

## Kažení a konzervace potravin

### Mikroorganismus a potravina

- uchycení mikroorganismů (fimbrie, pouzdra, slizová vrstva)
- rozšiřování mikroorganismů (povrch x hloubka)
- technologické zpracování - růstová křivka mikroorganismů v potravine (délka lag fáze)
- kontaminační dávka
- druh mikroorganismů (růstová fáze, generační doba)
- mikroflóra potraviny (vzájemné vztahy mezi mikroorganismy)
- vliv vnitřních (fyzikálně-chemické vlastnosti potraviny) a vnějších faktorů (podmínky skladování potraviny)
- trvanlivost potravin ovlivňuje také počet a druhové zastoupení mikroorganismů, a to zejména při nízkých teplotách skladování
- čím méně je v potravine mikroorganismů a čím méně jsou aktivní, tím delší čas je potřeba k jejich pomnožení a vzniku senzorických změn (dlouhá lag fáze a delší generační čas)

### Rozdělení mikroorganismů

- Patogenní
- Podmíněně patogenní
- Toxinogenní
- Saprophytické
- Ušlechtilé kultury
- Probiotika

### Způsoby kontaminace potravin

- Primární – živý organismus
- Sekundární – křížová kontaminace při výrobě a manipulaci s potravinami

### Kažení potravin

- Kažení je komplex biologických, fyzikálních, chemických a biochemických změn.
- Projevy kažení: změna senzorických vlastností – vizuálních, čichových, chuťových apod.

### Vlivy působící na rozvoj kažení potravin

- mechanické poškození hmyzem, fyzikální poškození, otlak, zmrznutí, vysušení apod.
- aktivita enzymů vlastní potravine
- chemické změny

### Projevy mikrobiálního kažení

- viditelný růst, pigmentové kolonie, hlavně plísně
- tvorba plynu
- sliz
- difuze pigmentů a enzymů
- zápach (off-odours)
- špatná chuť (off-flavors)
- produkce metabolitů: alkohol, estery, ketony, sirné sloučeniny fluoreskující pigmenty, organické kyseliny, diaminy

### Zdroje mikroorganismů kažení:

- půda, voda, rostliny a jejich produkty, prach, gastrointestinální trakt zvířat a lidí

Zkáze nejrychleji podléhají chlazené čerstvé potraviny bohaté na proteiny.

- červené maso, drůbež, ryby, mléčné výrobky
- všechny jsou vysoce výživné, mají velký obsah volné vody –  $a_w$ , relativně neutrální pH

Z dalších čerstvých potravin je to ovoce a zelenina.

### Faktory ovlivňující kažení potravin

- Počáteční množství všech mikroorganismů
- Typ potravin/vnitřní faktory
  - pH
  - $a_w$
  - obsah živin
  - antimikrobiální látky
  - oxidačně-redukční potenciál
  - biologické struktury
- Teplota a doba skladování
- Přístup vzduchu

### Nejčastější mikroorganismy způsobující kažení

#### Gram pozitivní

- Sporotvorné: *Clostridium*, *Bacillus*
- Nesporotvorné: *Micrococcus*, *Brochothrix*
- BMK: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*

#### Gram negativní

- Koliformní bakterie: *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Hafnia*
- *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Alteromonas*, *Flavobacterium*

### Přehled MO podílejících se na kažení potravin

Gram negativní tyčinky:

- nejčastěji napadají čerstvé chlazené potraviny, min růst T 0 - 3 °C, při 5 - 10 °C rostou rychle
- nejvíce se vyskytuje *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Flavobacterium*
- Koliformní tyčinky: poněkud vyšší T optimum, 8 - 15 °C
- *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Hafnia*, *Erwinia*

Gram pozitivní tyčinky:

- sporulující *Bacillus*, *Clostridium*, *Alicyclobacillus*
- *Brochothrix thermosphacta* na čerstvém mase, *Micrococcus* spp. roste i v přítomnosti NaCl

### **Sporotvorné bakterie**

- *Bacillus, Clostridium, Desulfotomaculum*

Důležité:

- spory přežívají 100 °C
- při pH nižším než 4 spory neklíčí
- základ stanovení: kultivace po usmrcení vegetativních buněk
- 

### **Aerobní a fakultativně anaerobní sporotvorné mikroorganismy**

Mesofilní

- některé druhy rodu *Bacillus*
- mesofilní → inaktivace 30 min. při 80 °C

Termotolerantní

- *B. coagulans* – inaktivace 8 min. při 88 - 90 °C
- inkubace při 30 °C, pH 4,0-7,0, rozmnožování při T 15 - 20 °C

Termofilní:

- *B. stearothermophilus*
- inkubace při 55 °C, pH více než 5,3

Způsobují plynu prosté kysání nekyselých konzerv.

### ***Alicyclobacillus* spp.**

- termo-acidofilní bakterie, tvoří endospory, aerobní
- růst v rozmezí 30 - 60 °C, pH 3 - 6, optimální pH 4 – 4,5
- některé druhy jsou schopny produkovat spory při pH nižším než 3,2
- schopnost produkovat 2,3-dibromfenol a 2,6 dichlorfenol, guajakol
  - *A. pomorum*,
  - *A. acidoterrestris*,
  - *A. hesperidum*,
  - *A. cycloheptanicus*,
  - *A. herbarius*,
  - *A. sendaiensis*

### **Anaerobní sporotvorné mikroorganismy**

**Mezofilní**

Proteolytické druhy rodu *Clostridium*

- *Cl. sporogenes, Cl. putrefaciens, Cl. bifermentans* – rozklad bílkovin za tvorby merkaptánů, indolu, skatolu, kadaverinu, putrescinu, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> → bombáž konzerv

Sacharolytické druhy

- v sýrařství – *Cl. tyrobutyricum* zkvašuje laktát na kys. máselnou za silného vývoje plynu, působí nežádoucí duření sýrů

**Termofilní**

***Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum***

- působí bombáž kyselých konzerv obsahujících sacharidy a uchovávaných nad teplotu 30 °C
- nemá proteolytické enzymy, netvoří toxiny, roste při pH 4,1-6,7, neroste pod 37 °C

- škrob, obiloviny, koření, sušení houby, sušené mléko, konzervovaná zelenina, rajčatové výrobky
- důvod rozvoje → pomalé chlazení konzerv

#### ***Desulfotomaculum nigricans***

- G- tyčinky, netvoří bombáže, tvoří H<sub>2</sub>S ze síranů a cysteinu
- roste při 45 – 70 °C může se rozmnožovat i při 30 – 37 °C, opt. T 55 °C, pH 6,2-7,8, ale pomalý růst i při pH 5,6
- nekyselé konzervy

#### **Kyselinotvorné mikroorganismy**

- kysání potravin
- *Bacillus, Clostridium, Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Staphylococcus, Lactobacillus, Propionibacterium, Bifidobacterium, Enterobacteriaceae, Acetobacter*, plísně, kvasinky
- bakterie mléčného kvašení: fermentují cukry za tvorbu kys. mléčné, výsledkem je pokles pH, vydrží až pH 3,6

#### **Mikrobiální sacharolytické enzymy**

- rozklad sacharidů - etanol, organické kyseliny, CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O

#### **Lipolytické mikroorganismy**

- hydrolýza a oxidace tuků
- *Pseudomonas, Rhizopus, Geotrichum, Aspergillus, Penicillium, Debaryomyces, Rhodotorula, Hansenula, Candida, Yarrowia*

#### **Mikrobiální lipázy**

- optimální teplota 20 °C, aktivní i při nízkých teplotách, produkovány i psychrotrofními MO
- termorezistentní (více produkované psychrotrofy)
- lipolýza tuku vede ke zvýšené produkci volných mastných kyselin
- vady potravin: vznik cizích vůní a chuti mléka: žluklá (MK C<sub>4</sub> - C<sub>8</sub>), nečistá, hořká, mýdlová (MK C<sub>10</sub> - C<sub>12</sub>)

#### **Proteolytické mikroorganismy**

- mikrobiální rozklad bílkovin → vznik toxických aminů a zápachu
- *Bacillus, Clostridium, Proteus, Serratia, Mucor, Thamnidium, Geotrichum, Aspergillus, Penicillium*

#### **Mikrobiální proteázy**

- optimální teplota 20 °C, ale produkují je i psychrotrofní MO
- termorezistentní, částečně odolné i k UHT
- některé MO štěpí celé bílkoviny (*Pseudomonas, Bacillus, Serratia*), jiné odbourávají nižší bílkovinné složky (*Escherichia, Proteus*)
- vady potravin: gelovatění, hořknutí, nečistá chuť a vůně

## Slizotvorné mikroorganismy

- *Leuconstoc* (melasa, limonády, maso)
- *Bacillus* (pečivo, strouhanka)
- *Fusarium*
- slizotvorná pouzdra na bázi polysacharidů a polypeptidů
- *Bacillus subtilis* a *B. mesentericus* - termofilní, spory těchto bakterií přecházejí teplotu pečení, která nepřekročí 100°C, **nitkovitost chleba** je výsledkem tvorby slizovitých pouzder těchto bakterií společně s enzymovou hydrolýzou lepku a škrobu, který po zcukření podporuje tvorbu pouzder, střída chleba začne druhý až třetí den po upečení vlhnout, maže se, je lepivá, zbarvuje se dožluta a odporně hnilobně páchne, při doteku se vytahuje do dlouhých nití

## Halotolerantní a halofilní bakterie

### Halotolerantní

- rostou i bez NaCl, ale pro rozmnožování potřebují více než 5% *Staphylococcus aureus*, některé bacily a klostridia (*Cl. botulinum*, *Cl. perfringens*)

### 2 - 5 % NaCl

- *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* – ryby, korýši

### 5 - 20 % NaCl

- *Bacillus*, *Clostridium*, mikrokoky - lák naloženého uzeného masa, slanečci

### 20 – 30 % NaCl

- *Halobacterium*, *Halococcus* - karotenoidní barviva, proteolytické vlastnosti, aerobní, sliz na mase, rybách

## Kvasinky a plísně

### Kvasinky

- *Candida*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Torulospora*, *Rhodotorula*, *Pichia*

### Plísně

- *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Byssosclamyces*

## Příklady mikrobiálního kažení

### Kysnutí

- mléčné výrobky, vakuově balené masné výrobky, pivo, víno, ovocné šťávy
- příčina: kys. octová, mléčná, citronová, máselná
- organismus: BMK, *Bacillus*, *Brochothrix thermosphacta*, bakterie máselného kvašení, *Acetobacter*, *Clostridium*

### Kvašení

- ovocné šťávy, majonézy, saláty
- příčina: etanol
- organismus: kvasinky

### Hnojový pach

- zelenina
- příčina: p-kresol, indol, skatol
- organismus: *Erwinia*, *Clostridium*

### Sliz

- maso, cukrářské výrobky

- příčina: tvorba polysacharidů
- organismus: *Pseudomonas fragi*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus subtilis*

#### Měknutí/hnití

- ovoce a zelenina
- příčina: pektinasy, cellulasy, xylanasy
- organismus: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, kvasinky, plísně
  - *Erwinia carotovora* (většina ovoce a zeleniny)
  - *Erwinia chrysanthemi* (ananas)
  - *Pseudomonas marginalis* (zelenina)
  - *Pseudomonas viridiflava* (fazole)
  - *Pseudomonas cichori* (čekanka, endive, zelí, salát)

#### Tvorba plynu

- sýry, tvaroh, olivy,
- příčina: tvorba oxidu uhličitého
- organismus: BMK, kvasinky

#### Tvorba biogenních aminů

- ryby, sýry
- přirozené antinutriční faktory
- spojujány s případy otrav z potravin a jsou schopné iniciovat různé farmakologické reakce

#### Nejvýznamnější biogenní aminy vyskytující se v potravinách:

- histamin, putrescin, kadaverin, tyramin, tryptamin,  $\beta$ -fenyletylamin, spermin a spermidin
- U ryb s vysokým obsahem histidinu v tkáních (zejména ryby čeledi *Scombroidae* - např. makrela, tuňák) vzniká činností MO ve velkém množství toxikologicky nejvýznamnější biogenní amin **histamin**.
  - Na tvorbě biogenních aminů se podílí zejména bakterie *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumonia*, *Hafnia alvei*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter aerogenes*, atd.

### Mikrobiologie konzervovaných potravin

#### Metody konzervace

- fyzikální: záhřev, chlazení, mražení, sušení, zahušťování, ionizující záření
- chemické: konzervační látky, lákování, uzení
- biologické: fermentace za vzniku kyseliny mléčné, fermentace za vzniku alkoholu

#### Konzervace zvýšenou teplotou

- nejrozšířenější způsob konzervace

#### Obecně platí:

- vztah času a teploty devitalizace mikroorganismů je semilogaritmický
- kombinace času a teploty je závislá na termorezistenci mikroorganismů a jejich množství
- účinnost devitalizace mikroorganismů ovlivňuje vnitřní prostředí potravin (pH, obsah vody, atd.)

#### D-hodnota

**D-hodnota** je doba potřebná ke snížení počtu MO na 10 % (tj. o jeden logaritmický řád)

$$D = \text{doba záhřevu} / \log CPM_{\text{výchozí}} - \log CPM_{\text{po záhřevu}}$$

- Většina vegetativních buněk:  $D_{65} = 0,2-2$  min
- Enterokoky:  $D_{65} = 5-30$  min
- Endospory: 100 °C hodiny, 120 °C minuty
- Kvasinky a plísně:  $D_{55} = 0,5-3$  min

### Z-hodnota

- Čím je teplota záhřevu mikrobiální populace vyšší, tím rychleji dochází k jejímu odumírání.
- Zvýšení teploty záhřevu, které je potřebné na snížení D-hodnoty na 1/10 se označuje jako z-hodnota.
- Pro výpočet sterilizačního programu u konzerv obsahujících mírně kyselé potraviny se obecně používá z-hodnota 10 °C.

### Q-hodnota

- teplotní koeficient  $Q_{10}$  nám určuje míru vlivu zvýšení teploty na devitalizaci MO
- $Q_{10}$ -hodnota udává, o co rychleji probíhá devitalizace MO, když se teplota prostředí zvýší o 10 °C

### F<sub>0</sub>-hodnota

- hodnota  $F_0$  udává počet minut, za které se při teplotě 121 °C dosáhne letální efekt rovný součtu letálních účinků v průběhu celého sterilizačního procesu

### Sterilizační efekt

Ochrana proti alimentární intoxikaci:

- *C. botulinum* typ A nebo B,  $D_{121,1} = 0,21$  min
- snížení počtu spór o 12 log řádů (tj. 12 D)
- $F_0 = 0,21 \cdot 12 = 2,52$  min

Ochrana proti kažení obsahu konzerv:

- *Clostridium sporogenes*,  $D_{121,1} = 1,0$  min

Konzervy pro tropické oblasti:

- *Bacillus stearothermophilus*,  $D_{121,1} = 4,5$  min

### Konzervy

- Konzervou se rozumí výrobek neprodyšně uzavřený v obalu, sterilovaný (ve všech částech účinek odpovídající účinku teploty 121 °C po dobu nejméně 10 minut).
- Polokonzervou výrobek neprodyšně uzavřený v obalu, pasterovaný (ve všech částech účinek odpovídající účinku teploty 100 °C po dobu nejméně 10 minut).
- Konzervy jsou obchodně sterilní výrobky. Sterility sedosáhne zahřátím obsahu konzervy na vysokou teplotu přímo v obalu, který brání jeho rekontaminaci.

### Obchodní sterilita

- nepřítomnost životaschopných mikroorganismů, které by se mohly za podmínek oběhu množit, a nepřítomnost mikroorganismů vyvolávajících onemocnění z potravin (ČSN56909)
- termostatová zkouška: 7 až 10 dní při 35 – 37 °C, CPM ne více než 10<sup>2</sup> KTJ/g
- zkoušení obchodní sterility se provádí před uvedením do oběhu, příp. v indikovaných případech

### Druhy konzerv

Polokonzervy (prezervy)

- pasterace, vaření, konzervace kyselinami či konzervačními látkami, < 5°C, 6 měsíců

Pravé konzervy

- < 25 °C, 4 roky

Konzervy do tropů

- > 40 °C, 1 rok

SSP produkty (Self-stable-products)

- potraviny v obalu (brání rekontaminaci), 1 rok při teplotě 20°C, záhřev na teploty < 100 °C + snížení  $a_w < 0,95$  (nebo kombinace teploty a pH, atd.)

## Kažení konzerv

### Nedostatečná sterilizace

- přítomnost sporotvorných mikroorganismů
- klostridia - tvorba plynů ( $H_2, CO_2$ ), bombáž obalu, zápach, změna textury a barvy
- *Bacillus coagulans* – slabé kysnutí obsahu bez tvorby plynu

### Netěšnost obalů

- kontaminace po sterilizaci při chladnutí (podtlak), kvalita chladící vody
- *Enterobacteriaceae*, BMK, kvasinky
  
- na kažení konzerv se může podílet také zpracování nekvalitní či mikrobiálně kontaminované suroviny
- způsob kažení konzerv je závislý na složení konzervy, pH jejího obsahu a podmínkách skladování
- mezofilní sporotvorné mikroorganismy (*C. sporogenes*, *C. botulinum* typ A a B – proteolytická aktivita)
- psychrotrofní MO (*C. botulinum* typ E- ryby)
- kyselé výrobky - *B. macerans*, BMK

## C. botulinum - alimentární intoxikace

- spory rozšířeny ubikvitárně (půda, voda, rostliny, střevo) – zde se nemnoží a netvoří toxin
- botulotoxin se tvoří za anaerobních podmínek při množení *C. botulinum* (pokud spory přežijí tepelné opracování)
- spory jsou termostabilní, toxin termolabilní (inaktivace při 100 °C/10 min)
- rizikové potraviny: domácí konzervy, uzené maso, málo kyselé zeleninové konzervy (pH > 4,6) při nedodržení zásad správné sterilace
- konzervy bývají bombované, smyslově beze změn

## Chlazení

- skladování za teplot vyšších, avšak blízkých 0 °C (typicky 0-5 °C)
- inhibice růstu mezofilních MO, případně jejich částečná redukce vzhledem k chladovému šoku (rychlé zchlazení na nízkou teplotu)
- nemá však vliv na inhibici psychrotrofních a psychrofilních MO
  - růst psychrotrofních MO je zpomalen, růstová rychlost psychrofilních je nižší
- schopnost růstu při nízkých teplotách je zvláště asociována s plazmatickou membránou – při zchlazování přechází z tekutého stavu do rigidního gelu, kdy je limitován přenos rozpuštěných látek
- teplota tohoto přechodu cytoplazmatické membrány u psychrotrofních a psychrofilních MO je výsledkem vyššího zastoupení nenasycených a krátkých MK, z kterých se skládají membránové lipidy
- změna mikrofóry odpovědné za kažení či změna metabolických pochodů

## Mražení potravin

- skladování za teplot nižších než 0 °C, typicky -18 °C
- obecně málo spolehlivé z pohledu devitalizace
- subletální poškození buněk
- **spory, viry → plísně a kvasinky → grampozitivní bakterie → gramnegativní bakterie**
  
- při -18 °C MO prakticky nerostou
- stabilní x kolísavá teplota

## Mražení potravin

- redukce mikroorganismů v důsledku chladového šoku, některé buňky jsou zničeny, u jiných pouze dochází k zastavení životních pochodů
- poškození buněčných membrán krystalky ledu
- vymražováním vody vzrůstá osmotický tlak → krystaly ledu vážou volnou vodu vně buňky – dehydratace buňky
- v závislosti na průběhu zamražení, potravině a mikroflóře dochází k redukci o 30 - 95 %

## Sušení

- Mikroorganismy jsou schopny využívat pouze tzv. vodu volnou.
- Dostupnost této volné vody pro mikroorganismy je vyjadřována vodní aktivitou ( $a_w$ ).
- Většina mikroorganismů má optimální  $a_w$  v hodnotách 0,95-0,99.
- Při snižující se hodnotě se schopnost růst v závislosti na jiných faktorech významně snižuje.
- Je však nutné počítat s tím, že naprostá většina mikroorganismů přežívá v podmínkách pod minimálními hodnotami  $a_w$ , a při zvýšení  $a_w$  může dojít k pomnožování mikroorganismů.
- Obecně lze konstatovat, že bakterie vyžadují pro růst vyšší hodnoty  $a_w$  než plísně.

## Chemické konzervanty

- Konzervanty jsou látky, které zamezují růstu mikroorganismů a prodlužují tím trvanlivost potravin.
- Výběr konzervačních prostředků závisí na výrobních podmínkách, zvláště pH potraviny (kyselosti), vodní aktivitě (voda je esenciální = nezbytná pro růst mikroorganismů) a typech mikroorganismů, které mohou být v potravě přítomny (jednotlivé konzervační látky mohou mít zesílenou účinnost na určité druhy mikroorganismů, a na některé naopak mohou mít účinek minimální, podobně jako je tomu u antibiotik).
- Do potravin pro kojence a malé děti se konzervační látky nepřidávají.
- Zákon definuje konzervanty jako látky, které prodlužují údržnost potravin a které je chrání proti zkáze způsobené činností mikroorganismů.

Mezi nejčastěji používané konzervanty patří:

- kyselina sorbová a její soli sorbany (E 200 –E 203)
- kyselina benzoová a benzoany (E 210 –E 213)
- parabeny (E 214 –E 219)
- siřičitany (E220 –E 219)
- dusitany a dusičnany (E 249 –E252)

## Solení a slazení potravin

sůl

- zvýšení osmotického tlaku → snížení  $a_w$
- inhibice růstu, plazmolýza, devitalizace
- snížení rozpustnosti kyslíku

sacharóza

- invertovaný cukr (67 % tvoří invert glukóza + fruktóza)
- enzymatický hydrolyzát škrobu (sirup)
- zvýšení osmotického tlaku → snížení  $a_w$

### **Ozařování potravin**

- vystavení potravin **ionizujícímu záření**, tzn. záření, jehož kvanta mají natolik vysokou energii, že jsou schopna vyřádit elektrony z atomového obalu a tím látku ionizovat
- mezi formy ionizujícího záření patří paprsky alfa, beta, gamma, rentgenové (paprsky X) nebo protonové záření
  - ionizuje vodu a vytváří vysoce aktivní volné radikály, které mají destruktivní účinek na DNA
- cílem ozařování je snížení počtu patogenních mikroorganismů a hmyzu, omezení kažení, omezení předčasného zrání a klíčení
- odolnost různých mikroorganismů je rozdílná, a také se liší podle druhu (složení) příslušné potravin
- použití: např. koření, ovoce, zelenina

### **Teorie překážek**

- inteligentní používání vnitřních a vnějších faktorů za účelem spolehlivé konzervace potravin
- kombinací různých faktorů vzniká řada překážek, které musí mikroorganismy překonat
- i když jednotlivé faktory nejsou dostatečné k zabránění růstu MO, jejich kombinací dochází k zesílení účinku
- čím nepříznivější překážka, tím vyšší úsilí musí mikroorganismy vyvinout

### **Nejběžnější překážky:**

- tepelné opracování,
- nízká teplota skladování,
- nízká aktivita vody,
- nízké pH,
- nízký redox potenciál,
- kompetitivní mikroflóra (bakterie mléčného kvašení)
- konzervační látky včetně NaCl a koření

### **Nové překážky:**

- využití vysokého tlaku, balení v modifikované atmosféře, využití bakteriocinů, aktivní obaly, atd.