

APLIKOVANÁ MIKROBIOLOGIE

Mikrobiologie potravin a nápojů

- 6000 př.n.l. výroba piva Sumery a Babyloňany
- 4000 př.n.l. využití kvasinek pro výrobu chleba Egyptany
- 19. stol.n.l. studium, charakterizace a manipulace mikroorganismů

Kažení potravin

- Zkažení
 - Nechtěné množení mikroorganismů, které způsobí, že potraviny jsou nepoživatelné (nechutné či nebezpečné)
- Ovoce, zelenina, mléčné výrobky a maso obsahují na povrchu množství mikroorganismů
- Mikroorganismy, které způsobí zkažení potravin, obvykle nejsou pro člověka patogenní

Mikroorganismy způsobující kažení potravin

- Gramnegativní bakterie
 - *Pseudomonas* – růst na různých sloučeninách, některé psychrofilní
 - *Acetobacter* – ocet
- Grampozitivní bakterie
 - *Streptococcus*, *Lactobacillus* – kys. mléčná
 - *Staphylococcus aureus* - enterotoxin - otrava jídlem
 - *Bacillus*, *Clostridium* - tepelně odolné spóry
 - *Clostridium botulinum* - vytváří toxin v potravinách připravovaných a skladovaných za anaerobních podmínek
- Houby
 - *Rhizopus* – chlebová plíseň
 - *Aspergillus* – karcinogenní aflatoxiny

Podmínky pro růst mikroorganismů

- Dostupnost vody
 - Nasolené nebo sušené potraviny obsahují málo vody, bakteriální buňka nemá dostatek vlhkosti pro svůj růst
 - Aktivita vody
 - Čistá voda = 1
 - Voda volně uspořádaná
 - Snížena v přítomnosti rozpuštěných látek (cukry, soli)
 - Voda uspořádaná okolo molekul rozpuštěné látky
 - Špatně dostupná pro bakterie
- pH
 - Kyselé pH obvykle inhibuje růst mikroorganismů
 - Některé plísňe jsou schopny kazit kyselé potraviny
 - *C. botulinum* netvoří za kyselých podmínek toxin
- Dostupnost nutričních látek (např. vitamínů)
- Teplota, množství kyslíku, osmotický tlak

Přirozené antimikrobiální látky

- Některé potraviny obsahují antimikrobiální látky
- Příklady:
 - Lysozym ve vejcích rozkládá bakteriální buněčnou stěnu
 - Benzoová kyselina v brusinkách inhibuje růst plísní
 - Cibule, česnek, ředkvičky, křen obsahují látky inhibující růst bakterií, kvasinek a plísní

Konzervace potravin

- Sušení
- Nasolení
- Působení vysoké teploty
- Působení nízké teploty
- Ozáření
- Přidání chemikálií

Působení vysoké teploty

- Prvořadým zájmem je zničení endospór *C. botulinum*
- Sterilizace
 - Čím je vyšší teplota, tím je kratší čas potřebný k usmrcení mikroorganismů
 - Čím je vyšší koncentrace bakterií, tím delší čas je potřebný k usmrcení
 - Růstová fáze vegetativní buňky nebo spóry ovlivňuje jejich tepelnou odolnost
 - Prostředí ovlivňuje tepelnou odolnost
 - Vlhkost, kyselé pH, vysoká koncentrace soli – organismy jsou více citlivé k teplotě
 - Potraviny obsahující proteiny a tuky jsou více rezistentní k teplotě

Pasterizace

- Působení tepla, které zničí nesporeující patogenní organismy, aniž by se výrazně změnila kvalita potravin
- Omezení celkového množství mikroorganismů
- Při pasterizaci nedochází ke sterilizaci
- Tři typy pasterizace
 - Vysoká teplota, krátký čas
 - Nízká teplota, dlouhý čas
 - Ultravysoká teplota (UHT)
- Teplota a doba pasterizace musí být přizpůsobeny individuální potravine

Působení nízké teploty

- Uchování potravin v lednici zpomaluje jejich kažení, protože enzymatické reakce jsou pomalé nebo neprobíhají
- Některé mikroorganismy jsou psychofilní a rostou při nízkých teplotách
- Mražení
 - Při -20°C je voda zmrzlá a není dostupná pro růst mikroorganismů
 - Ledové krystalky mohou poškodit buněčnou stěnu a až 50% mikroorganismů je zabito při zmrazovacím procesu

Desikace (sušení)

- Snižuje se obsah vody a mikroorganismy nemohou růst
- Doplněno přídatkem soli nebo cukru, které vytěsňují vodu
- Uzení snižuje obsah vody a na povrchu se usazují látky inhibující růst mikroorganismů (aldehydy, fenolické sloučeniny)
- Lyofilizace (vymrazování) je používáno pro uchování kávy, mléka, masa a zeleniny
 - Zmražená potravina je vysušena za podmínek vakua
- Sušení zabraňuje růstu mikroorganismů, ale neusmrcuje je

Přídavek chemikálií

- Řada různých látek
- Přírodní zdroje
 - Benzoát sodný (brusinky) (E211)
 - Kyselina sorbová (jeřábiny) (E200)
 - Propionát (*Propionibacterium*) (E280)
- Dusitany inhibují germinaci spor a produkci toxinu
 - Přeměňují se na karcinogenní nitrosaminy ve střevech a při smažení

Ozařování

- Gama záření
 - Může být použito až po zabalení
 - Nemění chuť
- UV záření
 - Pouze povrch potravin
- Mikrovlnné záření
 - Obecně není užitečné pro uchování potravin
 - Působí nepřímo vyvíjením tepla v potravine

Nemoci získané z potravy

- Alergické reakce
- Infekce
 - Potravina obsahuje MO, které kolonizují člověka
 - *Escherichia coli* O157:H7 a další kmeny
 - *Listeria*
 - *Salmonella*
 - *Campylobacter*
 - Prvoci
 - Viry, priony
- Intoxikace
 - Mikroorganismus rostoucí v potravě vytváří toxin nebo přeměňuje potravu na toxický produkt
 - *Clostridium botulinum* - exotoxin
 - *Claviceps purpurea* - otrava námelovými alkaloidy
 - *Aspergillus* - karcinogenní aflatoxiny (arašidy, olivy, kokosové ořechy, semeno slunečnice)
 - *Staphylococcus aureus* – tvorba enterotoxinu

Mikroorganismy při výrobě potravin a nápojů

Mléčné produkty

- Bakterie mléčného kvašení (*Lactobacillus*, *Streptococcus*)
- Přeměňují laktosu na kyselinu mléčnou
- Struktura a chuť závisí na kmenu použité bakterie
- Jogurt
 - *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus*, 40 °C
 - Kyselina mléčná a acetaldehyd
 - Okyselením mléka se srážejí proteiny a mění se struktura mléka
- Sýr
 - Vytvoří se kys. mléčná působením bakterií, mléčné proteiny se vysrážejí pomocí enzymu reninu
 - Tvaroh se oddělí od syrovátky
 - Sýr se nechává dozrát



Zrání sýra

- Chuť sýra závisí na druhu použitého mléka a způsobu zrání
- Měkké sýry (50 – 80% vody)
 - Camembert, Brie
 - *Penicillium camemberti (candidum)* na povrchu sýra
- Poloměkké (45% vody)
 - Krátce se zahřívají
 - Roquefort – *Penicillium roqueforti*
 - Ostatní sýry s modrou plísní – rod *Penicillium*
- Tvrdé (méně než 40% vody)
 - Snížení obsahu vody povařením
 - Ementál – *Propionibacterium* – kyselina propionová (chuť), CO₂ (díry)



Masné výrobky

- Klobásy a trvanlivé salámy
- Maso, sůl, koření
- Bakterie mléčného kvašení
- Fermentace
 - Snižuje se pH
- Poté uzení a sušení
- Obsah vody 30-50%
 - Suché a polosuché výrobky
 - Různá možnost skladování
- U některých plíseň na povrchu
 - *Penicillium nalgiovense*



Nakládání zelenina

- Vznikla jako způsob uchování zeleniny
- Zelenina se namočí do slané láky, čímž se dehydratuje
- Lák inhibuje růst nežádoucích mikroorganismů
- Bakterie mléčného kvašení a některé kvasinky přeměňují cukr na kys. mléčnou a octovou, alkohol, CO₂ a další sloučeniny
- Výroba kysaného zelí (2% soli), okurek, oliv (18% soli)
- Leuconostoc sp.*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*



Sojová omáčka

- Fermentace sojových bobů
- Sojové boby, sůl, pšenice, *Aspergillus oryzae* („koji“)
- Nechá se stát několik dnů, vytvoří se směs cukrů, peptidů a aminokyselin (amylasy, proteasy)
- Směs se přemísť do 18% roztoku soli společně s bakterií *Pediococcus soyae* a kvasinkami *Saccharomyces rouxii* a *Torulopsis*
- Směs se fermentuje 8 – 12 měsíců
- Kapalina = sojová omáčka
- Pevný materiál = krmivo



Výroba chleba

- Saccharomyces cerevisiae*
 - Kvasinka
 - Fermentuje cukry v mouce na ethanol a CO₂
 - CO₂ způsobuje nakynutí a strukturu těsta
 - Ethanol se odpaří během pečení



Výroba alkoholických nápojů

- Pomocí kvasinek za anaerobních podmínek
- Kvasinky se vyskytují přirozeně na povrchu ovoce
- Fermentace cukrů za vzniku ethanolu a CO₂
- Inhibice růstu při koncentracích alkoholu 14-18%

Alkoholické nápoje vyráběné pomocí *Saccharomyces*

Nápoj	Výchozí materiál	Princip
Pivo	Klíčící zrna (slad)	Fermentace (škrobu, poté cukrů)
Víno	Ovocná šťáva	Fermentace (cukrů)
Saké	Rýže	Amylasy z <i>A. oryzae</i> přeměňují škrob na cukry, které jsou fermentovány
Alkoholizované víno (sherry, portské)	Ovocná šťáva	Fermentace a přidávek brandy pro zvýšení koncentrace alkoholu asi na 20%
Brandy	Ovocná šťáva	Fermentace následovaná destilací
Whisky	Drcené zrna	Fermentace následovaná destilací
Rum	Melasa	Fermentace následovaná destilací
Vodka	Brambory	Fermentace následovaná destilací

Víno

- Mošt
 - Směs šťávy, slupek a zrníček
- Bílé víno - pouze šťáva
- Červené víno - celý mošt
- Fermentace za přítomnosti disiřičitanu
 - Inhibice růstu nežádoucích mikroorganismů
- S. cerevisiae*
- Komerční kvasinkové kmeny
 - Více odolné k alkoholu
 - Divoké kvasinky usmrceny SO₂

Pivo

- *Saccharomyces carlsbergensis*
 - Ležáky
 - Fermentace při 6-12°C, 8-14 dní
 - Spodní kvašení
 - *Saccharomyces cerevisiae*
 - Ale (světlé anglické pivo), porter, stout, pšeničná piva
 - 14-23°C, 5-7 dní
 - Svrchní kvašení
- Chmel je přidáván nejen kvůli hořké chuti, ale i proto, že má antibakteriální účinky

Další příklady fermentovaných potravin



Výroba octa

- Vodný roztok kyseliny octové (4%)
- Oxidací ethanolu octovými bakteriemi (*Acetobacter*, *Gluconobacter*)
- Bakterie tolerují vysoké koncentrace kyseliny a rostou tedy na kyselých vínech či jablečném moštu
- Neúplná oxidace ethanolu na acetaldehyd (alkoholdehydrogenasa), acetaldehydu na kyselinu octovou (aldehyddehydrogenasa)
 - Aerobní respirace
 - Akumulace kyseliny octové
 - Nutné dobré provzdušňování

Výroba kyseliny citronové

- Doplněk potravin a nápojů
- Aditivum do detergentů
- Farmaceutické aplikace
- První aerobní fermentace v průmyslovém měřítku
- *Aspergillus niger*
 - Kyselina citronová slouží jako chelátor železa
 - Kultivační médium neobsahuje železo
 - Výchozím substrátem je škrob nebo cukry (cukerné sirupy nebo melasa)
 - Škroby rozloženy amylasami na cukry
 - Katabolizovány glykolytickými a vstupují do citrátového cyklu
 - Sekundární metabolit

Kvasinky jako potravina

- Potřeba velké množství biomasy
- Kultivace za aerobních podmínek
- Postupné přidávání zdroje cukru (melasa)
 - Vysoká koncentrace cukru aktivuje fermentaci
 - Méně energie → méně biomasy
- Kvasnice
 - Živé buňky
- Potravinový doplněk
 - Mrtvé buňky
 - Vitamíny B, proteiny
- Zdroj různých sloučenin

Další významné průmyslové produkty mikroorganismů

- Antibiotika
 - Penicilin, různá antibiotika produkovaná rodem *Streptomyces*, bacitracin ...
- Vitamíny a aminokyseliny
 - Vitamin B₁₂, riboflavin
 - Glutamát, aspartát, fenylalanin, lysin
- Enzymy
 - Proteasy, amylasy, lipasy
 - Termostabilní a alkalistabilní i aktivní při nízkých teplotách nebo kyselém pH

Průmyslový mikroorganismus

- Vytváří požadovaný produkt ve vysokém výtěžku a v relativně krátkém čase
- Rychlý růst v levném, snadno dostupném médiu
- Nepatogenní
- Geneticky stabilní a manipulovatelný
 - Využití klasických selekčních technik
 - Ne geneticky upravený
 - Produkční kmeny
- Kvasinky, vláknité houby a některá prokaryota (*Streptomyces*, *Bacillus*, bakterie mléčného kvašení a další)

Průmyslová fermentace

- Fermentor
 - Velkoobjemová nádoba, ve které probíhá průmyslová fermentace
- Fermentace
 - Jakýkoli velkoobjemový mikrobiální proces
 - Nemusí být fermentace v biochemickém smyslu
- Charakteristiky aerobního fermentoru
 - Chlazení a sterilizace (chladicí plášť, spirály)
 - Aerace (lopatkové kolo, provzdušňování proudem sterilního vzduchu)
 - Nutnost kontroly teploty, pH, množství kyslíku, živin a produktu
- Přechod z laboratorního měřítka na průmyslové
 - Přenos kyslíku, tepla, dynamika kapaliny

Učebnice Madigan a kol., 2008,
Obr. 25.4, str. 737



Mikrobiologie zpracování odpadu

Odpadní vody

- Odpadní vody obsahují
 - Výkaly
 - Zdroj potenciálně patogenních mikroorganismů
 - Ostatní organický materiál (zbytky potravin, čisticí přípravky)
 - Podporuje množení nežádoucích mikroorganismů
- Průmyslové odpadní vody
 - Někdy toxické pro život
 - DDT, polychlorované bifenylly, těžké kovy
 - Potravinové zbytky – netoxické, ale velký objem biodegradabilního organického materiálu

Zpracování odpadních vod

- Snížení obsahu organického a anorganického materiálu a odstranění toxických látek
- Primární úprava
 - Odstranění velkých objektů a částic (třídění a sedimentace)
- Sekundární úprava
 - Procesy přeměny organických živin
 - Nepoužitelné v přítomnosti toxických látek
- Terciární úprava
 - Nutná pro úpravu pitné vody
 - Odstranění anorganických živin
 - Fosfáty a dusíkaté látky
 - Desinfekce

Degradace odpadu mikroorganismy (sekundární úprava)

- Aerobní a anaerobní úprava odpadu vede k degradaci organických látek na CO_2 a anorganické sloučeniny obsahující dusík
- Anaerobní mikroorganismy organické sloučeniny fermentují a produkty fermentace jsou využity dále v aerobní respiraci
- Úprava snižuje **biochemickou spotřebu kyslíku**
 - Udává spotřebu kyslíku mikroorganismy ve vzorku (odpadní vody)
 - Je obrazem obsahu obsažených organických a anorganických látek

Učebnice Madigan a kol., Obr. 36.4, str. 1029

Anaerobní úprava

- Čištění vody s vysokým obsahem organických látek
- Bioreaktory
- Mnoho různých mikroorganismů
- Hydrolýza, fermentace, metanogeneze (archea)
 - Obr. 36.6, str. 1030, Madigan a kol., 2008

Učebnice Madigan a kol., Obr. 36.6, str. 1030

Anaerobní úprava vody

Aerobní úprava

- Úprava vody obsahující malé množství organického materiálu
- **Biologické filtry**
 - Adsorpce organického materiálu na povrchu kamenné drtě
 - Mikrobiální biofilm
- **Metoda aktivovaného kalu**
 - Aerace ve velké provzdušňované nádrži
 - Dochází zde ke flokulaci (vločkování) mikroorganismů
 - Usazování vloček v usazovací jímnici
 - Část vyvločkováného materiálu (aktivovaný kal) se vrací zpět do provzdušňovací nádrže
 - Může následovat anaerobní úprava

Učebnice Madigan a kol., Obr. 36.7c, str. 1031

Aerobní úprava vody

Patogenní mikroorganismy

- Patogenní bakterie jsou obvykle eliminovány během sekundární úpravy
 - Malé množství z celkového počtu bakterií
 - Ve splašcích jsou velmi zředěné vodou
 - Při sekundární úpravě jsou přerosteny ostatními bakteriemi
- Viry mohou přežít
- Desinfekce chlorací nebo UV zářením při terciární úpravě

Patogenní mikroorganismy ve vodě

- *Escherichia coli* O157:H7
- *Salmonella typhi*
 - Tyfus
- *Vibrio cholerae*
 - Cholera
- *Campylobacter jejuni*
 - Úplavice
- *Legionella pneumophila*
 - Patogen respiračního traktu
 - V teplé vodě
- Prvoci
- Viry

Mikrobiální rozbor vody

- Indikátorové skupiny mikroorganismů
 - Indikátory obecného znečištění
 - Psychofilní bakterie
 - Mezofilní bakterie
 - Indikátory fekálního znečištění
 - Koliformní bakterie
 - Enterokoky
 - Jejich přítomnost signalizuje možnou kontaminaci patogeny
- Využití membránové filtrace, selektivně diagnostických médií

Využití reziduí upraveného odpadu

- Vyčištěné odpadní vody stále obsahují živiny, toxické sloučeniny, mění pH a teplotu přijímajícího vodního zdroje
 - Zhoršuje se kvalita přijímajícího vodního zdroje
- Využití kalů je problém
 - Spalováním se uvolňují znečišťující plyny
 - Využití jako hnojivo, ale kal nesmí obsahovat toxické látky

Mikrobiologie úpravy pevného odpadu

- Řízené skládky
 - Omezené množství použitelných míst
 - Anaerobní degradace trvá nejméně 50 let
 - Vytváří se methan, který musí být odstraněn
 - Těžké kovy a pesticidy mohou pronikat ven a znečišťovat spodní vodu
 - Recyklace
- Kompostování
 - Zahradní a kuchyňský organický odpad se smíchá s hlínou
 - Během několika dní se zvýší teplota na 37-65°C
 - Patogeny jsou zabity, termofilní bakterie nejsou ovlivněny
 - Kompost se provzdušní manuálním převrácením
 - Mnohá města třídí a kompostují kuchyňský a zahradní odpad