní imunitu, syntetizují některé vitaminy, produkují organické kyseliny (především kyselinu mléčnou) a bakteriociny inhibující nežádoucí mikroorganismy.

Probiotické bakterie musí být jednoznačně definovány, nesmí být patogenní, musí být schopné překonat nepříznivé prostředí v trávicím traktu (nízké pH, proteolytické enzymy, žlučové kyseliny, peristaltika střev apod.), musí být humánního původu. Musí mít rovněž schopnost efektivně osídlit střevní trakt a také musí prokázat stabilitu v průběhu skladování vzhledem ke své vitalitě.

Jako probiotické bakterie se v současnosti využívají nejčastěji speciální kmeny bakterií *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. lactis*, *Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *Enterococcus faecium*.

2.8.4 Indikátorové a indexové bakterie

Potraviny a potravinové suroviny se pro usměrnění a kontrolu zachování technologických postupů výroby, jejich trvanlivosti a zdravotní nezávadnosti musí pravidelně kontrolovat. Mikroflóra potravin a potravinových surovin se v průběhu jejich opracování a zpracování jakož i v průběhu skladování mění. V praxi není možné vyšetřovat tyto materiály na všechny nežádoucí mikroorganismy, které by přicházely v daném materiálu v úvahu. Byly proto vytipovány druhy, rody a skupiny mikroorganismů a jejich numerické limity (v hmotnostní, objemové či plošné jednotce) informující o mikrobiologickém stavu a procesech probíhajících v potravinách a potravinářských surovinách. Jde o tzv. indikátorové a indexové mikroorganismy. Musí se ve vzorcích zjišťovat lehce, rychle a lacino standardizovanými metodami.

Indexové mikroorganismy poukazují na možnost výskytu patogenních mikroorganismů (např. koliformní bakterie termofilní (fekální), *E. coli*).

Indikátorové mikroorganismy informující o primární a sekundární kontaminaci u potravin, potravinářských surovin, ploch přicházejících do styku s potravinami, zachování zásad správné laboratorní a výrobní praxe a technologických postupů jsou:

- Celkový počet mikroorganismů.
- Počet koliformních bakterií.
- Počet bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*.
- Počet enterokoků.
- Počet psychrotrofních bakterií.
- Počet termorezistentních bakterií.
- Počet termofilních bakterií.

Indikátorové mikroorganismy informující především o kažení potravin jsou:

- Počet aerobních sporulujících bakterií.
- Počet anaerobních sporulujících bakterií.
- Počet proteolytických bakterií.
- Bakterie rodu *Proteus*, celkový počet mikroorganismů, psychrofilní, koliformní mikroorganismy, *Enterobacteriaceae*.

Kromě bakterií je potřeba počítat také s mikroskopickými houbami (počet plísní a kvasinek).

2.8.5 Mikrobiální kontaminace potravin

Mikrobiální kontaminanty jsou mikroorganismy, které se do potravin dostaly neúmyslně při výrobě, zpracování, balení, přepravě nebo skladování.

Lze je členit například:

- Taxonomicky – priony (BSE), viry (žloutenka), bakterie, kvasinky, mikromycety, parazité.
- Podle významu v technologii výroby potravin – saprofytické, indikátorové, původci onemocnění z potravin.

Saprofytické mikroorganismy jsou přirozenou mikroflórou rostlin a živočichů. Pokud nejsou odstraněny při výrobě, ve finálním výrobku do jisté míry přetrvávají. Mohou se do potravin dostat i jako sekundární kontaminace. Svou aktivitou potraviny kazí a mění její vlastnosti. Jsou to mikroorganismy proteolytické, lipolytické, sacharolytické, pektolytické, dekarboxylující (dekarboxylují aminokyseliny). Při těchto procesech mohou vznikat i toxické produkty.

Indikátorové mikroorganismy jsou, jak bylo napsáno výše, účelově vytvořená skupina relativně snadno stanovitelná, jejich přítomnost a množství v potravine indikuje expozici této potraviny podmínkám, které mohly umožnit vnesení nebezpečných organismů a/nebo pomnožení patogenních a toxinogenních mikroorganismů.

- Indikace fekálního znečištění a tedy možná přítomnost salmonel, shigel, enteropatogenních *E. coli* - čeled' *Enterobacteriaceae*, koliformní bakterie, fekální koliformní bakterie, *E. coli*, enterokoky.
- Indikace možné přítomnosti *Listeria monocytogenes* – *Listeria ssp.*
- Indikace dostatečného tepelného ošetření konzerv vůči *Clostridium botulinum* – mezofilní klostridia.
- Indikace možné přítomnosti *Cl. perfringens* – sulfitredukující klostridia.

Mikrobiální původci onemocnění z potravin

Bakteriální původci se dělí podle způsobu (mechanismu) jakým onemocnění vyvolávají, na původce alimentárních infekcí a alimentárních intoxikací. Mezi nejvýznamnější alimentární patogenní bakterie patří: *Bacillus cereus*, *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella ssp.*, *Shigella ssp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*.

Kontaminace potravin

Ke kontaminaci potravin může dojít buď primárně, nebo sekundárně.

- **Primární kontaminace** - mikroorganismy jsou přítomny již v organismu (zvíře před porážkou), jinak řečeno v surovině před započítím výroby potravin např. mléko při dojení a v průběhu ošetření v zemědělském podniku, maso před porážkou a během porážky, rostlina před sklizní nebo během ní.
- **Sekundární kontaminace** – dochází k ní v průběhu vlastního procesu výroby nebo kulinární úpravy. Zdrojem kontaminace mohou být: prostředí a přírodní zdroje (půda, voda, rostliny, zvířata, org. odpady), člověk bacilonosič, stroje a zařízení.

Faktory působící na vznik onemocnění z potravin mikrobiálního původu

Pro vznik určitého alimentárního onemocnění je nutný výskyt příslušného patogenního mikroorganismu a řada dalších faktorů vyplývajících z vlastností daného mikroorganismu, vnějších a vnitřních podmínek potravin a odolnosti člověka – konzumenta.

Aby daný mikroorganismus vyvolal alimentární onemocnění, musí mít určité vlastnosti a schopnosti:

- Schopnost zachovat si v potravíně životaschopnost.
- Schopnost druhu nebo určitého kmene mikroorganismu vyvolat onemocnění – virulence.
- Schopnost v potravíně se pomnožovat.
- Musí mít specifické faktory patogenity – toxinogenita, invazivita.

Patogenitou se rozumí schopnost mikroorganismu vyvolat v hostitelském organismu onemocnění (patologický stav tj. morfologické nebo fyziologické změny). Stupeň patogenity jednotlivých kmenů v rámci jednoho druhu se nazývá **virulence**.

Invazivita je schopnost mikroorganismů procházet z trávicího traktu do tkání a orgánů člověka a tam se množit. Tyto mikroorganismy nemají většinou schopnost se v potravíně množit, zachovávají si však svou infekciozitu (infekčnost), ta souvisí s množstvím bakterií schopných vyvolat onemocnění. Předpokladem pro invazivitu je adhezivita pomocí specifických nebo nespecifických struktur na povrchu buněk.

Toxinogenita je schopnost produkovat toxiny. Podle vzniku můžeme bakteriální toxiny rozdělit na:

- **Endotoxiny** – jsou to mírně termorezistentní lipopolysacharidy, které jsou přirozenou součástí buněčné stěny. Po odumření buněk v žaludku se uvolňují do prostředí a působí otravy. Vyvolávají už v malých koncentracích průjemy, zvýšenou teplotu, snížení krevního tlaku apod.
- **Exotoxiny** – proteiny většinou termolabilní (některé jsou termostabilní např. toxin *Staphylococcus aureus* a enterotoxiny enteropatogenních *E. coli*), které se tvoří už v potravíně nebo až v žaludku člověka. Místem působení jsou střeva odtud název **enterotoxiny** – většina exotoxinů (*Clostridium perfringens*, *S. aureus*, *E. coli*, atd.). Výjimkou je botulotoxin produkováný *Clostridium botulinum*, který patří mezi neurotoxiny.

Pro vznik onemocnění je též důležité:

- Infekční dávka mikroorganismu tedy množství mikroorganismu nutné k vyvolání onemocnění – **MID minimální infekční dávka**, může být relativně vysoká (u *Salmonella enteritidis*) nebo nízká (u *Listeria monocytogenes*).
- Odolnost člověka podmíněná zdravotním stavem, věkem, ochrannými mechanismy (mikrobicidní vlastnosti pokožky a sliznic, vlastní střevní mikroflóra, buněčná imunita, fagocytóza).

Onemocnění z potravin rozdělujeme na:

Alimentární infekce je onemocnění způsobené po konzumaci potravin obsahujících patogenní mikroorganismus v dávce překračující MID. Bakterie se pak v trávicím traktu pomnožují a vyvolávají onemocnění (např. břišní tyfus, bacilární úplavice).

Alimentární intoxikace je akutní onemocnění vyvolané patogenním mikroorganismem, který se pomnožuje už v potravíně, kde produkuje i toxin (stafylokoková enterotoxikóza, botulismus) a jde tedy o otravu toxinem přítomným v potravíně, nebo se toxiny tvoří v trávicím ústrojí (toxikóza *Clostridium perfringens*).

Někdy je problematické striktně rozlišovat mezi jednotlivými skupinami onemocnění. Často se k alimentární intoxikaci řadí i některé akutní střevní infekce (salmonelózy aj.), neboť nelze vždy přesně oddělit toxické působení bakterií od jejich dalších negativních účinků na střevo.

2.8.6 Biogenní aminy

Biogenní aminy jsou skupinou alifatických, aromatických nebo heterocyklických bází odvozených od aminokyselin, které vykazují různé biologické účinky. Některé biogenní aminy mají samy významné biologické vlastnosti, neboť jsou např. tkáňovými hormony (histamin), protoalkaloidy (hordenin, gramin) a stavebními látkami, které se účastní biosyntézy dalších hormonů živočichů (fenylethylamin), fytohormonů neboli auxinů, alkaloidů a dalších sekundárních metabolitů rostlin. Biogenní aminy jsou přítomny ve všech živých organismech. V potravinách a krmivech představují tyto látky jedny z nežádoucích zplodin konečného rozkladu bílkovin. Z hlediska potravin a výživy je rozhodující cestou vzniku biogenních aminů **dekarboxylace přirozených aminokyselin** působením enzymů některých bakterií. Dekarboxylace je děj, kdy se odbourává karboxylová skupina – COOH a vytváří se oxid uhličitý, účinný enzym se pak nazývá dekarboxylasa. Dle chemické struktury je možné biogenní aminy rozdělit do několika skupin: alifatické (např. putrescin, kadaverin), aromatické (tyramin, 2-fenylethylamin), heterocyklické (histamin, tryptamin) a polyaminy (spermidin, spermin, agmatin). Někdy se mezi polyaminy zjednodušeně řadí i diaminy, podobně jako se heterocyklické aminy zjednodušeně řadí do skupiny aromatických aminů. Biogenní aminy se v potravinách tvoří na základě dekarboxylační aktivity bakteriálních enzymů nebo enzymů přítomných v potravinách. Tvorba biogenních aminů je složitý proces závislý na mnoha faktorech, jejichž identifikace je obtížná. Vznik a množství biogenních aminů v potravinách nebo potravinářských surovinách lze tedy ovlivnit omezením bakteriálního růstu nebo inhibicí aktivity příslušných enzymů. Mikroorganismy a jejich enzymovou aktivitu lze ovlivnit celou řadou faktorů, mezi něž patří zejména **aktivita vody, pH, teplota, redox potenciál, přístup vzduchu a působení přídavných látek** (např. glukono- δ -lakton). Na tvorbu biogenních aminů mají vliv také bakteriální aminooxidasy.

Dekarboxylasy jsou enzymy mnoha mikroorganismů přítomných v potravinách. Patří mezi ně rody *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Photobacterium*, právě tak jako rody čeledi *Enterobacteriaceae* jako jsou *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, z dalších bakterií pak např. *Staphylococcus*, *Micrococcus* a *Kocuria*. Dále ještě mnoho rodů bakterií mléčného kvašení schopných dekarboxylovat aminokyseliny. Pro vznik biogenních aminů je důležitá schopnost katabolizovat aminokyseliny, tato schopnost se u jednotlivých rodů BMK může lišit. Laktobacily jsou schopny na rozdíl od laktokoků katalyzovat řadu konverzí aminokyselin. Enterokoky pak mají výraznou schopnost dekarboxylovat aminokyseliny na příslušné aminy, které se účastní tvorby aroma sýrů, ale působí zároveň toxicky. Slabými producenty biogenních aminů jsou i některé laktobacily

(např. *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. plantarum*, aj.), streptokoky orální skupiny (*S. salivarius* ssp. *thermophilus*). **Na vzniku biogenních aminů se mohou kromě mikrobiálních dekarboxylas (exogenních) podílet i endogenní dekarboxylasy – tedy enzymy vlastní dané potravině nebo surovině.** Zvláště významně se endogenní dekarboxylace uplatňuje u potravin rostlinného původu. Biogenní aminy mohou vznikat také aminací a transaminací aldehydů a ketonů.

V nadlimitních koncentracích mohou mít biogenní aminy na organismus negativní vliv. **Za jednoznačně zdravotně nebezpečnou je považována dávka biogenního aminu 1000 mg/kg potravin.** Vysoké koncentrace biogenních aminů mohou působit **psychoaktivně**, tj. mohou se projevit jako přenašeči v centrálním nervovém systému, nebo **vasoaktivně** a působit tedy přímo nebo nepřímo na vaskulární systém. Vasodilatačně působí např. histamin, vasokontraktálně tyramin. **Symptomy konzumace vysokých dávek biogenních aminů jsou zvracení, dýchací potíže, pocení, bušení srdce, hypotenze nebo hypertenze (histamin) a migrény (fenylethylamin, tyramin).** Biogenní aminy také ovlivňují **karcinogenezi, neurologické poruchy** (Parkinsonova a Alzheimerova choroba), **způsobují alergie a deprese.** Nejzávažnější poznatky výzkumu z posledních let se týkají polyaminů. Ty jsou nezbytné pro dělení a růst buněk či pro aktivitu imunitního systému. Zjistilo se, že jejich obsah vzrůstá ve tkáních se zvýšenou intenzitou dělení buněk, např. v hojících se ranách, ale také v rostoucích nádorech. Polyaminy podle soudobých poznatků nejsou karcinogenní, nevyvolávají tedy vznik nádorů, jejich růst však podporují. Organismus si polyaminy za těchto okolností jednak syntetizuje, jednak je přesouvá z rezerv v jiných částech těla (zejména svalech a kůži), ale také je ve zvýšené míře využívá z potravy.

Zdravý člověk se vyrovnává se zvýšeným množstvím biogenních aminů přijatých potravou pomocí účinného **detoxikačního systému.** Ten tvoří systém enzymů aminooxidasa s prostetickou FAD (flavinadenindinukleotid) skupinou. Nejdůležitějšími jsou **monoaminoxidasa (MAO) a diaminoxidasa (DAO).** Detoxikační aktivita je značně individuální. Negativně ji ovlivňují především alkohol a některá léčiva ze skupiny psychofarmak, antialergik, mukolytik aj. Toxické působení biogenních aminů je ovlivněno aktivitou enzymů detoxikačního systému, ohroženi jsou pak především lidé trpící Crohnovou chorobou, gastritidami či žaludečními a střevními obtížemi, u nichž je aktivita enzymů nižší. Aktivita enzymů klesá také v premenstruačním období. Dále jsou vyššími hladinami biogenních aminů ohroženi lidé trpící migrénami, alergici a lidé s vyšším příjmem alkoholu. Vysoké koncentrace však ani u zdravých lidí nejsou schopny enzymy eliminovat a detoxikační systém selhává.

Obsahy biogenních aminů v potravině určitého druhu kolísají ve velmi širokých mezích, někdy až o dva řády. Obvyklé obsahy jednotlivých aminů v potravinách se pohybují v řádu jednotek až desítek mg/kg, hodnoty ve stovkách mg/kg se již pokládají za vysoké až velmi vysoké. Výjimečně dochází i k překročení hladiny 1000 mg/kg. Z hlediska výskytu se obvykle potraviny dělí na nefermentované, v nichž biogenní aminy vznikají především činností hnilobných bakterií, a na fermentované, v nichž je rozhodující působení bakterií mléčného kysání. **Z nefermentovaných potravin** jsou z hlediska obsahu biogenních aminů nejvýznamnější potraviny živočišného původu - ryby, maso a masné výrobky, mléko a mléčné výrobky. Z potravin rostlinného původu některá zelenina a ovoce, šťávy a džusy, čokoláda a houby. **Z fermentovaných potravin** jsou nejvýznamnější fermentované masné výrobky (u nás především fermentované salámy), sýry, fermentovaná zelenina (např. kysané zelí) a alkoholické nápoje jako jsou pivo a víno.

Například koncentrace biogenních aminů v čerstvém mléce je nepatrná. Naproti tomu **sýry** mohou obsahovat významná množství biogenních aminů. Pro tvorbu poměrně vysokých hladin biogenních aminů mají význam nejen koncentrace bílkovin a volných aminokyselin v sýrech, přítomná mikroflóra, ale nezanedbatelnou roli zde hraje i dlouhá doba zrání sýrů. Jako příčina vyšší četnosti otrav biogenními aminy jsou uváděny vysoké obsahy tyraminu a nebo histaminu. Vyšší obsahy těchto aminů jsou v sýrech zrajících pod mazem (typu tvarůžků či romadúru) a v sýrech poloměkkých a plísňových. Další skupinou jsou sýry vyráběné z nepasterovaného mléka a za zhoršených hygienických podmínek (např. brynza). V čedaru byla detekována množství tyraminu 1500 mg/kg, koncentrace celkových BA u tvarůžků byla 2540 mg/kg, u bryndzy 2490 mg/kg, u nivy 950 mg/kg. Sýry jsou dobrým substrátem pro tvorbu biogenních aminů, ale minimální výskyt otrav ukazuje, že při zachování správných technologických postupů se možnosti jejich tvorby minimalizují.

Hlavním účinným způsobem jak **bránit a redukovat produkci biogenních aminů v potravinách** je vedle dodržování hygieny a správných výrobních postupů používání prověřených mikrobiálních kultur. Ty by měly být složeny z bakterií, které nevykazují schopnost dekarboxylovat aminokyseliny, nebo z bakterií, které aminy oxidují na aldehydy, peroxid vodíku a amoniak.

3 MIKROMYCETY VÝZNAMNÉ V POTRAVINÁŘSTVÍ A SOUVISEJÍCÍCH OBORECH

V následující kapitole je uveden přehled významných vláknitých mikromycet (plísni) a kvasinek. Jsou zde popsány jejich hlavní identifikační znaky, vlastnosti a význam. U některých zvláště významných a morfologicky různorodých rodů jsou uvedeny podrobnější informace o některých významných druzích, které mohou pomoci při jejich identifikaci.

3.1 Vláknnité mikromycety (plísně)

3.1.1 Třída *Zygomycetes*

Patří do odd. *Zygomycota*, které obsahuje 2 třídy, 15 řádů, 38 čeledí, 181 rodů a 1090 spp. Třída *Zygomycetes* obsahuje asi 870 druhů. Jsou to suchozemské, saprofytní houby žijící na tlejících organických zbytcích. Významně se podílí na tvorbě humusu a půdy. Mohou se stát i příležitostnými parazity a původci mykóz rostlin, živočichů a člověka.

Řád *Mucorales*

Zahrnuje rychle rostoucí houby, tvoří mycelium bez přehrádek (coenocytické). Nepohlavně se rozmnožují pomocí sporangiospor tvořených ve sporangiu, které se tvoří na sporangioforu. Při pohlavním rozmnožování se tvoří zygospora uložená v zygosporangiu, ta se meioticky dělí a klíčí ve sporangiofor, na kterém se nepohlavně tvoří sporangiospory. Většina druhů je saprofytická, přednostně využívají substráty bohaté na cukry. Jednou z největších čeledí je čeleď *Mucoraceae*, která obsahuje rody *Actinomucor*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Rhizomucor*, *Parasitelalla*, *Zygorhynchus* a *Circinomucor*. Řada druhů je termofilních (*Rhizopus*, *Rhizomucor* a *Absidia*) a mohou růst i při 50 °C. Některé druhy jsou i lidskými parazity – způsobují tzv. mukormykózy, velmi těžká agresivní onemocnění, např. *Rhizopus oryzae*.

3.1.1.1 Rod *Mucor*

Je známo více jak 50 druhů. Vzdušné mycelium je vatovité, zpočátku je bílé nebo šedé, pak tmavé, rychle se rozrůstá. Hyfy jsou neseptované, málo větvené. Substrátové mycelium je většinou slabě vyvinuté. V hyfách se často tvoří tmavězelené chlamydospory. Silné vzpřímené většinou větvené sporangiofory nesou kulovitá sporangia, zpočátku světlá, pak tmavě hnědá, šedá až černá, viditelná pouhým okem. Zralé sporangium puká a část zůstává na sporangioforu s kolumelou jako límeček. Pohlavní rozmnožování je zřídka. Sporangiospory jsou kulovité nebo oválné.

Jsou to saprofytní houby vyskytující se na rostlinách, ovoci, potravinách, některé druhy jsou patogenní. *Mucor racemosus* má silnou invertasovou aktivitu, kazí ovocné šťávy, vyskytuje se i na zralém ovoci, mlátu a sýrech. *M. mucedo* se využívá na výrobu proteolytických enzymů, *M. pusillus* k výrobě syřidla. *M. rouxianus* a *M. javanicus* za anaerobních podmínek tvoří ethanol a CO₂ a využívají se k výrobě alkoholických nápojů v JV Asii.

3.1.1.2 Rod *Rhizopus*

Je známo asi 10 druhů. Kolonie jsou podobné jako u rodu *Mucor*. Značně větvené mycelium je ve zralém stavu šedé. Liší se jen tvorbou stolonů a rhizoidů. Dlouhé nevětvené sporangiofory vyrůstají minimálně po 2-3 ze šlahounovitých hyf (stolonů) v místech kde vznikají rhizoidy (kořínkovité útvary). Konec sporangioforu bývá rozšířený v apofýzu a přechází v kulovitou či čočkovitou kolomelu. Sporangiofory jsou v mládí hyalinní, později tmavě šedé nebo hnědé. Sporangia jsou kulovitá, v mládí světlá, ve zralosti černá, viditelná pouhým okem. Po prasknutí sporangiální stěny se kolomela s apofýzou kloboukovitě obrací, a jednoznačně tak charakterizuje rod *Rhizopus*. Spory jsou nepravidelně oválné až podlouhlé, často opatřené membránou a jemně rýhované.

Druhy s pektinolytickými enzymy se uplatňují při rosení lnu na polích. Některé druhy mohou produkovat mykotoxiny, jiné mohou být patogenní. *Rhizopus japonicus* a *Rhizopus delemar* se v Japonsku a JV Asii využívají k výrobě alkoholických nápojů. *R. stolonifer* (syn. *R. nigricans*) se využívá k produkci k. fumarové a specifickým oxidacím steroidních sloučenin při výrobě léčiv. Je to houba s kosmopolitním výskytem, hojnější v teplejších oblastech. Častý je zvláště na potravinách nebo v krmivech, způsobuje též hnilobu ovoce. Neprodukuje mykotoxiny. V laboratoři je vzhledem ke svému rychlému růstu a snadnému šíření považována za nebezpečnou kontaminantu. Příležitostně bývá izolován z klinického materiálu. *Rhizopus oryzae* bývá izolován z tlejících rostlinných zbytků, ovoce a potravin, využívá se k výrobě alkoholických nápojů v JV Asii, je ale také původce mukormykozy člověka a producentem ergotových alkaloidů.

3.1.2 Třída *Ascomycetes* a mikromycety, u nichž neznáme pohlavní rozmnožování

Třída *Ascomycetes* patří do odd. *Ascomycota*, které obsahuje 6 tříd 56 řádů, 226 čeledí, 3409 rodů, 32739 spp. Toto oddělení obsahuje kromě vláknitých mikromycet také kvasinky. Jsou to převážně saprofytické houby, méně často parazité rostlina živočichů. Nepohlavně se rozmnožují konidiiemi, které vznikají na konidioforech. V mnohých případech je to jediný

známý způsob rozmnožování. Při pohlavním rozmnožování vznikají askospory v ascích, které jsou uloženy v plodnicích. Nejznámější zástupce zařazujeme do rodů *Eurotium*, *Eupenicillium*, *Talaromyces*, *Emericella*, známější podle rodového označení konidiových stádií jako *Aspergillus* a *Penicillium*.

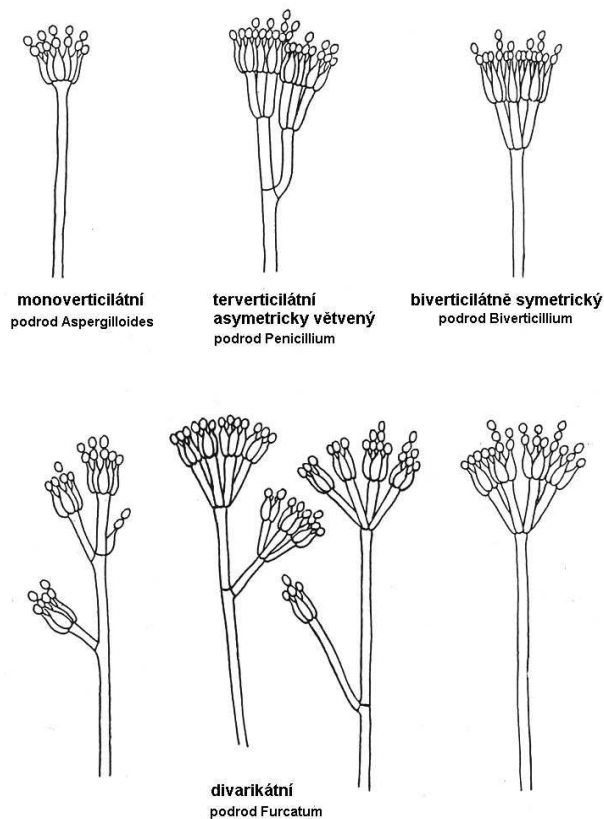
Existuje velké množství hub, u kterých neznáme způsob pohlavního rozmnožování. Tyto houby označujeme jako **mitosporické houby** (*Deuteromycota*, *Fungi imperfecti*). Jejich systém je umělý, založený především na tvaru konidií. Členíme je do 4 pomocných tříd ***Blastomycetes*** (patří sem asporogenní kvasinkovité mikroorganismy např. *Cryptococcus*, *Rhodotorula* aj.), ***Hyphomycetes*** (patří sem anamorfy askomycet např. *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*), ***Coelomycetes*** (patří sem např. fytopatogenní rody *Phoma* a *Septoria*) a ***Agonomycetes*** (patří sem fytopatogenní houby *Rhizoctonia solani*) Jejich nepohlavní rozmnožování probíhá nejčastěji konidii nebo fragmenty mycelia. Většina druhů je anamorfami druhů odd. *Ascomycota*, několik málo druhů jsou anamorfy odd. *Basidiomycota*. V systému askomycet tak nalezneme anamorfní stádía rodu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Monilia*, *Oidium*, *Trichoderma*, *Botrytis*, *Trichophyton* aj. Existuje však mnoho druhů mitosporických hub, u kterých neznáme teleomorfní stádium. Například u rodu *Aspergillus* a *Penicillium* je známo jen několik desítek teleomorfních stádií z několika stovek druhů.

3.1.2.1 Rod *Penicillium*

V současnosti rod *Penicillium* zahrnuje asi 225 akceptovaných druhů, 43 druhů je spojených teleomorfami rodu *Eupenicillium* a 24 druhů s teleomorfami rodu *Talaromyces*. Je známo více jak 350 synonym. Raper a Thom 1949 navrhli 4 sekce: **Monoverticillata**, **Biverticillata** – **symmetrica**, **Asymmetrica**, **Polyverticillata**. S tímto členěním se můžeme setkat ve starší odborné literatuře **Základní taxonomické schema** rodu *Penicillium* je následující: říše - *Fungi*, oddělení – *Ascomycota*, řád – *Eurotiales*, čeleď – *Trichocomaceae*, anamorfní rod – *Penicillium*, 4 podrody – *Aspergilloides*, *Biverticillium*, *Furcatum* a *Penicillium*.

Fruktifikační struktura **konidiofor** je tvořen **stopkou** a větvenou částí zvanou **penicillus**. Stopka může být zakončena rozšířenou částí označovanou jako **vezikulum**. Stopka může být hladká, drsná nebo bradavičnatá. **Fialidy** (sterigmy) jsou buňky produkující konidie, mají ampuliformní (lahvičkovitý či lahvicovitý) nebo lanceolátní - acerozní (kopíčkovitý či jehlicovitý) tvar. Vyrůstají přímo na stopce nebo z metul. **Metuly** jsou buňky vyrůstající v přeslenech ze stopky na jedné nebo více větvích. **Větve** jsou buňky nacházející se mezi stopkou a metulami někdy se rozdělují podle stupně větvení ještě na ramy a ramuly. **Konidie**,

kteřé se tvořív v řetězcích, mohou tvořit sloupce anebo se rozbíhat, jsou kulovité, oválné nebo elipsovité, na povrchu hladké nebo různě drsné.



Obr. 1: Typy konidioforů u rodu *Penicillium* (Kubátová, 2006)

Každý podrod má specifickou stavbu konidioforů (Obr. 1). Základní charakteristika podrodů je následující. Podrod *Aspergilloides* má monovercillální konidiofor, některé druhy mohou tvořit v minoritním množství i penicilly s metulami, fialidy jsou lahvicovité (ampuliformní). Příkladem je *P. glabratum* nebo *P. spinulosum*. Podrod *Biverticillium* má bivercillálně větvený symetrický konidiofor, s typickými jehlicovitými (acerozními) fialidami, konidie jsou elipsovité až hruškovité, metuly jsou úzké, početné, v přeslenu, délkou a šířkou podobné fialidám. Jen málo druhů tvoří divergentní (rozbíhavé) penicilly s přechodným typem fialid a kulovitými konidii. Příkladem jsou např. *P. purpurogenum* a *P. islandicum*. Podrod *Furcatum* vytváří 2 typy bivercillálních penicillů. První typ (sekce *Furcatum*) je morfologicky podobný podrodu *Biverticillium*. Odlišuje se lahvicovitými fialidami, metuly jsou delší než fialidy, často nestejně délky, počet metul v přeslenu je obvykle 2 až 5. Patří sem např. *P. citrinum*. Druhý typ (sekce *Divaricatum*) můžeme charakterizovat jako nepravidelný.

Některé druhy jsou spojeny s monoverticilátními formami, jiné vytváří větve, které jsou divergentní a vyrůstají subterminálně. Řadíme sem např. *P. canescens* aj. Podrod ***Penicillium*** zahrnuje terverticilátní druhy, méně často quaterverticilátní, některé druhy mohou tvořit menší podíl biverticilátních penicillů, fialidy jsou téměř vždy ampuliformní, řadíme sem druhy často se vyskytující v potravinách a krmivech a významné producenty mykotoxinů, např. *P. expansum*, *P. aurantiogriseum*, *P. italicum*, *P. digitatum*, *P. camemberti*, *P. roqueforti*, *P. verrucosum*.

Řada druhů uvolňuje do prostředí barviva (žlutá, červená, oranžová). Tvoří kolonie s velkým množstvím konidií (dlouhé řetízky 50 i více konidií). Vzdušné mycelium je často bezbarvé, substrátové je zbarvené v závislosti na druhu. Často bývá přítomen výpotek (exudát). Jednobuněčné konidie jsou zelené, modrozelené, šedé, hnědé, načernalé.

P. chrysogenum se nepohlavně rozmnožuje konidiemi; teleomorfa není známa. Starší název (*P. notatum*). Kolonie poměrně rychle rostoucí, dosahující cca 30 - 45 mm v průměru, obvykle jsou sametové, s paprskovitými rýhami, bílým až nažloutlým myceliálním okrajem, s modrozeleně až žlutozeleně zbarvenou sporulující částí a žlutými kapkami exudátu. Patří mezi xerofilní druhy. Vyskytuje se velmi hojně po celém světě, je jedním z nejběžnějších penicilií kontaminujících potraviny rostlinného i živočišného původu, krmiva i různé suroviny. Vyskytuje se také často na zaplísňených stěnách. Je schopen produkovat antibiotikum penicilin. Příležitostně byl zaznamenán jako původce různých typů mykóz u člověka. Produkuje mykotoxiny roquefortin C, PR-toxin, k. sekalonovou, meleagrín.

P. roqueforti se nepohlavně rozmnožuje konidiemi; teleomorfa není známa. Kolonie rychle rostoucí, dosahující cca 40 - 70 mm v průměru, sametové, většinou bez rýh, nebo jemně rýhované, tmavozelené, často s bílým třásnitým okrajem. Spodní strana je olivově zelená až tmavě černozeleňá. Používá se pro výrobu sýrů typu Roquefort, může se však vyskytnout i jako kontaminanta jiných potravin či krmiv (např. siláží). Roste rychle při chladničkových teplotách a způsobuje kažení uskladněných potravin. V čisté kultuře je schopen produkovat PR-toxin, avšak na sýrech je jeho produkce velmi slabá a látka se rozkládá. Dále může produkovat roquefortin C, k. mykofenolovou, izofumigaklavin A a B.

Penicillium camemberti (syn. *P. candidum*) kolonie tvoří vlnaté nebo vločkovité 2 - 3 cm, zpočátku bílé pak světle šedozeleňé. Někdy mírně paprskovitě rýhované. Spodní strana je bílá nebo světle žlutá. Bílý okrajový lem je 5 mm široký. Používá se při výrobě sýrů s povrchovou plísní, někdy kontaminuje sýry uchovávané v chladničce. Může produkovat mykotoxin k. cyklopiazonovou v sýrech uchovávaných při 25 °C 5 dní, ne však v sýrech uchovávaných v chladničce.

Penicillium nalgiovense tvoří kolonie vlnaté nebo vločkovité 3 - 3,5 cm, zpočátku bílé pak žlutozelené. Vegetativní mycelium někdy růžové až červenavé, lem kolonie zůstává bílý. Někdy se tvoří oranžový až červenavý výpotek. Spodní strana je oranžověčervená až hnědočervená, pigment proniká i do okolního substrátu. Konidie jsou kulovité, hladké. Využívá se na výrobu sýrů (Nalžovský sýr) a trvanlivých plísňových salámů.

Penicillium expansum tvoří kolonie 4 - 5 cm, modrozelené až šedozelelé, se zrnitým povrchem nebo s jasně viditelnými svazky konidioforů. Okrajová zóna je paprscitě rýhovaná. Okrajový lem je bílý 1 - 2 mm, výpotek bezbarvý nebo jemně oranžovohnědý. Spodní strana je bezbarvá někdy žlutohnědá. Vyskytuje se hojně v přírodě, v ovzduší, půdě. Má celulólytickou aktivitu, napadá různé potraviny, zeleninu a ovoce, na jablkách působí tzv. modrou hnilobu. Produkuje antibakteriální antibiotika a mykotoxiny patulin, citrinin, roquefortin C, chetoglobosin C.

3.1.2.2 Rod *Aspergillus*

Do r. 2001 bylo známo více než 221 druhů, 24 synonym, 87 teleomorf. Druhy anamorfního rodu *Aspergillus* a druhy asociovaných teleomorfních rodů se označují souhrnným názvem „aspergily“. Většina druhů byla popsána na základě morfologické (fenotypové) druhové koncepce, založené na podobnosti pozorovatelných morfologických i fyziologických vlastností. Rod se vnitřně dělí na podrody a sekce. Podrod ***Aspergillus*** (2 sekce – *Aspergillus* a *Restricti*, 2 teleomorfy – *Eurotium* a *Dichlaena*), podrod ***Fumigati*** (3 sekce – *Fumigati*, *Clavati* a *Cervini*, 3 teleomorfy - *Neosartorya*, *Neocarpenteles* a *Dichotomomyces*), podrod ***Ornati*** (sekce - *Ornati*, teleomorfa – *Sclerocleista*), podrod ***Circumdati*** (7 sekcí - *Circumdati*, *Candidi*, *Cremeri*, *Flavi*, *Flavipedes*, *Nigri*, *Terrei*, 4 teleomorfy – *Neopetromyces*, *Chaetosartorya*, *Petromyces*, *Fennellia*), podrod ***Nidulantes*** (4 sekce – *Nidulantes*, *Ochraceorosei*, *Usti* a *Sparsi*, teleomorfa - *Emericella*), ještě existují dva teleomorfní rody *Warcupiella* a *Hemicarpenteles* u nichž v současnosti anamorfní taxon neexistuje.

Mycelium je plstnaté až vatovité, bezbarvé nebo barevné. Staré kolonie jsou pokryté bílou, šedou, černou, zelenou či žlutou vrstvou spor. Konidiofory jsou nevětvené, septované, vyrůstající z jedné buňky (bazální buňka). Na konci konidioforu je kulovité až protáhlé vezikulum na němž radiálně vyrůstají fialidy v jedné či dvou řadách (primární – vlastně jde o metuly a sekundární). U některých druhů se tvoří neuspořádané asky s 8 askosporami umístěné v kleistotheciu sírověžluté barvy.

Rod bohatě enzymaticky vybavený (proteolytické, amylolytické, pektolytické enzymy), častý původce kažení potravin a zemědělských surovin. *Aspergillus glaucus* způsobuje plesnivění potravin s nízkým obsahem vody (chléb, džemy). Některé druhy jsou patogenní, z nich nejvýznamnější jsou *A. fumigatus*, *A. flavus* a *A. niger*. Řada druhů produkuje mykotoxiny. Některé druhy a kmeny jsou využívány v biotechnologiích, jako producenti enzymů (např. *A. niger* - amylasy, lipasy), organických kyselin (*A. niger* – k. citronová, *A. terreus* – k. itakonová), fermentovaných potravin (*A. oryzae* – saké, miso).

Aspergillus flavus se nepohlavně rozmnožuje konidiemi, případně sklerocii; teleomorfa – *Petromyces flavus*. Kolonie rychle rostoucí, dosahující cca 60 - 70 mm v průměru, hrubě zrnité, žlutozeleně či žlutoolivově zbarvené díky zbarvení konidií. Mycelium je bílé. Spodní strana většinou světlá, někdy světle hnědá až naoranžovělá. V kolonii se později mohou vytvářet nápadná tmavá sklerocia víceméně kulovitěho tvaru. Někdy se tvoří bezbarvý až hnědý exudát. Vyskytuje se na celém světě, hojněji však v subtropických a tropických oblastech, a to na různých substrátech rostlinného původu a v půdě. Velmi často bývá izolován zvláště z burských oříšků a z cereálií. Může produkovat hepatotoxické a kancerogenní aflatoxiny B a kyselinu cyklopiazonovu, dále k. kojovou, k. aspergilovou, a k. 3-nitropropionovou. Patří mezi oportunní patogeny, způsobuje např. aspergilózu průdušek.

Aspergillus niger se nepohlavně rozmnožuje konidiemi; teleomorfa není známa. Kolonie rychle rostoucí, dosahující cca 40 - 60 mm v průměru, hrubě zrnité, hnědočerné až černé po vytvořených konidiích. Mycelium je bílé až světle žluté. Kolonie jsou někdy paprscitě rýhované. Některé kmeny produkují do agaru žlutý pigment. Spodní strana kolonií světlá nebo žlutá. Mohou se tvořit sklerocia krémového nebo žlutohnědého až světlerůžového zbarvení. Vyskytuje se celosvětově velmi hojně, hlavně však v teplejších oblastech, a to především na rozmanitých potravinách, jak rostlinného tak i živočišného původu. Často se vyskytuje i v xerofilních podmínkách. Dlouho byl považován za netoxinogenní, avšak v 90. letech byla u několika kmenů zjištěna produkce mykotoxinu ochratoxinu A, některé kmeny mohou produkovat fumonisin B₂, dalšími toxickými metabolity jsou nafto-4-ryrony a malforminy. Často bývá izolován z klinického materiálu.

Aspergillus fumigatus – teleomorfa je *Neosartorya fumigata*. Vytváří rychlerostoucí kolonie, sametové, modrozelené, zelené konidie jsou elipsoidní až kulovité, jemně bradavčité. Mycelium je hyalinní, konidiofor tyrkysovězelený až tmavozelený. Produkuje mykotoxiny fumitremorginy A a B, verruculogen, gliotoxin, fumigaklaviny, fumigatoxiny a tryptochivaliny. Je považován za významného oportunního patogena způsobujícího např. onemocnění plic u imunodeficitních pacientů, u ptáků i jiných živočichů.

Aspergillus oryzae – produkuje amylolytické a proteolytické enzymy a má i lipolytickou aktivitu. Používá se k výrobě alkoholických nápojů (z rýže) a k výrobě dalších potravin. Produkuje mykotoxiny, u skotu vyvolává neurotoxikózy.

Teleomorfní stádium *Neosartorya* (*N. fischeri* anamorfa *A. fischerianus*) jsou termorezistentní – mohou se vyskytovat v pasterovaných potravinách – džemy, ovocné pyré – zvláště nebezpečné jsou v kojenecké a dětské výživě.

3.1.2.4 Rod *Byssochlamys*

Jsou to askomycety s imperfektním stádiem *Paecilomyces*, asi 4 druhy. Tvoří plochý, řídký, bílý až žlutohnědý porost. Konidiofory jsou větvené a septované, fialidy jednotlivě nebo v chomáčcích s řetízky konidií. Aský bývají uloženy v řídkém myceliu. Askospory mimořádně termorezistentní – devitalizace při 88 °C za 30 min nebo při 90 °C za 2 - 18 min., některé kmeny i více jak 25 min. zvláště je-li v zahříváním médiu vysoká koncentrace cukru, který působí protektivně. Vyskytují se na zelenině, ovoci, ovocných šťávách i pasterovaných, kompotech. *Byssochlamys fulva* (*P. fulvus*) - nepohlavní stádium tvoří septovaný konidiofor, fialidy se tvoří na krátkých metulách ve skupinách po 2 – 4. Vytváří cylindrické konidie v řetězcích a jsou žlutavě zbarvené. Chlamydospory se netvoří. Roste i při sníženém O₂ a zvýšeném obsahu CO₂, působí kažení konzerv, produkuje k. byssochlamínovou, patulin a bysso toxin. *B. nivea* (*P. niveus*) - hladké konidiofory se tvoří zřídka, fialidy se tvoří ve skupině po 2 – 3, obvykle ale po jedné přímo na hyfách, konidie jsou globózní až široce elipsovité, hladké, hyalinní až světležluté, tvoří se v divergentních řetězcích. Chlamydospory jsou hojné, silnostěnné, globózní až hruškovité, hladké až jemně drsné, jednotlivé nebo v řetězcích. Produkuje patulin, k. byssochlamínovou a k. mykofenolovou. *B. erlichii* produkuje kys. penicilovou.

3.1.2.5 Rod *Cladosporium*

Je známo více jak 600 druhů a variet. Teleomorfní stádia jsou *Mycosphaerella*, *Davidiella*, *Apiosporina* a *Venturia*. Saprofyt, část druhů je adaptovaná jako parazité rostlin (obilí, ovoce, zelenina), některé jako kontaminanty potravin rostlinného a živočišného původu. Mycelium tmavě zbarvené, septované, kolonie ploché, sametové, vzdušné hyfy zelené, substrátové modrozelené až černozelené. Konidiofory tmavé, nepravidelně větvené, septované, na konci s kratšími či delšími řetízky konidií. Konidie jsou kulovité, vejčité, oválné, tmavé. Ubikvitární, fytopatogenní, kromě rostlinných materiálů se vyskytuje i na masných výrobcích,

textiliích. Rozkládá celulosu, pektin, tuky. U jablek způsobuje čern (melanózu) – znehodnocuje je i jako materiál pro moštování.

C. herbarum (teleomorfa *Davidiella tassiana*) vytváří sametové kolonie, místy práškovité od konidií. Zbarvení kolonií je olivovězelené až olivověhnědé, spodní strana je zelenočerná. Konidiofory vyrůstají z hyf laterálně a někdy terminálně, se zduřelými místy, světlé až olivověhnědé nebo hnědé s hladkou stěnou. Kazí ovoce a zeleninu, sýry, maso, na kterém může tvořit černé skvrny. Roste na vlhkých sklepních stěnách (pivovary, vinné sklepy). Tvorba mykotoxinů nebyla zjištěna. **C. cladosporoides** (teleomorfa není známá) se může vyskytovat také na vodou poškozeném dřevě a na stěnách z papíru a plastu. Toto a další kladosporia mohou být patogenní pro člověka.

3.1.2.6 Rod *Fusarium*

V současnosti je známo více jak 50 druhů, jejich identifikace ale není jednoduchá. Zástupci rodu ***Fusarium*** jsou součástí půdního ekosystému, kde se podílí na rozkladu organické hmoty. Řada druhů se během vývoje přizpůsobila k parazitismu rostlin, část může být za určitých podmínek patogenní pro člověka. Rod *Fusarium* náleží k významným potenciálně patogenním polním plísním. Některé rody našly uplatnění v biotechnologiích jako kulturní kmeny k výrobě mykoproteinu – quornu. Vzdušné mycelium je řídké, nepravidelné, bílé, šedé nebo barevné (žluté, červené, růžové, fialové). Tvoří dvou a vícebuněčné srpkovité makrokonidie. Mikrokonidie jsou hladké, oválné až hruškovité. Mohou se tvořit kulovité chlamydospory.

Všudypřítomné plísně, jsou fytopatogenní, jako příklad skladištní plíseně způsobují kažení na tuky bohatých potravin (ořechy, tuky, máslo atd.), tvoří celou řadu mykotoxinů – T-2 toxin, zearalenon, fumonisiny (*F. graminearum*, *F. sporotrichoides* aj.). Některé druhy jsou patogenní pro člověka např. *F. solani*, *F. oxysporum* aj. Teleomorfy jsou *Giberella* a *Nectria*. ***Giberella fujikuroi*** tvoří růstové látky gibereliny urychlující klíčení semen a růst rostlin, využívá se např. pro urychlení klíčení ječmene ve sladovnách.

F. culmorum se nepohlavně se rozmnožuje konidiemi či chlamydosporami, pohlavní stádium není známé. Kolonie na rychle rostoucí, po 7 dnech při 25 °C porůstající celou Petriho misku světle růžovožlutým myceliem. Do média je produkován červený až vínový pigment. Později se v kolonii tvoří světle oranžová až hnědá sporodochia (malé okem viditelné slizovité shluky konidií) s masou konidií. Některé kmeny mohou mít olivověhnědé mycelium i spodní stranu kolonie. Rozšířen celosvětově zvláště v půdě a na cereáliích. Způsobuje krčkové i kořenové hniloby u obilnin a napadá i uskladněné brambory a cukrovou

řepu. Produkuje řadu mykotoxinů, zvláště trichotheceny, DON, nivalenol a zearalenon. U několika izolátů byla zjištěna též produkce T-2 toxinu a HT-2 toxinu. Je spojováno s dermatitidami u lidí.

3.1.2.7 Rod *Alternaria*

Bylo popsáno asi 449 druhů, variet a synonym. Kosmopolitní plíseň, vázaná především na půdní ekosystém. Teleomorfní stádia patří do rodů *Pleospora* a *Lewia*. Vyznačuje se rychlým růstem. Kolonie jsou z počátku bezbarvé, pak šedé, olivově zelené až černé. Zrnité později vlnaté. Konidiofory jsou krátké, septované většinou nevětvené. Konidie tmavé, hruškovité, kyjovité, septované, mohou tvořit krátké řetízky. Někdy se tvoří chlamydospory. Ubikvitárně se vyskytující plíseň, v půdě, na rostlinách, jako vzdušná kontaminace v mlékárnách, sklepích v pivovarech. Některé druhy mohou být patogenní pro člověka (*A. alternata*, *A. tenuissima* aj.). Některé druhy produkují mykotoxiny (*A. alternata* aj) a vzhledem k možnosti intoxikace cestou inhalace spor, není vyloučen jejich podíl na poškozování zdraví exponovaných jedinců.

Alternaria alternata se nepohlavně rozmnožuje konidiiemi, pohlavní stádium není známé. Kolonie velké cca 40 - 50 mm v průměru, sametové až jemně vlnaté, tmavě černoolivově zbarvené, u některých kmenů zpočátku šedobílé. Spodní strana tmavě šedá až černá. Sporulaci podporuje vystavení kolonií záření blízkému UV. Vyskytuje se velmi hojně na celém světě, a to na různých substrátech rostlinného původu včetně potravin a krmiv, a také v půdě, na textiliích a jiných vlhkých substrátech a površích. Může produkovat vysoce toxický metabolit AAT (*Alternaria alternata* toxin) podobný fumonisinu, kyselinu tenuazonovou a dále řadu méně významných toxinů, např. alternariol aj. Patří mezi oportunní patogeny, způsobuje např. kožní léze.

3.1.2.8 Rod *Stachybotrys*

Je známo asi 82 druhů a synonym. Konidiofory jsou hyalinní až šedé, v horní části bradavičnaté, jednoduché nebo sympodiálně větvené. Kolonie šedobílé až černé. Fialidy charakteristicky stluštělé, na konidioforu 3 - 7 fialid. Spory kulovité, oválné či válcovité, často bradavičnaté, uložené ve slizovité hmotě. Saprofyt, v seně, slámě a jiném celulosovém materiálu. *Stachybotrys chartarum* syn. *Stachybotrys atra* Nepohlavně se rozmnožuje konidiiemi, teleomorfa není známa. Kolonie poměrně pomalu rostoucí, šedé až černé. Spodní strana kolonií nezbarvena. Vyskytuje se po celém světě, zvláště na substrátech obsahujících celulózu (papír, rostlinné zbytky, potraviny), na sádkartonových stěnách, v půdě. Může

produkovat mykotoxiny satratoxin G a H, o nichž je známo, že vyvolávají stachybotryotoxikózu u koní a jiných hospodářských zvířat a u člověka, a stachybotrylaktam.

3.1.2.9 Rod *Trichoderma*

Tvoří rychle rostoucí kolonie. Mycelium je zpočátku bílé, vatovité či řídké vločkovité. V době sporulace se tvoří chuchvalce mycelia roztroušeně nebo stmelně. Konidie se tvoří na fialidách v přeslenech či shlucích, vyrůstajících na postranních větvích – profialidách. Konidie jsou u většiny druhů zelené. Často tvoří chlamydospory. Identifikace jednotlivých druhů je vzhledem k podobnosti obtížná a je nutno využít molekulárně genetických metod.

Trichoderma viride se nepohlavně rozmnožuje konidiemi či chlamydosporami, sexuálně askosporami. Kolonie jsou velmi rychle rostoucí, pokrývající celou Petriho misku řídkým bělavým myceliem, později tmavozeleně sporulujícím. Sporulaci kolonií podporuje denní světlo. Spodní strana nezbarvena. Teleomorfa se v kultuře netvoří. Hojně rozšířená půdní houba vyskytující se též na dřevě, uskladněných obilninách, ovoci a zelenině. Produkuje řadu sekundárních metabolitů, např. mykotoxin trichodermin. *T. harzianum* – tvoří intenzivně rostoucí kolonie, mycelium je bílé až žluté. Spodní strana kolonie je světlá nebo nažloutlá. Mykotoxiny netvoří. Vyskytuje se v půdě, na obilkách, na textiliích a papíře. V Potravinách může být zaměňována za *T. viride*. *T. reesei* – má celulolytické schopnosti, využívá se k zužitkování celulosového odpadního materiálu při zkrmování a při výrobě krmného droždí.

3.1.2.10 Rod *Monilia*

Kolonie jsou kypřé, vlasovité, bílé nebo později růžové až lososově červené. Vytváří bohaté vzdušné mycelium. Jednoduché nebo větvené řetězce oválných konidií vznikají odškrabáním z jedné hyfy. Druhy jsou buď saprofytické, nebo parazitují na rostlinách. Jsou příčinou hniloby peckovin (meruňky, broskve) a jiného ovoce – moniliózy (*M. fructigena*). Některé druhy mohou způsobovat alergie. *Monilia sitophila* teleomorfa *Neurospora sitophila*, synonymum: *Chrysonilia sitophila*, Taxonomické zařazení: *Ascomycota*, *Sordariales*, *Sordariaceae* Způsob rozmnožování: Asexuálně konidiemi; sexuálně askosporami. Kolonie velmi rychle rostoucí, vlnaté až provazčité, světle lososově růžové až oranžové. Spodní strana světlá. Teleomorfa se v kultuře většinou netvoří. Vyskytuje se na celém světě, všeobecně však nebývá izolována příliš často. Hojněji se vyskytuje v pekárnách a na chlebu (červená pekárenská plíseň). Pokud vyroste na Petriho miskách v laboratoři, stává se velmi nebezpečnou rychle se šířící kontaminantou. Produkce mykotoxinů nebyla zjištěna.

3.2 Významné kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy

Kvasinky nejsou taxonomicky jednotná skupina. Podle způsobu pohlavního rozmnožování dělíme kvasinky do několika skupin. Rody tvořící askospory řadíme do odd. *Ascomycota*. Nejdůležitější je tř. *Saccharomycetes*, řád *Sacchromycetales* s několika čeleděmi a mnoha významnými rody (např. *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*) rody tvořící bazidiospory nebo sporidie a heterokaryotní mycelium s přezkami řadíme do oddělení *Basidiomycota*. Rody u nichž neznáme, tvorbu pohlavních spor řadíme mezi mitosporické houby (deuteromycety). Dříve byly označovány jako nepravé kvasinky nebo kvasinkovité mikroorganismy. Sporotvorné kvasinky nazýváme **pravými kvasinkami**. Někteří příslušníci této skupiny ztratili schopnost spájení, jsou tedy **nedokonalými** (imperfektními) stádii **dokonalých** (perfektních) kvasinek. Mají spolu společné morfologické, fyziologické i biochemické vlastnosti, pouze taxonomické zařazení zůstalo zachováno.

3.2.1 Rody tvořící askospory

3.2.1.1 Rod *Saccharomyces*

Druhy kvasinek tohoto rodu jsou schopny zkvašovat většinou několik cukrů, nikdy ale nevyužívají laktosu jako zdroj uhlíku a NO_3^- jako zdroj dusíku. Jsou většinou krátce elipsoidní, vejčité nebo protáhlé, spájení je izogamní, askospory jsou kulovité až elipsoidní v asku po 1 - 4.

Saccharomyces cerevisiae je technologicky nejdůležitější kvasinka. Tvar buněk je kulovitý až oválný, pro starší buňky je charakteristická zřetelná ostře ohraničená vakuola. Velikost 6 - 7 x 7,5 - 8,7 μm . Zkvašuje glukosu, galaktosu, sacharosu, maltosu a částečně nebo úplně rafinosu. Vegetativně se rozmnožuje multilaterálním holoblastickým pučením. Pohlavní rozmnožování - haplo-diplobiotický životní cyklus, vegetativní buňky se mění přímo na asky. Spóry diploidních kmenů jsou po 1 - 4 v asku, jsou kulovité s hladkou stěnou. Kmeny jsou homothalické i heterothalické. U *S. cerevisiae* subsp. *uvarum* u pivovarnických polyploidů, se spóry zpravidla nevyskytují, nebo jen po 1 - 2 a nejsou vitální.

Dnes platí pro kvasinky svrchního kvašení *S. cerevisiae* subsp. *cerevisiae* název *Saccharomyces cerevisiae* a pro kvasinky spodního kvašení *S. cerevisiae* subsp. *uvarum* pojmenování *Saccharomyces pastorianus*. Vinařské kmeny mají protáhlejší tvar, dříve byly označovány jako samostatná varieta *S. cerevisiae* var. *elipsoideus*.

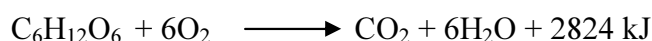
S. cerevisiae je pивní, vinná, lihovarnická a pekařská kvasinka, v jednotlivých odvětvích se využívají speciální kmeny, které vyhovují příslušným podmínkám. Je modelovým organismem pro biochemické a genetické práce.

Největší praktický význam má schopnost anaerobně zkvašovat hexosy na ethanol a CO₂.



Teoretický výtěžek ethanolu je 51,1 %.

Za aerobních podmínek (respirace) vzniká vedle ethanolu oxid uhličitý a voda a energetický zisk je mnohem větší.



Kmeny pro výrobu pekařského droždí a pivovarské vyžadují vyrovnanost tvaru, velikosti buněk a stálost technologických vlastností. Většinou byly vyselektovány polyploidní (nejčastěji triploidní) nebo aneuploidní buňky, které mají v důsledku nadbytečných chromozomů porušený průběh meiózy. **Pekařské droždí** se připravuje aerobní fermentací okyselených melasových zápar přiživěných amonnými solemi a fosfátem. Zápary se provzdušňují sterilním stlačeným vzduchem přiváděným ke dnu kvasných tanků a aerobní metabolismus je zajištěn opakovanými přítoky melasové zápary. Buňky se rozmnožují za nízké koncentrace cukrů v prostředí. I při tomto procesu se následkem částečné hexosové represe dýchání produkuje určité množství ethanolu.

Pivovarské kvasinky dělíme na dvě základní skupiny. **Svrchní pivovarské kvasinky (nově *S. cerevisiae*)** Velmi podobné pekařským kvasinkám. Většinou nemají enzym melibiasu – trisacharid rafinosu fermentují z 1/3 – pomocí invertasy odštěpují fruktosu, kterou zkvašují. Disacharid melibiosu, který pak vzniká, neumí rozložit. Kvašení probíhá za vyšších teplot, nad 15 °C (20 - 25 °C), buňky jsou po proběhnutí kvašení vynášeny na povrch fermentační kapaliny (mladiny). Používají se pro výrobu anglických piv. **Spodní pivovarské kvasinky (nově *S. pastorianus*)** Kvašení probíhá při 6 - 10 °C a trvá déle, pH mladiny 4,2 - 5,6, koncentrace zkvasitelných cukrů 11 - 12 % extraktu, při pomnožování vyžadují aerobní podmínky (vzdušnění), při kvašení a dokvašování vyžadují anaerobní podmínky, po prokvašení klesají kvasinky na dno kvasných nádob. Rafinosu zkvašují úplně. Piva vyrobená spodním kvašením mají delší trvanlivost než piva svrchně kvašená. Dříve se tyto kvasinky označovaly jako *S. uvarum*, ještě dříve jako *S. carlsbergensis* (roku 1881 vypěstoval v pivovaru Carlsberg E. Ch. Hansen čisté jednobuněčné kvasinky, od nichž se odvozují téměř všechny dnes používané kmeny pivovarských kvasinek.) Používají se pro výrobu českých piv plzeňského typu.

3.2.1.2 Rod *Zygosaccharomyces*

Jsou to osmotolerantní kvasinky, které v prostředí snesou i 50 % glukosu. Buňky mohou tvořit pseudomycelium. Fermentuje glukosu, maltosu, sacharosu. Vyštěpil se z rodu *Saccharomyces*. Vegetativní fáze (pučení) je převážně v haploidním stavu, tvorbě asků těsně předchází spájení buněk a tvorba zygoty. Není u nich přítomna hexosová represe dýchání. Sporulují na ztužených půdách i v přítomnosti zkvasitelných sacharidů. Bývají příčinou kažení medu, čokolád a čokoládových cukrovinek. *Zygosaccharomyces bisporus* významně fermentuje glukosu, působí kvašení medu a sirupů za vzniku pěny. *Zygosaccharomyces bailii* dříve *Saccharomyces bailii* se vyskytuje na potravinách s obsahem cukru nad 5 %, marcipánu a výrobcích studené kuchyně. Snáší nízké teploty a nízké pH. Snáší i poměrně vysoké koncentrace ethanolu a SO₂, je odolná i k ostatním konzervačním prostředkům. Je kontaminantem ve vinařství (tvorba křisu v láhvovaném víně) *Zygosaccharomyces rouxii* (dříve *Saccharomyces rouxii*) vytváří buňky různé velikosti, tvoří i pseudomycelium. Kází sirupy, šťávy a marcipán.

3.2.1.3 Rod *Kluyveromyces*

Nemá hexosovou represi dýchání, vegetativní fáze je především haploidní, takže spájení buněk těsně předchází tvorbě asků. *Kluyveromyces marxianus* má dvě variety. *K. marxianus* var. *marxianus* (dříve *K. marxianus* a *K. fragilis*) - Buňky jsou elipsoidní nebo cylindrické s rozměry 2 - 6 x 3 - 10 μm, samotné nebo v párech či řetízích. Pseudomycelium se vytváří dobře, pravé mycelium ne. *K. marxianus* var. *lactis* (dříve *K. lactis*) - Vegetativní buňky jsou kulovité nebo elipsoidní až cylindrické s rozměry 2 - 6,5 x 3 - 8 μm. Vyskytují se jednotlivě, v párech i v malých shlucích. Vytváří se jen rudimentární pseudomycelium.

V kapalinách vytvářejí sediment a prstenec, ale zpravidla i tenkou kožku na povrchu. Tvoří kulovité spory. Obě fermentují laktosu. Jsou složkou kefirových zrn (konglomerát kvasinek a bakterií mléčného kysání) používaných při výrobě kefiru. *K. marxianus* var. *lactis* se používá k výrobě krmných kvasnic (pěstuje se na syrovátce).

3.2.1.4 Rod *Pichia*

Rod s nízkou kvasnou schopností. Je známo asi 40 druhů. Neasimilují NO₃⁻. Tvoří protáhlé vegetativní buňky, může tvořit pseudomycelium. Spory jsou kulovité, kloboukovité, saturnovité nebo hranaté a rychle opouštějí askus. Na tekutých substrátech tvoří křís bílé barvy a moučnatého vzhledu. Z cukrů vzniká k. octová. Org. kyseliny tvoří s alkoholy estery, které mohou působit nepříjemnou chuť a pach kontaminovaného produktu. Častý průvodce

pivních kvasinek. Jsou nežádoucí kontaminantou piva, vína, ovocných šťáv, výrobků studené kuchyně i kysaného zelí. *Pichia membranaefaciens* má kulovité nebo elipsoidní buňky s rozměry 2,5 - 5 x 3 - 6,5 µm. Jsou buď jednotlivě, nebo v párech či skupinách. V jednom asku tvoří 1 - 4 spory. Nevytváří pseudomycelium. V kapalném prostředí tvoří pouze sediment. Slabě fermentuje glukosu, dusičnan neasimiluje.

3.2.2 Bazidiomycetní kvasinky

Bývají sem řazeny kvasinky tvořící bazidiospory na protáhlých bazidiích (č. *Filobasidiaceae*), dále kvasinky tvořící teliospory, z nichž pučí promycelium (metabazidium) nesoucí sporidie (*Rhodosporidium*). Bývají sem přiřazována i stádia některých vyšších bazidiomycet. Vegetativní rozmnožování probíhá u všech zástupců pučením. Pro sexuální cyklus je charakteristické heterokaryotní mycelium s přezkami.

a) č. *Filobasidiaceae*

3.2.2.1 Rod *Filobasidiella*

Perfektní stádium rodu *Cryptococcus*. Tvoří na polokulovitém konci bazidie 8 přisedlých elipsoidních nebo zašpičatělých spor. *Filobasidiella* je patogenní rod. *F. neoformans* s kulovitými bazidiosporami a *F. bacillispora* s tyčinkovitými sporami, jenž byly dříve označované jako *Cryptococcus neoformans* mohou napadat tkáň lidí a zvířat (mozková tkáň, poraněné kosti) a působit onemocnění často končící smrtí. Často se vyskytují v suchém ptačím trusu (holubí) odtud se dostávají do vzduchu. Infekční cesta je vdechováním. *C. neoformans* netvoří pseudomycelium a vytváří okolo svých buněk polysacharidová slizová pouzdra. Tvoří kulaté až oválné buňky nepravidelných tvarů, zřídka protáhlé. Rozmnožuje se pučením. Má fenoloxidázovou aktivitu. Asimiluje inositol jako zdroj uhlíku. Kolonie mají žlutavé až šedooranžové zbarvení.

b) Rody tvořící sporidie

Jsou zde oxidační typy kvasinek bez kvasných schopností. *Rhodosporidium* (perfektní stádium rodu *Rhodotorula*) tvoří oranžové až růžové kolonie – způsobeno karotenoidními barvivy.

c) Rody tvořící balistospory

Sporidiobolus (perfektní stádium rodu *Sporobolomyces*) tvoří růžově zbarvené kolonie. Tvoří vegetativní spory – balistospory. Balistospory tvoří také rody *Sporobolomyces* vytvářející velké množství pseudomycelia i pravého mycelia a produkující karotenoidní barviva a *Bullera*

(tento rod netvoří barviva). Všechny uvedené růžové kvasinky se často vyskytují ve vzduchu a představují cca 50 % kvasinkové populace mořské i sladké povrchové vody.

4.2.3 Rody, u nichž není známa tvorba pohlavních spor

Tyto rody se někdy nazývají **nepravými kvasinkami** nebo **kvasinkovitými mikroorganismy**.

3.2.3.1 Rod *Candida*

Zahrnuje druhy nekvasící i s kvasnými schopnostmi. Rozmnožují se multilaterálním pučením, ve vhodných půdách tvoří pseudomycelium až pravé mycelium

Candida tropicalis vytváří kulovité nebo mírně elipsoidní buňky, mezi nimi se však nachází i cylindrické a protáhnuté buňky jako články pseudomycelia. Buňky mají rozměry 4,3 - 7,2 x 5,8 - 10,8 μm . Buňky snadno tvoří pseudomycelium. Vytváří měkké, krémovité, hladké i kučeravé kolonie, často radiálně pásované. Pokud se vytváří i pravé mycelium může se měkký charakter kolonie měnit až na kožovitý. V kapalném prostředí vytváří sediment, při okraji prsteneček, případně na povrchu mázdrů. *C. tropicalis* se zařazuje mezi patogenní kvasinky. Nejčastěji se však vyskytuje jako všeobecný komenzál v ústech, trávicím ústrojí, v plicích, ve vagíně, na pokožce lidí a zvířat. Velmi často se vyskytuje v kvasném průmyslu. Svoji houževnatostí a malou náročností na podmínky výživy vytlačuje často z fermentačního procesu jiné kvasinky. Používá se na výrobu krmného droždí z netradičních substrátů, často pod jinými názvy (např. *C. kefyra*, *C. murmanica* atd.), čímž se zastírají její vlastnosti oportunního patogenu.

Candida albicans vytváří oválné blastokonidie (blastospory) 3 – 6 μm velké a pučí z nich dceřiné buňky, které se protahují a zůstávají spojeny v pseudomycelium, může tvořit též pravé mycelium a také chlamydospory velké 7 - 10 μm . Vyskytuje se na ovoci, rostlinných materiálech, v prachu, ve vzduchu a ve vodě. Významný patogen způsobující kandidózy pokožky a nehtů, může napadat i vnitřní orgány a působit vážná i smrtelná onemocnění. Zvláště ohrožení jsou lidé pracující s půdou (zahradníci) a s ovocem a cukernými nálevy (v konzervárnách).

Candida utilis vytváří pravidelné, krátce cylindrické buňky. Vyznačují se polárně uloženými lipidovými kapičkami. Mají rozměry 3,5 - 4,5 x 7 – 13 μm . V kapalných prostředích tento druh vytváří sediment a prsteneček. Využívá se na výrobu krmného droždí, pěstuje se na různých médiích (melasa, sulfítové louhy z papíren aj.), je obávaným kontaminantem pekařského droždí. Asimiluje dusičnan.

Candida kefyr je imperfektní stádium *Kluyveromyces marxianus*, která zkvašuje i laktosu. Druhy tvořící pouze kulovité až elipsoidní buňky byly dříve řazeny do rodu *Torulopsis*, ten však byl **zrušen**.

3.2.3.2 Rod *Malassezia*

(dříve *Pityrosporum*)

Tvoří malé oválné až lahvicovité buňky, množí se unipolárním pučením. Nekvasí ani netvoří pseudomycelium. Má výraznou lipolytickou schopnost, opt. Teplota růstu je 35 - 37 °C (pomalý růst při 25 °C). Zástupcem je *Malassezia furfur*. Za určitých podmínek patogen (na pokožce nohou, vlasatých částech hlavy, aj.), původce onemocnění pityriasis versicolor, může vyvolat katetrové sepse s pneumonií či peritonitidu. Běžný kontaminant kůže zdravých lidí. Škodí při výrobě olivového oleje.

3.2.3.3 Rod *Rhodotorula*

Buňky jsou kulovité, oválné až podlouhlé. Většinou netvoří pseudomycelium, nekvasí. Tvoří barevné růžové až oranžové kolonie (karotenoidní barviva). Netvoří křís v kapalinách ale usazeninu, někdy ve vodě tvoří sliz. Velmi rozšířené, vyskytují se v půdě, vodě, vzduchu, v potravinách a nápojích. *Rhodotorula glutinis* tvoří malé buňky s rozměry 2,5 - 5 x 6 - 13 µm, buňky mohou být někdy protáhlé až do 16 µm. V kapalném prostředí se vytváří sediment a prstenec, zpravidla světlé, krémové až světle růžové barvy. Asimiluje NO₃⁻, nevyžaduje vitaminy v médiích. *Rh. glutinis* je nejrozšířenější druh rodu *Rhodotorula* v přírodě. Jsou to ubikvitní kvasinky rozšířené po celém světě. Dají se izolovat ze vzduchu, půdy, sladké i slané vody, z vinařských provozů, z povrchu rostlin, ale i z různých orgánů živočišného těla. Všechny druhy rodu *Rhodotorula* jsou lipidotvorné, hromadí v buňkách tuk - za určitých podmínek až nadměrné množství. S tím souvisí schopnost produkovat lipasy, využívat n-alkany aj. *R. glutinis* byla modelem na zkoumání transportu látek, hlavně pentóz, přes cytoplazmatickou membránu. Mutanty *R. glutinis* rezistentní k nystatinu, se používaly na podrobnější zkoumání membránového potenciálu.

3.2.3.4 Rod *Sporobolomyces*

Nemá kvasné schopnosti, tvoří žluté až růžové kolonie. Vytváří balistospory, které vytváří poprašek na koloniích tím, jak jsou vymršťovány a dopadají zpět na kolonii. Tvoří mycelium. Vyskytuje se na na zvlhlých cereáliích a také listech rostlin a s nimi se dostává do vody.

3.2.3.5 Rod *Geotrichum*

Geotrichum candidum (dříve *Oidium lactis*, *Oospora lactis*) je nesporulující forma perfektního stádia *Galactomyces geotrichum*. Rozmnožuje se rozpadem hyf na arthrokonidie, ve starší literatuře označované jako oidie, téměř obdélníkovitého tvaru 3 - 7 x 8 - 18 µm nebo elipsoidní. Enzymaticky velmi aktivní, rozkládá tuky, sacharidy i bílkoviny. Opt. teplota izolátů z rostlin 25 - 27 °C, z živočichů 30 – 31 °C, max. 35 - 38 °C. Vyznačuje se oxidační činností, stravuje org. kyseliny i jejich soli, ethanol apod., nekvasí. Na polotuhých médiích tvoří bílé kulaté plstnaté kolonie. Na mléce a ml. výrobcích tvoří chlupatý povlak měnící se později na slizovitý žlutavě zbarvený. Je to houba rozšířená ubikvitně, provází člověka i zvířata v každé činnosti. Vyskytuje se v mléčných výrobcích, mléku, smetaně, tvarohu, sýru, na starším droždí, na kysyném zelí a okurkách, ale i v půdě, ve vodě, v aktivovaných kalech z odpadních vod, v odpadu po zpracování mořských ryb apod. Vyskytuje se i na nedostatečně sanitačně ošetřených strojích v potravinářském průmyslu, je pak označována jako „maschine mould“. Je to obyčejný saprofyt, ale může se vyvinout pro člověka až na sekundárního patogena. Nejčastější izoláty pocházejí z dýchacích cest a gastrointestinálního traktu. Osidluje osoby s diabetem nebo s imunosupresí u nichž vyvolává infekce různé lokalizace. Často provází kandidy při vaginálních mykózách, bronchopneumoniích a dermatomykózách. Je to lipolytická kvasinka, vhodná například na využití odpadních produktů ze zpracování tučných ryb a tučných mléčných produktů, na neutralizaci zápar z rafinace olejů.

3.3 Význam mikromycet

3.3.1 Negativní význam mikroskopických hub

Mikromycety mohou ovlivnit zdraví člověka nejen prostřednictvím jimi kontaminovaných potravin, ale **patogenní mikromycety** mohou působit přímo na zdraví člověka. Způsobují **mykotické infekce** (mykózy a mykoalergie). Některé vláknité mikromycety také produkují toxické látky – **mykotoxiny** a mohou tak být příčinou vzniku **mykotoxikóz**. O negativním významu mykotoxinů pro zdraví člověka se hovoří především v souvislosti s potravinami, k expozici mykotoxinům může však docházet i v pracovním a životním prostředí člověka. Mikroskopické houby jsou ale také příčinou kažení potravin a potravinářských surovin, krmiv pro zvířata a degradace nejrůznějších materiálů.

3.3.1.1 Onemocnění vyvolaná mikromycetami

Chorobné stavy vyvolávané mikromycetami, nebo podmíněné jejich přítomností v prostředí můžeme rozdělit do čtyř skupin:

Mykózy jsou infekční onemocnění vyvolávaná vesměs mikromycetami, v absolutní převaze patřícími mezi vřeckaté (*Ascomycota*) nebo imperfektní houby a jen zcela výjimečně i mezi stopkovýtrusné (*Basidiomycota*). **Kožní mykózy** jsou vyvolány houbami, které se množí pouze v keratinových vrstvách kůže a jejích adnex (vlasy, nehty), ale nepronikají do hlubších tkání. **Systémové mykózy** jsou onemocnění, postihující jeden nebo více orgánů, která mohou diseminovat a přejít do septického stavu, zvláště u imunoalterovaných pacientů (AIDS, transplantace apod.). Infekce imunoalterovaných pacientů působené oportunními houbami, které pro zdravého, imunokompetentního jedince nepředstavují reálné nebezpečí. Jedná se nejčastěji o nosokomiální nákazy (hospitalismy), které jsou obtížně a obvykle s prodlením diagnostikovatelné, u rizikových skupin často vyžadují empirickou antimykotickou terapii a vyznačují se vysokou smrtností. Mezi tato onemocnění patří především kandidóza (*Candida albicans* a další druhy), aspergilóza (nejčastějším původcem je *Aspergillus fumigatus*, méně často pak *A. flavus* a *A. niger*), kryptokokóza (závažné onemocnění vyvolané kvasinkou *Cryptococcus neoformans* (teleomorfa *Filobasidiella neoformans*), mukormykóza (původci onemocnění jsou exosaprofytní plísně rodu *Mucor*, *Rhizomucor* a *Rhizopus* s celosvětovým výskytem) a pneumocystóza (původcem je *Pneumocystis jiroveci* (lidské kmeny *P. carinii*) kosmopolitní patogen člověka).

Mykotoxikózy jsou chorobné stavy vyvolané metabolickými produkty hub. Jde o **houbové intoxikace**, otravy způsobené jednorázově toxiny obsaženými v tělesné hmotě (nejčastěji plodnicích) hub. V převážné většině jde o otravy způsobené požitím plodnic makromycet. Druhou skupinou jsou **mykotoxikózy** vyvolané toxickými metabolity (mykotoxiny) uvolňovanými do prostředí. Vyvolávají je takřka výhradně mikromycety.

Mykoalergózy (mykoalergie) jsou stavy přecitlivělosti na některé metabolické produkty, ale především i na hmotné částice houbového původu (např. spory). Výskyt mykoalergií je relativně vysoký. Nejčastěji se jedná o alergeny přítomné na sporách. Po chemické stránce je většina mykoalergenů tvořena proteiny a glykoproteiny, popř. polysacharidy. Doposud bylo popsáno více než 80 rodů hub, které mohou vyvolávat alergické reakce u lidí. **K nejvýznamnějším alergenům patří mitosporické druhy rodu *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Helminthosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Penicillium***, v menší míře některé basidiomycety (*Pleurotus ostreatus* – hlíva ústříčná, *Calvatia* spp. - pýchavka, *Coprinus* spp. - hnojník, *Psilocybe cubensis* - lysohlávka), kvasinky

(*Candida albicans*, *Malassezia furfur*, *Saccharomyces cerevisiae*) a zygomycety jako je *Mucor* a *Rhizopus*. U pekařů byly zjištěny alergické projevy i proti antigenům *Monilia sitophila*. Pro **alergiky na venkovní plísň** (především *Cladosporium* a *Alternaria*) platí podobná opatření jako pro pylové alergiky: v období sezóny méně větrat, při velkých obtížích omezit pobyt venku, zejména spojený s fyzickou námahou, chránit si oči slunečními brýlemi, vyhýbat se kontaktu s tlejícími organickými zbytky (kompost, padané ovoce, práce ve skleníku). U **alergií na domovní plísň** (nejvýznamnější jsou *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* a *Cladosporium*) je nutné: udržovat v bytech přiměřenou vlhkost – pod 50 %, často větrat, nepoužívat zvlhčovače nebo čističky vzduchu s vodní nádrží, viditelné povlaky plísni likvidovat protiplísňovými prostředky, nikdy mechanicky neoškrábávat, z ložnic a dětských pokojů odstranit pokojové rostliny.

Mycetismy jsou stavy vyvolané mycetickými elementy, které však působí tkáňové podráždění pouze svou mechanickou přítomností, aniž by měly možnost se v tkáních pomnožovat, anebo se zde pomnožují jen zcela výjimečně v nepatrné, pro rozvoj onemocnění zřejmě nevýznamné míře.

3.3.1.2 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou sekundární toxické metabolity plísni, patřící mezi významné toxiny přírodního původu. Název mykotoxiny byl poprvé použit Forgaczem a Carllem r. 1955. Jsou to strukturně odlišné organické sloučeniny o nízké molekulové hmotnosti (až na výjimky nižší než 700 g/mol). Většinou jsou termostabilní. Jsou nebílkovinné povahy, toxické pro člověka a živé organismy. Důvod, proč jsou produkovány, je vysvětlován tím, že jsou prostředkem plísni v boji o potravu a přežití. Mykotoxiny nejsou nezbytné pro rozvoj plísni. K dietární a profesionální expozici mykotoxinům dochází nezávisle na vůli a zájmu člověka. V současnosti je známo kolem 500 mykotoxinů, produkováných více jak 350 druhy mikroskopických hub.

Z celkového počtu 114 druhů vláknitých mikromycet (plísni), které mají význam v potravinách, je 65 druhů toxinogenních. V současné době je asi 50 mykotoxinů dáváno do souvislosti s mykotoxikózami u lidí a zvířat. Produkce mykotoxinů závisí zejména na typu potraviny, způsobu jejího uchování a přítomnosti mikrobiálních překážek, např. konzervačních látek.

Určitý mykotoxin jak uvádí může být produkován zástupci několika rodů plísni. Dva i více mykotoxinů mohou být produkovány určitým druhem plísni. Záchyt toxinogenních plísni v potravinách ještě neznamená přítomnost mykotoxinů. Ne všechny kmeny potenciálně

toxinogenních plísní jsou toxinogenní. Mykotoxin může přetrvávat v potravine nebo krmivu, i když se již produkční houba nevyskytuje. Významnou roli hraje i vhodnost substrátu (substrátová specifita).

Mykotoxiny mohou být obsaženy také ve sporách a částech prachu, které kontaminují životní a pracovní prostředí člověka. Při porušení zásad správné technologické praxe může dojít k profesionální expozici a ohrožení zdraví pracovníků (např. v mísících krmných směsí, v balících tropických a subtropických potravin). Stavební materiály na bázi celulosy mohou obsahovat spory zástupců rodu *Stachybotrys* produkujících trichoteceny a mohou být původci kontaminace prostřednictvím plic (inhalační). Obyvatelé žijící v prostředí těchto domů trpí iritací očí, pokožky, sliznic, mají ve zvýšené míře respirační obtíže, bolesti hlavy a zvýšenou únavnost. Spolu s dalšími mikromycetami (např. rod *Penicillium*) se předpokládá podíl *Stachybotrys* na vzniku únavového syndromu staveb (sick building syndrome).

Základní příčiny výskytu mykotoxinů v potravinách

Základními příčinami výskytu mykotoxinů v potravinách, jsou sklizeň vlhkých obilovin a jejich nevhodné skladování, technologické operace prováděné volně na vzduchu za nevyhovujících hygienických podmínek (vysoká vlhkost a teplota), použití zaplísněných surovin pro výrobu potravin, nevhodné uchovávání potravin v domácnosti (vlhkost, teplota), krmění zaplísněných krmiv (kontaminace mléka, vnitřností a masa). Ze stejných příčin také dochází k výskytu mykotoxinů v krmivech pro zvířata.

Řada plísní se může v napadených potravinách nebo jejich surovinách rozvíjet ještě při 15% obsahu vody, zatímco většina bakterií a kvasinek potřebuje pro svůj rozvoj alespoň 30 % vody. Do substrátu jsou mykotoxiny vylučovány zejména v rozsahu a_w 0,85 – 0,99, při teplotách -4 až 40 °C s optimem 20 – 30 °C.

Prevence - produkci mykotoxinů v zemědělských produktech a následně v potravinách se dá zabránit prevencí růstu jejich producentů. Vhodnou úpravou skladovacích prostor (vlhkost, atmosféra - řízená atmosféra). Vyloučením sekundární kontaminace a využitím vhodných konzervačních postupů (např. chemická inhibice růstu – k. propionová, mravenčí, octová).

Faktory ovlivňující tvorbu mykotoxinů v životním prostředí člověka

Za nepříznivých podmínek dochází ke kontaminaci pracovního a životního prostředí člověka sporami a následně osídlení prostředí, k růstu plísní a produkci mykotoxinů. Tato situace je umožněna **existencí zdrojů kontaminace** (Přítomnost spor v prostředí – existuje řada zdrojů např. zemědělská a průmyslová výroba, obytná zástavba se zahradami, čistírny odpadních vod, v domácnostech plesnivé potraviny či odpadky. Spory se ze zdrojů dostávají do prostředí klimatizací, okny, na oděvu a obuvi, na těle hmyzu.), **existencí vhodného substrátu**, dále **existencí vhodných podmínek pro osídlení** (Při nedostatečně zabezpečeném větrání a vhodné klimatizaci, při nesprávné regulaci vytápění a vlhkosti a při nadměrné vlhkosti v budovách. Ta je způsobena zatékáním vody, vzlínáním vlhkosti, netěsností spojů sanitárních rozvodů, při nevhodném chování člověka – praní a sušení prádla v bytech, nadměrné pěstování pokojových rostlin, vaření, nepřiměřené utěsnění větracích otvorů apod, a také při záplavách.), **nedodržováním vhodných hygienických podmínek a nedůsledným čištěním a dekontaminací pracovního a životního prostředí člověka.**

Toxicita mykotoxinů

Mykotoxiny lze rozdělit na **silně toxické** mykotoxiny (LD_{50} cca jednotky mg/kg.t.hm) to jsou např. aflatoxiny, patulin, T-2 toxin, ochratoxin A, **středně toxické** (LD_{50} cca desítky mg/kg.t.hm) jsou např. kyselina cyklopiazonová a sterigmatocystin a **slabě toxické** (LD_{50} cca stovky mg/kg.t.hm) např. trichoteceny nebo zearalenon. Jde o toxicitu pro laboratorní zvířata (potkan), která může být u stejného druhu zvířete ovlivněna věkem, pohlavím apod. **LD_{50}** je označení pro 50 % letální (smrtelnou) dávku toxinu, jež je schopna usmrtit přesně 50 % pokusných zvířat.

Pokud jde o expozici mykotoxinům, rozlišujeme **akutní jednorázovou expozici** (trvá obvykle 24 h, u inhalace 4 h) a **opakovanou expozici** (v dávce nižší než při akutní toxicitě) Mykotoxiny mohou vyvolávat **akutní**, po jednorázovém požití, a **chronické otravy** po opakovaném podání menších dávek. Významné jsou **pozdní účinky mykotoxinů**, za delší dobu po expozici, ty mohou být mutagenní, karcinogenní, embryotoxické, teratogenní, imunosupresivní a alergenní.

Degradace mykotoxinů

Mykotoxiny jsou látky značně stabilní, přesto je lze, ikdyž někdy s obtížemi, degradovat. Lze využít řadu fyzikálních, biologických a chemických metod **degradace mykotoxinů**, například aflatoxin lze degradovat zářením, teplem, silnými kyselinami a zásadami, amoniakem,

oxidačními látkami. V mléce ho denaturuje peroxid vodíku a riboflavin. Je třeba brát v úvahu mutagenní potenciál produktů těchto reakcí. Adsorbenty (bentonit, aktivní uhlí) lze využít k odstranění aflatoxinu a patulinu z tekutin. Patulin je stálý při nízkém pH, ale ne v přítomnosti větších kvant vit. C nebo bisulfitu. **Biodegradace mykotoxinů:** příkladem může být degradace aflatoxinu vlastním myceliem pomocí enzymu peroxidasa. Některé mikroorganismy *Flavobacterium*, *Candida lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* degradují patulin. Některé mykotoxiny degraduje mikroflóra bacheru a intestinální mikroflóra dalších zvířat.

V potravinách a potravinářských surovinách ale degradace mykotoxinů pozbývá smyslu, neboť pro výrobu potravin se nesmí použít zaplesnivělá surovina nebo surovina obsahující nadlimitní množství mykotoxinů. Řada degradačních metod pro potraviny ani nelze použít, došlo by k znehodnocení potravin po stránce sensorické nebo ke zničení nutričně či jinak významných látek. Produkty degradace mykotoxinů mohou být rovněž toxické.

Analytika mykotoxinů a limity v potravinách

Pro stanovení mykotoxinů můžeme využít především imunochemické metody (ELISA, RIA) a chromatografické metody (GC, HPLC, TLC, HPTLC) s využitím hmotnostní spektrometrie. Pro testování toxicity využíváme biologické metody např. testovací mikroorganismy (*Bacillus*, *Salmonella*) nebo tkáňové kultury (testy toxicity, mutagenity) pokusná zvířata (potkani – LD₅₀).

Pro významné mykotoxiny (aflatoxiny, ochratoxin A, patulin, deoxynivalenol, zearalenon, fumonisiny, T-2 a HT-2 toxin) jsou stanoveny limity příslušnými právními předpisy v rámci EU (Nařízení komise (ES) č. 1881/2006, 1126/2007 a 165/2010). Limity jsou v µg/kg v rozpětí od tisícovek až po setiny a tisíce v závislosti na druhu mykotoxinu a druhu a použití potravin nebo suroviny. Příslušné dokumenty jsou volně dostupné na internetu.

Významné mykotoxiny

Aflatoxiny jsou polycyklické, nenasycené, vysoce substituované kumariny. Je známo přibližně 20 typů aflatoxinů (B, D, G, M, P, Q, R, W). Jsou vysoce termostabilní s prokázanou karcinogenitou, největší akutní toxicitu má **AFB₁**, pak G₁, B₂ a G₂. Mezi hlavní toxické účinky patří hepatotoxicita, imunotoxicita, mutagenita, karcinogenita a teratogenita. Působí poškození jater i v nízké koncentraci. Mechanismus působení spočívá v blokádě

syntézy DNA, RNA a proteinů. Citlivá jsou především mláďata. Producenty jsou příslušníci rodu *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* aj.). Pro AFB₁ ale i AFG₁ a G₂ jsou dominantním substrátem olejnatá semena (ořechy, arašidy, pistácie aj), dále se aflatoxiny vyskytují v kukuřici a kukuřičných výrobkách, koření atd.

Plísně rodu *Aspergillus* tvoří aflatoxiny během růstu na vlhkých rostlinných krmivech (seno, sláma, zrní), napadají reprodukční orgány rostlin (např. kukuřice) už během vegetace a mohou se dále pomnožovat a produkovat aflatoxiny během sklizně a dalšího zpracování rostlinného materiálu na krmiva. Aflatoxiny B₁ a B₂ jsou v organismu dojnice hydroxylovány na aflatoxiny M₁ a M₂, které jsou vylučovány do mléka. Aflatoxin M₁ (AFM₁) je vázán na proteinovou frakci mléka. Proto mají sýry dokonce 3 – 5 x vyšší obsah AFM₁. K expozici AFM₁ u člověka spíše dochází především pitím mléka a konzumací mléčných produktů než požitím stravy kontaminované AFB₁. Významně mohou být postiženy zejména děti s vysokou spotřebou mléka a mléčných produktů, které mají relativně nízkou hmotnost, vykazují vysokou buněčnou aktivitu a zatím mají nedostatečně vyvinutý imunitní systém.

Optimální aktivita vody (a_w) je pro tvorbu aflatoxinů $a_w > 0,95$ (u *A. flavus* je spodní hranice $a_w > 0,82 - 0,84$). Maximální tvorba aflatoxinů u *A. flavus* a *A. parasiticus* je mezi pH 2,5 – 6,0. Zvýšený obsah CO₂ (> 20 %) a snížený obsah O₂ v kontrolované atmosféře snižuje tvorbu mykotoxinů, ale neovlivňuje růst *A. flavus*.

Ochratoxiny jsou obecně charakterizovány jako deriváty 7-izokumarinu vázané na aminokyselinu L-β-fenylalanin. Nejdůležitější je **ochratoxin A (OTA)**, který je fyzikálně i chemicky značně stabilní, dále např. ochratoxin B, C, D, α aj. Hlavní toxické účinky OTA jsou nefrotoxicita, imunotoxicita, mutagenita, karcinogenita, teratogenita, neurotoxicita. Jeho rezidua lze nalézt ve svalovině drůbeže a prasat. Producenty jsou rody *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. niger*, *A. glaucus* aj.) a *Penicillium* (*P. expansum*, *P. chrysogenum*, *P. verrucosum*, *P. commune* aj.). Kontaminují hlavně obilniny a výrobky z nich. V chladných oblastech produkují OTA plísně rodu *Penicillium* a to od 4 do 30 °C při relativní vlhkosti 22 %, v tropech pak spíše plísně rodu *Aspergillus* (*A. ochraceus* v rozmezí teplot 15 – 37 °C).

Citrinin - Producenty citrininu jsou plísně rodu *Penicillium* (*P. citrinum*, *P. expansum*, *P. viridicatum*, aj.) a *Aspergillus* (*A. terreus* aj.) a některé další. Je to silný nefrotoxin, poškozuje metabolismus jater, je karcinogenní, mutagenní, teratogenní, imunotoxický. Vyskytuje se v plesnivých krmivech a potravinách.

Patulin - Po chemické stránce jde o nenasycený lakton. Produkují ho hlavně plísně rodu *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssoschlamys* a *Paecilomyces* (nejdůležitější jsou *Penicillium expansum*, *P. griseofulvum*, *Aspergillus clavatus*, *Byssoschlamys nivea*). Má antibiotické

účinky, způsobuje poškození gastrointestinálního traktu, je imunosupresivní, mutagenní, neurotoxický. Karcinogenní a teratogenní účinky jsou diskutabilní. Bývá často detekován v obilovinách a ovoci - jablka, mošty, šťávy.) Teplota tvorby patulinu je u *P. expansum* a *P. patulum* (*P. griseofulvum*) při 20 – 25 °C, optimum pro tvorbu patulinu se pak předpokládá mezi pH 3 a 6,5.

Zearalenon je to resorcynocyklycký kaselý lakton. Není akutně toxický, ale má estrogení a anabolické účinky. Tvoří ho řada druhů rodu **Fusarium** (*F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. moniliforme* aj.) a **Giberella** (*G. zea*, *G. fujikuroi*). V obilovinách se vyskytuje již na poli nebo při skladování. Bývá často detekován v kukuřici, pšenici, žitu, čiroku, ječmeni a výrobcích z nich jako jsou mouka, pečivo, slad, pivo aj.

Deoxivalenol (vomitoxin) DON patří mezi mykotoxiny trichotecenové skupiny B a z hlediska způsobu biosyntézy mezi seskviterpeny. Producenty jsou plísně rodu **Fusarium** (*F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*). Akutní toxicita se projevuje střevními potížemi, zvracením, může vzniknout akutní DON toxikóza. Způsobuje hemoragie, kožní změny, gastrointestinální onemocnění, má i teratogenní a imunosupresivní účinky. Vyskytuje se v obilovinách a výrobcích z nich.

Sterigmatocystin je meziproductem syntézy AFB₁, jeho toxické účinky jsou podobné jen méně akutně toxické. Producenty jsou plísně rodu **Aspergillus** (*A. versicolor*, *A. flavus*, *A. parasiticus* aj.), *Chaetomium*, *Penicillium*, *Bipolaris*, *Emericella*, *Monocillium*, *Eurotium*. Vykazuje hepatotoxický, nefrotoxický, karcinogenní, mutagenní a teratogenní účinek. Výskyt v obilovinách, zelené kávě, tvrdých sýrech (gouda, eidam), koření, moštech – hroznový, grepový.

T-2 toxin - Patří mezi významné zástupce mykotoxinů trichotecenové skupiny A, z hlediska způsobu biosyntézy mezi seskviterpeny. Producenty jsou příslušníci rodu **Fusarium** (*F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. sporotrichoides* aj). Akutně je dermatotoxický (nekrózy kůže), má emetické účinky, způsobuje hemoragie. Dlouhodobě je imunotoxický, genotoxický, možný karcinogen. Bývá v obilovinách, koření a byl nalezen i v pivu.

Kyselina cyklopiazonová je to indolová tetramerická sloučenina. Producenty jsou plísně rodu **Aspergillus** (*A. flavus*, *A. versicolor*, *A. oryzae* aj.) a **Penicillium** (*P. camemberti*, *P. commune*, *P. griseofulvum*, *P. cyclopium*, *P. chrysogenum* aj). Působí nekrózy vnitřních orgánů jater, ledvin, kosterního svalstva, je to gastroenterotoxin, hepatotoxin, nefrotoxin, neurotoxin, mutagen, má i teratogenní účinky, působí embryotoxicky. Vyskytuje se v obilovinách, plísňových sýrech, drůbežím mase, vejcích. Kyselina cyklopiazonová, kterou

produkuje *P. camemberti*, je toxická v tak vysokých dávkách, které se při normální konzumaci sýra nedostanou do organismu člověka.

Fumonisin jsou to složité alifatické sloučeniny. Byla izolována celá řada fumonisinů a jejich metabolitů (A₁, A₂, B₁, B₂, C₁, C₂, P₁, P₂ aj). Dominantním je **fumonisin B₁**. Producenty jsou plísně rodu *Fusarium* (*F. moniliforme*, *F. proliferatum* aj). Fumonisin působí neurotoxicky, inhibují syntézu sfingolipidů vyskytujících se v nervové tkáni, postihují játra, plíce, ledviny, působí imunotoxicky, teratogenně, jsou možnými karcinogeny. Vyskytují se v potravinách na bázi kukuřice, v pивě, chlebu či koření.

Alternariové mykotoxiny - Jde o řadu mykotoxinů produkovaných plísněmi rodu *Alternaria* (*A. alternata*, *A. citri*, *A. solani*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, aj.). Jde především o kyselinu tenuazonovou, alternariol methylether, alternariol, altenuen, izoaltenuen a altertoxiny I – III. Po chemické stránce jde o dibenzo- α -pyrony (alternariol, altenuen, altenuisol aj), tetramické kyseliny (k. tenuazonová) a altertoxiny (altertoxin I – III). **K. tenuazonová** je nejvýznamnějším alternariovým mykotoxinem, je nejvíce akutně toxická, inhibuje syntézu proteinů, může způsobovat kardiovaskulární kolaps, vyvolává salivaci, anorexii, erytrémy, křeče, zvracení, tachykardii, gastrointestinální hemoragie a smrt. **Altertoxiny I - III** jsou rovněž vysoce akutně toxické, jsou mutagenní a cytotoxické. **Alternariol methylether** je slabě mutagenní, způsobuje nekrózy, je teratogenní a karcinogenní. **Alternariol** je cytotoxický (inhibuje buněčnou proliferaci), fetotoxický a teratogenní, má nízkou akutní toxicitu. Alternariové mykotoxiny se vyskytují v ovoci (jablka, citrusy, hrozny aj.) a zelenině (rajčata) a výrovcích z nich (šťávy a mošty, protlaky), v obilovinách (ječmen, oves, žito), ořechách, slunečnici a řepce. Optimální podmínky pro tvorbu mykotoxinů jsou při 25 °C a a_w 0,98.

Přehled nejvýznamnějších mykotoxinů, jejich producentů a potravin, ve kterých bývají často zjišťovány je uveden v tabulce č. 4.

Tab. 4: Výskyt a stanovované koncentrace mykotoxinů v potravinách (Malíř et al., 2003, upraveno)

Mykotoxin	Vybraní producenti	Potravina	Stanovené koncentrace
Aflatoxiny (zejména B1)	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Arašídny, ořechy, pekařské výrobky, ryby, pivo, vaječné výrobky	Jednotky až stovky μg/kg
Alternariové mykotoxiny	<i>Alternaria alternata</i>	Rajčata, protlaky, jablka, obilniny	Jednotky až stovky μg/kg
Deoxynivalenol	<i>Fusarium</i> spp.	Obiloviny a výrobky z nich	Setiny až desítky mg/kg
Fumonisin	<i>Fusarium</i> spp.	Kukuřice a kukuřičné výrobky	Jednotky až tisíce μg/kg
Kyselina cyklopiazonová	<i>Penicillium</i> spp.	Obiloviny, mléko, sýry, plísňové sýry	Jednotky až stovky μg/kg
Ochratoxin A	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium verrucosum</i>	Obiloviny a výrobky z nich, pivo, luštěniny, koření, vepřové maso a vnitřnosti	Stovky ng/kg až desítky μg/kg
Patulin	<i>Aspergillus clavatus</i> <i>Penicillium expansum</i>	Jablka a výrobky z nich, ovoce	desítky až stovky μg/kg
Sterigmatocystin	<i>Aspergillus versicolor</i>	Obiloviny a výrobky z nich, tvrdé sýry	Jednotky až stovky μg/kg
T-2 toxin	<i>Fusarium</i> spp.	Obiloviny a výrobky z nich, pivo, koření	Jednotky až stovky μg/kg
Zearalenon	<i>Fusarium</i> spp.	Obiloviny a výrobky z nich, koření, banány, slad, pivo	Jednotky až desítky μg/kg

3.3.1.3 Biokoroze – rozklad materiálů

Biokoroze (biodeteriorace) je každá změna vlastností materiálů způsobená životními pochody organismů. V procesu biokoroze se aktivně uplatňuje **biodeteriogen** (organismus působící nežádoucí změny materiálu) a pasivně technický materiál, který může, ale nemusí, být substrátem, tedy zdrojem živin. Biodeteriativní (rozkladná) aktivita mikromycet způsobuje značné ztráty při houbové (fungální) korozi předmětů, průmyslových výrobků a materiálů. Na **rozkladu dřeva** a jiných materiálů rostlinného původu se mohou podílet mikroskopické houby vykazující celulytickou aktivitu (např. rod *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Stachybotris*, *Penicillium* aj.), rozloženou celulosu využívá například *Mucor*, nebo houby se schopností rozkládat lignin např. rod *Humicola* a *Phialophora*. Suchou hnilobu dřeva, které přichází do kontaktu s půdou, pak způsobují celulytické askomycety rodu *Chaetomium*, *Fusarium*, *Paecilomyces* a *Trichoderma*. Mikroskopické houby se mohou podílet i na **biokorozi anorganických materiálů**. Mezi zástupce patří *Alternaria tenuis*, *Cladosporidium cladosporioides*, *Alternaria* sp., *Aspergillus*, *Penicillium*, *Verticillium* a další. Hyfy hub mohou pronikat do pórovitého systému stavebních materiálů. Mnohdy můžeme pozorovat prorůstání houbových vláken do zděné konstrukce z napadeného dřeva apod.; zdroj organických látek tedy může být i mimo anorganický stavební materiál. Mikromycety se mohou vyskytovat i na omítkách s převahou anorganických látek, za přítomnosti stop organických látek znečišťujících omítku. Korozní nebezpečí, které houby představují pro stavební materiály, je spojeno především s organickými kyselinami, jež produkují – s kyselinou šťavelovou, vinnou, jantarovou, octovou atd. Ty reagují s některými složkami stavebních materiálů a rozkládají je. Roli hraje samozřejmě i mechanické působení mycelia na napadený materiál.

3.3.1.4 Plísně v budovách

Z vláknitých mikromycet se ve vzduchu **venkovního prostředí** i vnitřního **prostředí budov** často vyskytují, mikromycety rodu *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Penicillium*, *Mucor* a *Rhizopus*, setkáváme se s nimi pod označením „**indoor fungi**“ a „**outdoor fungi**“. Člověk je zde vystaven různým faktorům vnitřního prostředí s následným negativním vlivem na zdraví obyvatel tzv. „**building-related illnesses**“ (BRI). BRI jsou onemocnění alergická, infekční, způsobená toxickou nebo zánětlivou reakcí vyvolanou mikroorganismy přítomnými ve vnitřním prostředí budov. Souhrn zdravotních problémů, nepříjemných pocitů a celkového diskomfortu v souvislosti s pobytem v určitých budovách je známý jako **syndrom nezdravých (nemocných) budov** „**sick building syndrome**“. Na

vzniku tohoto syndromu se mohou významně podílet také mikroskopické houby. Houby kolonizují zejména vodou poškozené stavební materiály, přičemž mohou produkovat detekovatelné množství mykotoxinu (obvykle až 2/3 kultivovatelných izolátů). Tyto aerosolují v úlomcích a otěrech z materiálů, prachových částicích (většina z nich v respirabilní velikosti schopné dosáhnout až do plicních alveol). Tzv. **první kolonizátoři vnitřního prostředí** (aspergily a penicilia) jsou všudypřítomné vzdušné houby a molekulárně-epidemiologické studie prokázaly jejich vysokou korelaci s izoláty z vnějšího prostředí. **Sekundární** (kladosporia, alternárie a chetomia) a **terciární kolonizátoři** (fusária, akremonia, kvasinky) snadno rostou na různých stavebních materiálech v optimálních tepelně-vlhkostních podmínkách, díky silné biodegradační aktivitě.

Při rozkladné činnosti mohou vznikat **volatilní toxické látky (VOC)**. Jde o těkavé organické látky, které jsou indikátorem matabolické aktivity a růstu mikroskopických hub (Různé typy alkoholů, ketonů, aldehydů, eterů, esterů a terpenů. Na plísňovém zápachu se podílí zejména 2-methyl izoborneol a 2-metoxy-3-izopropyl pirazin a geosmin). K silným producentům VOC patří *Aspergillus* (např. *A. versicolor* produkuje nepříjemně páchnoucí ethylhexanol), *Cladosporium* a *Penicillium*. Aspergily a penicilia produkují zejména 2-ethylhexanol, cyklohexan a benzen. Houbové VOC způsobují při zvýšené koncentraci (od 250 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ dráždění a otoky dýchacích cest a *in vitro* působí cytotoxicky. Těkavé látky mohou u člověka vyvolávat **bolesti hlavy, dráždit oči, sliznice nosu, uši či vyvolávat únavu**. Na tyto látky vzniká přecitlivělost a mohou působit jako alergeny.

3.3.1.5 Další příklady negativního působení mikromycet

Mikroskopické houby osidlují rovněž **vodní prostředí** a člověk se s nimi může dostat do kontaktu i v tomto prostředí. Ve vodním prostředí se vyskytují dvě skupiny hub, z nichž první skupina prodělává celý svůj životní cyklus ve vodním prostředí (např. odd. *Chytridiomycota*) a druhá skupina půdních hub se vyskytuje ve vodách ve formě spor, kam se dostávají splachy či vymýváním z půdy. Z hub, které se do povrchové vody dostávají s odpady, na rostlinném materiálu, s půdou apod. jsou to např. *Mucor*, *Fusarium* či *Penicillium*. Z kvasinek se vyskytují např. *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Debaryomyces hansenii*. Hygienický význam mají kvasinky rodu *Candida*, jelikož mají vysokou rezistenci vůči chloru a dalším desinfekčním prostředkům a které se mohou vyskytovat ve vodě z koupališť a bazénů a na vodou smáčených plochách, jako jsou rošty či podlahy. Voda v přírodních i umělých koupalištích, v bazénech a samozřejmě voda pitná je sledována i po mikrobiologické stránce a platí pro ni legislativou stanovená kritéria.

Parametry pro mikromycety zde však stanoveny nejsou. Přesto je vhodné vyskyt některých sledovat, zvláště počty výše zmíněných kvasinek rodu *Candida*.

Nepřímo člověka v negativním slova smyslu ovlivňují mikroskopické houby také jako původci mnoha ekonomicky významných **chorob rostlin**. Napadené rostliny mají nízkou produkci nebo úplně hynou. To samozřejmě negativně ovlivňuje produkci potravin a krmiv pro hospodářská zvířata. Tyto houby byly také příčinou rozsáhlých hladomorů se všemi jejich negativními důsledky a zasáhly tak výrazně do dějin lidstva. Z významných fytopatogenů lze jmenovat *Synchytrium endobioticum* původce rakoviny brambor, mikromycety rodu *Puccinia* způsobující rzi na obilí a jiných rostlinách, druhy rodu *Ustilago* působící sněti, fusária působící fusariózy či *Claviceps purpurea* – paličkovici nachovou – námel, vyskytující se na obilí a produkující toxické námelové alkaloidy. *Phytophthora infestans* původce plísně bramborové byla rovněž řazena mezi houby, dnes se odd. *Oomycota*, kam tento mikroorganismus patří, řadí do říše *Chromista*. Podobně jako u člověka jsou mikromycety příčinou chorob i u zvířat. Jsou to mnohdy stejné druhy a působí onemocnění podobného charakteru.

3.3.1.6 Boj proti nežádoucím mikromycetám

V boji proti nežádoucím mikromycetám můžeme využít, **fyzikálních prostředků**, mezi něž počítáme rovněž prostředky mechanické, **chemických a biologických prostředků** a jejich vzájemných kombinací. Mezi **mechanické prostředky** patří odstraňování prachu, nečistot, zbytků organického materiálu, vhodný způsob ventilace popř. klimatizace s využitím vhodných filtrů, působení elektrického pole či záření. Mechanické prostředky se často s výhodou kombinují s prostředky chemickými a fyzikálními. Další **fyzikální způsoby** desinfekce využívají účinků vysokých teplot ať již za atmosférického tlaku (var ve vodě po dobu 30 minut, v mycích a pracích přístrojích při teplotě 90 °C, proudící horký vzduch v horkovzdušných sušárnách 60 až 20 min. při 160 - 180 °C) či v tlakových nádobách (autoklávy – var po dobu 20 resp. 10 minut při 121 – 134 °C), působení UV záření (germicidní účinky zářivky 253,7 – 264 nm), ionizujícího záření, ultrazvuku, filtrace, přímého působení plamene (žhání) apod. U **fyzikálně-chemických metod** jde o kombinaci využití teploty a desinfekčních přípravků v mycích, pracích a čistících přístrojích při teplotě 60 °C s desinfekčními přípravky nebo využití formaldehydové desinfekční komory na desinfekci textilu, kožešin, umělohmotných předmětů.

Chemické prostředky jsou ve formě roztoku, aerosolu, pěny, které působí na mikroorganismy ve stanovené koncentraci a po požadovanou dobu. Vybírají se podle

následujících požadavků: desinfekční účinnost (fungicidní), doba působení, vliv na desinfikovaný materiál a prostředí, způsob použití, zápach, toxicita a dráždivost pro člověka a živočichy, zanechávání toxických reziduí, vhodné balení, dávkování, skladování, stabilita, biodegradabilita, finanční náročnost. Účinnost je potřeba kontrolovat. Používají se jako preventivní přípravky, desinfekční přípravky nebo konzervační přísady. Na mikroskopické houby (kvasinky a plísně) působí desinfekční přípravky přímým kontaktem s povrchovými strukturami buněk, průnikem buněčnou stěnou nebo membránou, nebo reakcí s nukleovými kyselinami, bílkovinami a enzymy. Fungicidní účinky mají například **sloučeniny boru** (užívané při ochraně dřeva a lignocelulosových materiálů proti dřevokazným houbám v kombinaci s fluoridy (sločeninami dvoumocné mědi a šestimocného chromu), **sloučeniny mědi nebo stříbra**. Z organických fungicidů jsou to **alkoholy, aldehydy** (formaldehyd, glutaraldehyd aj.), **deriváty močoviny** (používají se jako přísady do různých materiálů ve stavebnictví), **fenoly** (obtížně biodegradovatelné, rezidua jsou alergeny), **kvarterní amonné soli, organické kyseliny** (octová, propionová, sorbová, benzoová aj.), **organické sloučeniny obsahující dusík** (využívají se jako přísady do desinfekčních, preventivních přípravků, přísady do nátěrů a stavebních hmot – triaziny, imidazoly aj), **organické sloučeniny mědi a zinku** (k prevenci v ochraně dřeva, textilu a stavebních materiálů), **organické sloučeniny obsahující síru** (přísady do stavebních hmot, technických kapalin a papíru), **organické sloučeniny obsahující dusík a síru** (využití v průmyslu a stavebnictví – dithiokarbamáty, izothiazoly, thiazoly aj).

3.3.2 Pozitivní význam mikroskopických hub

Mikroskopické houby nemají jen negativní význam pro člověka, ale nacházejí své využití v mnoha odvětvích lidské činnosti. V následující kapitole je uveden stručný výčet nejdůležitějších možností využití těchto mikroorganismů.

Pozitivní význam plísni spočívá ve výrobě **antibiotik**, příkladem může být penicilin produkovaný *Penicillium chrysogenum* či cephalosporin produkovaný *Acremonium chrysogenum*, **enzymů** nacházejících využití v celé řadě průmyslových odvětví např. amylasy, celulasy, invertasy, lipasy, proteasy aj. Producenty těchto a jiných enzymů jsou plísně rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a další. Významná je rovněž produkce **organických kyselin** zejména kyseliny citronové, k jejíž průmyslové výrobě se využívá *Aspergillus niger*. Plísně se využívají i k provádění specifických oxidací. Tradičně se některé plísně využívají při **výrobě fermentovaných potravin**. V našich podmínkách jde přadevším o sýry. Z hlediska růstu plísni rozlišujeme sýry s plísní na povrchu jako je Brie, Camembert, Hermelín, při jejichž

výrobě se využívá *Penicillium camemberti* (někdy se lze na obalech sýrů setkat s označením *P. candidum* – jde pravděpodobně jen o mutanta *P. camemberti*, nikoli o samostatný druh) a sýry s plísní v těstě, např. Roquefort, Gorgonzola nebo Niva, pro jejichž výrobu se využívá *Penicillium roqueforti*. Dnes existují i sýry s kombinacemi obou plísní např. Vltavín. Při výrobě sýrů se používá syřidlo (renin) které může být vyrobeno pomocí *Rhizomucor miehei* či *Mucor pusillus*. Plísně se využívají také při výrobě tepelně neopracovaných fermentovaných masných výrobků jako je např. Uherský salám, Fuet, Křemešník. Při výrobě těchto výrobků dochází na jejich povrchu k nárůstu plísňového pokryvu. Využívají se plísně *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium nalgiovense* a další. Při výrobě přívlastkových vín (botrytické výběry, Tokajské, Sauternské) se uplatňuje *Botrytis cinerea*, která porůstá bobule hroznů a rozkládá v nich přítomné kyseliny, taninové látky, urychluje vypařování vody a zvyšování obsahu cukru. Vína z takových hroznů mají velmi specifické a nezaměnitelné vlastnosti a jsou velmi ceněna. V jiných částech světa zvláště v Asii se vyrábí řada potravin, při jejichž výrobě hrají plísně významnou roli. Příkladem může být miso (fermentovaná kaše z rýže nebo soji, kde se při výrobě využívá *Aspergillus oryzae* a kvasinky) a saké (japonské rýžové víno vyráběné pomocí *A. oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae* a bakterie *Lactobacillus sake*). Plísně se využívají v **ochraně rostlin** v boji proti patogenním houbám (proti námelu *Claviceps purpurea* se využívá *Fusarium roseum*), plevelům (proti vodnímu hyacintu v tropických vodách se využívá *Acremonium zonatum*) a škůdcům (proti mouchám a mšicím lze využít plísně rodu *Verticillium*). Plísně lze využít také pro **čištění odpadních vod, bioremediaci půdy a dekontaminaci půdy**.

Také kvasinky se využívají v různých průmyslových odvětvích. Hlavním průmyslovým významem je **výroba alkoholických nápojů, ethanolu** (z brambor či obilí) a **pekařského droždí** (*Saccharomyces cerevisiae*). Kvasinky se využívají také při kvasné **výrobě ethanolu** fermentací odpadních materiálů (sulfitové louhy, apod.). **Vyšší alkoholy** (přiboudliny) získávané při rafinaci kvasného lihu se používají jako rozpouštědla laků. Kvasinky produkují vitaminy skupiny B a využívají se tedy pro výrobu **léčivých výživných preparátů** s obsahem vitamínu B (Pangamin). **Autolyzáty a extrakty z kvasinek** se využívají jako přísady do potravin (polévky, omáčky, polévkové koření) a živných půd pro mikrobiologii. Kvasinky *Candida utilis* se využívá na **výrobu krmného droždí** jako zdroje bílkovin pro hospodářská zvířata, pro výrobu se používají tradiční substráty (melasa, sulfitové louhy, sláma, syrovátka, škrobárenské odpady) nebo netradiční (n-alkany). Z buněk kvasinek se **izoluje řada látek** enzymů, koenzymů, nukleotidů atd., radioaktivní sloučeniny tohoto typu se připravují z *Candida utilis* pěstované na půdě s radioaktivní sacharosou. *S. cerevisiae* se používá na

výrobu ergosterolu (provitamin D), ten se izoluje z buněk, po ozáření UV se mění na vitamin D. K **produkci karotenoidů a tuků** lze využít některé kvasinky rodu *Rhodotorula*. Kvasinky lze použít i na **výrobu glycerolu**.

4 ZÁKLADY KINETIKY RŮSTU MIKROORGANISMŮ A TVORBY JEJICH PRODUKTŮ

Pro kvantitativní popis fermentačních procesů je potřeba znát a sledovat kinetiku reakcí. Dominantní roli zde hraje kinetika růstu mikroorganismů. Znalosti o kinetice reakcí lze pak využít pro matematické modelování, optimalizaci a řízení procesů.

4.1 Růst mikroorganismů

Mikroorganismy se za optimálních podmínek rozmnožují obrovskou rychlostí. Generační doba (čas, za který se zdvojnásobí počet buněk v kultuře) je u bakterií za optimálních podmínek asi 20 min. Za 48 h by tedy vzniklo asi $2,5 \times 10^{43}$ buněk tj. asi 4000 násobek hmoty Země. Toho však nelze dosáhnout, protože dostupné živiny se postupně vyčerpají a produkty metabolismu působí inhibičně na růst mikroorganismů.

Mikrobiologické procesy mají na rozdíl od chemických některé zvláštnosti:

Kromě běžných koncentrací známých i z chemické kinetiky vystupují v mikrobiologických rychlostních rovnicích zvláštní veličiny - **počet jedinců – buněk**. Chemický proces lze rozdělit na elementární stupně, jejichž rychlosti závisí na dynamických proměnných poměrně jednoduchým způsobem, většinou nelineárně. Tyto funkce lze vyjádřit polynomy relativně nízkého stupně. **V mikrobiologii je elementárním procesem enzymatická reakce**, jejíž rychlost závisí na koncentraci vstupních látek nepolynomiálně. V chemii jsou právě autokatalytické reakce poměrně vzácné, v popisu rozmnožování mikroorganismů je naopak **autoreprodukce (autokatalýza) základním typem kinetického pochodu**. **V mikrobiologii existuje daleko větší prostorová heterogenita než v chemii**, systém je rozčleněn na jednotlivé reakční prostory, oddělené semipermeabilními membránami. V běžných chemických procesech je počet molekul, účastnících se reakcí velký. **V mikrobiologických systémech může být tento počet podstatně menší. Biologické reakce jsou podstatně složitější než chemické, především co se týče jejich regulace**. Z hlediska kinetiky to však zcela neplatí. **Je možné počet reakcí podstatně a účelně snížit na základě kriteria**

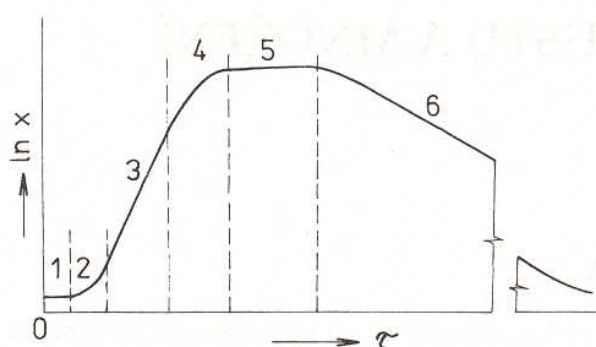
jednoduchosti na takový počet, který nutný a dostačující pro popis systému. Je to dáno tím, že se jedná většinou o **následné reakce (časová hierarchie)**, ze kterých se dá určit reakce řídící.

Podle podmínek kultivace mikroorganismů rozlišujeme dva základní procesy **jednorázovou** – statickou (vsádkovou) kultivaci a **kontinuální kultivaci**.

4.2 Jednorázová kultivace

Tento typ kultivace se vyznačuje následujícími charakteristickými vlastnostmi.

- Růst mikroorganismů probíhá v prostředí, jehož vlastnosti se mění v závislosti na životní činnosti buněk.
- Množení nemá trvale vzestupnou tendenci – probíhá ve fázích vzestupu a poklesu.
- Systém je uzavřený – buňky i jejich metabolické produkty jsou po celou dobu kultivace v uzavřeném prostředí.
- Limitujícími faktory jsou zde především vyčerpání živin a nahromadění metabolitů.
- Růst mikroorganismů je charakterizován **růstovou křivkou** viz obrázek č. 2 (má sigmoidní tvar nebo tvar J – což je v podstatě neúplná sigmoida). Na ose x je čas kultivace na ose y logaritmus počtu živých buněk. Z této křivky je zřejmé, že po počáteční stagnaci nastává nárůst mikroorganismů, který po vyvrcholení počíná klesat. Přírůstek ani úbytek není rovnoměrný, v některých úsecích je rychlejší a v některých pomalejší. Tyto úseky vymezují na křivce růstové fáze.



Obr. 2: **Růstová křivka** (Šilhánková, 2002)

τ - doba (h), x - počet živých buněk v 1 ml, 1 - lag fáze, 2 - fáze zrychlujícího se růstu, 3 - exponenciální fáze, 4 - fáze zpomalujícího se růstu, 5 - stacionární fáze, 6 - fáze odumírání

4.2.1 Fáze růstové křivky

Lag fáze (přípravná fáze – adaptační)

Buňky se prakticky nerozmnožují, zvětšuje se jejich objem a aktivuje se jejich enzymový systém. Jejich počet se může často snižovat odumíráním starších a méně životaschopných buněk. Délka této fáze je závislá na druhu mikroorganismu, fyziologickém stavu buněk, velikosti inokula. Zkrácení této fáze lze dosáhnout optimálním množstvím inokula (5 – 10 % obj.) - nejlépe v exponenciální fázi růstu a ze stejného média.

Fáze zrychleného růstu (akcelerační)

Kultura je přizpůsobena podmínkám prostředí. Rychlost růstu převyšuje rychlost množení – buňky jsou větší než v jiných fázích. Tato fáze je ovlivněna fyziologickým stavem inokula. Buňky jsou citlivé na změny prostředí.

Fáze exponenciální – logaritmická

Je charakterizována intenzivním množением buněk, jejichž počet nerůstá geometrickou řadou. Generační doba je nejkratší a během fáze se nemění. Metabolismus je velmi aktivní, substrát je rychle vyčerpáván. Proces ještě není limitován nedostatkem živin. Úbytek odumíráním je v poměru k přírůstku minimální. Limitujícími faktory jsou především druhové vlastnosti kultury, povaha prostředí a teplota kultivace. Toto je nejdůležitější fáze. Přeneseme-li buňky v této fázi do nového kultivačního média o stejném složení, pokračují v množení se stejnou generační dobou bez zřejmé lag-fáze.

Růst bakterií v logaritmické fázi je obvykle charakterizován pomocí tzv. **růstových konstant**.

Matematicky lze růst vyjádřit rovnicí (1)
$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

z rovnice vyplývá, že rychlost růstu a množení bakterií je v kterémkoli časovém okamžiku úměrná množství mikroorganismů. Rychlostní konstanta μ – **specifická růstová rychlost** je rychlost při jednotkové koncentraci mikroorganismů, při $x = 1$.

Při integraci této rovnice obdržíme (2)

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t$$

x = konečné množství buněk, x_0 počáteční množství, v časovém úseku t . Převedením na dekadické logaritmy nabude rovnice tvaru

$$\log x = \frac{\mu t}{2,302} + \log x_0$$

z rovnice (2) vyplývá, že

$$\ln(x/x_0) = \mu t$$

$$x = x_0 e^{\mu t}$$

Další parametry vyjádřeny pomocí μ jsou:

Generační doba T neboli doba zdvojení biomasy.

$$T = \frac{\ln 2}{\mu}$$

nebo jinak

$$T = \frac{t \cdot \log 2}{\log x - \log x_0}$$

počet generací n je dán poměrem $x/x_0 = e^{\mu t}$

$$x/x_0 = 2^n$$

$$n = \frac{\log x - \log x_0}{\log 2}$$

V souvislosti s hodnocením exponencionální fáze je třeba se zmínit o **vlivu limitujícího prvku**. Limitujícím je takový prvek, sloučenina, faktor, který v daném rozmezí jednotek (např. koncentrace) přímo ovlivňuje rychlost růstu mikroorganismů nebo rychlost syntézy produktu. Všechny ostatní látky v médiu jsou v koncentracích větších než limitující. Mezi měrnou rychlostí růstu a koncentrací limitujícího elementu existuje vztah, který je označován jako **Monodův vztah**. Tento vztah je v technické mikrobiologii používán ve tvaru

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S}$$

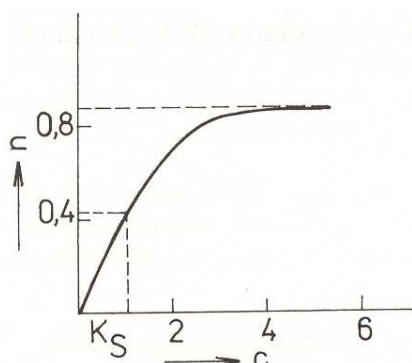
μ_{\max} = maximální růstová rychlost

S = koncentrace substrátu

K_S = substrátová neboli saturační konstanta

Grafickým vyjádřením je hyperbola.

Saturační konstanta (Obr. 3) je taková koncentrace substrátu, při níž je dosaženo specifické růstové rychlosti rovné polovině maximální růstové rychlosti.



Obr. 3: Vliv koncentrace tryptofanu na rychlost růstu mutanta *E. coli*, vyžadujícího tryptofan (Šilhánková, 2002)

c – koncentrace tryptofanu (ng/ml), n – počet generací za 1 h, K_s – saturační konstanta

Zpomalení rozmnožování na konci exponenciální fáze nebo jeho úplné zastavení může být způsobeno jednak vznikem zplodin metabolismu, které inhibují množení, jednak vyčerpáním živin, nejčastěji jde o vyčerpání té živiny, která je v médiu v relativně nejnižší koncentraci. **Celkový nárůst G** jehož je dosaženo, je lineární funkcí výchozí koncentrace této limitující živiny c tedy :

$$G = Kc$$

K je výtěžková konstanta neboli výtěžnost mikroorganismu na dané živině. Udává tedy kolik g sušiny biomasy se vytvoří z 1g živiny, a je konstantní v průběhu celé růstové křivky. Vztah platí pro cukry, zdroje dusíku, fosforu a pro ty látky (vitaminy, aminokyseliny), které daný mikroorganismus není schopen syntetizovat. Přitom je ovšem K pro každou z těchto sloučenin u daného mikroorganismu odlišné. Lineární vztah mezi nárůstem a koncentrací limitující živiny umožňuje stanovit koncentraci vitamínu nebo jiné růstové látky v potravinách z nárůstu vhodného auxotrofního mikroorganismu vyžadujícího tuto látku.

Fáze zpomaleného růstu (deklinální)

Postupné zpomalování množení i celkového metabolismu. Rychlost množení se zpomaluje – narůstá počet odumírajících buněk. Postupně se vyčerpávají živiny a hromadí se metabolity. Dochází rovněž ke změnám pH, redox potenciálu aj., jež působí nepříznivě.

Fáze stacionární

Vyrovňuje se počet odumírajících buněk s přirůstajícími. Rychlost množení je nulová. Množení buněk dochází maxima. Koncentrace mikroorganismů je konstantní. Tvoří se endospory sporulujících mikroorganismů (*Bacillus*, *Clostridium*).

Pro některé fermentace je tato fáze nejdůležitější – dochází k největší produkci žádaných metabolitů (sekundárních metabolitů). Dosažení maximální koncentrace mikroorganismů v této fázi závisí na současně působících faktorech: na koncentraci energetického a uhlíkatého zdroje, na koncentraci O₂ v médiu, zdrojích dusíku, stopových prvcích, růstových faktorech, pH atd. Limitní je především dodávka živin.

Fáze zrychleného odumírání

Úbytek buněk převládá čím dál více nad přirůstkem. Podmínky prostředí se zhoršují. Koncentrace živin je snížena pod kritickou hladinu snižuje aktivitu metabolismu. Odbourávají se zásobní látky a nastává hromadné odumírání buněk.

4.2.2 Způsoby průmyslové jednorázové kultivace

Statická neboli stacionární kultivace

Dedná se o kultivaci probíhající v klidovém, nehybném prostředí (např. na Petriho misce, v kultivační baňce). Mikrobiální kultura se ponechá inkubovat při určité teplotě po danou dobu. V průmyslovém měřítku lze využít např. povrchovou kultivaci.

Povrchová kultivace

Provádí se dvěma způsoby:

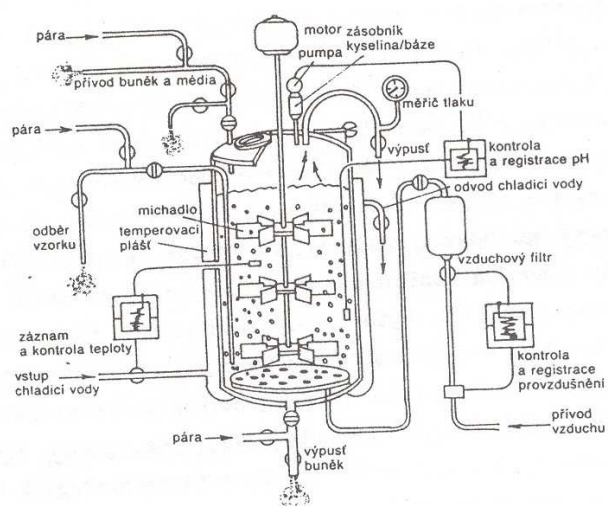
- Pro vlastní fermentaci se používají podlouhlé perforované nádoby s polotuhým médiem (v 1-10 cm vrstvě), které se po zaočkování umístí v místnosti s kontrolovanou teplotou a vlhkostí.
- Kultivace v pomalu se otáčejících bubnech s kontrolovanou teplotou a vlhkostí (vyvinuto v Japonsku) – především při výrobě plísňových enzymů – lepší výtěžnost než při submersní kultivaci.

Médium se připravuje smícháním otrub s vodou a přídatnými živinami. Po sterilizaci se přenese do nádob. Není možné zabránit sekundární kontaminaci, proto se očkují vysoké dávky inokula, aby nedošlo k přerůstání kontaminující mikroflórou. Maximální enzymová aktivita po 24 - 72 h kultivace.

Výhody této metody jsou snadné čištění enzymových preparátů a vyšší výtěžnost. Metoda má ale i své **nevýhody**, je potřeba velkých prostor, jde o způsob náročný na pracovní síly, hrozí nebezpečí sekundární kontaminace.

Submersní kultivace

Submersní znamená ponořený, hloubkový. Médium se zaočkovaným mikroorganismem je promícháváno pohybem nádoby, míchacím zařízením nebo vlivem proudění sterilního vzduchu přiváděného do nádoby. Mikroorganismy tak mnohem efektivněji využívají živiny a intenzivněji se množí. V průmyslových aplikacích se využívají nádoby **fermentory** – **bioreaktory** (Obr. 4) o různém objemu 5 – 200 m³ (i 3000 m³), využívá se 80 % objemu. Prostor fermentoru musí být sterilizovatelný. Médium se sterilizuje ve fermentoru. Nutná aerace se provádí za aseptických podmínek. Doba fermentace 12 –140 h v závislosti na organismu a produktu.



Obr. 4: Fermentor (bioreaktor) pro aerobní kultivaci (Vodrážka, 1991)

4.3 Kontinuální (průtoková) kultivace

Spočívá v nepřetržitém pomalém přítoku živin ke kultuře za současného nepřetržitého odbírání části kultury. Tím je zajištěn dostatek živin, zředění nepříznivě působících metabolitů. **Prostředí je ve stavu dynamické rovnováhy.**

Zředovací rychlost

$$D = \frac{Q}{V} \quad (\text{h})$$

Q – hodinový přítok (objem přitékající kapaliny konstantního složení za hodinu)

V – objem kultury

Doba zdržení ($1/D$ převrácená hodnota D) udává dobu (h), za kterou se vymění celý objem kultury.

Kdyby D (zředovací rychlost) byla vyšší než **specifická růstová rychlost (μ)**, buňky v kultuře by ubývaly (vyplavovaly) a po určité době by vymizely úplně. Proto musí být $D \leq \mu_{\max}$. Stálý přítok média a odtok metabolitů zajišťuje růst v prakticky stejných podmínkách - ve **fyziologicky ustáleném stavu**. Tento systém je možné považovat za otevřený neboť ve stavu **dynamické rovnováhy** ($D = \mu$) lze bakterie udržovat neomezeně dlouho.

Toho lze dosáhnout dvěma způsoby:

V turbidistatu tedy na základě udržování stálé koncentrace buněk. Kultura roste maximální rychlostí, všechny živiny jsou v nadbytku. Zařízení je vybaveno kontinuálním stanovením počtu mikroorganismů (turbidimetrickou metodou). Přítok živin je regulován podle hustoty buněk (je-li vyšší růstová rychlost - více buněk – zvýší se přítok nového média).

V chemostatu tedy na základě kontroly chemických charakteristik. Regulace procesu konstantní koncentrací substrátu. Rychlost je limitována nízkou koncentrací jedné živiny.

Při kontinuální kultivaci se musí $\mu = D$. Dojde-li k porušení rovnováhy a $D > \mu$ počet buněk v systému bude klesat, koncentrace substrátu se bude zvyšovat až do ustavení rovnováhy charakterizované vyšší koncentrací substrátu a nižším počtem buněk. Bude-li $D < \mu$ budou mikroby dokonaleji využívat substrát a zvyšovat počet buněk. To ale vyvolá nedostatek substrátu a snížení růstové rychlosti. V systému se vytvoří nový ustálený stav, hodnoty veličin se vyrovnají. Tato vlastnost kontinuálního systému se označuje jako **autoregulační schopnost**.

Kontinuální kultivace může být **homokontinuální** – kultura je v důsledku intenzivního míchání v celém objemu homogenní (může být jednostupňová nebo vícestupňová) nebo **heterokontinuální** – složení kultury je prostorově různorodé (př. tubulární uspořádání). Princip **kontinuální kultivace v jednostupňovém systému** je následující. Tato kultivace začíná obdobně jako vsádková inokulací média, ve vhodném okamžiku se započne s přítokem média, kultura se už většinou nepřivádí. S přítokem média je vhodné započít v exponenciální fázi kdy je kultura nejaktivnější. U tohoto způsobu je možno pracovat v podmínkách

odpovídajících exponenciální fázi, případně fázi zrychleného nebo zpomaleného růstu. **Vícetupňová kultivace** využívá se například pro biosyntézu substancí produkovaných způsobem nespojeným s růstem, kdy se dosáhne vysoké koncentrace buněčné hmoty v prvním stupni a ta potom v dalších stupních katalyzuje tvorbu produktu. Nejznámější jsou tzv. **kaskády bioreaktorů**.

Základ kontinuálních procesů byl položen ve 20. letech minulého století, kdy se započalo s výrobou krmného droždí kontinuálním způsobem. **Produktivita těchto systémů je vyšší než u vsádkových**. Kontinuální kultivace se využívá pro **lihovarské a pivovarské kvašení, pro výrobu krmného droždí, při výrobě octa, čištění odpadních vod** atd. U výroby pekařského droždí se nepoužívá (vede k rychlému hromadění kontaminace o vyšší specifické rychlosti růstu).

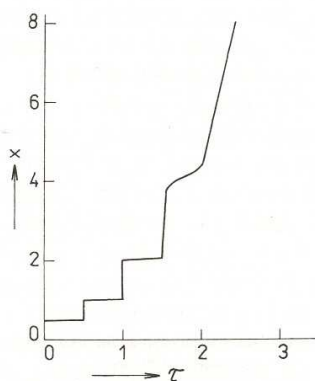
4.4 Synchronizované kultury

Využívají se pro studium fyziologických a biochemických vlastností buněk určitého úseku buněčného cyklu (např. počátek replikace DNA). Všechny buňky jsou ve stejné fázi buněčného cyklu. Přesné synchronizace lze dosáhnout jen pro první 2-3 dělení (Obr. 5).

Synchronizace lze dosáhnout:

Fyziologickými metodami – např. působením vratných inhibitorů určitého stupně buněčného cyklu (hydroxymočovina inhibuje syntézu DNA), nebo přenesením kultury na určitou dobu do nízké teploty.

Mechanicky – oddělením mladých malých buněk centrifugací nebo filtrací.



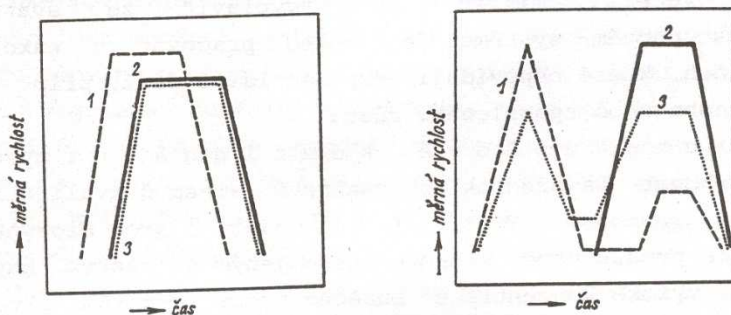
Obr. 5: **Růstová křivka synchronizované kultury *E. coli***. τ - doba (h), x – počet buněk v 1 ml ($\times 10^6$) (Šilhánková, 2002)

4.5 Rozdělení fermentačních procesů

Fermentační procesy můžeme rozdělit podle různých hledisek, především podle vztahu mezi spotřebou substrátu a tvorbou produktů a podle typu reakcí.

Podle vzájemných vztahů **rychlosti tvorby produktu, syntézy biomasy a spotřeby substrátu** můžeme charakterizovat tři hlavní typy vztahů:

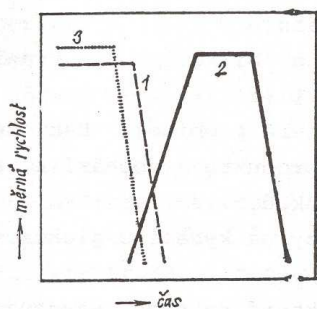
- **Syntéza produktů probíhá paralelně s úbytkem zdrojů uhlíku.** Typické pro anaerobní metabolismy. (Produkce ethanolu kvasinkami a kys. mléčné BMK, růst je zcela závislý na schopnosti mikroorganismů získávat energii glykolýzou - Obr. 6 a).
- **Syntéza produktů probíhá v několika fázích:** nejprve se tvoří biomasa, potom pomalu začíná syntéza metabolitu, přičemž biomasa také roste a původní substrát ubývá. (Biosyntéza kyseliny citronové a některých aminokyselin – Obr. 6 b).



Obr. 6: **Tvorba produktu spojená s růstem (a) a tvorba produktu částečně spojená s růstem** (Šroubková, 1996)

Měrná rychlost 1 – růstu, 2 – tvorby produktu, 3 – spotřeby substrátu

- **Syntéza produktů není zjevně spojena se spotřebou zdrojů uhlíku a růstem mikroorganismů.** (Biosyntéza některých antibiotik, vitaminů a enzymů. Tyto látky se často vylučují z buněk až po skončení růstu, nebo může vznikat metabolit, který se v druhé fázi využívá pro tvorbu konečného produktu – Obr. 7).

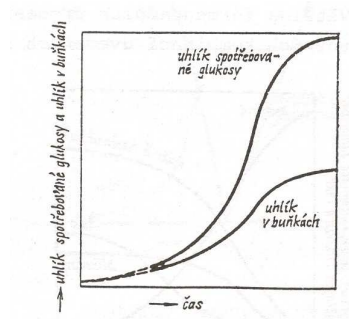


Obr. 7: **Tvorba produktu spojená s růstem** (Šroubková, 1996)

Měrná rychlost 1 – růstu, 2 – tvorby produktu, 3 – spotřeby substrátu

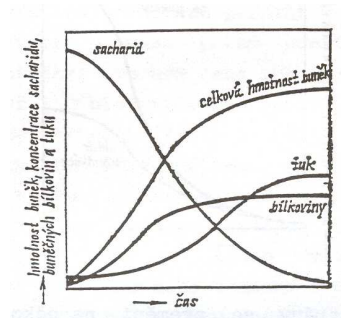
Podle **typu reakcí** rozlišujeme:

- **Jednoduché reakce** (Obr. 8), kdy se substrát přeměňuje na produkty v ustáleném stechiometrickém poměru bez hromadění meziproduktů (růst kvasinek na glukose).



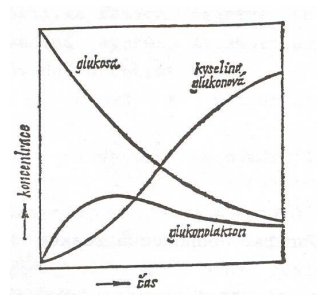
Obr. 8: **Jednoduchá reakce** (Šroubková, 1996)

- **Souběžné reakce** (Obr. 9), kdy se substráty přemění na několik produktů podle proměnlivých stechiometrických vztahů. Relativní rychlost tvorby těchto produktů se mění podle koncentrace substrátu. (tvorba tuků a bílkovin u kvasinek *Rhodotorula glutinis*).



Obr. 9: **Souběžná reakce** (Šroubková, 1996)

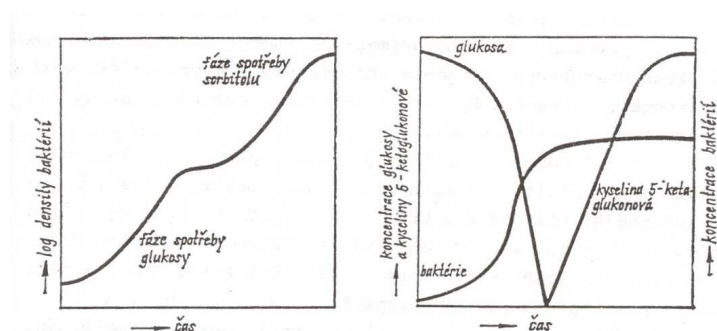
- **Následné reakce** (Obr. 10), které probíhají tak, že dříve než začne tvorba konečného produktu, dochází k hromadění jednoho nebo více meziproduktů. (konverze glukosy na kyselinu glukonovou u *Pseudomonas ovalis*).



Obr. 10: **Následná reakce** (Šroubková, 1996)

- **Postupné reakce**, které na sebe navazují, aniž by vznikl meziprodukt. Je přítomno více substrátů, postupnost je regulována indukcí enzymů, jejichž syntéza podléhá katabolické represi prvním substrátem. Pokud jsou v médiu dva substráty, a jsou využívány uvedeným způsobem dochází k **diauxii** (Obr. 11 a). Prodleva po první růstové fázi je obdobou fáze lagu (oxidace glukosy na kys. 5-ketoglukonovou přes meziprodukt kys. glukonovou u *Acetobacter suboxydans* – Obr. 11 b).

Většina fermentačních procesů je složitějších a skládá se z různých kombinací uvedených reakcí.



Obr. 11: **Postupné reakce a – diauxický růst *E. coli*, b – oxidace glukosy na kys. 5-ketoglukonovou u *Acetobacter suboxydans*** (Šroubková, 1996)

Podle tvorby produktů rozeznáváme:

- Produkty energetického metabolismu – např. ethanol, methan.
- Produkty jsou základní energetické sloučeniny – lipidy, glykogen.
- Produkty bílkovinné povahy s biologickou aktivitou – enzymy extracelulární a intracelulární (amylasy, β -glukosidasa).
- Produkty tvořící strukturální složky buněk – bílkoviny.
- Meziproducty metabolismu – např. vitamin B₁₂.
- Sekundární metabolity – např. antibiotika.
- Transformované substráty – např. steroidy.

5 MĚŘENÍ KONCENTRACE MIKROORGANISMŮ

Mluvíme-li o kinetice růstu mikroorganismů, která je dominantní všem reakcím, je třeba se zmínit i o způsobu měření koncentrace mikroorganismů. To je do značné míry problematické neboť složení buněk se v průběhu růstu a vlivem vnějších činitelů mění. I když známe jejich přesný počet, neuvažujeme jednotlivé komponenty buňky. Stejně se hodnotí koncentrace a ne koncentrace aktivních buněk (to vede k rozdílům hlavně ve stacionární fázi).

5.1 Počítání buněk

Přímé mikroskopické počítání buněk v různě upravených preparátech, koncentrace mikrobů alespoň 10^6 - 10^7 (v zákvasech, v kulturách), rychlé výsledky, u bakterií nelze rozlišit živé a mrtvé buňky.

- **V komůrkách** (Bürkerova aj.) pro bakterie, kvasinky a spory plísní, nativní preparáty, u bakterií fázový kontrast.
- **Fixovaný preparát na sklíčku** – pro suspenze bakterií - známý objem kapaliny, fixace a obarvení.

Elektronické počítání buněk založené na nasávání známého objemu s izolovanými buňkami do nevodivé (skleněné) trubice. Při průchodu buňky otvorem dojde ke změně vodivosti – registrace impulsu (Celloscop).

Nefelometrické stanovení buněk zjištění počtu buněk v čiré kapalině na základě intenzity světla odraženého od jednotlivých buněk. Rychlá a citlivá metoda. Vhodné pro koncentrace 10^5 - 10^7 /ml a jednotlivé koky a krátké tyčinky, u dlouhých tyčinek a řetízků možnost nepřesností. Celkový počet na základě kalibrační křivky zhotovené pomocí přesného mikroskopického počítání buněk.

5.2 Kultivační stanovení mikroorganismů

Plotnová metoda – narostlé kolonie na Petriho misce **KTJ** (CFU).

Nejpravděpodobnější počet mikroorganismů (MPN), spočívá v seriovém desítkovém zředování vzorku a ve zjištění, ve kterých zředěních již došlo k vymizení mikroorganismů, takže nenastal v tekuté půdě po inkubaci růst. Nepříliš přesná metoda, ale umožňuje rozbor tuhých i tekutých vzorků s malým počtem zárodků.

5.3 Stanovení buněčné hmoty mikroorganismů

Přímé metody

- Gravimetrické stanovení buněčné sušiny
- Stanovení obsahu dusíku v buněčné hmotě
- Stanovení obsahu bílkovin v buněčné hmotě

Nepřímé metody

- Turbidimetrické a volumetrické stanovení

5.4 Zjištění přibližného počtu mikroorganismů na základě jejich biochemické činnosti

- Radiochemické metody
- Měření el. vodivosti
- Limulus test - lyzát amoebocytů kraba *Limulus polyphemus*
- Chemoluminiscenční metody

6 MIKROBIÁLNÍ TECHNOLOGIE

V současné době využití mikroorganismů v nejrůznějších oblastech průmyslu nabývá stále většího významu. Tato kapitola bude věnována nejvýznamnější oblasti technologického využití mikroorganismů, které má vztah k potravinářskému průmyslu.

6.1 Výroba aminokyselin

Aminokyseliny byly až do poloviny minulého století připravovány v relativně malých množstvích extrakcí hydrolyzátů bílkovin nebo chemickými syntézami. Průmyslová velkovýroba aminokyselin byla zahájena v roce 1957 v Japonsku – výroba kys. glutamové fermentační cestou.

Tyto postupy využívají schopnost mikroorganismů syntetizovat a v prostředí hromadit v relativně velkých množstvích L-aminokyseliny, využitelné přímo pro organismy.

Existují tři metody výroby aminokyselin **prekurzorová metoda** – omezeně využívaná, **enzymová metoda** – enzymy mikrobiálního původu nebo mikrobiální buňky vykazující potřebnou enzymovou aktivitu, při této metodě přeměňují vhodné substráty na aminokyseliny (výroba kys. L-asparagové z kys. fumarové) a **fermentační metoda** používaná pro výrobu většiny aminokyselin.

Technologický proces je univerzální pro většinu fermentačně vyráběných aminokyselin a skládá se z těchto operací:

- Laboratorní pomnožení čisté kultury
- Provozní propagace produkčního kmene
- Produkční fermentace
- Odstředění nebo filtrace – oddělení biomasy od rozpustné složky média
- Čiření
- Adsorpce aminokyseliny na iontoměničce
- Zachycená aminokyselina se po eluci nechá krystalizovat
- Sušení
- Balení

Fermentační příprava aminokyselin je aerobní proces, kyslík se spotřebovává hlavně na reoxidaci NADPH na NADP⁺ a pro tvorbu ATP. Podle spotřeby kyslíku lze rozdělit aminokyseliny do dvou skupin: první skupina **vyžadující dostatek kyslíku** – kys. glutamová, prolin, glutamin, arginin a druhá skupina odvozená od kys. asparagové – threonin, lysin, isoleucin kde **nedostatek kyslíku nevádí**.

Optimální pH pro kultivaci je 7 - 8. **Optimální teplota** je 28 - 30 °C. **Živiny pro mikroorganismy:** zdroj uhlíku tvoří cukry, hydrolyzáty škrobu, kyselina octová, n-alkany, zdroj dusíku - amonné soli. **Růstové látky:** kvasičný extrakt, masový extrakt, kukuřičný výluh a nezbytné soli.

Aminokyseliny jsou produkovány bakteriemi, aktinomycetami, kvasinkami i plísněmi. Nejčastěji se využívají bakterie. Pro produkci aminokyselin se využívají mutované kmeny mikroorganismů nebo mikroorganismy pozmeněné genetickými manipulacemi (mutanty kmenů rodu *Micrococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Aerobacter*). Tyto mikroorganismy syntetizují a v prostředí hromadí aminokyseliny v množství mnohonásobně vyšším než výchozí geneticky nezměněné organismy.

Kys. L-glutamová

Jedná se o neesenční aminokyselinu. Objem výroby je obrovský (více jak 400 000 tun), je na prvním místě mezi produkty fermentačního průmyslu. Využívá se např. v potravinářství (chuťová přísada glutaman sodný), jako náhrada přírodního hedvábí se užívá poly-gama-glutamát.

Hlavními producenty jsou koryneformní bakterie *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*. Bakterie vyžadují k růstu biotin a přeměňují cukry z více než 50 % na kys. L-glutamovou. Například *Corinebacterium glutamicum* ze 100g glukosy/l vytvoří 30 - 50 g kys. glutamové.

L-lysin

Je esenciální aminokyselina, která se využívá v potravinářství a krmivářství. Producenty jsou mutanty koryneformních bakterií (*Corynebacterium*, *Brevibacterium*). *Corynebacterium glutamicum* hromadí v 1 l média více než 50 g lysinu. Jako zdroj uhlíku a růstových faktorů pro produkční kmeny bakterií slouží nejčastěji hydrolyzáty sojové či arašídové mouky. Jako zdroj uhlíku se využívá i sacharosa, glukosa a laktosa, průmyslově se využívá i řepná melasa.

L-tryptofan

Využívá se v lékařství a v krmivářství (výživa monogastrů).

Podle výchozího substrátu můžeme producenty rozdělit do skupin:

- Kmeny syntetizující L-tryptofan přímou fermentací sacharidů (nízká výtěžnost).
- Mikroorganismy využívající jako prekurzor anthranilovou kyselinu – kvasinky.
- Mikroorganismy využívající jako prekurzor indol a jeho deriváty – bakterie.

Vhodné zdroje uhlíku jsou sacharosa, glukosa, glycerol, ethanol i oleje a tuky. Výtěžnost při použití kvasinek souvisí se stupněm autolýzy použité kultury v závěru fermentace. Při 50% autolýze je výtěžnost na glukosu 4,3 %, ethanol 4,0 % na glycerol 3,0 %. Neautolyzovaná kultura poskytuje poloviční výtěžky.

Threonin

Jde rovněž o esenciální aminokyselinu. Při její výrobě se využívají geneticky modifikované kmeny *E. coli* se zvýšenou aktivitou dehydrogenasy homoserinu, klíčového enzymu biosyntézy threoninu.

6.2 Enzymy

Všechny reakce prováděné živými buňkami jsou realizované enzymovými katalyzátory, které tyto buňky produkují. Enzymy nacházejí uplatnění nejen jako katalyzátory, ale i jako analytická činidla a nepostradatelné prostředky v buněčných a genových technologiích, jako léčiva a látky upravující vlastnosti různých výrobků.

6.2.1 Enzymové inženýrství

Enzymové inženýrství je biotechnologický směr, který zahrnuje proces získávání enzymů, jejich úpravy pro různé aplikace, optimalizaci jejich použití, snahu o konstrukci umělých enzymů. Enzymy se získávají z přírodních zdrojů pomocí technik izolace a frakcionace bílkovin. Pro přípravu čistých enzymů se využívají chromatografické metody jako HPLC a FPLC, preparační elektromigrační metody a afinitní chromatografie. V současnosti se kromě rostlinných a živočišných buněk využívají ve velkovýrobě především mikroorganismy. Mikrobiální buňky poskytují paletu asi 3000 enzymů. Produkce mikrobiálních enzymů produkovaných jak bakteriemi (nejpoužívanější), tak i kvasinkami a plísněmi má řadu výhod:

- Rychlý růst a množení produkčních mikroorganismů.
- Možnost zvyšovat jejich produkci manipulacemi s geny nebo s okolím.
- Vzhledem k obrovskému spektru mikroorganismů lze nalézt druh mající enzym s podobnými nebo výhodnějšími vlastnostmi jako rostlinné nebo živočišné buňky.
- Vlastnosti izolovaného enzymu lze ovlivnit volbou produkčního mikrobiálního kmene (termofilní enzymy od termofilních mikroorganismů – pro prací prostředky).

6.2.2 Lokalizace enzymů

U prokaryot jsou enzymy vázány na cytoplasmatickou membránu popř. buněčnou stěnu, nebo jsou rozpuštěny v cytosolu. U eukaryot je řada enzymů charakteristickým způsobem spojena s organelami – enzymy podílející se na replikaci DNA v jádře, enzymy lytické a depolymerizující ve vakuolách, spojené se syntézou ATP v mitochondriích. Bakteriální enzymy můžeme rozdělit na intracelulární a extracelulární.

Intracelulární enzymy - zůstávají součástí buněčného obsahu. Z průmyslově významných enzymů jsou to např. katalasa nebo glukosaoxidas. Při jejich získávání je nutné je z buněk uvolnit – rozbít buňky. K desintegraci lze využít různé způsoby.

- **Fyzikální způsoby:** mechanické drcení a mletí – abraziva (křemičitý písek, skelný prach, pemza); míchání s malými částicemi – skleněné kuličky; střižnými silami v tuhém stavu – abrazivo, -20 °C, píst; střižnými silami v kapalině – homogenizační zařízení; osmotickým šokem – 20% sacharosa (voda z buňky); ultrazvukem; změnou tlaku plynu; střídavým zmrazením a táním; zahříváním.
- **Chemické způsoby:** kyselé a zásadité prostředí; povrchově aktivní látky – tenzidy se spojují s lipoproteiny – propustnost membrán; organická rozpouštědla – aceton, toluen, chloroform, pro enzymy lokalizované na membránách; antibiotika – narušení

membrán (polymixin), blokace syntézy b. stěny (penicilin); aminokyseliny – glycin – lyze buňky.

- **Enzymové způsoby:** lytické enzymy – lysozym; autolýza – vlastními enzymy, náhlá změna opt. životních podmínek.

Extracelulární enzymy – jsou z buněk vylučovány do vnějšího prostředí. Patří sem většina mikrobiálních enzymů komerčního významu např. proteasa, amylasy, pektinasa, lipasa, invertasa a další. Izolované enzymy byly použity ve velkovýrobě v r. 1890 – na zvyšování rychlosti hydrolyzy škrobu na D-glukosu přidavkem extraktu z plísní. K širšímu využití v průmyslu došlo po 2. světové válce.

6.2.3 Výroba enzymů

Mikrobiální enzymy se připravují z biomasy produkčního kmene mikroorganismu (intracelulární enzymy) nebo kultivačního (fermentačního) média po ukončení kultivace (extracelulární enzymy).

Výroba mikrobiálních enzymů probíhá dvěma základními postupy: **na tuhých nebo polotuhých substrátech** se kultivují hlavně plísně. Jako tuhá fáze slouží odpady ze zemědělství nebo potravinářského průmyslu, obilní šrot, mouky. Kultivace vyžaduje dostatečnou vlhkost materiálu. Další možností je kultivace **v submersní kultuře** a to vsádkovou nebokontinuální kultivací. Do sterilního média na jehož složení je kladen velký důraz se přidává inokulum v množství 3 – 10 % objemu média. Doba kultivace se pohybuje od 30 do 150 h. Více je využívána vsádková kultivace protože je relativně krátká a dá se snadno udržet bez kontaminace. Převážná většina výrob enzymů je aerobní submersní kultivace.

K získání enzymů se používá celá řada separačních, izolačních a purifikačních technik a zařízení.

Postup:

- Separace biomasy od fermentační tekutiny – rotačními vakuovými nebo tlakovými filtry a odstředivkami.
- Izolace enzymů z vyčiřené média – extracelulární enzymy.
- Intracelulární enzymy – uvolnění enzymů po dezintegraci buněk (vysokotlaká homogenizace, kuličkové mlýny).

- Z roztoku se enzymy izolují vysolováním přidavkem anorganických solí nebo snížením jejich rozpustnosti org. rozpouštědly za snížené teploty (pod $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- Vysrážená bílkovinná frakce se rozpustí v malém množství vody a následují další frakcionační a purifikační stupně, dialýza, membránová ultrafiltrace, chromatografie, gelová filtrace.
- Někdy lze purifikovat enzym zahřátím na teplotu, při které dojde k denaturaci znečišťujícího enzymu.
- K zahuštění roztoků kteréhokoliv stupně výroby se užívá ultrafiltrace a odpařování.
- Enzymy se pak suší a uchovávají při nízkých teplotách, nebo se volí vhodné metody stabilizace.

Snaha vyhnout se náročné izolaci enzymů a dále zvýšit jejich stabilitu vedla k vypracování technik na výrobu **imobilizovaných organel a imobilizovaných celých buněk**, vyšlechtěných na vysoký obsah žádaného enzymu.

6.2.4 Stabilizace enzymů

Stabilita enzymů je limitujícím faktorem jejich použití. Je to schopnost zachovat si svou aktivitu při změnách podmínek prostředí. Nejdůležitějším faktorem, který rozhoduje o schopnosti enzymu zachovat si svoji aktivitu je odolnost k denaturaci.

Volné enzymy mají řadu nevýhod: nízká stabilita, pracná a náročná izolace, přechod do reakčního prostředí a nutnost jejich následného odstranění.

Stabilitu enzymů lze zvýšit několika způsoby: přidavkem nízko- nebo vysokomolekulárních látek do prostředí (ionty a kationty – Mg, Ca, sírany, fosforečnany, pektiny, alginová kyseliny, inertní rozpustné bílkoviny). Chemickou modifikací za použití vhodných činidel a reakčních podmínek – selektivní modifikace postranních zbytků určitých aminokyselin. Vytvořením příčných vazeb v molekule. Rozvinutí (denurací) a opětným svinutím (renaturací) molekuly. Imobilizací např. vazbou na polymerní nosič.

6.2.4.1 Imobilizované enzymy

Imobilizované enzymy jsou zachycené nebo lokalizované v určité části prostoru. Zachovávají si svou katalytickou aktivitu. Snadno se odstraňují z reakční směsi. Mohou být opakovaně použity. Imobilizované enzymy mohou být vázány na nerozpustný nosič nebo jsou zachyceny v nějaké struktuře (Obr. 12). Mohou být zachyceny v izolované formě nebo jako celé buňky.

Jejich aktivita je ve většině případů nižší než u volných enzymů, obdobně bývá snížen i stupeň inhibice. Mají širší možnost uplatnění než rozpustné enzymy.

Příprava imobilizovaného enzymu sestává z následujících kroků:

- Výběr vhodného enzymu.
- Výběr vhodného nosiče: Nosiče – sorbenty – pro navázání enzymů. Materiály sloužící k opouzdření (enkapsulaci) enzymů nebo k zachycení v matricích různých gelů.
- Výběr vhodné imobilizační techniky.

Základní principy imobilizace:

Vazba na pevný nosič

- **Imobilizace různými typy sorpce.** Enzym není obvykle vystaven prostředí, které jej inaktivovalo. Charakter vazeb je stálý. Nepříliš spolehlivá metoda. Volba vhodných nosičů dává lepší výsledky.
- **Imobilizace iontovou vazbou** bývá silnější. Využívají se přírodní i syntetické polymery jako nosiče.
- **Imobilizace kovalentní vazbou** – vylučuje desorpci z nosiče. K chemické vazbě lze využít řadu funkčních skupin molekuly enzymu 2- a 6-aminoskupin, α , β , γ karboxylové skupiny atd. nebo lze využít nebílkovinné části enzymu – u glykoproteinových enzymů (vazby na deriváty celulosy, sklo, syntetické polymery).

Imobilizace zachycením ve struktuře gelu - Je založena na tvorbě polymerní matrice ve vodním roztoku enzymu. Nevýhoda – imobilizovaný enzym lze využít jen ke konverzi nízkomolekulárních látek (využívá se polyakrylamid, polyvinylalkohol, škrob, atd.).

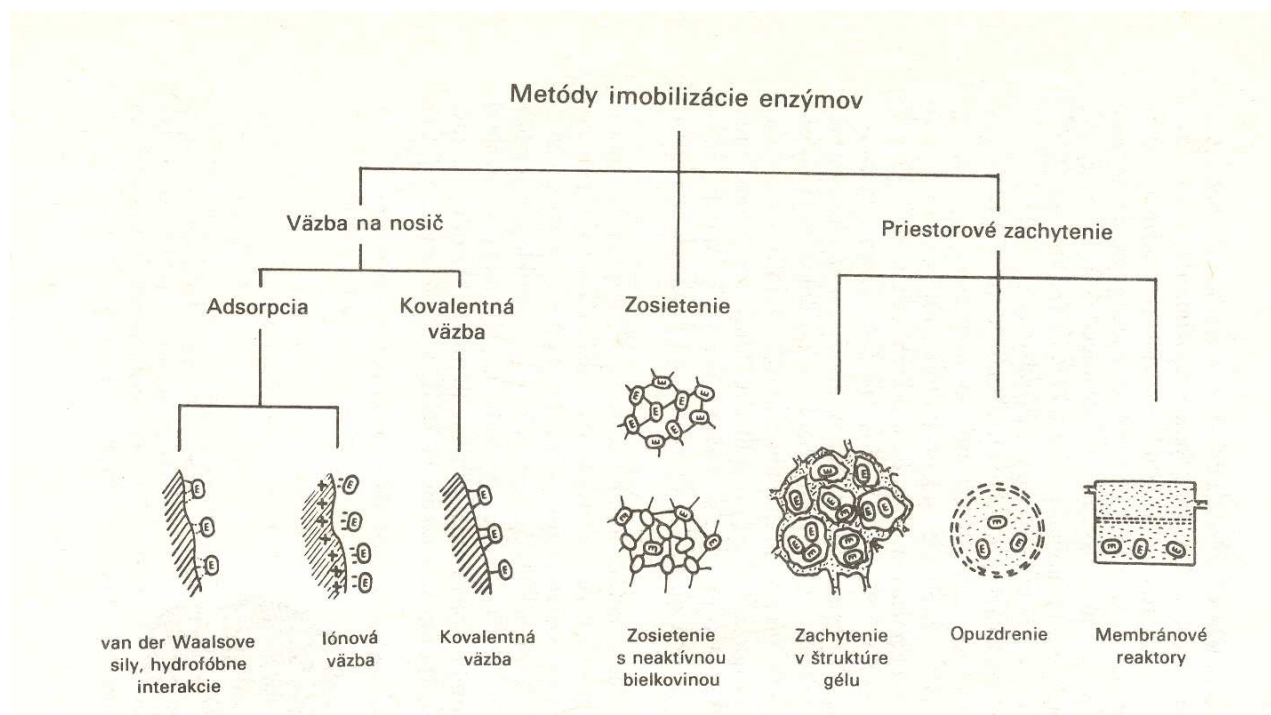
Zesítení (prokřížení) - Principem je vytvoření mezimolekulárních vazeb enzymových s různými bi- nebo multifunkčními činidly. Molekuly enzymů se mohou vázat navzájem ale i na jiné molekuly, především neaktivní bílkoviny. (Lze výhodně kombinovat s adsorpcí a enkapsulací.)

Enkapsulace - Uzavření enzymu do semipermeabilní membrány, částice o průměru 1-100 μm . Vhodné pro enzymy působící na nízkomolekulární substráty.

Membránové bioreaktory - Z průmyslového měřítka se jeví jako nejperspektivnější. Využívají syntetické semipermeabilní membrány připravené z vhodného materiálu a umístěné do vhodného modulu. V těchto zařízeních probíhá enzymem katalyzovaná reakce, kdy

enzymy jsou membránami v reaktoru zadržovány, přičemž současně může probíhat jak jejich biokonverze, tak i separace produktů.

Další generaci tvoří **imobilizované multienzymové systémy** vázané na biomembrány (např. mikrozómů, tylakoidů) otevírající cestu k použití enzymů pracujících pomocí kofaktorů, protože umožňují jejich regeneraci a k provádění mnohostupňových procesů.



Obr. 12: **Metody imobilizace enzymů** (Halgaš, 1988)

6.2.4.2 Imobilizované buňky

Během let byly vyvinuty techniky dovolující imobilizovat většinu typů buněk se zachovalou životností. K imobilizaci se používají především buňky mikroorganismů. Buňky se běžně imobilizují po **ukončení růstové fáze tj. v autolyzované formě**. Lze však použít i **živé buňky** (v růstové fázi). Pak je třeba dbát aby při imobilizaci nedošlo k poškození jejich životnosti.

Imobilizované buňky mají oproti imobilizovaným enzymům řadu **výhod**: Odpadá nákladný proces izolace a čištění enzymu. Větší stabilita enzymů zachovaných v přirozeném prostředí buňky. Použití i při výrobách vyžadujících multienzymové systémy bez i s účastí kofaktorů, nebo i celé metabolické dráhy. Menší citlivost imobilizovaných buněk k toxickým látkám. Některé enzymy vykazují vyšší aktivitu při fyziologickém spojení s buněčnými strukturami. Zjednodušení a nižší pracnost technologie výroby (využití chemických reaktorů a

použití kontinuálních kolonových procesů místo vsádkových fermentací. Optimální využití enzymových systémů – vyšší produkce metabolitu při použití stejného množství buněk.

Použití má ale i určité **nevýhody**: Jde o heterogenní systém - omezený přístup substrátu – nemůže být využita celá aktivita katalyzátoru. Biomembrány působí jako bariéry pro některé substráty většinou makromolekulové povahy. (To lze částečně odstranit permeabilizací buněk – umělým zvýšením propustnosti, za cenu usmrcení buněk – tím se ale uvolní metabolity, jako jsou kofaktory, do roztoku). Jsou přítomny enzymy, které mohou katalyzovat nežádoucí reakce. Je nutné udržet neporušenost buněk v imobilizované formě – v nerostoucích buňkách klesá aktivita enzymů – nutnost přidavku nutričního média nebo zdroje energie pro udržení životnosti a pomalého růstu. Intenzivní růst buněk vede k jejich uvolňování nebo k destrukci imobilizovaného systému – problémy s izolací produktu a ucpávání reaktoru.

Principy vazby buněk s nosiči lze rozdělit na: Fyzikální (př. Van der Waalsovy síly), fyzikálně-chemické (polární interakce) a chemické (koordinačně kovalentní nebo kovalentní vazba).

Z hlediska metodického rozlišujeme: Fixaci enzymů v jednotlivých buňkách nebo buněčných agregátech, zachycení buněk v různých gelech, zachycení buněk do sítě vznikajícího polymeru, inkapsulaci buněčné suspenze, iontovou vazbu buněk na iontoměniče, imobilizaci na různé nosiče (syntetické a přírodní materiály), vzájemnou vazbu buněk bez použití ve vodě nerozpustného nosiče.

Imobilizace buněk bez použití ve vodě nerozpustného nosiče je relativně nejjednodušší způsob. Výsledkem jsou buňky s požadovanými stabilizovanými aktivitami, nebo buněčné agregáty se zdokonalenými sedimentačními vlastnostmi.

- **Fyzikální a fyzikálně-chemické fixace obsahu buněk a tvorba pelet – miceliálních agregátů.** Metody fixace enzymu tepelným ošetřením případně kombinací např. s citrátovými ionty. Vzájemná chemická vazba buněk především vláknitých mikrobů tvořících mikrobiální peletu se realizuje vzájemným propletením a adhezí vláken, tvořících peletu (částici).
- **Zesítnění vnitrobuněčného obsahu individuálních buněk a mikrobiálních pelet.** Chemickou reakcí buněk resp. některých buněčných komponent (zvláště bílkovin) s polyfunkčními síťovacími činidly dochází ke kovalentnímu zesítnění vnitrobuněčného obsahu individuálních buněk nebo jednotlivých buněk pelety. Peleta se tím stává

chemicky stabilizovanou částicí. Škála polyfunkčních síťovacích látek zahrnuje především dialdehydy, polydiazosloučeniny atd.

- **Agregace buněk flokulací, kdy agregáty buněk se tvoří na principu fyzikálně-chemické interakce (převážně polární), zprostředkované flokulačním činidlem.** Flokulační činidla jsou: aniontové a kationtové polyelektrolyty, minerální hydrokoloidy apod.
- **Agregace flokulací kombinovaná se zesítním agregátu** – kombinace dvou předcházejících metod. Po tvorbě agregátu flokulací následuje zesítnění agregátů síťovacími činidly, nejčastěji glutaraldehydem. Zesítnění vede k chemické stabilizaci enzymu v buňkách, tvořících agregáty formou kovalentní vazby.
- **Agregace buněk zesítním celých nebo parciálně autolyzovaných buněk s jejich parametry a vlastními, nebo přídatnými bílkoviny.** Tento způsob imobilizace spočívá v kompetitivní chemické reakci buněčného materiálu s bílkoviny respektive síťovacím činidlem a směs se pak míchá, mrazí, lyofilizuje, případně suší. Jako přídatné bílkoviny se používá obvykle albumin.
- **Vzájemná vazba celých předem individuálně zesítněných a permeabilizovaných buněk.**

Uzavření buněk do různých polymerních materiálů, nejčastěji mechanické, do různých typů materiálů. Vznikají částice imobilizovaných buněk různých velikostí a forem s podstatně zdokonalenými sedimentačními schopnostmi. Z toho vyplývá snadná separovatelnost od reakčního média a vlastností částic, umožňující kontinualizaci biochemických procesů.

Imobilizace buněk na částice ve vodě nerozpustných nosičů. Jako nosič jsou využívány částice různých syntetických a přírodních materiálů, organických i anorganických. Rozlišujeme následující vazby buněk s nosiči:

- **Fyzikální sorpci** buněk na nosič.
- **Fyzikálně-chemickou** (iontovou, polární) vazbu buněk na nosič s charakterem iontoměniče.
- **Chemickou**, koordinačně – kovalentní nebo převážně kovalentní vazbu na nosič
- **Kombinované způsoby** imobilizace buněk.

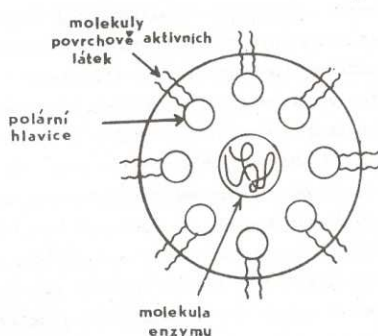
Jako nosiče se využívají materiály používané i k imobilizaci enzymů např. silikagel, porézní sklo, písek, cihelná drť, keramické materiály, bentonit, celulóza a její deriváty, pryskyřice atd.

Velmi výhodná je **imobilizace buněk a enzymů na povrch buněk** - využití mikrobiálních buněk jako nosičů. Jde především o odpadní buňky z výroby, kvasinky po výrobě piva nebo mycelium po výrobě penicilinu či kyseliny citronové.

6.2.4.3 Enzymové micely

Vedle technik imobilizace se k přípravě vhodných forem katalyzátorů rozvíjí výroby **enzymových micel**. Např. vazbou řady molekul tenzidů na molekuly enzymů lze připravit tzv. **obrácené micely** (Obr. 13). Tenzidy se váží svými polárními hlavicemi na polární povrch molekuly enzymu, zatímco nepolární části tenzidů vytvoří nový, hydrofobní povrch.

Molekuly enzymů s takovým povrchem jsou pak dispergovatelné v nepolárních rozpouštědlech. Tyto formy enzymových katalyzátorů tedy rozšiřují možnosti jejich použití i na provádění přeměn ve vodě nerozpustných látek, jako jsou steroidy, prostaglandiny, lipidy. Další oblast využití tzv. **micelární enzymologie** je pak i v tradičním vodném prostředí, a to pro realizaci kondenzačních reakcí, kdy jedním z reakčních produktů je voda. V micelární formě byla připravena řada enzymů (hydrolasy a oxidoreduktasy).



Obr. 13: **Schema obrácené enzymové micely** (Vodrážka, 1991)

Jiným způsobem realizace enzymových přeměn látek nerozpustných ve vodě je použití **dvoufázového systému**, sestávajícího z vody a organického rozpouštědla nemísitelného s vodou. Vodní fáze obsahuje rozpuštěný enzym, organické rozpouštědlo pak hydrofobní substráty. Mícháním nebo třepáním je pak substrát převáděn do vodné fáze. Tam dojde k přeměně katalyzované enzymem a vzniklý produkt se vrací do organické fáze. Produkty lze

snadno separovat od biokatalyzátoru, lze pracovat v podstatně zmenšeném objemu reakční směsi. Použití k transformaci steroidů, oxidaci uhlovodíků, konverzi glukosy na ethanol, k biosyntéze tryptofanu z indolu a serinu atd.

6.2.5 Využití průmyslově vyráběných enzymů

Průmyslově vyráběné enzymy nalézají své uplatnění v celé řadě odvětví např. při výrobě pracích prášků – asi 35 % produkce enzymů, v textilním a kožedělném průmyslu, při výrobě krmných směsí, v lékařství a farmaceutickém průmyslu (výroba aminokyselin, antibiotik, léčiv), při výrobě čistých enzymů pro analytiku. Významnou úlohu zastávají také v potravinářském průmyslu. Využívají se při **výrobě fruktosového sirupu** hydrolýzou škrobu a konverzi vzniklé glukosy na směs 50 % glukosy a 50 % fruktosy za katalýzy glukosaisomerasou. (asi 2 mil. t/rok), při produkci bezlaktosového mléka, při zpracování ovoce, čiření vína a moštů se používají pektolytické a celulólytické enzymy, amylolytických enzymů se využívá v pivovarnickém průmyslu, proteolytické enzymy chimosin, pepsin, a mikrobiální proteasy se využívají při zpracování mléka, protelytické enzymy se používají také při tenderizaci (křehčení) masa.

6.3 Výroba organických kyselin

Mikroorganismy jsou schopny produkovat značné množství organických kyselin jako extracelulárních metabolitů. Hlavními producenty jsou bakterie a plísně.

K nejdůležitějším organickým kyselinám produkovaným **bakteriemi** patří:

- **k. octová** - jako producent se využívají bakterie rodu *Acetobacter*, kyselina se využívá v potravinářství, chemickém a farmaceutickém průmyslu,
- **k. mléčná** - producentem jsou např. bakterie rodu *Lactobacillus*, kyselina nachází využití v potravinářství, textilním a kožedělném průmyslu,
- **k. propionová** - producentem jsou bakterie rodu *Propionibacterium*, kyselina se používá ke konzervaci krmiv, proti plísním,
- **k. máselná** – jako producent se využívá např. *Clostridium butyricum*, kyselina se může využít v potravinářství, kosmetickém průmyslu při výrobě umělých hmot.

Další kyseliny bakteriálního původu jsou např. kyselina vinná, jantarová atd.

Mezi významné organické kyseliny produkované **plísněmi** patří:

- **k. citronová**, která má široké využití v potravinářství a dalších průmyslových odvětvích a k jejíž výrobě se nejčastěji využívá *Aspergillus niger*,
- **k. glukonová** produkovaná plísněmi rodů *Penicillium* a *Aspergillus* má využití ve zdravotnictví nebo se používá k čištění kovů (Fe, Al, Cu),
- **k. fumarová** jejímž producentem je rod *Rhizopus* se využívá v chemickém průmyslu a v potravinářství (nápoje),
- **k. kojová** produkovaná plísněmi rodu *Aspergillus* má antibiotické vlastnosti, může se využívat rovněž jako insekticid nebo stimulátor růstu,
- **k. gallová**, kterou produkují plísně rodu *Aspergillus* či *Penicillium* se využívá v tiskařském průmyslu.

6.3.1 Výroba kyseliny citronové

Kyselinu citronovou poprvé izoloval v krystalické formě r. 1784 Scheele z citronové šťávy. Z citrusů se také potom vyráběla. V roce 1917 Currie prokázal její produkci u *Aspergillus niger* a stanovil podmínky pro její produkci. Průmyslová výroba započala v roce 1923 (v ČSR roku 1926 v Kaznějově u Plzně, jako substrát se používala řepná melasa).

Jako producenti se využívají různé plísně: *Aspergillus niger*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, ale i některé bakterie. Spory *A. niger* jsou uchovávány na sterilním říčním písku nebo aktivním uhlí, lyofilizované nebo na sporulačním agarovém médiu.

Biosyntéza kyseliny citronové: glukosa je štěpena na dvě molekuly k. pyrohroznové, jedna molekula je dekarboxylována na dvouuhlíkatou sloučeninu a druhá karboxylována na čtyřuhlíkatou sloučeninu. Jejich kondenzací tj. oxalacetátu a aktivní formy octové kyseliny (acetyl-CoA) vzniká kyselina citronová. Optimální eplota je 28 - 34 °C, pH opt. pod 3,5, pod pH 2 se tvoří výhradně k. citronová, nad pH 5 převažuje k. glukonová.

Pro výrobu této kyseliny (Obr. 14) můžeme použít dva způsoby kultivace. **Povrchová kultivace** - Inokulum tvoří spory *A. niger* smíchané s aktivním uhlím. Inokuluje se sterilní melasová zápara a plní se do kvasných mís v kvasných komorách. Po 2 - 3 dnech se tvoří mycelium. Po ukončení fermentace za 8 - 9 dní obsahuje asi 10% k. citronové. Pak následuje izolace a další zpracování kyseliny. **Submersní kultivace** je převládajícím způsobem výroby. Má řadu výhod: vyšší výtěžnost, kratší dobu fermentace, menší nároky na zastavěnou plochu, proces lze automatizovat. Jako živný substrát se používají zbytky z potravinářských výrob, které jsou bohaté na cukry např. melasa nebo otruby. Substrát se připravuje a steriluje v tanku

(115 °C 30 min). Spory na nosiči (obilná zrna) se inokulují do aerovaného média. Po 24 h se vytvoří ze shlukujících se hyf pelety. Peletami se zaočkuje substrát. V první fázi (42 - 52 h) se tvoří biomasa, ve druhé se tvoří k. citronová. Vše probíhá za neustálého míchání, aerace a chlazení. Opt. teplota 28 – 30 °C (při vyšší teplotě se tvoří k. šťavelová). Doba fermentace je 4 - 7 dní (podle obsahu cukru v substrátu 10 – 15 %), výtěžnost je asi 73 %.

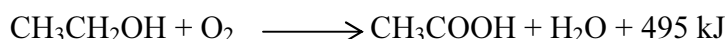
Izolace: po skončení kultivace je oddělen roztok od mycelia (filtrace), mycelium může být využito ke krmným účelům. Následuje srážení za horka vápenným mlékem. Citrát vápenný se odfiltruje, promývá a rozkládá H₂SO₄. Roztok se odseparuje od vzniklé sádry, čistí se přes aktivní uhlí a iontoměniče, odpaří ve vakuu a nechá vykrytalizovat. Získá se krystalická kyselina citronová – monohydrát (teplota do 36 °C) nebo bezvodá forma při teplotě nad 36 °C. Krystalický produkt se promývá a suší při 50 – 60 °C.

Využití kyseliny citronové je široké. Nejvíce se používá v potravinářství (asi 65 %) do nealko nápojů, jako okyselující činidlo, konzervant a antioxidant, ve farmacii (asi 20 %) např. jako krevní antikoagulans, má ale také technické využití (asi 15 %) je složkou leptavých roztoků, bělicích prostředků, mycích a čistících prostředků kde slouží jako náhrada fosfátů.

6.3.2 Kyselina octová (ocet)

Kyselina octová je buď mikrobiálním produktem, nebo se vyrábí chemickou syntézou. Historie výroby octa je velmi stará. Ocet se vyráběl samovolným kvašením z vína a piva, obdobně se zpracovávalo i ovoce.

Kyselina octová je produkována bakteriemi r *Acetobacter* popř. *Gluconobacter*. Vzniká oxidací ethanolu bakteriemi podle sumární rovnice



Reakce je exotermická – uvolňuje se velké množství tepla. Musí být zajištěna dostatečná aerace. Koncentrace ethanolu v substrátu 2,5 – 3 %, vyšší koncentrace snižuje výkon (teoreticky i 13 %). Ukončení oxidace při 0,3 % ethanolu v substrátu, jinak dochází k přeoxidaci (přeoctění) octové kys. na CO₂ a vodu v důsledku nedostatku asimilovatelného uhlíku.

Jako surovina se používá **surový ethanol** z brambor, melasy, kukuřice, sulfitových výluhů **ethanol z méně hodnotných druhů vína a ovoce**. Nejvyšší octy jsou vinné a ovocné. Při oxidaci surového lihu se musí dodávat sacharidy, růstové látky a anorganické živiny. Opt. teplota pro rychlé octářství 30 – 35 °C, pro submersní 28 – 30 °C.

Při kvasné výrobě octa byly na základě dlouholetých zkušeností poprvé použity imobilizované mikrobiální buňky, a to již v 19. století. Při tomto procesu jsou buňky bakterií zachyceny na povrchu bukových hoblin nebo jiného kusového materiálu, který je pro svůj velký povrch vhodným nosičem, zaručujícím dobrý styk bakterií s živinami i kyslíkem.

Metody výroby octa:

- **Orleánská metoda** - Výroba nejkvalitnějšího octa z méně kvalitního vína. Probíhá při 20 – 22 °C. Zdlouhavá (1 – 3 měsíce) a drahá metoda. V octu bylo asi 6 % hm kyseliny octové a 0,5 % obj. ethanolu. Ocet je jemný, buketní a vysokoprocentní.
- **Rychlé octářství** - V očetnicích, acetátorech, dnes plnoautomatické očetnice – acetogenerátory (Fringsovy velkoocetnice). Bakterie jsou uchyceny na pevném nosiči zkrápěném recirkulovaným substrátem, aerace je v protiproudu. Cyklus trvá 7 - 8 dní, zbytkový ethanol 0,3 %, kys. octové 11 %, výtěžnost asi 90 %.
- **Submersní způsob** - Tímto způsobem lze vyrábět octy ze surovin obsahujících min. 5 - 6 % hm ethanolu (11 – 12 % obj. ethanolu, vína). Substrát (octovina) se připravuje obdobně jako pro upoutané kvašení. Jde o vsádkovou kultivaci. Probíhá v acetátoru (50 – 500 hl) vybaveném armaturami a regulační technikou včetně analyzátoru alkoholu, který při poklesu na 0,1 - 0,3 % zajistí automatické odpuštění dávky octa a přítok nového substrátu. Výkon acetátoru o 300 hl je asi 60 hl octa za 24 h (3x více než u stejně velké velkoocetnice). Doba jednoho cyklu je asi 48 – 72 h. Výsledná koncentrace 10 – 12 % kyseliny octové.

Surový ocet obsahuje řadu příměsí - mikrobiální zákal, chemické zákaly (komplexy kovů s bílkovinami pektiny atd.). Je nutné ho vyčistit čířením (bentonit), filtrací (křemelina, směs bavlny a celulosy) nebo ultrafiltrací. Čistý ocet se plní do dubových kádí kde se nechá zrát alespoň 3 měsíce, během nichž se vytváří látky dávající octu charakteristické sensorické vlastnosti především ethylacetát. Po vyzrání se pasterizuje a lahvuje. Produktem je ocet 10 – 12 %, který se na požadovanou koncentraci ředí vodou.

6.3.3 Kyselina mléčná

Kyselina mléčná byla objevena r. 1780 Scheelem. Průmyslová výroba byla poprvé uskutečněna v roce 1881 v USA, protože ale byla neekonomická, byla výroba zastavena. V roce 1895 začala průmyslová výroba této kyseliny v Německu.

Jako producenti kyseliny mléčné při průmyslové výrobě jsou využívány bakterie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* a subsp. *bulgaricus* (homofermentativní,

teplotní optimum 45 – 48 °C). Již malé množství kyseliny (4 %) inhibuje růst bakterií proto je nezbytná kontinuální neutralizace CaCO_3 nebo Ca(OH)_2 . Optimální pH je 5,5 - 6,0.

Jako uhlíkaté substráty se využívají škrobnaté či na sacharidy bohaté suroviny, opt. 12 - 18 % sacharosy. Škrobnaté suroviny nutno hydrolyzovat (*Lactobacillus* nemá amylolytické enzymy). Dusík se dodává ve formě kukuřičného extraktu, sladových klíčků, síranu amonného.

Výroba probíhá ve **fermentorech** (20 – 100 m³). Ve většině technologických procesů vzniká ve formě vápenaté soli. Aby se všechny Ca-laktát rozpustil, fermentační půda se zahřívá. Po přidání H_2SO_4 se kys. mléčná uvolní a oddělí se od síranu vápenatého. Další purifikace je závislá od využití.

Podle stupně čistoty se kyselina mléčná dodává jako: **technická** pro textilní a kožedělný průmysl, na výrobu plastických fólií, **potravinářská** (bezbarvá kapalina s asi 60 % kyseliny mléčné) do šťáv, sirupů, esencí a extraktů, při zpracování ovoce, zeleniny a ryb, má příjemné aroma a konzervační vlastnosti nebo **farmaceutická** velmi čistá více než 90 %.

6.4 Výroba antibiotik

Antibiotika jsou sekundární metabolity mikroorganismů tvořené v určitých vývojových fázích z primárních metabolitů. V malých koncentracích potlačují životní procesy jiných mikroorganismů. Jako producenti antibiotik jsou využívány mikromycety (plísně) a bakterie (hlavně aktinomycety – rod *Streptomyces*). Prvním v širším měřítku vyráběným antibiotikem byl penicilin objevený v roce 1928 Alexandrem Flemingem. Dnes je známo několik tisíc antibiotik, jen malá část se ale využívá v praxi.

Výrobu antibiotik lze rozdělit na fermentační část a izolační část.

Fermentace

Jde převážně o submersní způsob kultivace. Substrát bohatý na živiny se sterilizuje (110 – 115 °C 60 - 90 min), ochladí se na požadovanou teplotu a zaočkuje produkčním mikroorganismem. Optimální teplota (penicilia 24 °C, aktinomycety 25 – 30 °C, bakterie 37 °C), pH 5,5 - 7,2 a aerace se udržuje po celou dobu fermentace. Fermentace má dvě fáze.

1. fáze růst mycelia (asi 36 h) a **počátek produkce ATB** za současného úbytku redukujících cukrů a aminového dusíku. **2. fáze tvorby ATB** (po 72. h) nastává až po dostatečném nárůstu a vývoji mycelia. Proces fermentace trvá 80 – 130 h a končí dosažením maximální koncentrace ATB v půdě. Půda se pak ochladí na 10 – 15 °C.

Izolace ATB:

Oddělení biomasy od roztoku filtrací (rotační vakuové filtry s křemelinovou vrstvou).

Izolace ATB z mycelia:

- Extrakcí organickými rozpouštědly z biomasy nebo suchého lyofilizovaného preparátu. Biomasa se extrahuje za studena nebo za zvýšené teploty rozpouštědly mísitelnými s vodou (řada aceton – ethylacetát – butanol – methanol).
- Suchý materiál se extrahuje řadou petrolether – benzen – chloroform – diethylether.

Izolace ATB z filtrátu:

- Extrakcí organickými rozpouštědly nemísitelnými s vodou ethylacetát, butylacetát za úpravy pH vodní fáze.
- Srážení ATB ve formě nerozpustných solí.
- Adsorpcí ATB na iontoměničce popř. na vhodné povrchově aktivní látky (aktivní uhlí, aktivovaný oxid hlinitý).

Čistá ATB se převádí do příslušných lékových forem (injekce, tablety, dražé, masti, čípky, zásypy) pro příslušné použití. Finální preparát musí být sterilní. Aplikace ATB s ohledem na možnost vzniku rezistence mikroorganismů.

7 MIKROBIOLOGIE VZDUCHU, VODY A PŮDY

7.1 Vzduch

Vzduch je směs plynů, par a tuhých částic s poměrně stálým složením. Hlavními složkami ovzduší jsou kyslík, dusík, oxid uhličitý a vzácné plyny. Tyto plynné složky si zachovávají stálý objemový podíl, zatímco množství vodních par je velmi proměnlivé. Další látky, jež jsou výsledkem lidské či přírodní činnosti, se v ovzduší vyskytují ve formě aerosolů a jejich množství i vzájemný poměr značně kolísá. Tuhé částice tvoří především prach a mikroby, případně saze a jiné tuhé nečistoty. Živým organismům v ovzduší (mikroorganismy, pyl rostlin apod.) říkáme **aeroplankton**.

Ve vzduchu nejsou příznivé podmínky pro růst a rozmnožování mikroorganismů. Vzduch obsahuje minimum živin využitelných pro mikroorganismy. Nepříznivě na mikroorganismy působí UV záření a střídání teplot. Limitujícím faktorem je také vlhkost vzduchu. Mikroorganismy se přesto, někdy i ve značném množství ve vzduchu vyskytují. Do

vzduchu se dostávají nejčastěji s prachovými částicemi a kapénkami vody či v malých kapičkách exkretů sliznic a slin. S množstvím prachu ve vzduch stoupá obvykle i množství mikroorganismů, přičemž záleží i na původu prachu (prach z půdy obsahuje nejvíce mikroorganismů). Nejméně mikroorganismů je ve vzduchu ve vysokých polohách, nad ledovci a vodními plochami, kde účinně působí UV záření. Vlhké a teplé podnebí znamená vyšší počet mikroorganismů ve vzduchu. Pohybem vzduchu a větrem se mikroorganismy roznášejí na různá místa.

Složení mikroflóry ve vzduchu kolísá. Pravidelně se vyskytují kvasinky a plísně. Kvasinky např. *Saccharomyces*, *Candida*, *Rhodotorula* se vyskytují ve větší míře zvláště v letních měsících kdy dozrává ovoce, plísně jako např. *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* či *Rhizopus* vytvářejí barevné konidie odolné vůči UV záření. Z bakterií jsou ve vzduchu nejvíce zastoupeny rody *Bacillus*, jejichž spory jsou schopny dlouho odolávat nepříznivým podmínkám, a *Micrococcus*. V menší míře se mohou vyskytovat i některé druhy rodu *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Kocuria*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*. Většina těchto bakterií tvoří barviva karotenoidní povahy, jež je chrání před působením ultrafialového záření. Ve vzduchu se mohou vyskytovat také bakterie rodu *Staphylococcus* zejména *S. aureus* a rodu *Proteus*, které mají dobrou schopnost udržovat se v aerosolu. Ve vzduchu se mohou vyskytovat také patogenní mikroorganismy. Do aerosolu přechází často i *Mycobacterium tuberculosis* a viry. V ovzduší stájí, anebo v centrech epidemií či epizootií, vznikají mimořádné situace. Zde se důležitými vektory mikroorganismů stávají aerosoly (často slizovité povahy) a hmyz.

Kvalita a množství mikroorganismů ve vzduchu závisí na zdrojích kontaminace a proudění vzduchu. Záleží také na počtu osob na pracovišti, jejich činnosti, na používaných strojích a zařízeních, zpracovávané surovině, na úrovni sanitace a hygieny apod. Působí zde samozřejmě i přírodní podmínky včetně nadmořské výšky, polohy, podnebí, ročního období.

Čistota vzduchu je důležitá v potravinářském průmyslu, zdravotnictví a farmaceutickém průmyslu i v zemědělství. Významně přispívá k tvorbě zdravého životního prostředí a zdraví člověka a zvířat. Požadavky na kvalitu vnitřního prostředí staveb s výjimkou prostorů vyžadujících zvýšené nároky na jeho čistotu se pokládají za splněné, **nepřekročí-li koncentrace bakterií 500 KTJ/m³ vzduchu a koncentrace plísní vyšší než 500 KTJ/m³ vzduchu**. Nepřípustný je viditelný nárůst plísní na zdech a povrchu pobytových místností. K zabezpečení dostatečné čistoty vzduchu lze v současnosti využít řadu opatření a způsobů od nejjednoduššího větrání, využití filtrace vzduchu přes různé filtry, UV záření až po aplikaci

nanomateriálů. Z bakterií jsou proti působení UV záření nejodolnější pigmentující bakterie *Micrococcus*, *Staphylococcus*. Všeobecně jsou ale citlivější než plísně. UV působí hlavně na nukleotidy a tím ničí buňky, po 30 min. působení odumírá cca 50 % bakterií a plísňových spor. Z plísní je nejodolnější *Cladosporium*, středně odolný je rod *Penicillium* a nejcitlivější je rod *Aspergillus*. Tekuté desinfekční prostředky použitelné jako aerosol musí být netoxické. Plynné desinfekční prostředky (formaldehydové páry) mohou být použity v uzavřených prostorech bez lidí. Elektrické čištění vzduchu je založeno na tom, že elektricky nabitě částice aerosolu jsou přitahovány k opačně nabitým elektrodám.

7.2 Voda

Voda je nejen základní složkou každého organismu, ale i nevyhnutelným předpokladem jeho existence. Vodu v přírodě nacházíme v různých formách a dělíme ji na srážkovou, povrchovou a podzemní. Podle čistoty a účelu použití pak na pitnou, užitkovou a odpadní.

Pitná voda používaná v potravinářství musí být zdravotně nezávadná a musí vyhovovat požadavkům norem, vzhledem k možnému riziku významného ovlivnění mikrobiální skladby finálních výrobků. Za pitnou vodu se považuje voda dodávaná spotřebitelům systémem hromadného a individuálního zásobování, voda používaná v potravinářských objektech a při dalších epidemiologicky významných činnostech na výrobu, zpracování anebo prodej výrobků určených ke konzumaci, potravinářský led a pára vyráběná z vody.

Užitková voda je taková, která vyhovuje technickým požadavkům a používá se k zemědělským a průmyslovým účelům. Může pocházet z různých zdrojů z řek, rybníků, jezer, dešťová voda. Zásobování musí být upraveno tak, aby nemohla být použita jako pitná. Pro jednotlivé provozy se obvykle upravuje.

Odpadní vody lze podle původu rozdělit na komunální (splaškové), průmyslové a zemědělské. Odlišují se charakterem znečištění, chemickým složením, fyzikálními vlastnostmi podle technologických procesů, ve kterých se voda použila. Hlavními kritérii posouzení škodlivosti průmyslových odpadních vod na recipienty a posouzení efektivnosti jejich znečištění jsou: obsah nerozpustných látek, biologická spotřeba kyslíku (BSK), chemická spotřeba kyslíku (CHSK), celková sušina, teplota. Odpadní vody z potravinářského průmyslu patří většinou mezi netoxické a biologicky rozložitelné odpadní vody. Podle původu je můžeme rozdělit na odpadní vody vzniklé při přípravě surovin na zpracování (cukrovary, škrobárny, konzervárny ovoce a zeleniny, atd.), plavící vody (řepa, brambory), vody ze zpracování surovin (difuzní vody v cukrovarech), nevyužité suroviny a produkty, výrobní ztráty (krev, mléko, pivo, tuky z tukových závodů), oplachovací a umývací vody (mytí lahví,

máčecí vody ze sladoven), chladicí vody (mlékárny, mrazírny, pivovary atd.). Čištění odpadních vod probíhá mechanicky (nejčastěji filtrace, cezení, usazování a zahušťování, flotace) nebo biologicky (aerobní čištění– aktivační proces, biofilmové reaktory nebo anaerobní čištění).

Provozní vody jsou vody pro nejrůznější výrobní procesy, jako např. voda chladicí, promývací apod. Speciální požadavky na ní kladené jsou dané technologií. Neodpovídá zpravidla zdravotně hygienickým požadavkům na vodu pitnou a užitkovou.

Osídlení vody mikroorganismy je závislé na řadě faktorů, z nichž nejdůležitější jsou z fyzikálních faktorů především teplota, provzdušnění, tlak vody a rychlost sedimentace, z chemických pak obsah solí, obsah biogenních prvků, obsah organických látek a obsah rozpuštěných plynů. Mikroorganismy tvoří ve vodě nutnou a specifickou biocenózu, jejímž biotopem je převážně volná voda. I mikrobiální plankton se formuje, podléhá kvantitativním a kvalitativním změnám působením faktorů z okolního prostředí a přitom ovlivňují svým podílem i samotný biotop a do určité míry ho mění. Mikroorganismy osidlující vodní prostředí můžeme rozdělit na dvě skupiny. **Autochtonní mikroorganismy** jsou vodě vlastní, přirození obyvatelé vody např. *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus*, *Chromobacterium*, *Achromobacter*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*, *Serratia marcescens*, železité bakterie *Cladotrix*, sirmé *Sphaerotilus*, mikromycety *Mucor*, *Fusarium*, *Saprolegnia*.

Alochtonní mikroorganismy se do vody dostávají z jiných biotopů, které jsou pro ně původním a základním životním prostředím. V závislosti na kvalitě vodní lokality a jejich geneticky zafixovaných požadavcích zde buď hynou, z nedostatku vhodné výživy, nebo po určitou dobu přežívají. Některé se mohou za vhodných podmínek i pomnožit a daný biotop druhotně osídlit. V některých vodních biotopech lze těžko určit přesnou hranici mezi oběma typy. Především ve znečištěných povrchových vodách a v odpadních vodách často dochází k tak dokonalému přizpůsobení některých druhů (např. půdních), že jsou za daných podmínek pro lokalitu autochtonní. Naopak zase typy téměř nepřizpůsobivé jsou pro nás významnými indikátory původu znečištění vody, např. průmyslovými závody, zvláště potravinářskými, z výroby léčiv, splachem z polí, ze vzduchu atd. Z půdy a ze vzduchu se do vody dostávají bacily – *Bacillus subtilis*, *B. megatherium*, řada nesporulujících tyčinek, nitrifikační a denitrifikační bakterie, kvasinky a plísňe. Vyskytují se i zástupci střevní mikroflóry enterobakterie, enterokoky, *Clostridium perfringens*. Ve vodě se vyskytují příležitostně i patogenní mikroorganismy jako např. *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* aj. Běžnou součástí vody jsou aktinomycety. Počty a druhové zastoupení mikroorganismů podléhá v průběhu roku značným výkyvům. Větší variabilitu vykazují tekoucí vody než stojatá voda.

Pro život ve vodě jsou bakterie poměrně dobře vybaveny, i když nemají účinný aparát, zabraňující jejich sedimentaci. Bakterie se mohou ve vodě poměrně dlouho vznášet. Bakterie osidlují všechny části hydrosféry. Jako součást **neuston** tvoří povrchový film na hladině, jako součást **planktonu** se vznášejí ve vodním sloupci, jako součást **benthosu** spoluvytvářejí biocenózu bahna a sedimentů. Značná část bakterií ve vodě je fixována na rozptýlený, nebo vodou unášený substrát.

Voda jako taková je pro mikroorganismy původním substrátem. Záleží ovšem na tom, zda se jedná o vodu podzemní nebo povrchovou. Nejvyšší a nejčistší voda proto pochází z hlubokých studní, kde je nízký obsah kyslíku, málo živin a daleko nižší teplota než v povrchových vodách. Dalším faktorem, který ovlivňuje osídlení vody mikroorganismy je **přirozená filtrační schopnost půdy** nad podzemní vodou. Takže při toku vody přes tuto půdu dochází k přirozené filtraci a k zachytávání mikroorganismů. Ve srovnání s vodou povrchovou je obsah mikroorganismů ve vodě z podzemních zdrojů výrazně nižší a méně proměnlivý, protože zdroje povrchové jsou na rozdíl od podzemních přístupné jakémukoliv znečištění.

Přírodní vody jsou, před vpuštěním do veřejných vodovodů, v úpravnách vod upraveny takovým způsobem, aby vyhověly právním předpisům na jakost (vyhláška 252/2004 Sb. ve znění pozdějších úprav) a tedy i po stránce mikrobiologické neobsahovaly nadlimitní množství mikroorganismů vč. patogenních. V úpravnách vod se voda upravuje fyzikálně (česle a síta na zachycení plovoucích nečistot, lapáky a usazovací nádrže na suspendované látky), chemicky (síranem železnatým nebo hlinitým či chloridem železitým), biologicky (pískové filtry, provzdušňovací nádrže). Dále se může upravovat tvrdost vody. Voda se desinfikuje chlorem nebo jeho sloučeninami, oligodynamickými prostředky (sagen – kovové Ag - chlorid sodnostříbrný), ozonem, UV zářením.

Vody z veřejné vodovodní sítě jsou kontrolovány a nehrozí tedy ohrožení zdraví spotřebitelů. Jiná situace je u vod studničních. Na základě průzkumů se odhaduje, že značná část studní v ČR je patogenními bakteriemi kontaminována. Skutečnost, že voda ze studny je dlouho používána bez jakýchkoliv pozorovaných nepříznivých důsledků, ještě neznamená garanci její nezávadnosti. U pravidelných uživatelů takové vody se snad může vyvinout tolerance k těmto bakteriím, ale onemocnět mohou jak návštěvy a malé děti, tak uživatelé samotní, pokud se v důsledku různých příčin jejich imunitní systém oslabí.

Pro mikrobiologické posuzování kvality vody je používáno určité spektrum indikátorových mikroorganismů, které obvykle obsahuje **indikátory fekálního znečištění** a **indikátory obecné kontaminace**. Indikátory obecného znečištění tvoří umělá skupina

organotrofních bakterií schopných růst na předem specifikovaném živném médiu s optimem růstu při 22 °C a 36 °C. Bakterie s optimem při 36 °C mají významnější postavení než bakterie s optimem při 22 °C pro jejich těsnější vztah k teplokrevným živočichům. V podstatě jde o běžnou součást mikroflóry okolního prostředí. Jejich význam spočívá především v indikaci průniku organického znečištění z vnějšího prostředí, nebo poruchy a nedostatky při úpravě vody, či neúčinnost desinfekce. Mezi stanovované **indikátory fekálního znečištění** patří **koliformní bakterie** (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*), **termotolerantní koliformní bakterie**, **presumptivní nebo přímo stanovená *E. coli***, **intestinální enterokoky** (*E. faecium*, *E. faecalis*), **siřičitany redukující střevní sporulující anaerobní bakterie - klostridia** (*C. perfringens*). **Indikátorem jiného než fekálního znečištění** je *Pseudomonas aeruginosa*. Současná koncepce indikátorového systému pro pitnou vodu postihuje především průnik fekálního znečištění, které představuje jedno z nejzávažnějších a nejčastějších ohrožení vodního prostředí. Selhává však ve vztahu k virologické, protozoální, mykobakteriální či mycetické a helmintologické kontaminaci, ale také k indikaci přítomnosti bakteriálních agens, jiného než střevního původu, jako mykobakterie, legionely. Mezi indikátorovými mikroorganismy pro teplou vodu ale nalezneme i limity pro legionely a mykobakterie. Přítomnost těchto mikroorganismů ve vodě může indikovat více méně hrubé závady hygienického či epidemiologického charakteru. Dalšími nepříjemnými a doprovodnými mikroorganismy, které nejsou požadovány mikrobiologickými rozbory, jsou: stafylokoky, hemolytické streptokoky, kvasinky rodu *Candida*, aeromonády, salmonely.

7.3 Půda

Přírozeným rezervoárem mikroorganismů je půda. Půda poskytuje organismům živiny a energii a mikroorganismy prostřednictvím svých aktivit a účastí na koloběžích živin zpětně ovlivňují její fyzikální a chemické vlastnosti. Půda je tedy prostředím pro mikroorganismy, ale zároveň je i jejich produktem. Vznik půdy je navozen spolupůsobením biologických a fyzikálně-chemických faktorů, které rozrušují horninový podklad. Půda je směsí zvětralé zemské kůry a organické hmoty včetně celé řady organismů od mikrobů přes živočichy až po rostliny.

Půda jako základní součást životního prostředí je pro člověka nezbytnou podmínkou jeho existence. Tento obrovský význam souvisí s její základní vlastností či charakteristikou, kterou je především půdní úrodnost, její produktivita, biodiverzita a s tím související kvalita a zdraví půdy. Půda je proto bezesporu nejcennějším přírodním bohatstvím. Je přirozenou součástí

národního bohatství každého státu. Zdravá půda je základem produkce kvalitní suroviny pro potravinářský a krmivářský průmysl.

Mezi půdní organismy patří různorodí zástupci rostlinné, živočišné a mikrobiální říše, kteří se označují společným názvem **edafon**. Půdní organismy jsou součástí organické hmoty, která tvoří zhruba 6 % celkové hmotnosti půdy, zbytek tvoří minerální část. Z tohoto celkového množství organické hmoty připadá na tzv. mrtvou organickou hmotu zhruba 85 % hmotnosti, ze zbylé živé organické hmoty připadá asi 8,5 % na kořeny a 6,5 % na edafon. V půdě se vyskytují organismy od mikroskopické velikosti, účastníci se rozkladu organických látek, až po obratlovce, kteří mají výrazný vliv i na fyzikální vlastnosti půdy. Všechny skupiny organismů tak mají vliv na biologické procesy v půdě, které jsou důležité jak pro růst rostlin, tak pro existenci živočichů. Celková svěží hmotnost edafonu v půdě může dosahovat 4 - 20 t/ha, kvantifikovaná jako hmotnost sušiny činí tedy 1 - 5 t/ha, někteří autoři uvádí i hodnoty vyšší. Edafon se svou činností v půdě podílí na zvětrávání hornin, rozkladu a syntéze organických látek, tvorbě humusu, promíchávání minerálních a organických složek půdy, tvorbě půdních agregátů.

Rozdělení půdních organismů

Půdní organismy můžeme dělit podle různých kritérií. Přirozeně a trvaleji se vyskytující organismy označujeme jako **autochtonní (původní)**. Jsou schopny rozkládat i humus, jsou charakterizovány pomalou, ale konstantní aktivitou. Z řad mikroorganismů se jedná například o bakterie rodů *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Cellulomonas*, z mikroskopických hub pak *Mucor*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*. **Zymogenní (oportuní)** mikroorganismy se objevují ve velkých počtech při přítomnosti vhodného lehce rozložitelného substrátu a jsou charakterizovány velkou metabolickou aktivitou, mající významný podíl na procesech mineralizace. Patří se například bakterie rodu *Bacillus*, *Mycobacterium*, některé druhy rodů *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Aeromonas* a sinic rodů *Nostoc*, *Anabaena*, nebo hub rodů *Rhizopus*, *Fusarium*, *Cephalosporium*. V půdě najdeme i **patogenní** mikroorganismy, jsou zde přítomny především patogeny rostlin (*Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Erwinia*, *Clavibacter*, *Agrobacterium*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Phytophthora*), ale i člověka (např. *Clostridium*), pro které je půda přirozeným stanovištěm, jsou to tedy patogeny primární. K sekundárním patogenům, kteří se dostávají do půdy sekundárně a mohou v ní přežívat dlouhou dobu patří například *Neisseria* sp. nebo *Bacillus anthracis* (původce sněti slezinné – antraxu), ty můžeme označit též jako

alochtonní organismy. Půda je tedy z pohledu potravinářského významným zdrojem mikroorganismů, které mohou kontaminovat potravinové suroviny nebo potraviny a podílet se na jejich kažení (*Pseudomonas*, *Erwinia*, *Penicillium*, *Aspergillus*, aj.) nebo mohou být původci alimentárních onemocnění (*Clostridium*, *E. coli*, *Salmonella* aj.).

Podle funkce v potravním řetězci ekosystému, kde každý organismus má vymezené místo a funkci při zabezpečování koloběhu látek a kde jsou jednotlivé skupiny organismů na sebe vázané jako na zdroj výživy a energie a přeměně energie, dělíme organismy na:

- **Producenty**, což jsou **autotrofní** organismy, které jsou schopné z anorganických sloučenin vytvářet organické látky (**primární produkce biomasy**). Patří sem některé mikroorganismy (sinice, řasy, chemoautotrofní bakterie), ale rozhodující jsou hlavně zelené rostliny.
- **Konzumenty**, tedy heterotrofní organismy, především z řad živočichů, kteří žijí v určitém ekosystému buď trvale, nebo migrují z ekosystému do ekosystému. Patří sem býložravci, masožravci, všežravci ale i parazitické rostliny a půdní mikroorganismy, které spolu s živočichy vytvářejí **sekundární produkci biomasy**.
- **Reducenty (dekompozitory)**, kam patří heterotrofní organismy představované v ekosystémech především bakteriemi, houbami a prvoky. Jejich hlavní funkcí je rozklad a přeměna odumřelého organického materiálu primární i sekundární produkce až na minerální látky.

Podle systematického zařazení rozlišujeme: **fytoedafon** bakterie, aktinomycety, houby, řasy a **zoedafon** půdní živočichové (prvoci, stonožky, žížaly a další).

Podle velikosti, bez ohledu na to z jaké říše organismy pocházejí, můžeme rozdělit edafon na:

- **Mikroedafon** (menší než 0,1 nebo 0,2 mm) - Najdeme zde v podstatě všechny skupiny mikroorganismů (**bakterie, aktinomycety, sinice, řasy, většinu hub, prvoky** ale i **viry**). Nejpočetnější a nejdynamičtější složkou půdních mikrobiálních společenstev mikroedafonu jsou autotrofní a heterotrofní bakterie včetně aktinomycet a sinice. Další význačnou skupinou v této kategorii jsou houby resp. mikromycety s celou řadou fyziologických, genetických a morfologických forem (kvasinky, spory hub). Celková plocha povrchu buněk bakterií v půdě do hloubky 30 cm může na ploše jednoho hektaru dosahovat až 600 ha, u mikromycet až 470 ha.

- **Mezoedafon** (0,1–2 mm) který tvoří drobní živočichové o velikosti od 100 µm do zhruba 0,2-0,5 cm. Patří sem především drobní členovci (roztoci, chvostokoci, hlístice).
- **Makroedafon** (2–20 mm) jež tvoří především roupice, hmyz, mnohonožky, stonožky, suchozemští stejnonožci, pavouci a měkkýši.
- **Megaedafon** (> 20 mm) do nějž patří hlavně žížaly a obratlovci (např. hraboši, krtci).

Prostorové rozmístění a počty organismů v půdě

Půda je heterogenní systém a také výskyt edafonu je velmi nerovnoměrný. Nerovnoměrnost výskytu se týká jak času, kdy se mění mikroklimatické podmínky a dostupnost živin a zdrojů (nejdynamičtější a nejrychleji se rozvíjející složkou edafonu jsou bakterie), tak samozřejmě i prostoru.

Podle jednotlivých skupin půdní mikroflóry dosahují průměrné počty od několika miliónů až po stovky miliard jedinců na 1 m². Hmotnost mikroorganismů v jednom gramu půdy může dosahovat 0,6 - 3 mg. Na 1 m² půdy do hloubky 0,2 m můžeme najít 1 - 100 g a v optimálních podmínkách dokonce až 1000 g biomasy mikroorganismů. V **1g suché půdy najdeme 10⁷ - 10¹¹ bakterií**, s aktivním povrchem jejich těla až 2000 mm², celková délka aktinomycet v gramu půdy může dosahovat až 250 m. Počet **hub** (mikromycet) v jednom gramu půdy je podle typu půdy kolem **10⁴ - 10⁶** o **celkové délce hyf 100 metrů** i víc (výjimečně až 2000 m). Množství autotrofních řas je 10¹ - 10⁶ v gramu především v horních vrstvách půdy. **Povrch těla bakterií** vyskytujících se na ploše jednoho hektaru do hloubky 0,2 m může při hmotnosti 800 kg činit až **600 ha**. U **hub** může tato plocha dosahovat až **470 ha** při hmotnosti 3000 kg (i více) jejich biomasy. Dohromady může tedy **celková plocha** tohoto velmi aktivního povrchu **všech mikroorganismů** tvořit až **4600 hektarů na ploše 1 ha půdy**.

Sledujeme-li **vertikální distribuci** v prostoru dle údajů různých autorů, najdeme bez ohledu na různé půdní druhy a typy nejvíce organismů ve vrstvě půdy zhruba do 10 cm, maximálně do 30 cm. Organismy, vyskytující se v této vrstvě představují zhruba 75 % až 90 % veškeré biomasy organismů v půdě, do hloubky 50 cm je to až 95 %. Avšak některé bakterie lze nalézt i ve velkých hloubkách (stovky metrů), jde především o sulfát-redukující a metanogenní bakterie či archebakterie.

Podobně nerovnoměrná je i **horizontální distribuce mikroorganismů**. Jiné množství mikroorganismů najdeme na půdních agregátech, jiné v půdním roztoku, několiknásobně více půdních organismů najdeme v bezprostředním okolí kořenů v tzv. **rhizosféře** než

v ostatních partiích půdy. Rhizosféra je tenká vrstvička půdy přiléhající ke kořenům rostlin, kde dochází ke kontaktu kořenů rostlin a půdy, zhruba do vzdálenosti 1mm a kde dochází k vzájemným interakcím kořenů i s půdními organismy. Jedná se o obrovský komplex vzájemně provázaných dílčích reakcí zprostředkovaných vzájemným působením rostliny, půdy a půdních mikroorganismů. V rhizosféře dosahuje intenzita biochemických dějů až o několik řádů vyšších hodnot než v okolní tzv. volné půdě.

Mikrobní konsorcia v rhizosféře, vytvářející organizovaná společenstva s kolektivní funkcí tzv. **biofilmu**, v němž se rozvíjí složité vzájemné vazby a vztahy, pak naopak zprostředkují kořenům rostlin příjem důležitých, často nedostatkových živin. Mikroorganismy produkují i další pro rostliny aktivizující látky a stimulanty jako jsou např. auxiny, gibbereliny, ethylen, různá antibiotika atd.. Dochází k produkci tzv. informačních molekul, pomocí kterých dochází k vzájemné komunikaci mezi rostlinou a mikroorganismy.

V rhizosféře dochází také vlivem působení rhizosferních mikroorganismů k inhibici růstu půdních patogenů napadajících rostliny (např. *Fusarium*) a naopak ke stimulaci klíčení spor a růstu hyf hub, které jsou antagonisty patogenních organismů. Najdeme zde celou řadu G+ a G- bakterií (např. *Agrobacterium radiobacter* který je antagonist *A. tumefaciens*) i mikromycet (např. *Pythium oligandrum* což je antagonist *P. ultimum* a *Botrytis cinerea*).

Populační hustota mikroorganismů, zvláště bakterií, je tedy mnohem vyšší v rhizosféře než ve volné půdě. Relativní vzestup počtu mikroorganismů se udává jako **poměr R/S**, kde R je počet mikroorganismů v 1 g půdy rhizosféry a S je počet mikroorganismů v 1 g volné půdy. Poměr R/S nabývá hodnot 5 - 100 a závisí mj. i na stáří rostliny, druhu rostliny a na jejím výživném stavu.

Dekompoziční procesy

Nejzásadnějšími procesy, které se v půdě odehrávají vlivem působení půdních organismů, především mikroorganismů jsou **procesy dekompoziční**. Dějům kdy větší část organických látek dostávajících se do půdy je v procesech dekompozice rozložena na látky minerální říkáme **mineralizace**. Menší část může být vázána v biomase mikroorganismů (**imobilizace**). Část organické hmoty je rozložena částečně, dochází k resyntézám neúplně rozložených organických látek a přeměně na humusové látky relativně odolné rozkladu, dochází tak k procesu **humifikace**.

Kvalita a obsah půdní organické hmoty také zásadně ovlivňuje zadržování živin a stabilitu půdních agregátů; snižování jejího obsahu zhoršuje vodní infiltrační kapacitu půdy. Úbytek půdní organické hmoty vede tedy k **degradaci půdy**.

Bioremediace

Vysoká variabilita půdních organismů (především mikroorganismů) a jejich rozličných metabolismů, především dekompozičních, poskytuje možnost využití autochtonních mikroorganismů při odstraňování toxických či jinak škodlivých látek (které jsou často antropogenního původu) z životního prostředí. Těmto procesům využitelným a probíhajícím i v půdě, kdy dochází k transformaci, rozkladu nebo imobilizaci polutantu pomocí mikroorganismů říkáme **bioremediace**. Tohoto procesu je využíváno k transformaci těžkých kovů v půdě, rozkladu či k inaktivaci různých cizorodých látek (například pesticidů, kterých se celosvětově spotřebuje 1 000 000 t/rok, polutantů z průmyslové činnosti či automobilového provozu, aromatických uhlovodíků, ropných látek atd.). Aby tyto procesy v půdě probíhaly, musí být látka v půdě v pro mikroorganismy přijatelné formě a fyzicky dostupná (rozpustná ve vodě, nasorbovaná na půdní částice atd.) a v určité koncentraci. Patřičné mikroorganismy musí být přítomny v místě kontaminace a vybaveny určitými enzymy, dále zde musí být příhodné klimatické podmínky (teplota atd.). Schopnost metabolizovat xenobiotika má velké množství bakterií, aktinomycet, mikromycet, případně i řas. Mikroorganismy mohou využívat xenobiotika jako zdroj uhlíku, dusíku či jiných živin a energie pro růst své biomasy. Z řad bakterií s biodegradačním potenciálem jsou to především rody *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Alcaligenes*, *Deinococcus*, *Desulfomonile*, ale i zástupci mikromycet rodů *Candida*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* či vyšších hub např. *Pleurotus*.

8 MIKROBIOLOGIE NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH POTRAVIN A POTRAVINOVÝCH SUROVIN

8.1 Maso a masné výrobky

Libové maso zbavené viditelného tuku a kostí obsahuje 70 - 80 % vody (a_w 0,99), asi 20 % bílkovin, okolo 5 % tuku, přibližně 1 % minerálních látek, malé množství nízkomolekulárních dusíkatých látek a asi 0,5 - 1 % glykogenu. Tyto hodnoty kolísají podle druhu zvířete, pohlaví, plemene, věku a způsobu výživy. Hodnota pH masa živého zvířete se pohybuje okolo 7,0. Ihned po zabití je pH masa 7,0 - 6,8. Za 24 hodin po porážení pH masa klesne vlivem vzniklé kyseliny mléčné na 5,8 - 5,3 (hovězí maso do 6,2 a vepřové do 6,0). Tyto vlastnosti z masa činí ideální substrát pro rozvoj mikroorganismů.

8.1.1 Čerstvé maso

Svalovina zdravých zvířat podle současných poznatků neobsahuje mikroorganismy. Svalovina může být infikována mikroorganismy u nemocných zvířat nebo jako důsledek stresu před porážkou (primární kontaminace). Hlavním zdrojem sekundární kontaminace masa je kůže a trávící trakt jatečných zvířat. Vykolování je nejryzиковější technologickou operací čisté porážky zvířat. Na cm^2 kůže se vyskytuje $10^6 - 10^8$ mikroorganismů a ve zvířecích výkalech minimálně 10^7 . Ke kontaminaci masa může dojít prakticky při každé operaci technologického procesu. Po každé operaci se může množství bakterií zvýšit asi o jeden logaritmický řád. Významným zdrojem kontaminace jsou ruce pracovníků, kteří manipulují s masem a používané nástroje a zařízení, pokud nejsou pravidelně a řádně čištěny. Během technologie porážení je v závislosti na hygienických podmínkách povrch svaloviny kontaminován – ve špičkových provozech na 10^2 až 10^3 u provozů s nedostatečnou úrovní hygieny 10^6 až 10^7 mikroorganismů na cm^2 .

Skladba mikroorganismů čerstvého masa se po jeho technologické úpravě značně mění a závisí na mnoha faktorech. Nejčastěji se vyskytují bakterie rodu *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*. Z plísní pak *Cladosporium*, *Sporotrichum*, *Geotrichum*, *Thamnidium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Monilia*. Je třeba počítat i s výskytem patogenních mikroorganismů, zejména intestinálního původu – *Shigella*, *Campylobacter* aj.

8.1.2 Chlazené maso

Mikrobiologické poměry při chlazení jsou závislé na teplotě, vlhkosti, pohybu vzduchu, kvalitě masa a přítomné mikroflóře.

Ihned po jatečném opracování musí být maso vychlazeno, aby se zabránilo jeho zkáze. V EU se požaduje, aby maso bylo vychlazeno na teplotu pod $7\text{ }^\circ\text{C}$, pro jeho delší údržnost je však třeba ho uchovávat při teplotách kolem $0\text{ }^\circ\text{C}$. Maso v chladírnách na povrchu osychá – dochází tak k inhibici mikroorganismů poklesem a_w . Do hloubky mikroorganismy pronikají tím pomaleji, čím nižší teplota se použije. Zchlazováním masa se výrazně omezí růst mezofilních mikroorganismů, které bývají hlavní součástí původní mikroflóry. Teplota chlazeného masa umožňuje rozvoj psychrotrofních mikroorganismů, které s postupem času dominují. Podmínky pro růst mikroorganismů nejsou v každém místě chlazených půlek (čtvrtí) stejné. Nejrychlejší množení probíhá v nařezaných oblastech v okolí plece, krku, podél hrudního koše. Na vnější straně těla je růst mikroorganismů pomalejší.

Převažují psychrotrofní mikroorganismy *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, méně pak *Serratia*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, z plísní pak zejména *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*. Metabolické procesy psychrotrofů jsou specifické – tvoří se jiné metabolity než při vyšších teplotách. Produkují např. více slizu při nízkých teplotách než při teplotách optimálních pro jejich růst což vede k tzv. **slizovatění chlazeného masa**. Maso uchovávané při běžné atmosféře má poměrně krátkou údržnost, která mimo jiné závisí především na kvantitativním a kvalitativním složení primární mikrobiální kontaminace, teplotě uchovávání, vodní aktivitě a dostupnosti kyslíku. U baleného popř. vakuově baleného masa kde jsou potlačeny aerobní mikroorganismy, se kažení účastní i mikroorganismy rodu *Lactobacillus*, *Shewanella putrefaciens*, *Serratia liquefaciens*, *Brochothrix thermosphacta*, psychrotrofní *Enterobacteriaceae*, psychrotrofní klostridia a bacily a jiné.

Rychlost i rozsah rozkladu závisí na teplotě a dalších podmínkách skladování. Je proto nutné, dosáhnout co možná nejdříve potřebných nízkých teplot, případně využít doplňujících konzervačních a antimikrobiálních zákroků, jako např. snížení pH (postřik roztokem organických kyselin, zejména mléčné), snížení aktivity vody, využití vhodného obalu nebo úprava atmosféry v obalu či skladovacím prostoru.

8.1.3 Mražené maso

Mražení masa probíhá při cca $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, jeho skladování pak při cca $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při těchto teplotách se mikroorganismy nemnoží. Skladba mikroorganismů závisí na složení mikroflóry před zmražením a schopnosti tento zákrok přežít. Při zmražení dochází ke konzervaci mikroorganismů, které se po rozmražení mohou opět začít pomnožovat, spory mikroorganismů mražení snášejí. Nejmenší odolnost vůči zmražení vykazují např. G- tyčinky *E. coli*, *Serratia*, *Pseudomonas aeruginosa* a vegetativní stádia *Bacillus megatherium*. Odolnější jsou psychrofilní mikroorganismy *Pseudomonas fluorescens*, *Alcaligenes*. Nejdolnější jsou např. *Enterobacter faecalis*, *Micrococcus luteus*, podobnou odolnost vykazují i plísně, z nichž nejvýznamnější jsou *Mucor mucedo*, *Thamnidium elegans*, *Penicillium crustaceum*, *Cladosporium herbarum*, *Botrytis cinerea* – většinou napadají libové části masa. Uvádí se, že se u mraženého masa vyskytují mikroorganismy v tomto pořadí 48 % G+ koky, 16 % kvasinky, 15 % G- tyčinky, 10 % plísně, 8 % sporující G+ tyčinky.

8.1.4 Kažení masa způsobené mikroorganismy

Mikrobiální kažení masa může probíhat dvěma směry od povrch do středu anebo uvnitř ve hmotě masa zvláště v bezprostřední blízkosti kostí. Na kažení se může podílet řada mikroorganismů. Nejvýznamnější jsou proteolytické a lipolytické pseudomonády *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, které často tvoří společenstva se skupinou *Acinetobacter-Moraxella*, dále *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* a *Bacillus*, v případě kažení masa uvnitř ve hmotě i příslušníci rodu *Clostridium* (*C. perfringens*, *C. sporogenes* aj.). Vysoké počty mikroorganismů mohou být příčinou charakteristických projevů kažení masa, jimiž jsou zápach, způsobené produkty rozkladu bílkovin a tuků, který se projevuje, když mikroorganismy dosáhnou počtů kolem 10^6 KTJ/cm², **povrchové oslznutí**, jenž je patrné při počtech mikroorganismů okolo 10^8 KTJ/cm². Pokračuje-li kažení dále, rozvine se povrchová hniloba, kdy aerobní mikroorganismy započnou peptonizovat bílkoviny. Maso mění barvu, páchne a má alkalickou reakci. Z povrchu se rozšiřuje do hloubky masa hlavně okolo kostí, kloubů a velkých cév.

Hluboká hniloba masa je anaerobní proces, při kterém vznikají silně páchnoucí látky (merkaptany, indol, skatol, amoniak a další) jako produkty rozkladu proteinů. Zde se uplatňují anaerobní nebo fakultativně anaerobní bakterie (*Clostridium putrefaciens*, *C. sporogenes* aj., *E. coli*, *Alcaligenes*). **Zapaření** vzniká při zvašování teploty v opracovaném mase rozkladem fosforečných sloučenin bohatých na energii. Kromě autolytických pochodů se zde uplatňuje rozkladná činnost bakterií, jako jsou klostridia a koliformní bakterie. Této změně napomáhá pozdní vykrvení a vykolení, pozdní stažení kůže, nakupení nevychládlého masa. **Plesnivění masa** hlavně u masa skladovaného je poměrně častým projevem kažení, ke kterému může vzhledem k vlastnostem plísní, docházet i při nízkých teplotách. Jsou rozkládány bílkoviny a tuky, uvolněný amoniak zvyšuje postupně alkalitu, maso má zatuchlý pach. Na mase je patrný nárůst kolonií plísní. Nejvýznamnější jsou *Mucor mucedo*, *M. racemosus*, *Thamnidium elegans*, *Penicillium crustaceum*, *P. expansum*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus*. Růst mikroorganismů na povrchu masa vyvolává různé barevné změny, červené skvrny způsobuje *Serratia marcescens*, žluté *Micrococcus*, *Flavobacterium* či *Sarcina*. *Halobacterium halobium* způsobuje skvrny na povrchu tukových částí, které vlivem žluknutí a působením peroxidů přechází ze žluté přes nazelenalou na purpurovou až modrou. *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio fisheri* a jiné fosforeskující a luminiscenční bakterie způsobují fosforeskování povrchu masa.

U solených (lákovaných) masných výrobků dochází v lácích k vytvoření typické mikroflóry tvořené halotolerantními kmeny čeledí *Micrococcaceae* a *Staphylococcaceae*

(rody *Micrococcus* a *Staphylococcus*) a bakteriemi mléčného kvašení (rody *Lactobacillus*, *Lactococcus*, enterokoky – *Enterococcus faecium*) bakteriemi rodu *Vibrio* a **halotolerantními kvasinkami**. Zvrhnutí láku pak způsobuje nadměrné pomnožení určité skupiny mikroorganismů (hniloba láku způsobená rozvojem vibríí a zkysnutí láku způsobené např. stafylokoky a laktokoky), jehož příčinou je nedodržení hygienických a technologických parametrů při nakládání masa.

Trvanlivost a mikrobiální kažení tepelně opracovaných masných výrobků je dána především jejich dostatečným záhřevem (teplota v jádře obvykle 70 – 75 °C, výrobky k přímé spotřebě – jitrnice apod. tepelné opracování při 80 - 90 °C). V opačném případě dochází k jejich velmi rychlému kažení, na němž se mohou podílet např. laktobacily působící zelenání výrobků (reakce tvořeného peroxidu vodíku s myoglobinem). Tepelné ošetření u konzerv je voleno s ohledem na likvidaci sporulujících mikroorganismů tedy min 3 min. při 121 °C, v praxi se doba prodlužuje cca na 10 min. Na kažení těchto výrobků se mohou podílet právě sporulující bakterie, které přežily tepelný zákrok např. příslušníci rodu *Clostridium*, *Bacillus* a *Geobacillus* (*G. stearothermophilus*). V případě rekontaminace netěsnostmi uzávěrů, při nedostatečném tepelném ošetření to mohou být i jiné bakterie (koliformní, enterokoky, *Proteus*, aj.). V polokonzervách ošetřených nižšími teplotami se mohou vyskytovat mikrokoky, stafylokoky, enterokoky, bakterie mléčného kvašení a sporulující bakterie.

8.1.5 Fermentované masné výrobky

Fermentované masné výrobky jsou tradičními produkty v mnoha oblastech světa, v rámci Evropy jsou tyto výrobky spojovány především s její jižnější částí. Regionálně se tyto výrobky mohou významně odlišovat a mohou být řazeny do různých skupin. Fermentované masné výrobky lze podle technologie výroby, údržnosti a struktury rozdělit na: **Trvanlivé fermentované salámy** a **trvanlivá fermentovaná masa**, část výrobků s krátkou dobou trvanlivosti řadíme k **výrobkům tepelně neopracovaným určeným k přímé spotřebě bez další úpravy** (čajovky, métský salám apod.)

Trvanlivé fermentované salámy nejsou tepelně opracovány, údržnosti je dosaženo snížením pH (tvorba kyseliny mléčné) a následným sušením. Aktivita vody u hotových výrobků určených k expedici by měla být 0,93 a nižší, z důvodu zamezení nežádoucí činnosti mikroorganismů a výskytu patogenů. Patří sem takové výrobky jako uherský salám, lovecký salám, herkules, paprikáš, čabajská klobása a další. Dříve se tyto výrobky dělily ještě na podskupiny podle odlišností ve způsobu výroby a v některých vlastnostech. Velmi často ale nebyla mezi těmito skupinami ostrá hranice a mnohé z výrobků ležely právě na této hranici. K

tepelně nepracovaným výrobkům určeným k přímé spotřebě bez další úpravy patří např. čajovky, mětský salám apod. Jsou to výrobky různé struktury, na omak i skus měkké až pastovité. Mají krátkou dobu zrání okolo 14 dní, takže ztráty sušením jsou nízké max. 10 %. Vyznačují se vysokým obsahem tuku. Fermentací je dosaženo pH 5,4 - 5,6. Výrobky se nesouší pouze se zauzují studeným kouřem, jejich trvanlivost je tedy velice krátká. Vzhledem k tomu mohou být po mikrobiologické stránce rizikovými potravinami a jejich výrobě, prodeji a skladování musí být věnována zvýšená pozornost. Tyto výrobky musí být skladovány při teplotě pod 5 °C. Doba použitelnosti je zpravidla max. 48 hodin od expedice. **Trvanlivá fermentovaná masa** (syrové šunky, pršuty) patří historicky k nejstarším masným výrobkům. Jejich trvanlivost je dána nízkou a_w . Jsou konzervovány solením a sušením. Jsou to výrobky technologicky náročné, v první fázi výroby jsou uchovávány při nízkých teplotách, pak dlouho zrají a schnou. Často se vyrábí bez použití dusitanů.

Surovinám pro výrobu fermentovaných salámů musí být věnována velká pozornost jak z hygienického tak z technologického hlediska. Množství kontaminujících mikroorganismů vnesených surovinou musí být co nejmenší. Nízká mikrobiální kontaminace je významná především v počátečním období zrání, kdy se proti ní musí prosadit kulturní mikroflóra zajišťující fermentaci a podílející se na celkovém zrání. Vlastní výroba spočívá v mělnění hlavních složek díla tj. masa a tuku, které mají být před mělněním zmrazené nebo alespoň namrazené (ne však dlouhodobě), aby se dosáhlo správné mozaiky výrobku. Do mělněného masa se vmísí ostatní suroviny. Hotové dílo se pak plní (naráží) do střev propustných pro plyny i vodu. Uzení se užívá jen tam, kde není žádoucí plísňový porost na povrchu výrobku, neboť kouř působí antifungálně. Udí se kouřem o teplotě cca 18 - 23 °C buď v průběhu zrání, nebo po ukončení jeho rozhodující fáze. Kouř může negativně ovlivnit odbourávání cukrů především u salámů s malým průměrem.

Rozhodující fází výroby je **zrání** jakožto širší proces a vlastní **fermentace** jako jeho podstatná součást. Jde o komplex procesů, většinou mikrobiálních, které se ve svém průběhu navzájem ovlivňují a rozhodují o údržnosti, textuře, vybarvení, chuti i aromatu finálních výrobků. Během zrání jsou odbourávány a přeměňovány jednotlivé složky díla. Bílkoviny se štěpí působením zejména mikrobiálních enzymů na jednodušší sloučeniny, z volných aminokyselin vznikají aldehydy a těkavé organické kyseliny, které se podílí na aroma výrobků. Současně však vzniká i amoniak a aminy. Působením solí a snižováním pH dochází k denaturaci bílkovin a tvorbě správné textury výrobků. Tuky podléhají oxidaci a hydrolýze působením nativních i mikrobiálních lipas. Štěpení tuků a následná oxidace mastných kyselin

velmi výrazně ovlivňují aroma výrobků. Sacharidy jsou zkvašovány na organické kyseliny především na kys. mléčnou, což vyvolává silné okyselení.

Složení mikroflóry je rozhodujícím faktorem zrání, mění se v průběhu výroby, vlastního zrání i v průběhu skladování. Změny mikroflóry závisí na pH, a_w - její snížení předsušením zpomaluje fermentaci, teplotě, obsahu sacharidů. Při vyšší teplotě může dojít na počátku zrání k rozvoji nežádoucí mikroflóry, rychlému okyselení a nadměrné tvorbě plynu. Naopak příliš nízké teploty zpomalují nežádoucím způsobem zrání. V prvních fázích si konkurují proteolytické mikroorganismy a bakteriemi mléčného kvašení. Snížením pH (při odbourávání sacharidů) je potlačována hnilobná mikroflóra a prosazují se mléčné bakterie. Obsah mikroorganismů v tomto období stoupá z 10^4 až na 10^{11} v 1g. V důsledku zvyšování osmotického tlaku během zrání klesá množství i aktivita bakterií mléčného kvašení a počnou převládat lipolytické bakterie. Nejvýznamnější skupinu mikroorganismů tvoří **bakterie mléčného kvašení** zvláště u rychle zrajících salámů. Zkvašují sacharidy na kyselinu mléčnou a v menším množství i další kyseliny (mravenčí, pyrohroznovou, propionovou atd.). Z relativně malého počtu se jejich množství velmi rychle zvýší a konkurují tak ostatní mikroflóře. Významnou skupinou jsou též mikrokoky, ty mohou růst i v prostředí s nižší a_w a jsou aerobní, rostou tedy především v povrchových vrstvách salámů. Jsou katalasapozitivní, odbourávají peroxid vodíku, zároveň i redukují dusičnany na dusitany. Obě výše uvedené skupiny jsou složkami startovacích kultur, které se přidávají do díla při výrobě. Ve startovacích kulturách se nejčastěji vyskytují laktobacily např. *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. fermenti*, *L. sakei*, *L. curvatus*. Dále se používají *Staphylococcus xylosus* a *Staphylococcus carnosus*, *Pediococcus pentosaceus*, *P. cerevisiae*, druhy rodu *Micrococcus* popř. kvasinky rodu *Debaryomyces*. Bakterie mléčného kvašení se přidávají do díla v množství 10^6 - 10^7 /g. Protože některé druhy produkují významné množství peroxidu vodíku (*L. sakei*, *L. curvatus*) obsahují startovací kultury s těmito bakteriemi i mikrokoky. Další mikroorganismy působící při zrání fermentovaných salámů jsou např. některé druhy rodu *Leuconostoc*. Na počátku zrání se ale mohou vyskytovat i zástupci rodu *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Escherichia* apod. U některých salámů je na povrchu žádoucí bílý nebo šedobílý porost plísně. Plísně na povrchu zajišťují typický vzhled některých salámů, udržují suchý povrch, chrání ho před nadměrným přístupem kyslíku a přispívají k aroma výrobku. Využívají se především plísně rodu *Penicillium* - *P. candidum*, *P. nalgiovense*, *P. chrysogenum*, *P. expansum*.

Fermentované výrobky jsou náchylné na mikrobiální kažení. Riziko kažení se zvyšuje, když se na jejich výrobu použijí suroviny nevhodné jakosti (maso s příliš vysokým obsahem

mikroorganismů nebo mikrobiologicky kontaminované technologické obaly), nejčastěji ale při nevhodných podmínkách zrání (teplota vzduchu jeho vlhkost a cirkulace). V prvních hodinách a dnech zrání je riziko největší, protože syrový obsah má ještě poměrně vysoké hodnoty pH a a_w .

8.2 Drůbež a výrobky z drůbežího masa

Mikroorganismy nacházející se u jatečné drůbeže jsou složeny z mikroorganismů přítomných před smrtí, ale hlavní část je výsledkem kontaminace v průběhu technologického procesu.

Mikrobiální kontaminace povrchu těla drůbeže má značný význam v průběhu celého technologického postupu. K přirozené mikroflóře pokožky se přidružuje silnější kontaminace z peří a běháků, zejména u znečištěné drůbeže. Jde zejména o tyto mikroorganismy *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, **koliformní bakterie**, *Alcaligenes*, *Proteus*, *Bacillus*, aj. **včetně některých kvasinek a plísní.**

Při **škubání** se používá voda cca 60 °C teplá inhibující mikroorganismy na povrchu těla, voda tedy není významným zdrojem kontaminace pokud se dodrží její teplota a pravidelná výměna. Z hlediska mikrobiální kontaminace má velký význam **kuchání**, oddělování vnitřností od střevního traktu a těla a oplachování těla a vnitřností. V těchto technologických úsecích se uplatňují zejména mezofilní mikroorganismy a to č. *Enterobacteriaceae*, **stafylokoky, enterokoky, aerobní sporulující mikroorganismy**. Při **chlazení** drůbeže a především pak při chlazení vodou dochází ke kvalitativní změně skladby mikroorganismů. Kuchaná drůbež přichází do chladicí vany . Při silné kontaminaci vody může dojít ke kontaminaci velkého počtu kusů. Část této vody cca 5 % drůbež absorbuje a tím se zvyšuje její kontaminace. Zde se tvoří již 70 % celkového počtu psychrotrofních mikroorganismů. V současnosti se proto používá k chlazení sprchování vodou nebo chlazení proudem vzduchu či kombinace obého. **Mražení** snižuje počet mikroorganismů, neboť některé odumírají. Většina jich ale přežívá, složení se ovšem redukuje na psychrotrofní mikroorganismy např. *Pseudomonas*, *Alcaligenes*. Chlazenou drůbež uchovávanou pod 10 °C kazí zejména *Pseudomonas*, *Flavobacterium* a kvasinky *Torulopsis (Candida)* a *Rhodotorula*. U skladované nad 10 °C převládají mikrokoky, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*.

Výrobky z drůbežího masa

Skladba mikroorganismů závisí na mikrobiálních poměrech opracované drůbeže, na hygieně a další technologické úpravě, balení a skladování. U **mražených polotovarů a hotových jídel** z drůbeže je třeba počítat s přítomností psychrotrofních mikroorganismů. Zejména rodů

Pseudomonas, Alcaligenes, Micrococcus, Flavobacterium, Lactobacillus, dále to mohou být *Cladosporium, Sporotrichum, Penicillium, Monilia, Saccharomyces*. Z hlediska hygienické jakosti má zvláštní význam pro tento druh výrobků skupina lipolytických a proteolytických mikroorganismů. Na mikrobiální kontaminaci se může významně podílet **vykošťování drůbežního masa**. U uzených a vařených specialit se mikrobiální poměry neliší od výrobků např. z vepřového masa. Významné je nebezpečí kontaminace patogenními mikroorganismy zejména rodu *Campylobacter* a *Salmonella*.

8.3 Ryby a plody moře

Maso ryb obsahuje velké množství bílkovin a vitaminů. Vyznačuje se též nízkým obsahem sacharidů a vysokou hodnotou aktivity vody. Pro tyto své vlastnosti podléhá rychle zkáze. Zdrojem mikroorganismů podílejících se na kažení ryb je především jejich kůže pokrytá slizem, který je vhodným prostředím pro mikroorganismy. Počet mikroorganismů na povrchu ryb se pohybuje od 100 až po několik milionů na cm^2 . Počet mikroorganismů v zažívacím traktu se může pohybovat od 10^3 do $10^8/\text{ml}$. Na žábách se zjišťují počty v hodnotách několik tisíc až několik milionů v 1 g. Ve svalovině ryb jsou celkové počty mikroorganismů zjišťovány v rozpětí od nuly do 10^3 v 1 g. Mikroorganismy poměrně snadno pronikají poškozenou kůží do masa ryb. Nepoškozená kůže je dobrou bariérou proti pronikání mikroorganismů po asi 8 dnů od usmrcení ryb. Významným zdrojem nežádoucích mikroorganismů je i trávicí trakt ryb. Na kažení rybího masa se podílí celá řada mikroorganismů, z nichž nejvýznamnější patří k rodům *Pseudomonas, Alteromonas, Moraxela, Acinetobacter* a při vyšších teplotách také *Bacillus, Micrococcus* a bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*. Kažení je provázeno barevnými změnami a intenzivním zápachem, který způsobuje amoniak, sirovodík, methylmerkaptan, dimethylamin, trimethylamin a další biogenní aminy vznikající rozkladem dusíkatých látek.

U ryb s vysokým obsahem histidinu v tkáních (zejména ryby čeledi *Scombroidae* – makrelovité např. makrela, tuňák až 2,4 %) vzniká ve velkém množství toxikologicky nejvýznamnější biogenní amin **histamin**. Jeho hladina může ve tkáních makrelovitých ryb dosahovat velmi vysokých hodnot i 3000 mg/kg (makrela) či dokonce 8000 mg/kg u tuňáka. I ostatní biogenní aminy vznikají ve vyšším množství. Na tvorbě biogenních aminů se podílí zejména bakterie druhu *Morganella morganii, Klebsiella pneumonia, Hafnia alvei, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Clostridium perfringens, Enterobacter aerogenes, Bacillus* ssp. *Staphylococcus xylosum, Vibrio* ssp., *Pseudomonas* ssp. Významnou roli při vzniku biogenních aminů hrají teplota, čas a způsob úpravy a skladování ryb. V mase čerstvých ryb

bývá obsah biogenních aminů poměrně nízký (např. histaminu v mase tuňáka bývá 0 –10 mg/kg). Při skladování ryb při teplotách kolem 0 °C a nižších vznikají biogenní aminy v téměř zanedbatelném množství.

Maso korýšů má podobné složení jako maso rybí, obsahuje však více volných aminokyselin a jiných dusíkatých látek. Tyto látky jsou příčinou ještě rychlejšího kažení než u ryb. Je tedy nutno skladovat korýše při nízkých teplotách a proto se na jejich kažení podílejí především pseudomonády a jiné gramnegativní tyčinkovité bakterie. **Tkáně měkkýšů** obsahují kromě velkého množství nízkomolekulárních dusíkatých látek i 3 - 6 % glykogenu. Na jejich kažení se podílí především bakterie rodu *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* a *Lactobacillus*. Mikrobiální kontaminace měkkýšů je závislá na čistotě vod, ve kterých se nacházejí.

8.4 Mléko a mléčné výrobky

8.4.1 Mléko

Mléko lze charakterizovat jako tekutý sekret mléčné žlázy savců, obsahující 80 – 90 % vody. Sušina je tvořena zejména mléčným tukem, bílkovinami, mléčným cukrem a minerálními látkami, pH mléka se pohybuje okolo 6,5 - 6,7.

Mléko od zdravých dojnic obsahuje malý počet mikroorganismů. Počet mikroorganismů v mléce při opuštění vemene bývá 10^1 - 10^3 v 1 ml mléka. Po nadojení dochází ke značné změně původních mikroorganismů syrového mléka a to v důsledku kontaminace různého původu. Hlavním zdrojem kontaminace mléka po nadojení jsou ovzduší, dojící zařízení, vemeno, ruce pracovníků, ale i ostatní zdroje např. voda, hmyz apod.

Na mikroorganismy přítomné v mléce po nadojení má do jisté míry vliv i **baktericidní aktivita** čerstvě nadojeného mléka, způsobená přítomností **lakteninu**. Baktericidní schopnost je tím větší, čím nižší je teplota skladovaného mléka a čím nižší je počet mikroorganismů přítomných v mléce. Baktericidní fáze je nejučinnější při 38 °C a trvá cca 2 - 3 h. Pokud se mléko ihned neochladí, nastává fáze smíšené mikroflóry (tj. rozvoj přítomných mikroorganismů), při ochlazení na 10 °C trvá tato fáze asi 12 h. Potom nastává fáze rozvoje bakterií mléčného kvašení – mléko kysne.

Základní podmínkou úspěšného skladování čerstvě nadojeného mléka je kromě dodržování hygienických zásad při dojení především chlazení mléka. Mléko by mělo být po nadojení zchlazeno na 7 °C za 150 minut. Teplota pro uchovávání mléka by se měla pohybovat v rozmezí 4 – 6 °C (min. 8 °C při denním svozu a 6 °C při obdenním svozu). Prioritní roli zde tedy hrají psychrotrofní mikroorganismy, zejména příslušníci rodů

Pseudomonas, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Arthromonas*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*. Od nadojení mléka až po odvoz do mlékárny, dochází ke zvyšování počtu mikroorganismů v mléce nejen kontaminací, ale i rozmnožováním přítomných mikroorganismů v mléce.

Nežádoucí změny mléka

Mikroorganismy přítomné v mléce vyvolávají různé změny, jež závisí na druhu mikroorganismu a složce mléka, na kterou působí. Rozklad bílkovin proteolýzu lze rozdělit na dva stupně, peptonizaci, při které se bílkoviny mléka štěpí na peptony a peptidy a na rozklad bílkovin na peptonizaci navazující, při němž se tvoří amoniak, sirovodík, skatol, indol, CO₂ a NH₃ vznikající při dekarboxylaci nebo deaminaci aminokyselin. Proteolýzu mohou způsobovat zejména bakterie rodu *Micrococcus*, *Enterococcus faecalis*, některé druhy rodu *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Clostridium*, *Flavobacterium*.

Sladovou a karamelovou chuť způsobují mikrokoky a *Bacillus subtilis*, hořkou chuť *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus liquefaciens*, mikrokoky, *Mucor*, *Penicillium*, kovovou příchutí *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* – při nízkých teplotách. Rybí pachutí bývá vyvolána *Pseudomonas ichtiosmia*. Barevné změny např. modránění mléka může způsobovat *Pseudomonas cyanogenes*, žloutnutí mléka či fluorescenci *Pseudomonas fluorescens*, červené skvrny působí *Serratia marcescens*. Srážení mléka a tvorbu plynu působí *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium butyricum* a kvasinky rodu *Candida*. Žluknutí mléka působí lipolytické mikroorganismy *Pseudomonas*, *Proteus*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, plísně a kvasinky.

Mléko se po svezení do mlékárny dále upravuje, tj. čistí, odstřeďuje, homogenizuje, tepelně ošetřuje, zchlazuje a dále zpracovává. Odstřeďování mléka má velký význam při snižování počtu mikroorganismů v mléce. Vhodně zvoleným způsobem odstředění lze z mléka odstranit 90 i více procent mikroorganismů, naopak špatně zvoleným způsobem lze počet mikroorganismů v mléce zvýšit tím, že se poruší shluky bakterií. **Baktofugace** je proces odstranění spor mikroorganismů odstředivou silou. Při homogenizaci mléka dochází k rozbíjení tukových kuliček na menší, současně jsou ale rozrušovány i shluky mikroorganismů. V homogenizovaném mléku může proto, pokud není ihned spasterováno, dojít k významnému pomnožení kontaminující mikroflóry. Mléko může být tepelně ošetřeno pasterací nebo sterilací.

Pasteraci mléka lze rozdělit na několik způsobů podle teploty a času působení. Používají se tyto techniky: **dlouhodobá (nízká) pasterace** při 63 °C přibližně 30 min. zabezpečuje

úplnou devitalizaci vegetativních forem patogenních bakterií a téměř úplné usmrcení saprofytických bakterií. Používá se ale jen v malokapacitním měřítku. **Pasterace při 68 -72 °C** 8 - 40 s pro výrobu sýrů, **krátkodobá (šetrná) pasterace** při 71 - 74 °C 15 až 40 resp. 45 s a **vysoká pasterace** při 85 °C 8 - 15 s devitalizuje 99,9 % mikroorganismů. Pasteraci přežívají některé termorezistentní mikroorganismy například *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus faecalis*, *Microbacterium lacticum* apod. a samozřejmě spóry sporulujících mikroorganismů mezi něž patří zejména *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sporothermodurans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sporogenes* a další. Čím vyšší je počet mikroorganismů před pasterací, tím vyšší je i počet mikroorganismů přeživších. Při výrobě trvanlivého mléka se používá záhřev 130 - 150 °C po dobu 2 - 8 s ani zde však nedochází k absolutnímu zničení všech mikroorganismů, mohou přežít spóry některých druhů rodu *Bacillus* (*B. sporothermodurans* spóry snesou i záhřev 147 po dobu 5 s) a *Clostridium* (spóry *C. botulinum* jsou devitalizovány teplotou 141 °C po 1,8 s).

Větším problémem než přeživší mikroorganismy je **rekontaminace** mikroorganismy po tepelném ošetření. K rekontaminaci dochází jednak z nedostatečně vyčištěného či poškozeného strojního zařízení nebo z obalových materiálů. Z hlediska možnosti rekontaminace patří mezi významné mikroorganismy např. gramnegativní psychrotrofní tyčinky (krátká generační doba 2 - 7 h) *Pseudomonas* (*P. fragi*, *P. fluorescens*, *P. putida*), *Bacillus cereus*, příslušníci čeledě *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*), *Lactococcus thermophilus*, enterokoky, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus lactis* apod. Na počty mikroorganismů má vliv teplota skladovaného pasterovaného mléka, ta by měla dosahovat maximálně 5 °C. Je známo, že i mírné zvýšení teploty na 8 - 10 °C umožní rozmnožování mikroorganismů z čeledě *Enterobacteriaceae*, kde jsou nejvíce zastoupeny koliformní mikroorganismy. Přítomnost těchto bakterií v tepelně ošetřeném mléce je indikátorem rekontaminace.

Charakter změn tepelně ošetřeného mléka je v podstatě stejný jako u syrového mléka, změny jsou ale rychlejší v důsledku tepelného narušení jednotlivých složek mléka. Neprojevuje se antagonismus mezi jednotlivými mikroorganismy v důsledku likvidace většiny mikroorganismů, při silnější kontaminaci se tedy mohou mikroorganismy volně množit.

8.4.2 Sýry

Nejvýznamnějšími mléčnými výrobky u kterých probíhá fermentace jsou sýry. Vlastní výroba sýrů je složitý proces, ve kterém jsou kladeny vysoké technologické i hygienické nároky

nejen na mléko ale i na jednotlivé fáze výroby. Mléko nesmí obsahovat patogenní mikroorganismy, nevhodné je však i mléko, které je kontaminováno velkým množstvím koliformních bakterií a klostridií respektive bakterií máselného kvašení.

Významnou fází výroby sýrů jejich **zrání**. Téměř všechny mladé sýry mají velmi podobné složení bílkovin, tuku a cukrů. Teprve fermentace jim dává jejich typické senzorycké vlastnosti. Tyto vlastnosti pak určují zejména zákysové a speciální mikroorganismy (mazové a plísňové kultury), pH sýřeniny, obsah vody v beztuké hmotě sýry, pH sýra po solení, koncentrace soli ve vodě sýra, přístup kyslíku, teplota zrání, relativní vlhkost, textura a čas. Nejdříve dochází k fermentaci zbytkové laktosy na kyselinu mléčnou, octovou, CO₂ a aromatické látky. Tato fermentace určuje pH mladého sýra a na ní závislé změny jeho složek. Nejdůležitější částí zrání sýrů **fermentace bílkovin**. Fermentace bílkovin mladých sýrů se uskutečňuje působením proteolytických enzymů bakterií mléčného kvašení použitých při jejich výrobě jako mezofilní nebo termofilní zákys po plazmolýze jejich buněk jakož i enzymy proteolytických bakterií mazové kultury, enzymy plísní, reziduálním chymozinem a plazminem a u sýrů vyrobených ze syrového mléka i jeho vlastními proteolytickými enzymy a kombinací enzymů z těchto zdrojů.

Podle mikroorganismů, majících hlavní podíl na fermentaci bílkovin rozeznáváme dva typy zrání, **primární – anaerobní zrání** (kvašení) a **sekundární – aerobní** (proteolýza). Rozsah a hloubku zrání udávají množství a stupeň rozložení bílkovin. Ty jsou rozkládány přes albumózy a peptony na polypeptidy a dipeptidy až na aminokyseliny, které se mohou dále štěpit až na amoniak, těkavé kyseliny a sirovodík. U tvrdých a polotvrdých sýrů probíhá zrání ve větším rozsahu, bílkovina je rozložena ve značném množství ne však do hloubky (tj. na amoniak a aminokyseliny). U měkkých a polotvrdých sýrů, zejména u těch, kde se uplatňuje zrání vlivem aerobní mikroflóry rostoucí za přístupu vzduchu na povrchu nebo uvnitř sýrů (sýry zrající pod mazem a sýry s plísní na povrchu a v těstě), jsou strukturální změny kaseinu významnější než u sýrů tvrdých. U plísňových sýrů se proteolýza uplatňuje až po glykolýze, čili po přeměně laktosy na kyselinu mléčnou a další látky.

Peptidy mají významné chuťové vlastnosti. Některé z nich mohou působit nežádoucí hořkou chuť. Významnou tvorbou hořkých peptidů se vyznačují některé proteolytické enzymy buněčných stěn některých zástupců rodu *Lactococcus*. Chuť sýrů také významně ovlivňují aminokyseliny, např. prolin je důležitou součástí chuti sýrů ementálského typu, na uvolnění prolinu z bílkovin se podílí rod *Propionibacterium*. Při hlubokém zrání jsou aminokyseliny dále metabolizované, což je významné především u sýrů zrajících pod mazem, na tvorbě aromatu se zde podílí především *Brevibacterium linens*. K významnému štěpení

aminokyselin dochází také u plísňových sýrů, produktem jsou potom aldehydy, kyseliny, aminy, amoniak atd.

Při zrání sýrů jsou přeměňovány samozřejmě i ostatní důležité látky jako je mléčný tuk, dochází ke změnám popelovin a změnám obsahu vody. V průběhu zrání se vlivem vysušování mění a_w a spolu s ní se mění i fyzikální, chemické a mikrobiologické parametry sýrů. Zrání sýrů se účastní celá řada mikroorganismů, které můžeme rozdělit do několika skupin: **bakterie mléčného kvašení, propionové bakterie, mazové bakterie, ušlechtilé plísně, kvasinky.**

Bakterie mléčného kvašení

Základní úlohou bakterií patřících do této skupiny je produkce organických kyselin zejména kyseliny mléčné. Při zrání sýrů se účastní prostřednictvím svých proteolytických enzymů štěpení bílkovin a přeměny aminokyselin na sensoricky aktivní látky. **Za zákysové bakterie mléčného kvašení se považují ty, které při 36 – 37 °C dokáží za 6 hodin vyprodukovat tolik kys. mléčné, aby se snížila kyselost mléka z původní hodnoty pH 6,8 na pH < 5,3.** Složkami zákysových kultur využívaných při výrobě sýrů jsou zejména rody *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Enterococcus*. Termofilní kultury pak obsahují především *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*. Kromě definovaných mezofilních a termofilních zákysových kultur se při výrobě některých sýrů uplatňují i kultury nedefinované získané přímo z vlastního mléka, nebo předešlé výroby sýrů. Enterokoky přítomné v sýrech se významně podílí na tvorbě aromatu a chuti sýrů. **Nezákysové bakterie mléčného kvašení** (označované také NSLAB) jsou skupinou tvořenou především mezofilními laktobacily (*Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. curvatus*) a pediokoky (*P. acidilactici*, *P. pentosaceus*). Tyto bakterie pochází především z nepasterovaného mléka, u sýrů vyráběných z mléka pasterovaného je jejich zdrojem rekontaminace mléka ze zařízení či z předešlých výrob. V sýrech z nepasterovaného mléka může docházet k různým interakcím mezi zákysovémi a nezákysovémi bakteriemi, např. *Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus* a *L. plantarum* mohou inhibovat enterokoky a propionové bakterie produkcí inhibičních látek nebo odčerpáním limitních živin. Tyto bakterie rostou v mléce neochotně a neúčastní se kysání sýrařského mléka.

Propionové bakterie

Mají své nezanedbatelné místo při výrobě sýrů s oky v těstě. Jejich růst a fermentační činnost se projevují až po solení a později v průběhu zrání, kdy se v sýrech vyskytují v poměrně velkém množství 10^7 - 10^9 /g. Mohou se nacházet i v jiných sýrech, jejich počty jsou zde ale nižší. Do této skupiny patří *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *schermanii*.

Mazové bakterie

Jde o proteolytické bakterie *Brevibacterium linens*, nepatogenní stafylokoky a koryneformní bakterie. Jejich rozvoj je postupný, při zrání sýrů pod mazem se nejprve uplatňují kvasinky (*Geotrichum candidum*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*), které jsou taktéž složkou mazových kultur. Jejich množství může dosáhnout 10^9 /g postupně ale jejich počet klesá na úkor bakterií, jejichž denzita se může pohybovat mezi 10^4 - 10^9 /cm².

Plísně a kvasinky

V sýrařství se uplatňují dva druhy plísní *Penicillium roqueforti* pro výrobu sýrů s plísní v těstě a *Penicillium camemberti* (*P. candidum*) pro výrobu sýrů s plísní na povrchu. Obě tyto plísně se vyznačují velkou metabolickou aktivitou. Významně se tedy podílí na utváření sensorických vlastností daných sýrů.

Kvasinky nacházejí své uplatnění při výrobě sýrů zrajících od povrchu ke středu, tím rozumíme sýry zrající pod mazem a sýry s plísní na povrchu. Kvasinky zahajují aerobní fázi zrání a v krátkém čase jejich počty dosahují až 10^8 - 10^9 /g. Po čase jejich počty klesají a následně se rozvíjí bakteriální složka mazové kultury nebo plísně. Nejvýznamnějšími kvasinkami z pohledu zrání sýrů jsou *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum candidum*, *Cryptococcus catenulata* a *Yarrowia lipolytica*. Dále byly ze sýrů izolovány kvasinky rodů *Pichia*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, a další. Kvasinky asimilují laktáty, tvoří alkalické metabolity (NH_3), produkují potřebné růstové faktory pro bakterie, působí lipolyticky a proteolyticky a různými metabolity přispívají k tvorbě aroma těchto sýrů. Kvasinky proto nejsou jen doprovodnou mikroflórou zrání těchto sýrů, ale působí i jako kulturní mikroorganismy potřebné při jejich zrání a tvorbě aroma.

Sýry jsou velice rozmanitou skupinou potravin, kterou lze dělit podle nejrůznějších hledisek. Mezi jednotlivými skupinami jsou často výrazné rozdíly v technologii výroby (včetně používaných mikrobiálních kultur) a samozřejmě v sensorických vlastnostech.

Sýry s vysokodohřívanou sýřeninou

Do této skupiny patří sýry ementálského typu, **Ementál, Gruyère, Moravský bochník**, atd. Ve velkých sýrárnách se tyto sýry vyrábí z šetrně pasterovaného mléka (72 - 75 °C cca 25 s). Před sýřením se přidává 0,5 – 1 % mezofilního a 0,1-0,15 % termofilního zákysu a 5 - 20 ml propionové kultury na 1000 l mléka. Sýřenina se dohřívá až na 53 – 56 °C. Po 24 hodinách má být uvnitř sýra teplota 40 °C, která má zaručit dobrou fermentaci termofilní kulturou. Sýry se solí nejprve jeden den na sucho a pak ještě asi 4 dny v solné lázni o 22 % NaCl, při pH 5,2, teplotě 12 – 14 °C. Sýry zrají ve zracích místnostech 4 - 8 týdnů, úplné vyžrání pak trvá cca 5 měsíců. Teplota při zrání se pohybuje od 12 - 14 °C na počátku a konci zrání a 22 -24 °C po 21 dnech zrání, kdy se rozvíjí převážně propionové bakterie. Zákys tvoří směsná mikrobiální kultura obsahující *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lactobacillus helveticus*. Streptokoky na počátku rychle prokvášejí sýřeninu, laktobacily pak dokonale fermentují laktosu v pozdější fázi. Hlavní úlohou termofilních bakterií mléčného kvašení je vytvářet stabilní kysací a proteolytickou aktivitu. Streptokoky a laktobacily žijí v symbióze. Streptokoky uvolňují do prostředí mastné kyseliny a laktobacily aminokyseliny.

Sýry s vysokodohřívanou sýřeninou typu Parmezán

Kysání mléka před sýřením se provádí pomocí přirozené mikroflóry mléka, ale i za pomoci mezofilního zákysu *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, dále se přidává termofilní *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* a/nebo *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* v poměru koky : tyčinky 1:1, 3:1 až 8:1.

Sýry s nízkodohřívanou sýřeninou

Patří sem sýry holandského typu, jako je **Gouda a Eidam**. Při jejich výrobě se používají zejména mezofilní kultury *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*. Někdy se pro urychlení zrání přidává *Lactobacillus casei*, který má vyšší proteolytickou aktivitu. *Lactococcus lactis subsp. lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides subsp.*

cremoris fermentují citran za vzniku kyseliny octové, diacetylu a CO₂. Štěpení bílkovin a jejich další přeměny probíhají po celou dobu zrání sýrů, které trvá cca 6 - 8 týdnů při teplotách 12 – 18 °C. Bakterie mléčného kvašení se uplatňují při fermentaci laktosy a citranu a při fermentaci bílkovin. Fermentace bílkovin má vliv na sensorické vlastnosti sýrů a na snížení a_w. Bílkovina se štěpí proteolytickými enzymy mikroorganismů a enzymy syřidla. Teplota dohřívání a dosoušení je 36 – 40 °C teplotní optimum mezofilních bakterií mléčného kvašení je ale 29 - 30 °C. Teploty při dohřívání a obdobně vysoké teploty při dosoušení výrazně ovlivňují aktivitu kulturní mikroflóry.

Sýry s mletou sýřeninou typu čedar (Cheddar)

Při výrobě těchto sýrů se využívá mezofilní zákys tvořený *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* s přidavkem *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* nebo *Lactobacillus helveticus*.

Plísňové sýry

Sýry s plísní v těstě - Pro primární anaerobní zrání se mléko zakysává mezofilní bakteriální kulturou *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* a *Leuconostoc* spp. Očkuje se spórami plísní *Penicillium roqueforti* do mléka nebo do sýrového zrna. Sýřenina se zahřívá na 26 – 37 °C 30min. V těchto sýrech se rozvíjí i kvasinky *Debaryomyces hansenii*, *Candida* spp. *Kluyveromyces lactis*. Na povrchu těchto sýrů se vytváří během zrání mazová kultura, dávající sýrům specifické sensorické vlastnosti, musí se však odstraňovat protože ucpává vpichy, které zásobují kyslíkem plísně uvnitř sýrů. Při zrání sýrů se zvyšuje hodnota pH což spolu s obsahem soli může umožnit rozvoj halotolerantních bakterií *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus*.

Sýry s plísní na povrchu - Plísňový porost tvoří *Penicillium camemberti* nebo *Penicillium candidum*. K primární fermentaci se používá mezofilní kultura *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. V průběhu zrání, než se na povrchu vytvoří plísňový porost se i u těchto sýrů uplatňují mikroorganismy tvořící mazovou kulturu.

Sýry zrající pod mazem

Tyto sýry se vyznačují výraznou proteolýzou způsobenou aerobními proteolytickými mikroorganismy. Vyrábí se z plnotučného mléka, které se zaočkovává mezofilními mikroorganismy a sráží se syřidlem. Zrání probíhá při 13 – 15 °C, 90 – 95 % vlhkosti, pH 5,2 - 5,4. Mazová kultura obsahuje různé mikroorganismy z nichž každý má svou úlohu.

Kvasinky (*Candida lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*) oxidačně odkyselují povrch sýrů přeměnou kyseliny mléčné a mléčnanů na CO₂ a H₂O. ***Brevibacterium linens*** a bakterie rodu ***Arthrobacter*** jsou výrazně proteolytické. Dále se zde vyskytují např. zástupci rodu ***Micrococcus***, ***Corynebacterium*** tvořící oranžový maz. Zpočátku rostou tyto mikroorganismy na povrchu jako kolonie, aby se pak rozšířily po celém povrchu omývají se sýry max. 5 % NaCl.

Olomoucké tvarůžky

Jsou to tradiční kyselé sýry vyráběné z průmyslového tvarohu, který se několik týdnů uchovává v 4 – 5 % soli a podléhá určitému zrání. Sůl působí jako konzervant proti plísním. Tvaroh se míchá, mele a formuje. Potom se suší - což umožňuje rozvoj kvasinek - při teplotě 18 – 45 °C, sušina pak činí 36 % a pH 6,4. Proces vlastního zrání začíná až po praní a trvá při teplotě 15 – 20 °C 4 - 8 dní. Zrání působí proteolytická mikroflóra především ***Brevibacterium linens***. Při zrání se vytváří oranžový maz a typická chuť a vůně.

Čerstvé sýry

Do skupiny čerstvých měkkých sýrů, řadíme sýry jejichž výroba je ukončena mléčnou fermentací a vysolením. Vyrobené sýry mají měkkou konzistenci. Kromě mléčné fermentace nenastávají u tohoto typu sýrů žádné podstatné změny bílkovin. Pro výrobu čerstvých sýrů jsou vhodné mezofilní homo- nebo heterofermentativní bakterie mléčného kysání, produkující kromě kyseliny mléčné i látky aromatické, především diacetyl, jde zejména o ***Lactococcus lactis* subsp. *lactis***, ***Lactococcus lactis* subsp. *cremoris***, selektované na tvorbu kyseliny mléčné s minimální tvorbou CO₂, ***Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*** a ***Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum***, nedoporučuje se jako součást zákysové kultury *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* z důvodu intenzivní tvorby CO₂, která se může projevit dírkovitou konzistencí sýrů. V průběhu výroby čerstvých sýrů může docházet ke kontaminaci kvasinkami a plísněmi. Kvasinky se mohou významně pomnožovat i na povrchu balených sýrů. Při porušení obalu pak může docházet i k rozvoji plísní, nejčastěji rodu *Penicillium* a *Aspergillus*, který dominuje ovzduší sýráren. U čerstvých sýrů může docházet k časnému duření a vzniku tzv. síťovitosti sýrů způsobené činností koliformních bakterií.

Časté vady sýrů

Mezi vady sýrů mikrobiálního původu patří: **duření sýrů** a to **časné duření**, které se projevuje pod lisem nebo v solné lázni a způsobují ho *Escherichia*, *Enterobacter* či některé

kvasinky a **pozdní duření**, které způsobují *Clostridium tyrobutyricum* a *C. butyricum*. **Hořká chuť** je způsobena *Bacillus cereus*, *Bac. brevis*, kvasinkami rodu *Candida*. **Rakovina kůry** – projevem jsou měkká místa a propadávání, tuto vadu způsobují *Scopulariopsis brevicaulis*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Proteus*. **Hnilobná chuť** je způsobena činností *Clostridium sporogenes*, *Proteus*, koliformních bakterií. **Barevné změny** - žluté skvrny způsobuje *Micrococcus luteus*, *Aspergillus flavus*, hnědé skvrny pak *Penicillium casei*. Uvnitř sýrů může *Clostridium sporogenes* způsobovat velké bílé skvrny, rezavé skvrny působí *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *Propionobacterium theonii*.

8.4.3 Tekuté fermentované (kysané) mléčné výrobky

Asi nejnámějším fermentovaným mléčným výrobkem u nás je **jogurt**. Jogurty jsou vyráběny kysacím procesem z pasterovaného mléka s různým obsahem mléčného tuku, za použití „jogurtové kultury“, která obsahuje mikroorganismy druhu *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve vhodném poměru a vyvolává charakteristické biochemické změny. Jogurty patří k nejrozšířenějším kysaným mléčným výrobkům s dlouholetou tradicí průmyslové výroby. Obsahují řadu biologicky aktivních složek a látek, které pozitivně ovlivňují lidský organismus. Jde především o bakterie mléčného kysání použité při jejich výrobě a produkty jejich metabolismu a o látky pocházející z mléka. Do některých druhů jogurtů se přidávají také zdraví prospěšné probiotické kultury *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* aj.

Mléko určené na výrobu kysaných mléčných výrobků musí svými vlastnostmi a složením tvořit vhodné podmínky pro rozvoj přidaných čistých mlékařských kultur. Mléko nesmí obsahovat žádné inhibiční látky, musí být hygienicky získáno od zdravých a dobře krmených dojnic a musí mít normální složení a vlastnosti. U připravené suroviny je prováděno druhé tepelné ošetření, jehož cílem je jednak zničit nežádoucí mikroflóru, ale také má hotový kysaný mléčný výrobek vyrobený z vysokotepečně ošetřeného mléka lepší rheologické vlastnosti. Koagulát je hustší, jemnější a pevnější, snižuje se riziko oddělování syrovátky po fermentaci. Používá se obvykle záhřevu na teploty 85 °C a vyšší s výdrží několika minut (90 – 95 °C 5 min.).

Pro **výrobu jogurtů** se používá protosymbiotická směs mikroorganismů tvořená *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Poměr tyčinek a koků v kultuře se pohybuje v rozmezí 1 : 1 až 1 : 2 až 2 : 1. V jednom mililitru jogurtové kultury má být řádově nejméně 10⁷ bakteriálních jednotek. Úkolem této kultury je při fermentaci produkovat kyselinu mléčnou, aromatické látky, popřípadě látky

slizové zlepšující konzistenci jogurtů a ve vhodné míře štěpit bílkoviny. V jogurtové kultuře laktobacily hydrolyzují mléčné bílkoviny až na volné aminokyseliny a tím stimulují růst laktokoků, ti je potřebují pro svůj růst. Nosnou látkou aroma jogurtů je acetaldehyd, na jehož tvorbě se podílí oba druhy mikroorganismů, větší význam má ale *Lactobacillus*. Mléka určená na výrobu jogurtu se obvykle očkují 1 – 2 % aktivní kultury. V 1 gramu čerstvě vyrobeného jogurtu má být 10^9 jogurtových bakterií, jejich počet však může vlivem skladování klesnout na 10^6 /g, přičemž dříve začínají klesat počty laktobacilů. Vyhláška MZe č. 77/2003 Sb. ve znění pozdějších úprav uvádí v 1 g jogurtu řádově 10^7 bakterií mléčného kysání.

Mléko je zakysáváno ve fermentačních tancích a buď plněno přímo do drobného spotřebitelského balení, ve kterém probíhá fermentační proces, nebo probíhá fermentace přímo v tanku a po prokysání a případném promíchání s přidávanými komponenty je výrobek chlazen a plněn do spotřebitelského balení. **Klasická výroba** spočívá ve zrání jogurtu přímo ve spotřebitelském obalu po dobu 2 – 4 hodin při teplotě 40 – 45 °C. Potom se co nejrychleji ochladí pod 10 °C, aby se zastavilo kysání. Jogurt se sušinou 21 % má mít po ukončení fermentace 60 až 65 °SH a v době expedice ne víc jak 75 °SH. Takto vyrobený jogurt má bílou barvu, hladký povrch a jemnou konzistenci. Při obrácení kelímku nevytéká, při vložení lžice si zachovává jemnou konzistenci. Chuť a vůně je čistá, výrazně aromatická, jogurtová, správně kyselá. Jeho určitou nevýhodou je možnost při nedostatečném vychlazení po skončení fermentace dále prokysávat za vzniku kovové příchuti. **Novější technologie** používá **zrání ve zrácím tanku**, při teplotě 30 °C po dobu 16 – 18 hodin. Koagulát se pak rozmíchá, vychladí a plní do obalů. Tento jogurt je méně aromatický a méně kyselý, má řidší krémovitější konzistenci. Během 24 hodin se sice konzistence koagulátu zlepší, nikdy však již nedosáhne stejné struktury jako při fermentaci ve spotřebitelském balení. Na konci fermentace má mít jogurt 70 - 75 °SH. Pro nižší teplotu a delší čas fermentace zde existuje nebezpečí růstu kontaminující mikroflóry, např. mezofilních bakterií mléčného kysání, koliformních bakterií nebo kvasinek a plísní.

Při výrobě jogurtů může docházet ke kontaminaci suroviny a následně k rozvoji nežádoucí mikroflóry. Nedostatečná tvorba kyseliny mléčné může být příčinou rozvoje nežádoucích bakterií, kvasinek a plísní. Jejich činnost pak negativně ovlivňuje kvalitu, zdravotní nezávadnost a v neposlední řadě i sensorické vlastnosti jogurtů. *Bacillus cereus* může způsobovat sladké srážení provázené nesouvislou sraženinou a chuťovými změnami, kvasinky jako *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis*, *Candida* mohou působit kvasničnou či ovocnou chuť a plynatost (přítomnost bublinek plynu) jogurtu eventuelně i křisovitý povlak, plísně které rovněž snášejí nízké pH mohou jogurt kontaminovat. Koliformní

bakterie bývají při dobrém prokysání inhibovány při fermentaci vzniklými kyselinami. Mezi vady mikrobiálního původu spojené s bakteriemi mléčného kvašení a chybami v technologii výroby patří například přílišná tvorba slizových látek, hořká chuť vznikající při přílišné proteolýze, kovová chuť při přílišném prokysání, prázdňá (málo kyselá) chuť při nedostatečném prokysání, rheologické vady.

Na výrobu **kyselých mlék** se používá smetanový zákys složený z bakterií produkujících kyselinu mléčnou (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a subsp. *cremoris*) a aromatvorných bakterií *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* případně *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*.

Na výrobu **kefíru** se používají směsné kultury bakterií a kvasinek. Z bakterií jsou to *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* resp. *L. casei* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Z kvasinek jsou to ty, které dokáží fermentovat laktosu jako *Kluyveromyces lactis* a *K. marxianus* nebo *Candida kefyr*. **Kefírová zrna** používaná v tradiční malovýrobě jsou konglomerátem bakterií a kvasinek obsahujícím kromě výše uvedených mikroorganismů i další např. leukonostoky, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a často také bakterie octového kvašení

Acidofilní mléko se tradičně vyrábělo pomocí *Lactobacillus acidophilus*, v současnosti se pro dosažení vhodných organoleptických vlastností tento výrobek připravuje smícháním s mlékem fermentovaným pomocí smetanového zákysu v poměru asi 1 : 9.

U fermentovaných mléčných výrobků jsou **z organoleptických změn**, které mají souvislost s mikroorganismy nejčastější: slabá kyselost (nekvalitní kultura nebo zákys), silná kyselost (dlouhé ponechání při opt. teplotě), tvorba plynu (silná kontaminace koliformními bakteriemi), ztráta aroma (potlačení laktobacilů), napadení kultury bakteriofágem, vločkovitost a zdlouhavé srážení.

8.4.4 Zahuštěné mléčné výrobky

Tyto výrobky můžeme rozdělit na slazené a neslazené. **Slazené kondenzované mléko** – mikroorganismy jsou ovlivněny tepelným ošetřením, zahuštěním na obsah vody 25 % a přidáním 55 – 60 % cukru. Nejčastěji bývají izolovány laktokoky, enterokoky, stafylokoky, sporulující mikroorganismy, zřídka č. *Enterobacteriaceae*, kvasinky *Candida*, plísně *Aspergillus* a *Penicillium*. Z patogenů bývá někdy izolován *Staphylococcus aureus*. **Vady**, které se u těchto výrobků projevují jsou: bombáže (způsobené činností *Candida* – fermentací sacharosy a dextrosy, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*), houstnutí provázené abnormální vůní (koky fermentující sacharosu a tvořící plyn např. *Micrococcus freudenreichii*), kontaminace

plísňemi (zápach a pachuti), lipolýza tuku, hnilobný pach způsobený proteolýzou či ovocné vůně a chuti způsobené kvasinkami. **Neslazené kondenzované mléko** - zahuštěné odpařením a sterilizované. Izolovány bývají sporulující mikroorganismy a při nedodržení sterilizace i koliformní bakterie, stafylokoky a psychrofilní mikroorganismy. **Vady mikrobiálního původu:** bombáže a zápach (*Clostridium*, *Bacillus*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*), srážení (*Bacillus coagulans*, *B. cereus*, bakterie mléčného kvašení, koliformní bakterie), hořká chuť (bacily), rybí pach a chuť (*Aeromonas hydrophila*).

8.4.5 Sušené mléko

Obsah vody snížen na 4 – 6 %. Mikroorganismy jsou ovlivněny pasterací nebo sterilizací mléka, zahušťováním v odparkách a sušením nejčastěji rozprašováním. V odparkách jsou-li správně funkční a udržované není velká pravděpodobnost zvyšování počtu mikroorganismů. Teplota 40 – 65 °C. Při sušení rozprašováním dochází ke střetu kapek mléka o průměru 0,02 – 0,1 mm s horkým vzduchem 140 - 160 °C. Rychlé odpařování vody z kapek způsobuje, že se výrobek zahřeje na cca 65 °C. Dojde ke snížení počtu mikroorganismů devitalizací psychrotrofů a mezofilů, termorezistentní mikroorganismy přežívají. Izolovány bývají *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Micrococcus*, *Achromobacter*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, plísně, výjimečně salmonely, asi 20 – 40 % mikroflóry tvoří aerobní sporulující bakterie. U výrobků při jejichž výrobě byl použit zákys bývají izolovány i bakterie mléčného kvašení. Problém působí enterobakterie které se reverzibilně poškozují při výrobě, při obnově mléka se může obnovit jejich životaschopnost.

8.4.6 Mražené výrobky

Mikroflóra mražených mléčných výrobků je ovlivněna kvalitou mléka a jeho ošetřením a kvalitou přísad a pomocných látek. Ke znehodnocení mražených výrobků mikroorganismy nedochází často, výrobní proces je poměrně krátký i když poměrně technologicky složitý, skladování při –18 °C. Bývají izolovány sporulující mikroorganismy – *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, dále *Micrococcus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, č. *Enterobacteriaceae* – *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus*, někdy *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, virus inf. hepatitidy.

8.4.7 Smetana

Smetana má vyšší obsah tuku 10 a více % (smetana ke šlehání 30 – 40 %). Získává se odstředováním, pak se pasteruje a chladí a používá k přímému konzumu nebo k výrobě másla. Mikrobiologie smetany prakticky odpovídá mikrobiologii mléka, obsah mikroorganismů je u tepelně neošetřené smetany vyšší jak v mléce, proto se při pasteraci používají vyšší teploty. Ze smatany bývají izolovány bakterie mléčného kvašení, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, koliformní bakterie, sporulující mikroorganismy, popř. plísně a kvasinky např. *Geotrichum*. Množství mikroorganismů v tepelně neošetřené smetaně bývá zpravidla větší než v syrovém mléce, ze kterého byla smetana získána. Po pasteraci je ve smetaně jen nepatrné množství mikroorganismů, které se pohybuje v rozmezí 10^1 - 10^3 KTJ/g. Jsou zde přítomny sporulující tyčinkovité bakterie, mikrokoky, bakterie mléčného kvašení apod.

8.4.8 Máslo

Máslo obsahuje 80 – 82 % tuku, zbytek je voda a netuky. Máslo se vyrábí ze sladké nebo zakysané smetany (smetanový zákys – máslašské kultury). Při stloukání másla přechází velká část mikroorganismů ze smetany do podmáslí. **Vady másla** způsobené nežádoucí činností mikroorganismů jsou: žluknutí (především *Geotrichum*, *Cladosporium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium*), vůně a chuť po sýru (*Pseudomonas putrefaciens*), rybí pachůť (*Aeromonas hydrophila*, *Serratia marcescens*), hořká huť (*Candida* a proteolytické bakterie).

8.5 Mikrobiologie mouky, mikroorganismy v pekařství a cukrářství

8.5.1 Mouka

Základní surovinou v pekařství je mouka, její mikrobiologická kvalita ovlivňuje jakost pekařských výrobků. V 1g mouky se obsah mikroorganismů pohybuje v řádu desítek až 10^5 a v některých případech až 10^6 . Mikroflóra mouky je tvořena především bakteriemi, v menší míře se vyskytují plísně a kvasinky. Složení mikroflóry mouky je závislé na mikroflóře obilí, z něž se mouka vyrábí, neboť velká část mikroorganismů z něj přechází do mouky. Rozdíl mezi počtem mikroorganismů v obilí a v mouce závisí na způsobu čištění před mletím a na stupni vymílání.

V dobrém a zdravém obilí převládá *Erwinia herbicola*, která přechází i do mouky. V nekvalitním obilí a moukách se nevyskytuje, bývá vytlačena konkurenční mikroflórou. Úplně vymizet může v moukách silně zapařených a napadených plísněmi. V mouce jsou přítomny sporulující bakterie především *Bacillus subtilis* a *Bacillus megatherium*, počet sporulujících mikroorganismů se zvyšuje se vzrůstající teplotou použitou při sušení obilí. Z dalších rodů mikroorganismů se mohou v mouce vyskytovat *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Sarcina*, bakterie mléčného a máselného kvašení, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*. Koliformní bakterie se v mouce vyskytují poměrně často a někdy i ve vysokých koncentracích. Z plísní se mohou vyskytovat rody *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Monilia*. Nejčastěji se vyskytující kvasinky patří k rodům *Saccharomyces* a *Candida*.

Mouka je ve srovnání s obilím lepším substrátem pro mikroorganismy, protože postrádá přirozené ochranné látky, přítomné v živých semenech. Obsah vody v mouce významně ovlivňuje růst mikroorganismů, pod 13 % brání růstu mikroorganismů, 15 % vody umožňuje rozvoj plísní a 17 % i bakterií.

Kontaminující mikroorganismy mohou u mouky působit vážné vady např. plesnivění mouky, samozahřívání a kysnutí. **Plesnivění mouky** je provázeno ztuchlým pachem, nastává při zvýšené vlhkosti mouky způsobené často kondenzací par (uložení teplé mouky v chladných skladech, transport mouky při rozdílných teplotách mouky a vnějšího prostředí). Plesnivění snižuje jakost lepku, je zde velké a pravděpodobné nebezpečí výskytu mykotoxinů. **Samozahřívání mouky** není tak časté jako u obilí. Prvním stádiem je při zvýšené vlhkosti rozvoj mikroorganismů (plísně a nesporulující bakterie), teplota stoupá na 24 – 30 °C. V další fázi teplota stoupá asi na 40 °C, nastává rozvoj termofilních sporulujících bakterií a aktinomycet. Při dalším zvyšování teploty nad 50 °C převládají termofilní bakterie, počet plísní a aktinomycet se snižuje, kvasinky se vůbec nerozmnožují. Další zahřívání inhibuje i termofilní mikroorganismy v důsledku snížení vlhkosti zahřáté mouky. Vlivem samozahřívání dochází k inaktivaci některých enzymů (katalasa nad 40 °C), při mírném zahřátí stoupá aktivita amylasy – bývá zjištěn vyšší obsah cukrů v mouce. Klesá množství bílkovinného dusíku a stoupá aminový, celkový dusík se prakticky nemění. Mouka ztrácí bobtnací schopnost a pružnost lepku vlivem denaturace bílkovin. Mouka tmavne. **Kysnutí mouky** je poměrně řídké a nastává spíše v čerstvě semleté mouce. Dochází zde k velkému zvýšení kyselosti vlivem rozvoje acidogenních bakterií, zvláště mléčného kvašení, zkvašujících sacharidy. Současně mohou amylolytické druhy rozkládat škrob na glukosu. Za přítomnosti kvasinek následuje po tvorbě kyselin alkoholové kvašení a dále octové působením

Acetobacter. Těsta pak mají vůni po kyselině octové a esterech a jsou silně zhoršeny pekařské vlastnosti.

8.5.2 Pekařské kvasy

Kvásek kromě kvasinek (*Saccharomyces*, *Candida*) obsahuje i homofermentativní a heterofermentativní laktobacily *Lactobacillus plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. leichmanii*, *L. brevis*, *L. fermenti* a *L. pastorianus*. Ty tvoří v kvásku organické kyseliny (mléčnou, octovou, propionovou, jablečnou, jantarovou) příznivě ovlivňující bobtnání bílkovin, čímž ovlivňují strukturu těsta, brání rozvoji nežádoucích mikroorganismů a podílí se na tvorbě aroma. **Kvasinky** tvoří CO₂, který kypří kvásek a těsto a spoluvytvářejí aroma. Žitný kvásek tedy vykazuje jak kvasící, tak i typickou kysací mohutnost. Vyzrálý kvásek má obsahovat 4 – 7 x 10⁷ kvasinek a 2 x 10⁹ laktobacilů v 1 g. Z 500g kvásku se má vytvořit asi 1000 ml CO₂ za hodinu. Těsto vzniká smícháním kvásku, vody a mouky. Po dobu kynutí a v počátku pečení probíhají v těstě mikrobiální pochody. Při pečení se mikroflóra likviduje.

Pekařské droždí se používá k přípravě pšeničných těst pro výrobu bílého pečiva, některých druhů chleba a jemného pečiva. Základní surovinou je pšeničná mouka. Obsah mikroorganismů v mouce neovlivňuje podstatně kynutí, protože mikrobiologické procesy vyvolané droždím nedovolí dalším mikroorganismům se uplatnit. Zrání pšeničných těst podmiňuje činnost jednoho druhu mikroorganismu *Saccharomyces cerevisiae* dodávaného ve formě pekařského droždí. Droždí musí mít dobrou schopnost zkvašovat cukry a produkovat CO₂. Malý přídavek cukru působí příznivě na kvašení, větší koncentrace tento proces mohou negativně ovlivnit zvýšením osmotického tlaku. Procesy kvašení v těstě jsou ukončeny pečením, kdy odumírají všechny mikroorganismy s výjimkou některých bacilárních spor.

8.5.3 Chléb a pečivo

Čerstvý chléb a pečivo neobsahuje na povrchu ani uvnitř žádné vegetativní formy mikroorganismů vzhledem k používání vysokých teplot při pečení (chleba 280 °C, bílé pečivo 270 °C). Mikrobiální kontaminace je tedy sekundární a dochází k ní v průběhu následujících operací a manipulací s výrobky. Jde především o plísně, které se na povrch výrobků dostávají buď kontaktem se znečištěnými povrchy, nebo jako vzdušná kontaminace. Nejčastěji se vyskytují *Rhizopus nigricans*, *Mucor mucedo*, *Penicillium expansum*, *P. cyclopium*, *Aspergillus flavus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *Cladosporium* a další. Rychleji se kazí výrobky uskladněné ve vlhku, nakrájený chléb je taktéž náchylnější k plesnivění. Z bakterií, které se mohou uplatnit při kažení chleba a pečiva jsou to především zástupci rodu *Bacillus*, jejichž

spory přežívají tepelné zákroky (teplota uvnitř chleba při pečení nepřesáhne 100 °C). Tyto mikroorganismy a především *Bacillus subtilis* způsobují **nitkovitost** chleba a pečiva, neboť produkují do střídy pekárenských výrobků sliz polypeptidové povahy. Uvnitř výrobku jsou po rozlomení slizovitá vlákna spojující obě rozlomené části, výrobek páchne, střída je tmavá a mazlavá. K nitkovitosti dochází při pomnožení bakterií do koncentrace 10⁷/g. S nitkovitostí se setkáváme častěji v teplých letních měsících.

4.5.4 Trvanlivé pečivo

V náplních, které nejsou tepelně ošetřeny, se mohou vyskytnout plísně pocházející z jádrou (ořechy), zlomkových oplátek či jako vzdušná kontaminace. Mohou se též vyskytnout osmofilní kvasinky a sporulující mikroorganismy.

8.5.5 Cukrovinky

Jde o různorodou skupinu výrobků. **Kandyty** (tvrdé bombony) – plněné furé a neplněné dropsy a roksy bývají vzhledem k výrobě pouze sekundárně kontaminovány. Nebezpečné jsou osmofilní mikroorganismy (kvasinky) v náplních. CPM v kandytech bývá 10²-10³/g. V cukrovinkách převládají sporulující bakterie. Pro kažení je rozhodující obsah vody a osmotický tlak. Osmofilní kvasinky způsobují praskání a trhání cukrovinek s náplněmi ze sirupů a krémů. Bakterie *Clostridium* a *Bacillus subtilis* napadají marcipán a působí jeho zkysání a šedivý povlak. Prýštění náplní působí kvasinky, klostridia a *Leuconostoc*. Nahradí-li se glukosa invertním cukrem, sníží se hodnota rovnovážné vlhkosti a tím se omezí i možnost kažení. Mikroorganismy lze omezit rovněž přidáním konzervantů – k. sorbová, k. benzoová, silic – eukaliptová, anýzová, menthol, anethol nebo alkoholu.

8.5.6 Měkké cukrářské výrobky

Zahrnují široký a atraktivní sortiment zboží vyráběný v podstatě ze dvou polotovarů: z **korpusů** zpracovávaných při teplotách 160 – 240 °C, mikroflóra je tvořena sekundární kontaminací. A z **náplně** vyráběné z různých surovin – másla, tuků, jádrou, kakaa, vejec a dalších. Tyto suroviny mohou být zdrojem mnohých mikroorganismů. Nejzávažnější je z hlediska hygienicko-epidemiologického možná přítomnost stafylokoků zejména *Staphylococcus aureus*, salmonel, *E. coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Kažení cukrářských výrobků mohou kromě přítomných bakterií působit i plísně a kvasinky. Důležitou roli hraje je-li náplň při výrobě tepelně ošetřena či nikoliv. Rozvoj nežádoucích mikroorganismů inhibují i nízké teploty při skladování.

8.5.7 Čokoláda

Čokoláda má velice nízký obsah vody, takže aktivita vody se pohybuje od 0,30 do 0,48. To z ní činí prostředí nevhodné pro růst většiny mikroorganismů. Hlavní surovinou pro výrobu čokolády je kakao. Jde o rozdrčené kakaové boby, které prošly fermentací, sušením a pražením. Mikroflóra kakaa je tvořena převážně zástupci rodu *Bacillus*, a to *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megatherium* a *B. alvei*. Mohou se vyskytovat i termofilní druhy, např. *B. coagulans* a *Geobacillus stearothermophilus*. Počty bacilárních spór nedosahují zpravidla 10^4 /g. Koliformní bakterie se téměř nevyskytují, počty kvasinek a plísní jsou velmi nízké. Zdrojem bakterií, kvasinek a především plísní mohou být další suroviny přidávané do čokolády např. ořechy. V hotové čokoládě se vyskytují především bacilární spóry. Počty mikroorganismů v dobrých čokoládách by neměly překračovat 10^3 KTJ/g.

8.6 Ovoce a zelenina

Z mikrobiologického hlediska jsou ovoce a zelenina chráněné přírodními ochrannými mechanismy a faktory, které jsou druhově specifické a působí po různě dlouhou dobu. Významnou roli při tom hrají povrchová pletiva a tvorba antimikrobiálních látek, které mohou ve významné míře zabránit mikrobiální infekci a jejímu šíření. Mikrobiální kažení ovoce probíhá nejčastěji od povrchových partií. Vysoký obsah vody a cukrů z něj činí dobrý substrát pro rozvoj mikroorganismů. Proti rozvoji většiny bakterií ale působí poměrně nízké pH dužiny způsobené vysokým obsahem organických kyselin, to však nebrání rozvoji kvasinek a plísní. Zelenina má pH poněkud vyšší (např. rajčata okolo 4,3, mrkev 4,9 - 6,0, květák kolem 5,6 a špenát 5,5 - 6,0), aktivita vody je různá 0,92 - 0,98 a závisí na stavu a stupni zralosti zeleniny, proto se na jejím kažení podílí kromě plísní a kvasinek i bakterie. Významnou složkou mikroflóry jsou bakterie mléčného kvašení zejména příslušníci rodu *Leuconostoc* a *Lactobacillus*.

Velmi významným zdrojem mikrobiální kontaminace je půda, 1g půdy může obsahovat i více jak 10^9 KTJ/g. Mohou se zde vyskytnout i významné patogeny jako *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, ale i další mikroorganismy např. *Erwinia carotovora*. Na rajčatech se například dosti často vyskytují *Pseudomonas aeruginosa* a *Serratia marcescens*. Počty mikroorganismů jsou závislé na způsobu a době sklizně a mohou dosahovat i poměrně vysokých hodnot 10^7 KTJ/g i více, až 90 % mikroorganismů se ale odstraní při mytí.

Fermentovaná zelenina

Konzervace zeleniny kvašením je známá již velice dlouho a potraviny takto vzniklé jsou ve velké oblibě nejen pro dlouhou trvanlivost ale i pro své chuťové vlastnosti. Fermentovat lze nejrozličnější rostlinné suroviny zelí, okurky, olivy a jiné. U nás je nejvýznamnější fermentovanou zeleninou kysané zelí.

Fermentovaná zelenina se vyrábí spontánní fermentací, které podléhají lehce využitelné sacharidy, zatím co celulóza (balastní látka) a bílkoviny zůstávají nezměněné. Vstupní suroviny jsou velmi často kontaminovány velkým množstvím mikroorganismů jejichž zdrojem je především půda. Jedná se zejména o rody *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, čeled' *Enterobacteriaceae*, dále o rody *Bacillus*, *Clostridium* a různé druhy kvasinek a plísní. Na zelenině jsou vždy, i když v malém množství přítomné **bakterie mléčného kvašení**. Na živých rostlinách dominují zástupci rodu *Leuconostoc* oproti méně zastoupeným tyčinkovitým bakteriím mléčného kvašení jako *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum* a *L. brevis*. Při anaerobní fermentaci rostlinných produktů se obvykle rychle rozmnožují bakterie mléčného kvašení, které potlačují růst nežádoucí mikroflóry. Jejich růst je stimulován přiměřeným solením, sůl podporuje přechod lehce fermentovatelných sacharidů z buněk a selektuje poměrně halotolerantní bakterie mléčného kvašení od ostatní konkurenční mikroflóry.

Kysané zelí se vyrábí z hlávek zelí po odstranění košťálu a svrchních listů. Nakrouhané zelí se smíchá se solí asi 1,5 - 2,5 % (zvýšená koncentrace soli na 5 – 6 % mimo to, že zastavuje činnost bakterií máselného kvašení, snižuje i činnost žádoucích bakterií mléčného kvašení na 30 %) a ukládá do kádí přičemž se dusá, aby se odstranilo co nejvíce vzduchu. Do zelí lze přidávat další složky kmín, bylinky, jablka, (podle krajových zvyklostí), na podporu kvašení lze přidat malé množství cukru (1 - 5 %). Krouhanku je třeba zatížit, aby byla pod vytlačeným lákem. Vlastní kvašení by mělo probíhat při teplotě 18 – 20 °C 4 - 6 týdnů a lze jej rozdělit do tří fází. V **první fázi** trvající asi tři dny dochází k rozvoji heterogenní převážně aerobní mikroflóry - kvasinek, plísní, G- tyčinek (*Enterobacter*, *Ervinia*, *Klebsiella*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*), G+ tyčinek (*Bacillus*) a bakterií octového kvašení. V této fázi se tvoří řada aromatických látek jako kyselina octová, kyselina mravenčí a různé estery. Ve **druhé fázi** trvající přibližně stejnou dobu jako první dochází k velké tvorbě CO₂. Prosazují se heterofermentativní bakterie mléčného kvašení např. *Leuconostoc mesenteroides*. Tvoří se významné množství kyseliny mléčné, čímž dochází k potlačení nežádoucí mikroflóry (*Enterobacteriaceae*, *Clostridium*). Tato fáze končí při nárůstu kyseliny mléčné na 1 % kdy je inhibován i *Leuconostoc*. **Třetí fáze** je charakterizována růstem

halotolerantních druhů bakterií mléčného kvašení (až 10^6 /ml), zejména homofermentativního *Lactobacillus plantarum*, který může zvýšit koncentraci kyseliny mléčné až na 1,5 - 2 %, pak je sám inhibován. Potom nastupují heterofermentativní mikroorganismy *Lactobacillus brevis*, druhy rodu *Pediococcus* a *Enterococcus* (*E. faecalis*). V této fázi jsou fermentovány i hůře fermentovatelné pentosy jako arabinosa a xylosa. Při obsahu kyseliny mléčné 1,5 - 2,5 % a pH 3,8 - 3,6 je kysané zelí při uchovávání v prostředí o 3 °C skladovatelné asi měsíc.

Mikrobiální kažení kysaného zelí je zapříčiněno především pozdní fermentací. V případě, že je zelí znečištěno půdou obsahuje významná množství kontaminujících mikroorganismů např. klostridia, plísně, G- tyčinky, které silně konkurují žádoucím bakteriím mléčného kvašení. Po spotřebování kyslíku se mohou masivně rozvinout zejména klostridia působící máselné kvašení. Při vyšším pH se rozvíjí především enterobakterie a může docházet k tvorbě nežádoucích biogenních aminů. V aerobním prostředí se pomnožují zejména nežádoucí kvasinky (*Rhodotorula*, *Candida*, *Saccharomyces*) a plísně.

8.7 Mikrobiologie vajec a vaječných produktů

Vejce a vaječné hmoty

Vejce jsou výborným prostředím pro mikroorganismy, především hnilobné bakterie. Čerstvá vejce od zdravých nosnic zpravidla neobsahují mikroorganismy (asi 95 % sterilita). Možnosti kontaminace jsou již ve vaječniku nemocných nosnic přenosem krví do žloutku – **hematogenní kontaminace** (hlavně *Salmonella pullorum*). Ke **kongenitální kontaminaci** dochází při průchodu vejcovodem do vajec mohou pronikat mikroorganismy z kloaky (vejce není chráněno skořápkou). K **extragenitální kontaminaci** dochází z povrchu skořápky. Počty mikroorganismů na povrch skořápky se pohybují v řádech stovek až milionů. Zastoupeny jsou rody *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, z plísní *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Mucor*.

Snesené vejce úplně vyplňuje skořápkou. Jak se ochlazuje na teplotu prostředí, objem obsahu se mírně zmenšuje a přes póry ve skořápce s nasávaným vzduchem mohou pronikat mikroorganismy. Póry ve skořápce umožňují výměnu plynů, odpařování vody a mohou se stát vstupní branou pro mikroby, zvláště je-li poškozena mucinová vrstvička. Rovněž stářím dochází ke snížení obranyschopnosti proti kontaminaci. Obranu uvnitř vajec zajišťují enzymy bílku (lysozym a konalbumin) s baktericidními vlastnostmi. Působí lytický nebo baktericidně na druhy rodu *Bacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, a na *Salmonella typhi*.

Z patogenních mikroorganismů je drůbež nositelem salmonel působících salmonelózy. Ve vejcích se vyskytuje především *Salmonella pulorum* přenosná na kuřata. Mohou se

vyskytovat i *Salmonella typhimurium* a *S. paratyphi*. Kachní vejce jsou infikována salmonelami z 10 – 20 % často i *S. typhi*. *Mycobacterium avium* původce tuberkulózy slepic byl prakticky zlikvidován. Ve vejcích mohou být i zástupci rodů *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Proteus vulgaris* aj.

Bakterie kromě hnilob (Tab. 5) způsobují změny vůně vajec **senný pach** způsobuje *Enterobacter cloacae*, rybí pach *E. coli*, a zatuchlý pach *Pseudomonas*. **Plísně**, které mohou kontaminovat vejce, nejčastěji rody *Penicillium*, *Cladosporium*, *Sporotrichum*, *Mucor*, *Alternaria* aj., působí **tečkovitou skrnitost** (barva teček podle druhu plísně) a **plísňovou hnilobu**.

Skladování a konzervování vajec se děje především chlazením při teplotě ± 1 °C, nemá však klesnout pod $-2,5$ °C. **Vaječný obsah** se mrazí nebo suší, tříděný nebo jako melanž. Skořápky se před vytloukáním zbaví nečistot a měly by se dezinfikovat chloraminem. Vaječná hmota se filtruje, homogenizuje a pasterizuje (směs 64,5 °C 2,5 min., žloutek při 65 °C 3 min., bílek při 56 °C 2 - 3 min., s přidavkem cukru ve vaječné hmotě 78 °C 3 min.). Mražení musí být co nejrychlejší. Nelikvidují se všechny mikroorganismy. Při nevhodném rozmrazování může dojít k pomnožení mikroorganismů.

Tab. 5: Přehled bakteriálních hnilob vajec

Druh hniloby	Změny	Původce
Černá typ I	Tmavohnědý moučnatý žloutek, tmavohnědý bílek	<i>Proteus</i> sp.
Černá typ II	Zčernalý gelovitý žloutek, šedý, vodnatý bílek	<i>Aeromonas liguefaciens</i>
Hořčičná	Ve žloutku hořčici podobná tělíska, někdy pokryta olivově zeleným pigmentem	<i>Enterobacter</i> sp.
Červená	Žloutek je obklopen tělísky, červený bílek	<i>Serratia marcescens</i>
Růžová	Fluoreskující zelená barva se mění v růžovou, okolo žloutku zrnka	<i>Pseudomonas maltophilia</i>
Zelená	Zeleně fluoreskující bílek	<i>Pseudomonas putida</i>
Modrá	Modře fluoreskující bílek	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Žlutá	Na membránách se vyskytuje žlutý pigment	<i>Flavobacterium</i>
Bezbarvá	Nenastávají změny, počet mikroorganismů zvýšen	<i>Alcaligenes</i> sp.

Sušení vaječné hmoty probíhá rozprašováním ve věžích s horkým vzduchem (180 °C). Sušená vejce nejsou sterilní. Mohou se vyskytovat mikrokoky, enterokoky, koliformní bakterie, sporulující bakterie a zřídka i plísně. Koky a G⁺ tyčinky pochází většinou z kontaminace skořápky, ostatní z nečistot během zpracování. Při dobrém uskladnění počet mikroorganismů postupně klesá, enterokoky jsou ale odolné (dobrý indikátor hygieny výroby). Salmonely a *Staphylococcus aureus* se vyskytují v malých množstvích, ve vhodných podmínkách se ale mohou významně pomnožit.

Majonézy

Majonézy se vyrábí ze žloutků a oleje, kromě těchto základních surovin se při jejich výrobě používá sůl, koření, cukr, ocet a jiné potravinářské kyseliny. Základní majonéza má obsahovat 80 % tuku. Žloutek se používá pasterizovaný. Majonézy a majonézové saláty se nemohou podrobit tepelné úpravě a proto i přes poměrně nízké pH 4,1-3,4, patří mezi rychle se kazící potraviny. Na jejich mikrobiálním kažení se tedy podílí především kvasinky (*Saccharomyces*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia* aj.), které mohou působit bombáže. Dostatečná trvanlivost se dá dosáhnout důslednou hygienou výroby, používáním pasterizovaných surovin a nízkými teplotami po celou dobu výroby až po jejich spotřebu. Pokud se toto nedodrží není povolena chemická konzervace účinná. Rizikové jsou zejména psychrotrofní kvasinky, které se množí i při 7 – 2 °C a jsou méně citlivé vůči povoleným chemickým konzervantům (k. sorbová, estery k. benzoové). Někdy se na kažení mohou podílet plísně, méně pak bakterie mléčného kvašení (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*).

8.8 Alkoholické nápoje

8.8.1 Víno

Pod pojmem víno rozumíme řadu nápojů se značně různorodými vlastnostmi. Vína mají vysokou vodní aktivitu, pH se pohybuje od 2,7 do 3,8 – 4,0. Pro mikroorganismy významné živiny jsou alkohol (8 - 18 %), někdy i cukry (1 – 10 g/l), látky vzniklé během kvašení a látky obsažené v rostlinných šťávách. Víno se vyrábí ethanolovým kvašením moštu získaného po rozdrcení a vylisování bobulí révy vinné. Pro kvalitu budoucího vína je důležitá optimální teplota kvašení 15-20°C. Dalšími fyzikálními faktory kvasného procesu jsou osmotický tlak a vnitřní povrch. Průběh kvašení ovlivňují i další faktory: pH (2,5 - 6,5), rH (10 - 27,5) a světlo.

Bobule révy vinné mají na svém povrchu nejrozumnější mikroflóru, jejíž velký podíl tvoří divoké kvasinky. Kulturních kvasinek je na bobulích málo, jejich množství se zvyšuje

s dozráváním; jejich počty jsou tím vyšší, čím je bobule zralejší a čím je hrozen blíže k zemi. Na jedné bobulce je až 8×10^7 kvasinek. Běžně se vyskytujícími rody plísní na hroznech révy vinné jsou: *Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium* a v menší míře *Phytophthora*, *Moniliella*, *Alternaria* a *Cladosporium*. Na stěnách vinného sklepa a vinařského zařízení se můžeme setkat s rody: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geosmithia*, *Penicillium* a *Verticillium*.

V mošttech se vyskytují přirozené kvasinky ze slupek hroznů. Tyto kvasinky se podílí na spontánní fermentaci. K iniciátorům spontánní fermentace patří zejména *Kloeckera apiculata*, *Hansenospora uvarum* a *Metschnikowia pulcherrima*. Převaha těchto kvasinek je zpočátku 90 – 95 % kvasinkové flóry, zatímco zastoupení tzv. pravých vinných kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* bývá zpočátku jen 5 - 10 %. V 1 ml moštu je 10^5 až 10^9 divokých a kulturních kvasinek, počty plísní se různí podle kvanta nahnilých a naplesnivělých bobulí. Počty spor plísní mohou dosáhnout hodnot až 10^8 /ml a počty bakterií 10^4 /ml i více. Tato pestrá směs mikroorganismů se po vylisování začíná překotně množit. Prostředí se rychle stává anaerobním a při postupném zvyšování obsahu alkoholu se dominující mikroflóra stává kvasinky. Dnes se však většinou nahrazuje spontánní kvašení aplikací aktivních suchých vinných kvasinek (ASVK), ty jsou tvořeny čistou kulturou *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum* nebo *Saccharomyces bayanus*.

Bakterie mléčného kvašení zejména *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides* a *Oenococcus oeni* (dříve *Leuconostoc oenos*) se spolu s kvasinkami rodu *Schizosaccharomyces* a *Saccharomyces* účastní biologického odbourávání organických kyselin v mladém víně. Bakteriální odbourávání kyseliny jablečné je označováno jako **jablečno-mléčné kvašení** nebo **malolaktická fermentace**. V podstatě se při jablečno-mléčném kvašení bakteriemi dvojmocná kyselina jablečná dekarboxyluje na slabě disociovanou jednomocnou kyselinu mléčnou a oxid uhličitý, který z prostředí uniká. V současné době je snaha řídit tento proces pomocí inokulace *Oenococcus oeni*, jako nejvhodnější se ukázala inokulace do mladého vína před koncem nebo těsně po ukončení alkoholového kvašení, což pozitivně ovlivnilo rychlost a intenzitu jablečno-mléčného kvašení. Někteří odborníci doporučují inokulaci v průběhu alkoholového kvašení, ale nikoliv na jeho počátku, aby nedošlo k inhibici intenzivně se rozvíjejícími kvasinkami. **V našich podmínkách je to proces žádoucí, druhý nejdůležitější po ethanolovém kvašení. Tímto procesem se upravuje kyselost vína a jeho celková harmoničnost.**

Víno v lahvích obsahuje v malých koncentracích vždy nějakou mikroflóru, ať už jsou to kvasinky, bakterie anebo občas i plísně. Počet kvasinek ve víně má být malý, soudí se, že nemá přesahovat 100 na litr vína. Ve víně bývají přítomné i spory bacilů a klostridií, někdy i

koliformní bakterie. V malých množstvích se mohou vyskytovat i laktobacily, octové bakterie a streptokoky. Množství mikroorganismů v hotovém víně po lahvování je závislé na zvolené technologii ošetření vína po kvašení především na filtraci a síření.

Mikrobiologické vady vína – nemoci vína

Tyto vady jsou způsobeny rozvojem nežádoucích mikroorganismů, které rozkládají některé složky vína a vytvářejí složky nové, poškozující jakost vína. Změny způsobené mikroorganismy se obvykle neustále prohlubují a víno se nakonec stává nepoživatelným.

Křisovatění vína - Jde o nejznámější a nejrozšířenější vadu vína. Vyskytuje se převážně u vín s nižším obsahem alkoholu (do 12,5 %). Na hladině v nádobách se tvoří charakteristický bílý nebo šedobílý povlak nazývaný křís, lidově šum nebo květ. Hlavním původcem jsou kvasinky rodu *Candida* (*C. mycoderma*), *Pichia* (*P. membranaefaciens*) a *Hansenula* (*H. anomala*), které oxidují etanol na vodu a CO₂ a tvoří těkavé kyseliny spolu s aldehydy. Dochází rovněž ke snížení tříslovin a ke ztrátě aromatických látek – víno ztratí svůj charakter. Nejvýznamnějším opatřením je držet nádoby s vínem zcela plné, popřípadě prázdný prostor zasířit, a zabránit tak styku hladiny se vzduchem.

Vláčkovatění vína - Vyskytuje se hlavně u bílých vín. Projevuje se olejovitou konzistencí. V rané fázi se barva ani vůně nemění, ale později dochází k zakalení, změně chuti a víno se stává mdlým. Vláčkovitost způsobují především bakterie, které produkují sliz jako např. *Pediococcus cerevisiae*, *P. damnosus*, *Leuconostoc mesenteroides* a *L. dextranicum*. Je možné jej odstranit překvašením vína nebo jeho silným provzdušněním, prošleháním a zasířením. Slizové látky se pak usadí na dno a jsou odstraněny při stáčení vína.

Octovatění vína - Dochází k němu činností bakterií octového kvašení, konkrétně druhů *Acetobacter ascendens*, *A. mesoxydans*, *A. suboxydans* atd., mléčného kvašení a kvasinek rodu *Hanseniaspora*, *Kloeckera* a *Brettanomyces*. Kromě kyseliny octové vznikají i jiné těkavé kyseliny (kyselina mravenčí, propionová a máselná) a jejich estery. Ve víně se pak objevuje zápach a chuť po salátovém octu. Preventivní opatření proti octovatění: zpracovávat zdravé hrozny, čištění a dezinfekce výrobního zařízení, dostatečné zasíření moštu, rychlé nakvácení za použití kulturních kvasinek a stále plné nádoby s vínem.

Mléčné a manitové kvašení - Vyskytuje se především u vín s vysokým obsahem kyselin, tříslovin a zbytkového cukru. Původci této vady jsou bakterie mléčného kvašení. Nemocná vína mají drsnou chuť i vůni připomínající kvašené zelí. Fermentací vzniká kyselina mléčná, octová a CO₂ v doprovodu těkavých kyselin, případně manitu. Probíhá i za

anaerobních podmínek. Preventivní ochranou je oddělování nahnilých a poškozených hroznů při jejich zpracování, dostatečné zasíření a nízká kvasná teplota.

Zvrhnutí vína - Nejčastěji se vyskytuje u červených vín s nízkým obsahem kyselin a tříslovin. Víno ztrácí barvu, na vzduchu hnědne a kalí se. Má mdlou chuť. Tuto chorobu zapříčiňuje *Lactobacillus plantarum*, který rozkládá kyselinu vinnou, vinný kámen a glycerol na kyselinu octovou, mléčnou a CO₂. Slabě napadené víno je možné silně zasířit a scelit s vínem zdravým, silně napadené pak zpracovat na vinný ocet nebo jakostní destilát.

Pach po myšíně - Objevuje se u zdlouhavě kvašených vín, která jsou docukřována. Původci myšiny jsou jednak bakterie (*Lactobacillus brevis* a *L. cellobiosus*) a jednak kvasinky rodu *Brettanomyces*. Zabránit této nemoci můžeme silným zasířením, čiřením, aktivním uhlím a sterilní filtrací.

Pachut' po plísni - Tato vada je výhradně zapříčiněna nedostatečnou hygienou sudů a hadic používaných k transportu vína. Nejdůležitějšími rody plísní způsobující tuto pachut' jsou *Penicillium* a *Aspergillus*. Prevencí je nezpracovávat nahnilé hrozny, dostatečná sanitace hadic a zasíření sudů. Mírnou pachut' lze odstranit čiřením zdravými kvasinkami, silnější jen čiřením aktivním uhlím.

Pelargoniová vůně - Může se vyskytovat u vín se zbytkem cukru, která byla konzervována kyselinou sorbovou nebo jejími deriváty. Vzniká odbouráváním tohoto konzervačního prostředku bakteriemi mléčného kvašení a prozrazuje se ve víně vůní typickou pro květy pelargoníí.

Pach po koňském potu - Za příčinu jsou zpravidla odpovědné produkty látkové výměny (těkavé fenoly) kvasinek rodu *Brettanomyces*. V malém množství pozitivně ovlivňují aroma vína (vůně po kosatcích, hřebíčku, dýmová vůně), při vyšší koncentraci však způsobují vadu vína. Nejčastěji se tato choroba vyskytuje u červených vín zrajících v sudech barrique. Významným předpokladem k potlačení této vady je dobrá hygiena a dostatečné zasíření. Kvasinky *Brettanomyces* nesnášejí oxid siřičitý. Od 40 mg/l volného oxidu siřičitého dochází k výraznému zastavení jejich vývoje.

Riziko vzniku nemocí ve víně můžeme snížit: zpracováváním jen zdravých a vyzrálých hroznů, dobrou sanitací výrobního zařízení, čistotou sklepa a dodržováním správných zásad ošetřování vína.

8.8.2 Pivo

Pivo je pěnivý alkoholický nápoj sycený CO₂, který vzniká při kvašení. Vyrábí se kvašením mladiny vyrobené ze sladu, chmele a vody. Rozeznáváme dva základní typy **kvašení spodní**

za použití spodních pivovarských kvasinek *Saccharomyces pastorianus* s optimální teplotou kvašení 6 – 12 °C a **svrchní kvašení** za účasti svrchních pivovarských kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, teplota při tomto kvašení se pohybuje okolo 24 °C. V ČR se tradičně používá spodní kvašení. Pivo je nápoj, který má kyselé pH od 4,1 do 4,8, vysokou vodní aktivitu a značný obsah živin, hlavně cukrů, včetně některých faktorů podporujících růst mikroorganismů (aminokyseliny, vitamíny skupiny B). V závislosti od koncentrace původní mladiny, která se určuje stupňovitostí, a od prokvašení obsahuje pivo do 5 % extraktivních látek (sacharidy, dusíkaté látky a jiné). Obsah ethanolu se pohybuje v rozmezí od 1,8 do 4,0 % (8 °až 12 °mladiny) u speciálních piv i více.

Technologický postup výroby piva se dělí do dvou základních fází. **Výroba mladiny** zahrnující čištění a šrotování sladu, vystírání a rmutování, scezování a vyslazování mláta, vaření sladiny s chmelem (chmelovar), filtraci a chlazení mladiny. **Výroba piva** zahrnuje procesy hlavní kvašení, dokvašování a zrání, filtraci, stabilizaci a stáčení.

Mikrobiální kontaminace surovin pro výrobu piva nemá pro hotový výrobek větší význam, může však být zdrojem mikrobiálně kontaminovaného prachu. Největším rizikem je možnost výskytu termostabilních mykotoxinů v zaplesnivělém ječmeni a sladu, které přechází do hotového piva.

Výroba mladiny je z mikrobiologického hlediska důležitým procesem vzhledem k využívání vysokých teplot. Při tomto procesu se likviduje všechna mikroflóra přítomná v surovinách s výjimkou sporulujících bakterií, např. *Bacillus subtilis* a *Clostridium*, jejichž spóry mohou přežívat a dostat se do mladiny. Čerstvá mladina je tedy prakticky sterilní. Její složení a teplota, která se snižuje ve vířivé kádi a výměnících tepla až na teplotu 5 – 7 °C, z ní činí ideální prostředí pro rozvoj mikroorganismů. Je proto důležité zabránit její rekontaminaci. Nejčastější kontaminací chladnoucí mladiny jsou tzv. **mladinové bakterie a divoké kvasinky**. Mladinové bakterie jsou adaptovány na hořké chmelové látky obsažené v mladině a dobře se v ní rozmnožují. Zařazujeme je především k rodům *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, dále *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Serratia*, *Zymomonas*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*. Zdrojem kontaminace může být často i opětovně používaná biomasa kulturních kvasinek znečištěná bakteriemi a divokými kvasinkami. Její kontaminaci lze podstatně snížit praním. Během dokvašení se kontaminace postupně snižuje a škodlivé mikroorganismy jsou strhávány na dno klesajícími kvasinkami.

Významným faktorem ovlivňujícím mikrobiologickou kvalitu piva je filtrace, která zachytí podstatnou část mikroflóry a následná pasterace. Sterilizace bakteriologickou filtrací a aseptické plnění je velmi účinné, ale drahé. Průtoková pasterace a plnění piva do předehřátých

lahví při teplotě piva 70 °C jsou výhodné z hlediska úspory místa v porovnání s tunelovými pastéry. Tunelové pastéry jsou umístěny mezi stáček blok a etiketovací stroje. Obsah lahví musí dosáhnout teploty 62,5 °C po dobu 20 min. V hotovém pivě se odráží souhrn všech vlivů výroby i kontaminace, kterým bylo pivo během výroby vystaveno. Odráží se v něm i úroveň sanitace v pivovare.

8.9 Koření

Kořením rozumíme části rostlin jako kořeny, oddenky, kůra, listy, nať, květy, plody, semena, nebo jejich části, v nezbytné míře technologicky zpracované a užívané k ovlivnění chutě a vůně potravin. Koření se získává z různých druhů rostlin, z nichž většina má prokazatelně léčivé účinky na lidský organismus a tak tedy i koření ovlivňuje lidské zdraví. Některé druhy koření obsahují látky s antimikrobiálními vlastnostmi. Jsou to především silice obsažené v kmínu, fenyklu, anýzu, dobromysli, hřebíčku, skořici a dalších. Hlavní účinné látky silic tvoří karvon, eugenol, thymol, anethol, fenchon a jiné. Silice působí hlavně na kvasinky a plísně, méně na bakterie. Vzhledem k malému množství koření užívaného k výrobě potravin a přípravě pokrmů není možné, aby se projevil jejich antimikrobiální vlastnosti, do jisté míry se však mohou projevit při skladování většího množství koření.

Je třeba si uvědomit, že byliny si už ze svého stanoviště, ať už v přírodě nebo na poli, přinášejí více či méně rozsáhlou sbírku mikroorganismů, které se, v pro ně příznivých podmínkách, mohou vehementně množit. Nadzemní části rostlin jsou osídleny fylosférní (epifitní) mikroflórou, jejímž zdrojem je především půda. Existenční podmínky fylosférní mikroflóry, kromě vlhkosti, podstatně mění i růstová fáze rostliny, druh rostliny, mimokořenová výživa a aplikace pesticidů na list. Z hygienického hlediska je mimořádně kritické hnojení rostlin fekáliemi a jejich nechráněné sušení na volném vzduchu. Fylosférní mikroflóra je po kvantitativní stránce bohatá. Dominantní jsou zde bakterie, zastoupeny jsou však i mikromycety, kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy, jejich počet se zvyšuje nevhodným skladováním.

Množství mikroorganismů kontaminujících koření je velice proměnlivé, pohybuje se podle různých literárních údajů od desítek do cca 10⁹/g. Z mikroorganismů jsou v koření významně zastoupeny sporulující bakterie zejména bacily skupiny *subtilis* – *mesentericus*, dále sporulující anaeroby zejména termofilní, mikrokoky, pseudomonády, flavobakterie a streptokoky. Z patogenů je relativně častá přítomnost salmonel. *Staphylococcus aureus* se vyskytuje zřídka, častější bývá přítomnost *Clostridium perfringens* a *Bacillus cereus*.

Onemocnění z potravin vyvolaná kořením jsou ojedinělá. Některá koření však mohou významně ovlivnit mikroflóru (zejména proteolytickou) potraviny, do které byla přidána. Pokud jde o plísně, jejich počty mohou v přepočtu na 1 g koření dosáhnout hodnot od 1 až do 10^6 . Například počty $10^2 - 10^4$ /g jsou uváděny pro koriandr, kmín, bobkový list, muškátový květ, majoránku, nové koření, černý i bílý pepř a tymián a 10^2 /g pro bazalku, estragon, zázvor a hřebíček. Plísně jsou na rozdíl od bakterií všeobecně přizpůsobivější na určité extrémní podmínky prostředí, lépe snáší nižší hodnoty pH, nižší obsah využitelné vody a nižší teploty. Nejčastěji se vyskytujícími rody plísní na koření jsou *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Culvularia* a *Rhizopus*. Mnohé vláknité houby (plísně) tvoří toxické produkty – mykotoxiny – v prostředí s optimální vlhkostí 75 % a víc a s teplotou 20 – 30 °C, které difundují do napadeného substrátu. Za nejnebezpečnější ze zdravotního hlediska jsou považované aflatoxiny produkované *Aspergillus flavus* a *A. parasiticus*, trichoteceny a zearalenon, produkované některými druhy rodu *Fusarium* respektive některými penicilii a aspergily. Mykotoxiny produkují i zástupci rodů *Rhizopus*, *Mucor*, *Alternaria* a *Cladosporium*. Většina z nich bývá často přítomna také v koření. Z výše uvedeného vyplývá, že koření, jako surovina používaná v potravinářství a ve farmacii, je **významným vehikulem mikroorganismů** (popř. jejich metabolitů), které mohou negativně ovlivnit kvalitu výrobků.

Na množství mikroorganismů (včetně plísní) v koření má vliv jeho posklizňová úprava, způsob zpracování a podmínky skladování, tj: použité způsoby stabilizace (teplem, odvodněním, zmrazením) a sušení (přímým teplem ve stínu, či v sušárnách). **Sušení** musí ovšem probíhat tak, aby neutrpěla jakost suroviny, teplota sušení se proto pohybuje do 40 °C. Koření jako zemědělská komodita se pak dále různě zpracovává a to nejčastěji mletím, drcením nebo řezáním. Tím je dále ovlivňováno jak složení obsahových látek tak mikroorganismů. V současnosti se ke snížení množství kontaminujících mikroorganismů v koření využívá kromě mechanického odstranění nečistot a na nich vázaných mikroorganismů především ozařování ionizujícím nebo ultrafialovým zářením a ošetření sytou párou.

Ozařování ionizujícím zářením je upraveno vyhláškou MZd č. 133/2004 Sb. o podmínkách ozařování potravin. Ionizujícím zářením se rozumí záření tvořené částicemi nabitými, nenabitými nebo obojími, schopnými přímo nebo nepřímo ionizovat. K ošetření potravin ionizujícím zářením lze použít tyto druhy ionizujícího záření (záření radionuklidů ^{60}Co a ^{137}Cs , rentgenové záření o energii nepřevyšující 5 MeV, urychlené elektrony o energii nepřevyšující 10 MeV). Ozáření ultrafialovým zářením je vymezeno stejnou vyhláškou. Pro účely této vyhlášky se rozumí ultrafialovým zářením záření o vlnové délce 250 – 270 nm a

dávce 250 – 300 Jm. UV záření ničí mikroorganismy na povrchu koření, ale neničí je v jeho záhybech, kam nepronikne.

Ošetření koření vodní párou je nový způsob ošetření koření. Při sterilizaci dochází ke kontaktu koření s horkou vodní párou o teplotě 100 - 140 °C a jeho navlhčení. Následně je koření sušeno v kontinuální sušící jednotce s řízeným prouděním vzduchu, kde se dosuší na požadované hodnoty. Konečnou fází sterilace je šokové schlazení koření na teplotu nižší než 15 °C. Účinek parní sterilace se projeví nejen ve snížení četnosti mikrobů, ale také ve snížení aktivity enzymů v koření. Negativem parní sterilace je však ztráta části kořenící síly koření, způsobená snížením obsahu silic.

Další možností by bylo **ošetření koření vysokým tlakem** (100 – 1000 MPa). Tím se rozumí použití isostatického tlaku řádově tisíců barů po dobu několika minut, čímž se dosáhne účinku podobného sterilaci, tj. účinné inaktivace nežádoucích mikroorganismů bez nutnosti potravinu zahřívát nebo v kombinaci s velmi šetrným záhřevem.

Alternativou finančně náročných metod používaných k odstranění kontaminující mikroflóry koření by se mohla stát **aplikace extraktů nebo silic** z vybraných rostlin. Jako inhibiční faktory koření byly identifikovány látky obsažené v silici a to- eugenol, tymol, anetol, o-metoxycinamaldehyd.

Skladování a s ním spojená další péče o koření je pro jeho následné použití velice důležité. Koření špatným uložením ztrácí důležité aromatické látky, svou charakteristickou barvu, tuky v něm obsažené mohou žluknout. Špatně uchovávané koření může také pohlcovat nežádoucí pachy. V neposlední řadě také dochází k pomnožení mikroorganismů v koření, ať již jde o bakterie nebo o mikromycety, následně pak může být koření napadeno některými skladištními škůdci. Proto koření skladujeme a uchováváme jak ve skladech a obchodech, tak i v domácnostech v suchých, dobře větraných prostorách s optimální teplotou, chráněných proti slunečnímu záření a průniku škůdců. Silně vonící koření skladujeme odděleně. Zásady správného skladování je nutné dodržovat i v domácnostech.

9 MIKROBIÁLNÍ KULTURY A PŘÍKLADY JEJICH VYUŽITÍ

Pod pojmem mikrobiální kultury (MK) se rozumějí definované a rozmnožování schopné mikroorganismy v jednodruhových nebo směsných kulturách, selektované podle jejich specifických vlastností. Přidávají se do potravin nebo surovin a do zemědělských produktů s úmyslem vyrobit nebo alespoň zlepšit (změnit) jejich vzhled, vůni, chuť, konzistenci, trvanlivost a jejich konzumovatelnost.

Mikrobiální kultury podle druhu zpracovávané suroviny a požadovaného výsledného produktu jsou tvořeny **bakteriemi** (z nichž nejdůležitější jsou bakterie mléčného kvašení, dále bakterie propionového kvašení, bifidobakterie, enterokoky), **kvasinkami** (*Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Debariomyces* a další) a **plísněmi** (*Penicillium* a další), popř. mohou být tvořeny jejich směsí. Podle druhové a kmenové skladby se kultury dělí na **jednodruhové** (Single Strain Starters) obsahující jeden kmen určitého druhu, **vícedruhové** (Multiple Strain Starters) obsahující různé kmeny jednoho druhu, **směsné vícekmenové** (Multiple Mixed Strain Starters) obsahující různé kmeny vícero druhů a **tradiční kultury** (Traditional Starters or Raw Mixed Strain Starters) obsahující druhy a kmeny částečně nebo zcela neznámé. Podle funkce můžeme kultury rozdělit na **startovací**, u nichž je požadována funkce technologická spojená s jejich schopností přeměňovat příslušný substrát a ovlivňovat výsledné vlastnosti, **protektivní** (ochranné) a **probiotické**.

Mikrobiální kultury využíváme v celé řadě odvětví potravinářského průmyslu od výroby fermentovaných mléčných a masných výrobků, přes výrobu pečiva, fermentované zeleniny, až po výrobu vína a piva. V každém odvětví se využívají příslušné skupiny druhů nebo kmeny mikroorganismů.

V evropském potravinářském průmyslu mají z bakteriálních kultur největší význam bakterie mléčného kvašení používané v mlékařském průmyslu. Významně se uplatňují i v masném průmyslu při výrobě fermentovaných výrobků, při výrobě fermentovaných potravin rostlinného původu (např. kysané zelí), jako složky probiotických kultur a podobně. BMK se mohou významně podílet na tvorbě biogenních aminů.

V mlékařském průmyslu se uplatňují nejčastěji **mezofilní kultury** obsahující jak homofermentativní tak i heterofermentativní bakterie mléčného kvašení. Za zákysové bakterie mléčného kvašení se považují ty, které při 36 – 37 °C dokáží za 6 hodin vyprodukovat tolik kyseliny mléčné, aby se snížila kyselost mléka z původní hodnoty pH 6,8 na pH < 5,3. Jde o druhy *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* a *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*. Tyto bakterie se využívají ve vhodných kombinacích k výrobě kysané smetany, tvarohů, kyselého mléka a sýrů, u kterých se uplatňují i další speciální sýrařské kultury. Podmínkou však je, aby nedocházelo k nežádoucím interakcím mezi jednotlivými druhy mikroorganismů. Někdy může ale docházet k negativnímu ovlivnění citlivého druhu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* bakteriocinem, který může produkovat *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Mezofilní zákysové kultury se

vyznačují tvorbou kyselin, aromatických látek a CO₂, jejich proteolytická aktivita je v porovnání s termofilními sýrařskými kulturami minimální.

Termofilní zákysové kultury tvořené bakteriemi *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* a *L. helveticus* se využívají při výrobě sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou, jogurtů a někdy i místo mezofilních zákyků pro výrobu měkkých sýrů a tvarohů. Jejich hlavním úkolem je fermentovat laktosu na kyselinu mléčnou a podílet se svou proteolytickou aktivitou na přeměně bílkovin.

Kromě těchto základních zákysových kultur se používají v mlékařském průmyslu **kultury bakterií propionového kvašení** tvořené kmeny druhů *Propionibacterium freudenreichii* a *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. Propionové bakterie jsou nepostradatelné při zrání sýrů ementálského typu (vysokodohříváná sýřenina s tvorbou ok v těstě). Jejich hlavní úlohou je tvorba pravidelných ok v těstě způsobených oxidem uhličitým vzniklým fermentací mléčnanu. Současně vzniká kyselina propionová, kyselina octová a z kaseinu ve větším množství uvolněná aminokyselina prolín.

Při výrobě některých sýrů se používají vedle mezofilních kultur i **speciální kultury mazové** obsahující bakterie (*Brevibacterium linens* a *Kocuria rosea*) a **kvasinky** (např. *Kluyveromyces lactis* a *Candida utilis*) a **plísně** (*Penicillium roqueforti*, *P. camemberti*, *P. candidum* a *P. nalgiovense*, které se v současnosti používá při výrobě fermentovaných salámů). Pro výrobu kefiru se používají speciální kultury tvořené bakteriemi mléčného kvašení a kvasinkami označované jako kefirová zrna.

Zvláštní ale velmi významnou skupinu tvoří **probiotické kultury**. Jde o kultury využívané jako potravinový doplněk s pozitivním účinkem na organismus příjemce tím, že zlepšuje složení a rovnováhu ve střevní mikroflóře. Intestinální mikroflóra představuje v trávicím traktu komplexní ekosystém. Mikroorganismy, které mohou produkovat antimikrobiální látky – antibiotika, bakteriociny a nízkomolekulární inhibiční látky mohou potlačovat růst škodlivých mikroorganismů. Prospěšná intestinální mikroflóra příznivě ovlivňuje i chuť k jídlu, stimuluje imunitní systém, pohyblivost střev, funkci jater, ledvin a ostatních vnitřních orgánů, preventivně působí proti rakovině a anémii. Bakterie popř. jejich kmeny využívané jako lidská probiotika jsou to především *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve* Yakult, *B. lactis* (BB12), *B. longum* (SBT-2928, BB536), *B. infantis*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* (M 74), *Lactobacillus acidophilus* (NCFM, SBT-2062, DDS1), *L. casei* (Shirota, CRL431, DN014 001, immunitas) a dále *L. gasseri*, *L. rhamnosus* (GG, 271, GR1, VTT E-97800), *L. reuteri* (SD2112), *L. plantarum* (299V), *L. johnsonii* (La1,

Lj1), *L. lactis*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* (2038), *L. salivarius* (UCC118), *L. fermentum*, *L. paracasei* (CLR431, F19), *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Streptococcus thermophilus* (1131).

V masném průmyslu se při výrobě fermentovaných výrobků využívá řada druhů mikroorganismů. Podle jejich vlastností, činnosti a způsobu využití je lze rozdělit na mikroorganismy využívané jako startovací kultury, ochranné kultury a plísňové kultury. Mikrobiální kultury následující vlastnosti. Musí být halo- a nitrotolerantní ($> 6\%$ NaCl, > 100 mg NO₂⁻/kg), musí růst v teplotním rozmezí 27-43 °C s optimem při 32 °C ale i při nižších teplotách, nesmí produkovat štěpné produkty a metabolity bílkovin, které by mohly nepříznivě ovlivnit vlastnosti výrobků, nesmí být patogenní, bakterie mléčného kvašení musí být homofermentativní, aby netvořily plyn a další nežádoucí metabolity a nemají být - pokud to není v technologii požadováno - proteolytické ani lipolytické. Výzkum startovacích kultur pro masný průmysl umožnil nalézt během uplynulých desetiletí kmeny četných mikroorganismů, s jejichž pomocí lze vyrobit vysoce jakostní standardní produkty. Složením se mohou přípravky lišit v druhovém zastoupení (monokultury nebo směsné kultury laktobacilů, stafylokoků, mikrokoků apod.) nebo ve vzájemném poměru zastoupených kmenů. Tyto kmeny se přidávají do salámových směsí, aby snižovaly pH výrobku tvorbou kyseliny mléčné, zlepšovaly strukturu konečného výrobku gelovatěním myofibrilních proteinů při nižším pH, zmenšovaly ztráty vody při sušení vzhledem k poklesu pH. Aby vytvořily výrobek se specifickou chutí a vůní v důsledku prohloubené lipolýzy nebo proteolýzy, chránily tuk před oxidací peroxidem prostřednictvím činnosti katalasy, zlepšily rozklad dusičnanů a tak zlepšily barvu konečného výrobku a v neposlední řadě aby snížily riziko tvorby nitrosaminů. Přehled účinku jednotlivých skupin mikroorganismů startovacích kultur je uveden v Tab 6.

Bakterie mléčného kvašení, ale i jiné bakterie se při výrobě potravin uplatňují i jako **protektivní** neboli **ochranné kultury**. Tyto kultury produkují antimikrobiálně působící metabolity, jako jsou organické kyseliny, bakteriociny, diacetyl, CO₂, peroxid vodíku, deriváty aminokyselin. Rozdíl mezi startovací a ochrannou kulturou spočívá hlavně v tom, že při použití kompetitivních mikroorganismů nemusí nutně existovat technologická výhoda (jako u startovacích kultur), ale na druhé straně je nutné prokázat antimikrobiální účinky. Princip ochranné kultury je založen na skutečnosti, že vybraný (neškodný) mikroorganismus (nebo kombinace různých) bude v potravinovém prostředí růst preferenčně, čímž se potlačí růst jiných bakterií, jako jsou mikroorganismy působící kažení včetně patogenů. Vedle příznivých účinků potlačením nežádoucích bakterií, se ochranné kultury mohou vyhledávat pro příznivý účinek na chuť a vůni a barvu konečného výrobku prostřednictvím enzymů.

Tab. 6: Přehled účinku jednotlivých skupin startovacích kultur (Pipek, 1998)

Jakostní znak	Mléčné bakterie	Mikrokoky	Kvasinky	Plísně
Barva: redukce dusitanů	-	+++	-	-
snížení pH	+++	-	-	-
spotřeba kyslíku	-	++	++	-
rozklad H ₂ O ₂	-	++	+	+
Aroma: okyselení	+++	-	-	-
odbourání bílkovin	-	+	+	++
odbourání tuků	-	++	++	++
zpomalení žluknutí	-	++	++	++
Pevnost (snížením pH)	+++	-	-	-
Konzervace: pokle pH	+++	-	-	-
redukce dusičnanů	-	++	-	-
konkurence	++	-	-	+++
Ochrana povrchu (vysychání, O ₂)	-	-	-	+++
Snížení rezidua dusitanů	+	++	-	-

Jako ochranné kultury se mohou využívat např. *Lactobacillus rhamnosus* a *Propionibacterium freudenreichi* subsp. *shermanii*. Využívají se i další bakterie, které mohou být součástí mikrobiálních kultur, především však jde o bakterie mléčného kvašení. Například v masném průmyslu se k ochraně masa a masných výrobků využívají především *Lactococcus lactis* produkující nisin a *Lactobacillus sakei* produkující lactocin. Velkou antimikrobiální aktivitu vykazuje pediocin, bakteriocin II. třídy produkovaný některými druhy rodu *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* a *Enterococcus*. V současnosti se využívá řada bakterií produkujících celou škálu antimikrobiálních látek.

Mikrobiální kultury se vyrábí a do potravinářských podniků dodávají v různých formách jako: tekuté kultury, lyofilizované kultury, koncentrované hlubokozmrazené nebo lyofilizované kultury.

10 OCHRANA PROTI ROZKLADNÉ ČINNOSTI MIKROORGANISMŮ

10.1 Faktory prostředí ovlivňující mikroorganismy

Růst a množení mikroorganismů v potravinách nebo potravinových surovinách ovlivňuje působení řady faktorů. Z pohledu potravin lze tyto faktory rozdělit na **vnitřní a vnější faktory, způsoby zpracování a skladování a složení, vlastnosti a vzájemné ovlivňování mikroflóry.**

Vnitřní faktory jsou dány fyzikálními a chemickými vlastnostmi potravin. Patří sem: **Aktivita vody** (a_w) tj. míra využitelnosti vody pro mikroorganismy. Je dána poměrem parciálního tlaku vodní páry nad potravinou k parciálnímu tlaku vodní páry nad čistou vodou při stejné teplotě (**čistá voda a_w 1,0 optimum pro většinu mikroorganismů je a_w 0,98**), **pH, redox potenciál, struktura potravin, dostupnost živin pro mikroorganismy, přítomnost přirozených antimikrobiálních látek v potravině.**

Vnější faktory jsou faktory prostředí, ve kterém je potravina skladována. Patří sem: **teplota, vlhkost, čas, složení atmosféry, přístup světla, obalový materiál.** S těmito faktory úzce souvisí **způsoby zpracování a skladování** tj. různé fyzikální a chemické ošetření potravin mající za následek změnu vnitřních parametrů potravin a ovlivňující přítomnou mikroflóru. **Složení a vlastnosti mikroflóry** tedy vzájemné vztahy mezi přítomnými mikroorganismy. Jde zde o příklady ekologických vztahů (viz 1. díl skript) jako je synergismus, symbióza nebo kompetice (vzájemné negativní ovlivňování dvou či více mikrobiálních partnerů v důsledku kvantitativních a kvalitativních rozdílů v metabolismu a využití živin), amensalismus (ovlivnění interakčního partnera tvorbou nespecifických inhibičních látek např. organickými kyselinami vznikajícími při fermentaci) či antibióza (inhibice mikrobiálního partnera tvorbou specifických inhibičních látek např. antibiotik).

Základní informace o nejvýznamnějších faktorech ovlivňující mikroorganismy byly podány v prvním dílu skript v kapitole Základy ekologie mikroorganismů.

10.2 Ochrana proti rozkladné činnosti mikroorganismů

Intenzita rozkladných procesů (R) v určitém prostředí je přímo závislá na virulenci a počtu mikroorganismů a nepřímo závisí na odolnosti prostředí.

$$R = \frac{\text{počet mikroorganismů} \times \text{virulence}}{\text{odolnost prostředí}}$$

Je-li hodnota ve jmenovateli nepoměrně vyšší než v čitateli, může být rozklad velmi pomalý, neznamenný nebo k němu vůbec nedojde. Musíme vzít v úvahu, že ne všechny mikroby, které potraviny kontaminují, mají možnost se zde rozmnožovat a způsobovat rozklad. Vždy záleží na poměru jednotlivých činitelů, takže tentýž druh potraviny může někdy invazi mikrobů podlehnout a jindy nikoli. Praktické konzervační metody pracují tak, že zmenšují nebo úplně potlačují činitele v čitateli nebo naopak posilují činitele ve jmenovateli. Praktické způsoby konzervace můžeme rozdělit na tyto: **vylučování mikroorganismů z prostředí, přímá inaktivace mikroorganismů, nepřímá inaktivace mikroorganismů.**

10.2.1 Vylučování mikroorganismů z prostředí

V podstatě jde o fyzické odstranění mikroorganismů kontaminujících potraviny, potravinové suroviny nebo prostředí potravinářských provozů, pracovníků atd. Spočívá v nejjednodušších úkonech souvisejících s hygienou a čištěním až po využití složitých technických zařízení. Lze toho dosáhnout různými způsoby:

- K **omezení kontaminace potravin mikroorganismy** je nutné zajistit **čistotu místností** (bílení, desinfekce, omývání stěn, podlah strojů a zařízení) a **nástrojů** omývání hygienicky nezávadnou vodou s přídavkem činidel usnadňujících odplavení nečistot a desinfikujících pokud je to možné kovové předměty žiháme, sterilizujeme proudící párou, sklo myjeme horkou vodou a necháme oschnout, nepoužíváme utěrky. Velice důležité je dbát na **čistotu vzduch a vody**. Samozřejmostí je dodržování hygienických předpisů pracovníky v jednotlivých provozech. Pro zpracování by se měly používat jen kvalitní a co nejméně mikrobiálně kontaminované suroviny.
- **Ochuzování potravin o mikroorganismy během pracovního procesu** - dochází k němu při mechanickém způsobu odstraňování nečistot, kalů a pevných částic, na nichž mikroorganismy ulpívají. Nejsou samy o sobě konzervačními zásahy.
- **Úplné vylučování mikroorganismů z potravin** - uskutečňuje se u kapalin mikrobiální filtrací nebo baktofugací. **Baktofugace** je odstředivá separace mikroorganismů využívající rozdílů hustoty kapaliny a mikrobiálních spor v kapalině obsažených (mléko – předehtátí na 65 – 75 °C – usmrcení vegetativních forem mikroorganismů a pak odstředění spor).

10.2.2 Přímá inaktivace mikroorganismů – sterilace

Jedná se o zákroky vedoucí k inaktivaci nebo usmrcení mikroorganismů kontaminující potraviny nebo prostředí.

10.2.2.1 Fyzikální zákroky

Termosterilace – konzervace zahříváním

Nejprve odumírají vegetativní formy a posléze i spory mikroorganismů. Příčinou letálního účinku vysokých teplot je denaturace bílkovin a inaktivace enzymů. Výše a doba sterilační teploty jsou jednak ve vzájemném vztahu, jednak ve vztahu k řadě dalších faktorů. Mění se podle povahy prostředí a zejména podle druhu nebo kmene mikrobů.

Mluvíme-li o usmrcování mikroorganismů v souvislosti s konzervací potravin, máme na mysli jejich aktivní formy popř. spory. Nejde tedy nikdy o teoretickou, absolutní sterilitu, ale o **praktickou – obchodní sterilitu** - tj. o spolehlivou a trvalou přímou inaktivaci těch forem mikroorganismů, které mohou dané prostředí nepříznivě měnit. Jde-li o usmrcení vegetativních stádií mikroorganismů především patogenů, teplotami pod 100 °C, mluvíme o **pasteraci**. Likvidujeme-li i bakteriální spory (teplotami nad 100 °C), hovoříme o **sterilizaci**.

Výška smrtících teplot je ovlivněna řadou činitelů:

- **Vlhkost prostředí** – ve vlhkém prostředí hynou mikroorganismy rychleji než v suchém (spory bacilů ve vlhku inaktivuje teplota 120 °C za méně jak 30 min. v suchu za stejnou dobu teplota 180 °C).
- **PH prostředí – v konzervárenství rozlišujeme: Kyselé prostředí** – ovoce, okyselené konzervy (pH 2,7 - 4,0, nejčastěji 3,5). Mikroflóra kyselých hmot je citlivá na teplotu, mikroorganismy hynou při 60 – 100 °C za několik minut. Kvasinky hynou po 5 min při 66 °C, spory při 80 °C. Plísně hynou většinou i se sporami při záhřevu na 65 – 70 °C po 30 min, navíc zde působí i anaerobní prostředí. Sporulující bakterie ohrožují kyselé potraviny výjimečně. **Málo kyselé až nekyselé prostředí** se vyznačuje pH vyšším než 4,0. Zvláště nebezpečné jsou zde sporulující bakterie. Sterilace probíhá 5 - 20 min při 115-125 °C.
- **Výchozí koncentrace mikroorganismů** by měla být co nejnižší. Lze toho dosáhnout krátkou dobou skladování surovin před zpracováním, důsledným dodržováním hygieny a rychlým zpracováním.
- **Doba působení tepelného zákroku** - volbou termického zákroku s co nejvyšší teplotou a přiměřeně krátkou dobou působení se při stejné termoinaktivační účinnosti poškozují látky na nichž záleží, co nejméně.

Termosterilaci lze provádět různými metodami např. **přívodem tepla** (v uzavřených obalech, průchodem potrubím nebo deskovými sterilizátory), **odporovým topením** (využití

průchodu elektrického proudu vodičem - potravinou, vhodné pro neviskózní kyselé kapaliny), **vysokefrekvenčním ohřevem** (mikrovlny).

Ošetření UV, ionizujícím zářením

Využití záření je ošetřeno v Codex Alimentarius, evropské i národní legislativě (zejména vyhl. 134/2004 Sb.)

Ultrafialové záření má silné mutagenní a letální účinky na mikroorganismy. Jeho pronikavost do pevných předmětů je ale malá a proto je vhodné k ošetření povrchů, pracovních ploch, sterilizaci vzduchu a vody. V praxi se používá záření o vlnové délce 210 – 310 nm.

Ionizujícím zářením rozumíme záření tvořené částicemi nabitými, nenabitými nebo obojími, schopnými přímo nebo nepřímo ionizovat. K ošetření potravin a surovin ionizujícím zářením lze použít pouze tyto druhy ionizujícího záření:

- a) gama záření radionuklidů ^{60}Co nebo ^{137}Cs ,
- b) rentgenové záření o energii nepřevyšující 5 MeV, nebo
- c) urychlené elektrony o energii nepřevyšující 10 MeV.

Dávka ionizujícího záření musí být omezena na nejnižší nutnou míru, která je přiměřená ukazateli, pro který je potravina nebo surovina ošetřena ozářením. V praxi se používá tzv. **radiopasterace** tj. ozáření dávkou 3 -10 kGy (Gy = Gray - jednotka absorbovaného záření odpovídající adsorpci 1 J na kilogram produktu) vedoucí k inaktivaci vegetativních buněk (potravinu je vhodné konzervovat ještě dalšími zákroky např. chladem) méně často pak **radiosterilace** dávkou 8 – 10 kGy (např. pro koření a byliny). Průměrná dávka 10 kGy není spojena s žádnými zdravotními riziky.

Ultrazvuk

Zvukové vlny o frekvenci vyšší jak 20 kHz působí na mikroorganismy letálně tehdy, mají-li velkou intenzitu (okolo 10 W/cm^2) a nízký kmitočet. Stříhové vlnění a rychle se měnící tlaky vytvořené ultrazvukovými vlnami jsou účinné při destrukci mikrobiálních buněk, obzvláště v kombinaci s dalšími metodami ošetření jako je teplo, změny pH, chlorace. Ultrazvuk účinně inaktivuje bakterie, bakteriální spory, kvasinky, plísně, viry, ale citlivost různých mikroorganismů je i v rámci jedné skupiny různá. Využití ultrazvuku je tedy bohužel limitováno touto odolností, neboť dávky potřebné k dosažení potřebného inaktivačního účinku mohou vést k nežádoucím změnám potravin.

Ošetření vysokým tlakem

Tím se rozumí použití isostatického tlaku řádově tisíců barů po dobu několika minut, čímž se dosáhne účinku podobného sterilaci, tj. účinné inaktivace nežádoucích mikroorganismů nebo i dalších efektů jako například ovlivnění funkčních vlastností bílkovin (např. koagulace), inaktivace enzymů, ovlivnění počátku a způsobu krystalizace lipidů apod., bez nutnosti potraviny zahřívát nebo v kombinaci s velmi šetrným záhřevem. Tím vzniká možnost vyrábět údržné potraviny o vysoké kvalitě, blížíci se svými sensorickými vlastnostmi potravinám čerstvým, neboť při tomto procesu nedochází zpravidla k odbourání vitaminů, barvy ani vůně. Citlivost mikroorganismů k účinkům vysokého tlaku je různá. Pro inaktivaci plísni postačují tlaky okolo 400 MPa. Uvádí také, že citlivost je ovlivněna řadou faktorů, rodem a druhem mikroorganismu, teplotou a chemickým složením prostředí, například glukosa v koncentracích vyšších než 55 % poskytuje účinnou ochranu kvasinkám a plísním. Vegetativní formy plísni *Byssochlamys nivea*, *B. fulva*, *Eurotium (Aspergillus fischeri)*, *Eupenicillium* spp. a *Paecilomyces* spp. byly inaktivovány při 300 MPa a 25 °C. Počet spor těchto plísni byl velmi silně zredukován při 300 – 600 MPa a 10 – 60 °C, u *B. nivea* při 10 minutovém působení 800 MPa a teplotě 70 °C. Spory bakterií mohou přežívat dlouhou dobu, např. spory rodu *Bacillus* přežívají hodinové působení tlaku 1700 MPa.

10.2.2.2 Chemosterilace

Konzervace kyslíkem

Kyslík v molekulární formě škodí pouze striktním anaerobům. V atomické formě působí silně oxidačně a usmrcuje i aeroby. Zvláště účinný je **ozon**, ale sterilizuje jen povrchově, neproniká do vnitřních vrstev potravin. V koncentraci 10-40 mg O₃/m³ vzduchu při peroxidickém působení se může použít při krátkodobé ochraně hladiny kapalin ve větších nádržích. Doporučuje se k ochraně ovoce ukládaného v čerstvém stavu. Pro většinu ovoce se doporučuje 2 - 3 mg O₃/kg skladištního vzduch několik hodin denně.

Konzervace ionizovaným stříbrem

Jde spíše dekontaminaci, založenou na oligodynamickém působení stříbra a některých jiných kovů, jejichž nepatrné množství má v ionizované formě smrtící vliv na mikroorganismy. Nelze použít ke konzervaci nekyselých potravin (nepůsobí na spory) a ovocných šťáv, které mění vlastnosti po konzervaci stříbrem.

10.2.3 Konzervace nepřímou metodou

Při využití následujících metod jde o omezení nebo inhibici přítomných mikroorganismů.

10.2.3.1 Konzervace nepřímou inaktivací mikroorganismů

Fyzikální případně fyzikálně-chemické metody.

Osmoanabioza

Konzervace vysušováním prostředí spočívá na principu zbavování potravin volné vody či ve zvyšování osmotického tlaku v kapalném podílu potravin. Toho lze dosáhnout různými způsoby:

- **Sušení** - odnímání vody surovinám nebo potravinám lze provádět: **Vzduchem** – mírně ohřátým, který proudí okolo částic a to jednorázově u rozprašovacích sušáren, nebo přehříváním vzdušným proudem. **Přímým zahříváním** - vakuové sušení, expansní sušení. **Infračerveným zářením** – výhodné pro rostlinné materiály. Další možností je využít **sublimační sušení** – voda se přemění na led a pak se vysublimuje (nesprávně lyofilizace), **sušení přehřátou párou** – pro potraviny, které snesou déle trvající záhřev (zelenina) či **sušení ovoce osmózou** – v koncentrovaném roztoku cukru.
- **Evaporační zahušťování** v odparkách nebo kotlích. Využívá se u tekutých a polotekutých hmot - ovocná povidla (50 – 60 % suš.), ovocné koncentráty (60 % suš., u citrusů alespoň 50 % suš.).
- **Koncentrace vymrazováním** ze šťáv se provádí pozvolným zmrazováním, voda tvoří poměrně velké snadno mechanicky oddělitelné krystalky.
- **Koncentrace šťáv osmózou** je založena na působení mechanického tlaku.
- **Koncentrace přidavkem cukru** u ovoce – marmelády, džemy, sirupy, kandované ovoce.
- **Konzervace solí** spočívá v osmoanabióze, ale jsou možné i další účinky (destrukce protoplasm). Provádí se na sucho nebo lákováním.

Konzervace sníženou teplotou

Nízké teploty nevedou k usmrcení mikroorganismů v potravině, zastaví se jen jejich činnost. Ve zmražených potravinách zůstávají mikroorganismy životaschopné velmi dlouhou dobu.

- **Chlazení** je víceméně krátkodobé konzervační působení teplot ne nižších než 0 °C (0 – 5 °C, obvykle 1 – 3 °C a nesmí klesnout pod 0 °C). Používá se spíše k prodloužení trvanlivosti suroviny před procesem zpracování.
- **Mražení** je dlouhodobá konzervace pod – 10 °C (dostatečná ochrana před mikroorganismy), vlastní enzymy potravin vyžadují k inhibici jejich působení teploty ještě nižší -18 až -30 °C.

Konzervace odnímáním kyslíku

Je založena na principu potlačení aerobních mikroorganismů, vyžadujících vzdušný kyslík.

- **Mechanická evakuace okolí potravin** – k prodloužení trvanlivosti na omezenou dobu, jako doplňující činitel.
- **Prostředí netečných plynů** – např. CO₂ jeho inhibiční vliv je výsledkem působení více činitelů (CO₂ a kyselost u syčených šťáv).
- **Regulovaná atmosféra** např. k ukládání ovoce - používá se CO₂ a N₂.

10.2.3.2 Chemická konzervace – chemonabioza

Přídavkem chemické látky potlačíme v potravine mikroorganismy, nemusí však vždy dojít k jejich usmrcení (to se týká především spor).

Používané chemikálie musí splňovat tyto požadavky:

- Již nepatrná koncentrace musí učinit potravinu nevhodnou pro mikroorganismy.
- Účinná koncentrace musí být zdraví neškodná.
- Nesmí ovlivnit sensorické vlastnosti potraviny (chuť, vůně, barva atd.).
- Nesmí obsahovat nedovolené příměsi (těžké kovy a jiné látky).

Nejčastěji se používají tyto chemikálie:

- **Oxid siřičitý** ke konzervaci šťáv, vín, moštů, kečupů a protlaků.
- **Kyselina benzoová** nedá se použít do nekyselých potravin, hraniční pH je zpravidla 4,5. Působí fungistaticky i bakteriostaticky.
- **Kyselina sorbová** potlačuje plísně a kvasinky, má i bakteriostatický účinek doporučuje se kombinovat s proslazováním.
- **Kyselina propionová** má fungistatický účinek.

Jako konzervanty se využívají i soli kyselin.

Z dalších možností jsou to především:

Konzervace uzením (kouřem) působí zde mikrobicidní látky obsažené v kouři a částečné vysušení popř. teplota.

Konzervace umělou alkoholizací - Ethanol je nejúčinnější v koncentraci 76 %, koncentrovanější mikroorganismy vysušuje a tím je činí odolnějšími. V cukrářství se využívá k nakládání ovoce.

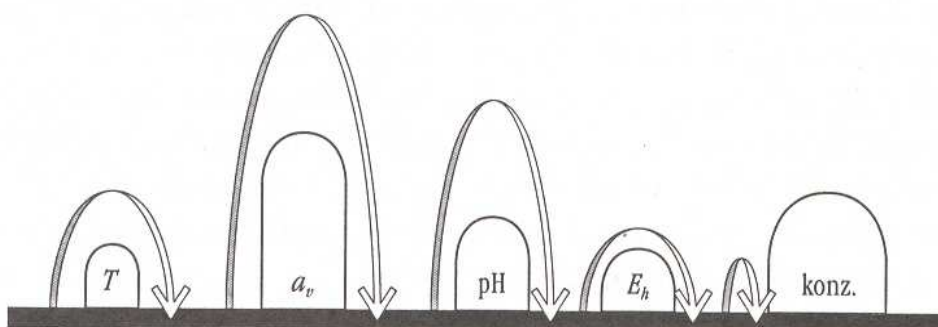
Použití organických kyselin získaných především fermentační činností (kyselina citronová, octová, vinná, jablečná, mléčná) chrání potraviny před rozkladnou činností mikroorganismů jen za určitých podmínek a zpravidla na omezenou dobu. Většina bakterií nesnáší okyselení naproti tomu plísně a kvasinky zastavuje až velmi silné okyselení. V potravinářství se spojuje okyselování s dalšími chuťovými úpravami – marinování.

Použití látek s antimikrobiálním účinkem pro konzervaci se používají jen pro člověka zcela neškodné látky, nesmí se užívat ve zdravotnictví. Používá se nisin, subtilin a další. Vhodné je kombinovat je s termosterilací a jinými metodami.

10.2.3.3 Konzervace biologickými zásahy

V běžné praxi se uplatňují dva druhy biologické konzervace - konzervace alkoholovým kvašením a konzervace mléčným kvašením.

I když samostatné působení jednotlivých faktorů není dostatečné pro zabránění růstu a rozmnožování mikroorganismů zhoršujících kvalitu potravin, mohou kombinace více či méně působících faktorů způsobit optimální konzervaci potravin. V mnohých potravinách působí na mikroorganismy současně více faktorů. Toto působení označujeme, jako **překážkový efekt** viz obrázek 14.



Obr. 14: **Kumulační efekt faktorů inhibujících růst mikroorganismů v potravině** podle Leistnera 1986 (Görner et Valík, 2004)

11 POUŽITÁ LITERATURA

- AMBROŽOVÁ, J. (2004): Mikrobiologie v technologii vod. VŠCHT Praha, ISBN: 80-7080-534-X, 244 s.
- ARPAI, J., BARTL, V. (1977): Potravinárska mikrobiológia. Alfa Bratislava, 280 s.
- BARKAI – GOLAN, R., PASTER, N. (2008): Mycotoxins in fruits and vegetables. Academic Prass Elsevier, London UK, 395 s. ISBN: 978-0-12-374126-4
- BASAŘOVÁ, G., ŠAVEL, J., BASAŘ, P., LEJSEK, T. (2010): Pivovarství. Teorie a praxe výroby piva. VŠCHT Praha, 863 s. ISBN: 978-80-7080-734-7
- BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. (1996): Lékařská mikrobiologie. Marvil, Praha. 558
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, Ninth Edition. (1994): Willims & Wilkins, USA, 787 s. ISBN: 0-683-00603-7
- BETINA, V. (1990): Mykotoxíny. Chémia – biológia – ekológia. Alfya, Bratislava, 288 s. ISBN: 80-05-00631-4
- CEMPÍRKOVÁ, R., LUKÁŠOVÁ, J., HEJLOVÁ, Š. (1997): Mikrobiologie potravin, JU ZF České Budějovice, 165 s. ISBN: 80-7040-254-7
- CLARK, T. A., MONCALVO, J-M. (2005): Fungal phylogeny based on complete mitochondrial genome sequences. In: Deshmukh, S. K., Rai, M. K. (eds) Biodiversity of fungi. Their role in human life. Sci. Publ. Enfield, USA. ISBN: 1-57808-368-0, s. 15 – 32.
- DEÁK, T. (2008): Handbook of food spoilage yeasts. CRC Press, Boca Raton, ISBN: 1-4200-4493-1, 235 s.
- DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. (2001): Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Washington, D.C. 872 s. ISBN 1-55581-208-1
- DRDÁK, M., STUDNICKÝ, J., MÓROVÁ, E., KAROVIČOVÁ, J. (1996): Základy potravinárskych technológií. MALÉ CENTRUM, Bratislava, 512 s. ISBN: 80-967064-1-1
- FASSATIOVÁ, O. (1979): plísňe a vláknité houby v technické mikrobiologii. SNTL Praha. 240 s.
- FERNANDES, R. (2009): Microbiology Handbook Meat Products. Leatherhead Food Int. Ltd UK, 297 s. ISBN 978-1-905224-66-1
- GÖPFERTO VÁ, D., JANO VSKÁ, D., DOHNAL, K., MELICHERČÍKOVÁ, V. (2002): Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena. Pro střední a vyšší odborné zdravotnické školy. Triton, Praha, 148 s. ISBN: 80-7254-223-0

- GÖRNER, F., VALÍK, Ľ. (2004): Aplikovaná mikrobiológia požívatin. Malé centrum Bratislava, 528 s. ISBN: 80-967064-9-7
- HALGAŠ, J. (1987): Biokatalyzátorey v organickej syntéze. VEDA Bratislava, 192 s.
- HRUBÝ, S. (1984): Mikrobiologie v hygieně výživy. Avicenum Praha, 208 s.
- CHUMCHALOVÁ, J., NĚMEC, M., KOTOUČKOVÁ L., PÁČOVÁ, Z., SAVICKÁ, D., KUBÁTOVÁ, A., PATÁKOVÁ, P. Miniatlás mikroorganismů. Dostupný na: <http://www.vscht.cz/main/soucasti/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/index-b.htm>
- INGR, I. (2003): Produkce a zpracování masa. Skriptum MZLU v Brně, s. 202, ISBN 80-7157-719-7
- JANDEROVÁ, B., BENDO VÁ, O. (1999): Úvod do biologie kvasinek. Karolinum, Praha, 108 s. ISBN: 80-7184-990-1
- JAVOREKOVÁ, S., KRÁLIKOVÁ, A., LABUDA, R., LABUDOVÁ, S., MAKOVÁ, J. (2008): Biológia pôdy v agrosystémoch. SPU, Nitra, 349 s. ISBN: 978-80-552-0007-1
- JAVOREKOVÁ, S., MAKOVÁ, J. (2012): Mikrobiológia. SPU, Nitra, 146 s. ISBN: 978-80-552-0760-5
- JAY, J.M., LOESSNER, M.J., GOLDEN, D.A. (2005): Modern Food Microbiology. Springer Science, NY USA, 790 s. ISBN 0-387-23180-3
- JESENSKÁ, Z. (1987): Mikroskopické huby v požívatinách a krmivách. Alfa, Bratislava. 320 s.
- JIČÍNSKÁ, E., HAVLOVÁ, J. (1995): Patogenní mikroorganismy v mléce a mléčných výrobcích. ÚZPI Praha, 106 s. ISBN 80-85120-47-X
- KADLEC, P., MELZOCH, K., VOLDŘICH, M. a kol. (2012): Technologie potravin. Přehled tradičních potravinářských výrob. KEY Publishing s.r.o., Ostrava, 569 s., ISBN 978-80-7418-145-0
- KADLEC, P., MELZOCH, K., VOLDŘICH, M. a kol. (2012): Technologie potravin. Procesy a řízení potravinářských a biotechnologických výrob. KEY Publishing s.r.o., Ostrava, 494 s., ISBN 978-80-7418-086-6
- KALAČ, P., KŘÍŽEK, M. (2002): Biogenní aminy a polyaminy v potravinách. Výživa a potraviny č. 1, pp. 12-13.
- KALAČ, P., KŘÍŽEK, M. (2005): Biogenní aminy a polyaminy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví. Potravinářská revue 2/2005, s. 40-42.
- KALAČ, P., MÍKA, V. (1997): Přirozené škodlivé látky v rostlinných krmivech. ÚZPI, Praha. 317 s. ISBN: 80-85120-96-8

- KALHOTKA, L. (2014): Mikromycety - vláknité mikromycety (plísňe) a kvasinky - v prostředí člověka. Mendelova univerzita v Brně, 78 s. ISBN: 978-80-7375-943-8
- KAMENÍK, J. (1994): Startovací kultury v masném průmyslu. ÚZPI Praha. 51 s. ISBN 80-85120-46-1
- KAMENÍK, J., (2011): Trvanlivé masné výrobky. FVHE VFU Brno, 284 s. ISBN: 978-80-7305-106-8
- KLABAN, V. (2005): Ilustrovaný mikrobiologický slovník. Galén, Praha. 654 s. ISBN 80-7262-341-9
- KLÁN, J. (1989): Co víme o houbách. SPN, Praha, 312 s. ISBN: 80-04-21143-7
- KOMPRDA, T. (2007): Obecná hygiena potravin, MZLU Brno, 148 s. ISBN: 978-80-7157-757-7
- KOTALÍK, P., DOUBRAVOVÁ K. Korozie a degradace stavebních materiálů. Dostupné na: http://www.vscht.cz/met/stranky/vyuka/predmety/korozie_materialu_pro_restauratory/kadm/pdf/2_4.pdf
- KUBÁTOVÁ, A., Vlákinné houby. In: Chumchalová, J., Němec, M., Kotoučková L., Páčová, Z., Savická, D., Kubátová, A., Patáková, P. Miniatlask mikroorganismů. Dostupný na: <http://www.vscht.cz/main/soucasti/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/index-b.htm>
- KUBÁTOVÁ, A. (2006): Atlas mikroskopických saprotrofních hub (Ascomycota) (2006). Dostupný na: <https://botany.natur.cuni.cz/cs/atlas-mikroskopicky-ch-saprotrofnich-hub-ascomycota-2006>
- KYZLINK, V. (1980): Základy konzervace potravin. SNTL Praha, 516 s.
- LOCHMANNOVÁ, J., LOCHMANN, O. (2001): Antiinfekční terapie v gastroenterologii. Triton, Praha, 170 s. ISBN: 80-7254-161-7
- MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., BÁRTA, I., BUCHTA, V., DVOŘÁČKOVÁ, I., PAŘÍKOVÁ, J., SEVERA, J., ŠKARKOVÁ, J. (2003): Vlákinné mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. NCO NZO, Brno, 349 s. ISBN: 80-7013-395-3
- MARENDIAK, D., KOPČANOVÁ, E., LEITGEB, S. (1987): Poľnohospodárska mikrobiológia. Príroda, Bratislava, 444 s.
- MARVÁNEK, T. (2014): Mikrobiologie ve vinařství. Diplomová práce. MENDELU.
- MINÁRIK, E., NAVARA, A.(1986): Chémia mikrobiológia vína. Príroda Bratislava, 560 s.
- NIKOLAÍ, T. (1997): Praktické a teoretické možnosti prodloužení údržnosti masných a drůbežích výrobků v souladu se současnými inovačními trendy. Seminář f. DERA FOOD TECHNOLOGY Brno 24.4.1997. 100s.

- OKAFOR, N. (2007): Modern Industrial Microbiology and Biotechnology. Sci. Publishers Enfield, USA, 530 s. ISBN: 978-1-57808-513-2
- PELIKÁN, M., DUDÁŠ, F., MÍŠA, D. (1996): Technologie kvasného průmyslu. MZLU Brno, 135 s. ISBN: 80-7157-240-3
- PIPEK, P. (1998): Technologie masa II. Karmelitánské nakladatelství v Kostelním Vydří, ISBN: 80-7192-283-8, 360 s.
- PLÁŠKOVÁ, P. (2008): Biokoroze anorganických materiálů. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Dostupné na: http://dspace.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/7513/pl%C3%A1%C5%A1kov%C3%A1_2008_dp.pdf?sequence=1
- ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J. Prokaryotické organismy. From Encyklopedie hydrobiologie : výkladový slovník [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2014-07-26]. Available from www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=P035>
- SHALABY, A. R. (1996): Significance of biogenic amines to food safety and human health. Food Research International, Vol. 29, No. 7, pp. 675-690.
- SAVICKÁ, D., Kvasinky. In: Chumchalová, J., Němec, M., Kotoučková L., Páčová, Z., Savická, D., Kubátová, A., Patáková, P. Miniatlasy mikroorganismů. Dostupný na: <http://www.vscht.cz/main/soucasti/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/index-b.htm>
- SEDLÁČEK, I. (2007): Taxonomie prokaryot. Masarykova univerzita. 270 s. ISBN 80-210-4207-9
- SCHINDLER, J. (2010): Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů. Grada Publishing, Praha. 224 s. ISBN 978-80-247-3170-4
- SILLA SANTOS, M.H. (1996): Biogenic amines: their importance in foods. Int. J. of Food Sci. 29. s. 213-231
- STEINHAUSER, L. a kol. (1995): Hygiena a technologie masa. 1. vyd. Brno: Vydavatelství potravinářské literatury LAST, 664 s. ISBN 80-900260-4-4
- ŠILHÁNKOVÁ, L. (2002): Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Academia, Praha, 363 s. ISBN: 8-85605-71-6
- ŠROUBKOVÁ, E. (1996): Technická mikrobiologie, MZLU Brno, 150 s. ISBN: 80-7157-226-8
- TANČINOVÁ, D., MAKOVÁ, J., FELŠŮCIOVÁ, S., KAČÁNIOVÁ, M., KMEŤ, V. (2012): Mikrobiológia potravín. SPU, Nitra, 150 s. ISBN: 978-80-552-0904-3
- TVRDOŇ, M. (1992): Mikrobiologie pivovarská a sladařská pro SOU. SNTL, Praha, ISBN: 80-03-00562-0, 88 s.

- VELÍŠEK, J. (1999) : Chemie potravin 1 – 3, OSSIS Tábor, ISBN 80-902391-2-9.
- VODRÁŽKA, Z. (1996): Biochemie. Academia, Praha, ISBN: 80-200-0438-6.
- VODRÁŽKA, Z. (1996): Biotechnologie. VŠCHT Praha, 182 s. ISBN: 80-7080-121-2.
- VOTAVA, M. a kol. (2005): Lékařská mikrobiologie obecná. NEPTUN Brno, 351 s. ISBN: 80-86850-00-5
- VOTAVA, M. a kol. (2006): Lékařská mikrobiologie speciální. NEPTUN Brno, 495 s. ISBN: 80-902896-6-5

Autor	Ing. Libor Kalhotka, Ph.D.
Název titulu	POTRAVINÁŘSKÁ MIKROBIOLOGIE PRO ZAHRANICKOU FAKULTU DÍL 2. Speciální část
Vydavatel	Mendelova univerzita v Brně Zemědělská 1, 613 00 Brno
Vydání	První, 2014
Náklad	200 ks
Počet stran	164
Tisk	ASTRON studio CZ, a.s.; Veselská 699, 199 00 Praha 9 Neprošlo jazykovou úpravou.
ISBN	ISBN 978-80-7509-016-4 ISBN 978-80-7509-017-1 (soubor) ISBN 978-80-7509-015-7 (I. díl)

Tato publikace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.

Byla vydána za podpory projektu OP VK CZ.1.07/2.2.00/28.0302 Inovace studijních programů AF a ZF MENDELU směřující k vytvoření mezioborové integrace.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ