

Mikrobiologická analýza ovocných šťáv v závislosti na technologickém ošetření

Mgr. Gabriel Slanicay

Bakalářská práce
2023



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická
Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Mgr. Gabriel Slanicay**
Osobní číslo: **T20531**
Studijní program: **B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin**
Specializace: **Technologie potravin**
Forma studia: **Kombinovaná**
Téma práce: **Mikrobiologická analýza ovocných šťáv v závislosti na technologickém ošetření**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

Technologie výroby ovocných šťáv.

Výskyt mikroorganismů v ovocných šťávách.

Možnosti detekce mikroorganismů v ovocných šťávách.

II. Praktická část

Mikrobiologická analýza vybraných ovocných šťáv.

Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] LEE, S., HAN, A., YOON, J.-H., LEE, S.-Y. Growth evaluation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in fresh fruit and vegetable juices via predictive modelling. *LWT – Food Science and Technology*, 162: 113485. 2022
- [2] JIN, T. Z., ABOELHAGGAG, R. M., GUO, M. Apple Juice Preservation Using Combined Nonthermal Processing and Antimicrobial Packaging. *Journal of Food Protection*, 84: 1528-1538. 2021
- [3] SOURRI, P., TASSOU, C. C., NYCHAS, G.-J. E., PANAGOUD, E. Z. Fruit Juice Spoilage by *Alicyclobacillus*: Detection and Control Methods – A Comprehensive Review. *Foods*, 11: 747. 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11050747>
- [4] OSOPALE, B. A., ADEWUMI, G. A. et al. A review of innovative techniques for rapid detection and enrichment of *Alicyclobacillus* during industrial processing of fruit juices and concentrates. *Food Control*, 99: 146-157. 2019
- ICMSF International Commission on Microbiological Specification for Foods. *Microorganisms in foods* 6. 2nd ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 2005
- Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně

Vedoucí bakalářské práce: **prof. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **19. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Robert Gál, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2023

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce pojednává o výskytu mikroorganismů v ovocných šťávách a o technologických operacích jak sterilačních tak vedoucích ke koncentraci a zahušťování ovocných šťáv. V teoretické části je uveden přehled a zhodnocení nejvýznamnějších termálních i netermálních metod. Jedna kapitola je věnována také výskytu a přehledu jednotlivých rodů a druhů mikroorganismů v ovocných šťávách. Praktická část bakalářské práce je zaměřena na mikrobiologickou analýzu višňové a jablečné šťávy v průběhu procesu jejich výroby od lisování ovoce, pasterace šťávy, filtrování až po výrobu koncentráту. V praktické části práce byla také provedena izolace DNA ve šťávách přítomných mikroorganismů a po následné amplifikaci polymerázovou řetězovou reakcí, byly vzorky DNA odeslány na sekvenaci NGS. Ve višňové šťávě dominovaly bakteriální rody *Tatumella*, skupina rodů *Escherichia-Shigella* a *Pseudomonas*, z eukaryotických mikroorganismů potom kvasinky *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* a *Saccharomyces*. V jablečné šťávě dominovaly bakteriální rody *Bacillus*, *Gluconobacter*, *Pantoea*, *Tatumella* a *Yersinia*, a rody kvasinek *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* a *Saccharomyces*.

Klíčová slova: višňová šťáva, jablečná šťáva, ovocný koncentrát, pasterace, mikrobiologická analýza, sekvenace DNA

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the occurrence of microorganisms in fruit juices and the technological operations both sterilizing and leading to concentration of fruit juices. In the theoretical part, an overview and evaluation of the most important thermal and non-thermal methods is given. A chapter is also devoted to the occurrence and overview of the different genera and species of microorganisms in fruit juices. The practical part of the bachelor thesis is focused on the microbiological analysis of cherry and apple juice during the process of their production from fruit pressing, juice pasteurization, filtering to concentrate production. In the practical part of the thesis, DNA isolation of microorganisms present in the juices was also performed and after subsequent amplification by polymerase chain reaction, DNA samples were sent for NGS sequencing. The cherry juice was dominated by the bacterial genera *Tatumella*, the genera *Escherichia-Shigella* and *Pseudomonas*, and the yeast genera *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* and *Saccharomyces*. The apple juice was dominated by the bacterial genera *Bacillus*, *Gluconobacter*, *Pantoea*, *Tatumella* and *Yersinia*, and the yeast genera *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* and *Saccharomyces*.

Keywords: cherry juice, apple juice, fruit concentrate, pasteurization, microbiological analysis, DNA sequencing

Děkuji vedoucí své bakalářské práce prof. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za cenné rady při psaní této práce a za čas, který mi věnovala. Dále děkuji laborantkám ing. Veronice Kučabové a ing. Olze Vlčkové za pomoc při práci v laboratoři.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 OVOCNÉ ŠŤÁVY	12
1.1 VÝROBA OVOCNÝCH ŠŤÁV	12
1.2 STABILIZACE A KONZERVACE OVOCNÉ ŠŤÁVY	13
1.2.1 Tepelná pasterizace	13
1.2.2 Paskalizace (HPP - High Pressure Processing).....	13
1.2.3 Pulzní elektrické pole (PEF - Pulsed Electric Field).....	14
1.2.4 Ozařování pulzním světlem.....	14
1.2.5 Vysokotlaká homogenizace (HPH – High Pressure Homogenization).....	14
1.2.6 UV záření	15
1.3 UCHOVÁVÁNÍ A KONCENTRACE OVOCNÝCH ŠŤÁV.....	15
1.4 TECHNOLOGIE ZPRACOVÁNÍ OVOCE VE FIRMĚ LINEA NIVNICE A.S.....	16
1.4.1 Višňová šťáva.....	16
1.4.2 Jablečná šťáva	20
1.4.3 Technologická zařízení při zpracování ovocných šťáv.....	22
1.4.4 Filtrační zařízení.....	27
2 MIKROORGANISMY V OVOCNÝCH ŠŤÁVÁCH	28
2.1 ROD <i>ALICYCLOBACILLUS</i>	29
2.2 RŮST MIKROORGANISMŮ V OVOCNÝCH ŠŤÁVÁCH	29
II PRAKTICKÁ ČÁST	31
3 CÍLE PRÁCE	32
4 MATERIÁL A METODIKA	33
4.1 ANALYZOVANÉ VZORKY ŠŤÁV	33
4.1.1 Višňová šťáva.....	33
4.1.2 Jablečná šťáva	33
4.2 POMŮCKY, ZAŘÍZENÍ, CHEMIKÁLIE.....	34
4.2.1 Pomůcky a zařízení	34
4.2.2 Chemikálie	34
4.3 KULTIVAČNÍ STANOVENÍ MIKROORGANISMŮ	34
4.4 IZOLACE DNA.....	35
4.4.1 DNeasy PowerSoil Kit	35
4.4.2 DNeasy mericon Food Kit	36
4.5 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	36
4.6 SEKVENACE DNA	37
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	39
5.1 KONVENČNÍ MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA	39

5.1.1	Višňové šťávy	39
5.1.3	Srovnání nárůstu mikroorganismů u višňových a jablečných šťáv.....	41
5.2	VYUŽITÍ MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÝCH METOD K DETEKCI MIKROORGANISMŮ V OVOCNÝCH ŠŤÁVÁCH	42
5.2.1	Izolace DNA.....	42
5.2.2	Výsledky sekvenace DNA višňové šťávy - bakterie.....	44
5.2.3	Výsledky sekvenace DNA višňové šťávy - houby.....	49
5.2.4	Výsledky sekvenace DNA jablečné šťávy - bakterie.....	51
5.2.5	Výsledky sekvenace DNA jablečné šťávy - houby.....	58
5.3	DISKUSE	59
6	ZÁVĚR.....	61
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	62
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	65
	SEZNAM OBRÁZKŮ	66
	SEZNAM TABULEK.....	67

ÚVOD

Ovocné šťávy jsou oblíbeným nápojem, který tepelně neupravený obsahuje řadu vitaminů a zdraví prospěšných látek. Na druhou stranu bez tepelného ošetření mohou být ovocné šťávy zdrojem nežádoucích mikroorganismů, mnohdy i patogenních. Tepelné ošetření má také negativní vliv na organoleptické vlastnosti ovocných šťáv. Existují i netermální způsoby ošetření ovocných šťáv, ale tyto technologie se používají velmi málo, navíc jsou málo účinné při inaktivaci enzymů, což má negativní vliv na organoleptické vlastnosti ovocných šťáv.

V teoretické části této práce jsem nastínil přehled technologických možností při ošetření ovocných šťáv a při výrobě ovocných koncentrátů. Nastínil jsem také přehled mikroorganismů, které se v ovocných šťávách mohou vyskytovat. Jednu kapitolu jsem věnoval rodu *Alicyclobacillus* zajímavému mikroorganismu, který způsobuje kažení ovocných šťáv.

V praktické části jsem provedl mikrobiologickou analýzu višňové a jablečné šťávy vyrobené ve firmě LINEA Nivnice a.s. Závěry mikrobiologické analýzy jsem konfrontoval s výsledky sekvenace DNA ve šťávách přítomných mikroorganismů. Přítomné mikroorganismy se povedlo určit až na úroveň jednotlivých rodů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 OVOCNÉ ŠŤÁVY

Ovocná šťáva je definována jako zkvasitelný, ale nezkvašený produkt získaný z jedlých částí ovoce, které je zdravé a zralé, čerstvé nebo chlazené či zmrazené, z jednoho nebo z více smíšených druhů, s charakteristickou barvou, vůní a chutí, které jsou typické pro šťávu pocházející z příslušného ovoce. [1]

Aroma, dužnina a buňky získané vhodnými fyzikálními prostředky ze stejného druhu ovoce mohou být do šťávy vráceny. [1]

Ovocné šťávy lze podle složení rozdělit na ovocnou šťávu, ovocnou šťávu z koncentrátu, koncentrovanou ovocnou šťávu, ovocnou šťávu extrahovanou vodou, dehydrovanou ovocnou šťávu a ovocný nektar. Podle složení disperzního systému se dělí na čiré, opalizující, zakalené a šťávy obohacené dužinou. Podle způsobu konzervace se dělí na čerstvě vylisované, chlazené, zmrazené, pasterizované a zahuštěné. [2]

1.1 Výroba ovocných šťáv

Výroba ovocných šťáv je proces, který začíná sběrem ovoce, buď přímo ze stromu, nebo sběrem padaného ovoce ze země. Následně je ovoce přepravováno ke zpracování do lisovny. Před tím může být nějakou dobu skladováno, aby se přeprava efektivně vytížila. Na podzim se ovoce, především jablka, skladuje při venkovní teplotě v kontejnerech přímo ve výkupnách do té doby, než dojde k naplnění kontejneru. Pevná slupka chrání plod a venkovní teploty jsou pro skladování celkem příznivé, takže ke kvalitativní degradaci ovoce téměř nedochází nebo jen mírně. V letních měsících je dobré zejména ovoce, které se rychleji kazí, jako jsou višně, jahody atd., skladovat v chladících místnostech. [2]

V lisovně je ovoce čištěno praním v kartáčových, bubnových nebo jiných pračkách. Ovoce někdy bývá přepravováno ze skládky k lisu plavením, čímž dochází zároveň k praní ovoce. Před vstupem do lisu se vytrídí poškozené nebo nahnílé kusy, většinou manuálně na pásovém dopravníku a následně dochází k nadrcení ovoce v drtiči. Podle sdělení generálního ředitele LINEA NIVNICE a.s. bývá dobré před vlastním lisováním eliminovat enzymaticky pektin z důvodu snížení viskozity. Nižší viskozita má pozitivní vliv na výlisnost a umožňuje také rychlejší a efektivnější vyčeřování vylisované šťávy. Ve firmě LINEA NIVNICE a.s. se nejčastěji používá enzym nebo směs enzymů značky ROHAPECT.

1.2 Stabilizace a konzervace ovocné šťávy

Vylisovanou ovocnou šťávu je potřeba ošetřit jednak z důvodu možného mikrobiálního kažení, ale také z důvodu enzymatického kažení. Pro inaktivaci mikroorganismů a inaktivaci enzymů se používají stejné metody.

1.2.1 Tepelná pasterizace

Nejčastější a nejpoužívanější způsob stabilizace a konzervace ovocné šťávy je tepelným zahřevem. Praxe je většinou taková, že se ovocné šťávy, které se ošetřují v obalu, nejdříve zahřívají na teplotu 60 °C až 75 °C po dobu 30 minut, potom jsou při této teplotě plněny, a pasterizovány při teplotě 84 °C až 88 °C po dobu 15–45 minut podle velikosti balení. Poté jsou produkty ochlazeny na pokojovou teplotu. Pro ovocné šťávy pasterizované mimo obal se používá šetrnější vysokoteplotní krátkodobá pasterizace, která probíhá při teplotách vyšších než 90 °C po kratší dobu, např. jablečný džus se obvykle pasterizuje při 95 °C až 98 °C po dobu 15–30 sekund. [3]

Mosqueda-Melgar et al. [4] uvádějí, že při teplotě 90 °C až 95 °C po dobu 4 až 10 sekund dojde ke snížení obsahu patogenů v ovocné šťávě až o 5 log.

Ve firmě LINEA NIVNICE a.s. se ovocné džusy a nápoje před plněním do obalu Tetrapac pasterizují při teplotě 98 °C po dobu 8 sekund.

Tato pasterizační teplota je dostatečná k eliminaci téměř všech mikroorganismů. Problém může být s termorezistentními bakteriemi, plísněmi a spory bakterií. Vysoká teplota zahřevu ovocné šťávy má negativní vliv na organoleptickou a nutriční kvalitu.

V poslední době je ve veliké oblibě minimálně zpracovaná ovocná šťáva, která vypadá a chutná čerstvě, a zároveň obsahuje množství živin a zdravých prospěšných látek. Chuť, textura, vzhled a nutriční obsah jsou důležité ukazatele kvality potravin obecně a jsou závislé na způsobu jejich zpracování. [5]

Existuje řada netermálních způsobů stabilizace ovocné šťávy. V praxi jsou ale používány ojediněle. Navíc tyto netermální technologie neinaktivují dostatečně enzymy.

1.2.2 Paskalizace (HPP - High Pressure Processing)

Technologie paskalizace je ošetření potravin pomocí velmi vysokého tlaku cca 6000 barů po dobu 2-15 minut v závislosti na druhu potravin. Tento tlak by byl na mořském dně v hloubce 60 kilometrů (nejhlubší místo Mariánský příkop má hloubku 11 km). Potravina je

zabalena do pružného obalu a umístěna do tlakové komory vysokotlakého lisu. Vše je ponořeno do tlakovací kapaliny, většinou pitné vody. [6]

Autoři v [7] uvádějí, že pro ovocné šťávy tlak 400 MPa po dobu několika minut je dostatečný k eliminaci mikroorganismů.

Paskalizaci u nás používají dvě firmy [6]. KOFOLA a.s. takto ošetřuje čerstvě vylisovanou ovocno-zeleninovou šťávu UGO. Beskyd Fryčovice a.s. ošetřuje pomocí této technologie čerstvé šťávy REFIT.

1.2.3 Pulzní elektrické pole (PEF - Pulsed Electric Field)

Technologie pulzního elektrického pole spočívá v aplikaci vysokonapěťových pulzů v délce mikrosekund až milisekund, které jsou generovány pulzním generátorem. V důsledku toho dochází k elektroporaci buněčných membrán mikroorganismů a tvorbě pórů v těchto membránách, což má za následek zvýšení permeability membrán, v případě ireversibilní permeability s následnou buněčnou smrtí – apoptózou. [5], [8]

Vhodnou kombinací velikosti napětí a délky pulzů lze snížit počet mikroorganismů v jablečné šťávě až o 6 log. [9]

1.2.4 Ozařování pulzním světlem

U této technologie dochází k inaktivaci mikroorganismů působením krátkých intenzivních pulzů širokého spektra světla v oblasti od UV záření až po infračervené záření, tj. v rozmezí vlnových délek 200 až 1100 nm. Na inaktivaci mikroorganismů mají vliv fotochemické, fototermické a fotofyzikální účinky. [10]

1.2.5 Vysokotlaká homogenizace (HPH – High Pressure Homogenization)

Technologie vysokotlaké homogenizace funguje na principu čerpání kapaliny přes homogenizační ventil při vysokém tlaku 100 MPa. Vzniká vysoká turbulence a smyk spolu se stlačením, vzrůstem a poklesem tlaku, což vede k rozpadu částic a rozptýlení v celém objemu. [11]

Dříve byla vysokotlaká homogenizace zamýšlena pouze pro ošetření mléka a mléčných výrobků. V poslední době bývá navrhována také pro ošetření ovocných šťáv. [12]

Vysokotlaká homogenizace poškozují strukturální integritu mikroorganismů. Inaktivaci mikroorganismů pomáhá také náhlé zvýšení teploty, které při tomto procesu vzniká. [7]

1.2.6 UV záření

UV záření se v potravinářství používá hlavně k dezinfekci vody a případně obalů. Pomocí UV záření lze ošetřovat i ovocné šťávy. Autoři ve [13] dokonce uvádějí, že UV záření o vlnové délce 254 nm se široce používá v průmyslu výroby džusů a nápojů. Existuje řada studií, které se problematikou inaktivace mikroorganismů v jednotlivých ovocných šťávách pomocí UV záření zabývají, např. [14], [15]. V České republice se tato technologie při ošetřování ovocných šťáv nepoužívá.

1.3 Uchovávání a koncentrace ovocných šťáv

Z důvodů dalšího uchování, prodloužení údržnosti, zmenšení objemu pro snadnější skladování nebo přepravu, se ovocné šťávy koncentrují. Nejpoužívanější způsob výroby koncentráту je vakuové odpařování na odparce. Podrobněji se technologii a výrobnímu postupu výroby koncentráту vakuovým odpařováním věnuji v následující kapitole, kde popisuji výrobu ovocných šťáv a koncentráту z nich ve firmě LINEA NIVNICE a.s. Proces výroby koncentráту z čerstvě vylisované šťávy zahrnuje i další operace předcházející samotnému vakuovému odpařování, a to především vyčeřování ovocné šťávy sedimentací s následnou filtrací většinou přes křemelinový filtr. Podle sdělení generálního ředitele LINEA NIVNICE a.s. je vyčeřování časově náročný proces, a je potřeba nejdříve čerstvě vylisovanou šťávu tepelně ošetřit z důvodu inaktivace mikroorganismů a enzymů.

Tepelné odpařování způsobuje ztrátu živin, degradaci barvy a má nežádoucí účinky na organoleptické vlastnosti ovocných šťáv. Organoleptické vlastnosti ovocných šťáv jsou hodně závislé na obsahu a složení těkavých látek, které se při zahřívání z ovocné šťávy odpařují. Jsou sice většinou jímány a pak do koncentráту zpět vráceny, nicméně i tak nelze dosáhnout původní organoleptické kvalitativní úrovně. [16], [17]

Existují i netermální metody výroby koncentráту z čerstvé ovocné šťávy. Jedná se především o tlakem řízené membránové procesy jako mikrofiltrace, ultrafiltrace, nanofiltrace a reverzní osmóza. Dále pak existují netermální metody řízené osmoticky, jako je např. přímá osmóza neboli dopředná osmóza (forward osmosis; dále jen FO). Tyto technologie představují spolehlivou alternativu k tepelnému zpracování ovocných šťáv na koncentrát s příslibem zachování výživově a organolepticky hodnotných látek. [18], [19], [20]

Mikrofiltrace a ultrafiltrace se nejčastěji používají k čiření a stabilizaci ovocných šťáv. Mikrofiltrace dokáže oddělit částice, mikroorganismy a makromolekuly v rozmezí velikosti

0,1–10 μm . Ultrafiltrace dokáže odstranit makromolekuly, jako jsou např. polysacharidy nebo bílkoviny v rozmezí molekulové hmotnosti od 1 do 1000 kDa. Nanofiltraci a reverzní osmózu lze využít při koncentraci ovocné šťávy, ale mnohem účinnější koncentrační metoda je FO. Dosahuje vyššího stupně koncentrace než tlakově řízené membránové procesy nanofiltrace a reverzní osmózy, v závislosti na druhu ovocné šťávy 60° - 65° Brix. [18]

FO využívá vysoce hypertonický nasávací roztok anorganických solí, cukrů a potravinářských přísad, který nasává vodu z roztoku přes polopropustnou membránu. FO má také malou energetickou náročnost. Obecně je spotřeba energie asi desetinová oproti tepelnému zahušťování. [21]

1.4 Technologie zpracování ovoce ve firmě LINEA NIVNICE a.s.

1.4.1 Višňová šťáva

Proces výroby višňové šťávy ve firmě LINEA NIVNICE a.s. začíná navázkou ovoce do drtiče. Vzhled a jakost višně ilustruje obr. 1. Skladování višně těsně před drcením můžeme vidět na obr. 2. Drcení višně v drtiči je zobrazeno na obr. 3-5. Na obr. 6 je pro zajímavost zachycen kamion, kterým se višně přepravují od pěstitele z Jižních Čech. Nadrcené višně putují potrubím do tanku na odležení za přítomnosti pektinázy po dobu cca půl hodiny. Pak se odležená drť čerpá do lisu. Vylisovaná kalná šťáva jde na jímač aromatických látek (součást koncentrační stanice). Vylisovaná šťáva je zde ošetřena bleskovým záhřevem na teplotu 100 °C s následným ochlazením na 50 °C. Důvod této pasterace je, aby šťáva snesla následující technologický krok, který trvá cca 8-10 hodin. Bez tepelného ošetření by šťáva obsahující 3,5 milionů CFU v 1 ml podlehla rychle zkáze. Vedlejším produktem tohoto procesu je višňové aroma, získané v poměru 1:150., které je skladováno zvlášť. Pak šťáva putuje do čeřících tanků a je podrobena dalšímu enzymatickému ošetření a kombinovanému želatinovo-bentonitovému čeření. Gravitační pak během 8-12 hodin dochází k oddělení čirého a kalného podílu šťávy. Vyčeřená šťáva (cca 95 procent objemu) se podrobí ostré křemelinové filtraci na svíčkovém filtru. Kalný podíl 5 procent jde na vakuový rotační křemelinový filtr. Po spojení obou podílů se čistá šťáva zkoncentruje odpařením vody na koncentrát. Vyrobený koncentrát se zchladí na teplotu cca 20 °C a přečerpá do skladovacích tanků při teplotách nižších než 10 °C. Na odparce dochází k zhuštění šťávy na koncentrát z výchozí hodnoty 16-17 Brix na 66-67 Brix. Při tomto procesu vznikají 3 druhy odpadů – výlisky, brýdová voda, kal po čeření v pevné formě.



Obrázek 1: Vzhled višní před lisováním



Obrázek 2: Skladování višní před lisováním



Obrázek 3: Sypaní višní do drtiče



Obrázek 4: Detail drtiče



Obrázek 5: Detail drtiče



Obrázek 6: Transportní kamion po vyložení višňi na váze

1.4.2 Jablečná šťáva

Proces výroby jablečné šťávy je obdobný jako proces výroby višňové šťávy. Jablka se nejprve plaví kanálem k pásovému dopravníku. Skládka jablek s plavebním kanálem je vyobrazena na obr. 7- 9. Jablka se plavením nejen přesunují, ale zároveň i umývají. Pásový dopravník dopravuje jablka ke šnekovému potrubí, kterým se jablka sypou do drtiče lisu. Na začátku pásového dopravníku dochází ještě k selekci shnilých plodů a před vstupem jablek do šnekového potrubí probíhá ještě kartáčové čištění.

Další postup je stejný jako u višňové šťávy. U jablek dochází na odparce k zahuštění šťávy na koncentrát z výchozí hodnoty 10-11 Brix na 68-69 Brix.



Obrázek 7: Skládka jablek před lisovnou



Obrázek 8: Detail skládky před lisovnou

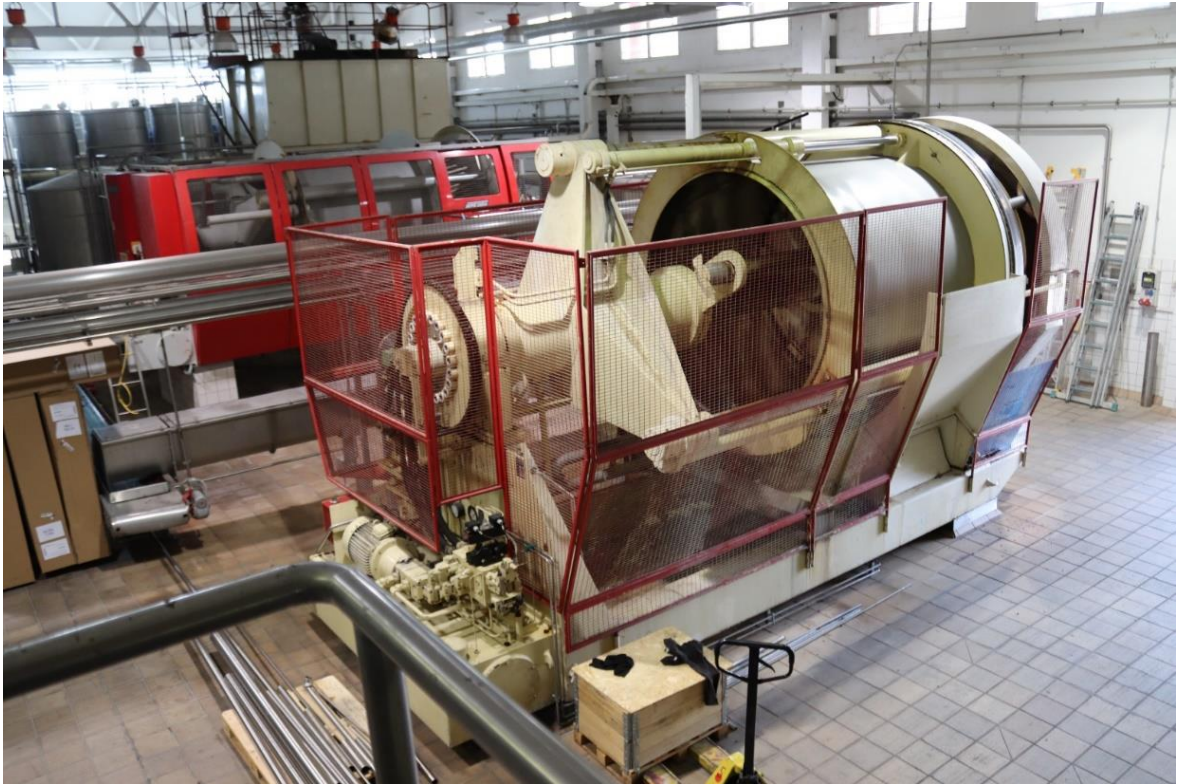


Obrázek 9: Vstup jablek do plavící komory

1.4.3 Technologická zařízení při zpracování ovocných šťáv

1.4.3.1 *Lis*

Ve firmě LINEA NIVNICE a.s. se při výrobě ovocných šťáv používá lis značky HP 5000 a HP5000i (obr. 10 a 11) oba od firmy Bucher Guyer, Niederweningen, Švýcarsko. Kapacita je 5-7 tun za hodinu a vylisnost 85-88 procent.



Obrázek 10: Lis Bucher HP5000



Obrázek 11: Lis Bucher HP5000i

1.4.3.2 *Koncentrační stanice - jímač aromatických látek a odparka*

Ve firmě LINEA NIVNICE a.s. se při výrobě koncentrátů z ovocných šťáv používá koncentrační stanice značky Unipektin, Eschenz, Švýcarsko (obr. 12-14). V nedávné době došlo ke spojení firem Bucher a Unipektin. Nátok šťávy 9-10 m³ za hodinu.



Obrázek 12: Jímač aromatických látek značky Unipektin



Obrázek 13: Odparka značky Unipektin



Obrázek 14: Odparka značky Unipektin

1.4.3 Baterie čerčících tanků

Ve firmě LINEA NIVNICE a.s. se při výrobě ovocných šťáv používá baterie čerčících tanků o kapacitě 14x 5500 litrů a 2x 10000 litrů (obr. 15).



Obrázek 15: Baterie čerčících tanků

1.4.4 Filtrační zařízení

Ve firmě LINEA NIVNICE a.s. se při výrobě ovocných šťáv používá svíчковý křemelinový filtr Destila, Brno (obr. 16).



Obrázek 16: Filtrační zařízení od firmy Destila

2 MIKROORGANISMY V OVOCNÝCH ŠŤÁVÁCH

V ovocných šťávách jsou vzhledem ke kyselému prostředí dominantními mikroorganismy kvasinky a plísně. Příkladem jsou druhy rodů *Aspergillus*, *Botrytis*, *Byssochlamys*, *Cladosporium*, *Candida*, *Dekkera* (*Brettanomyces*), *Fusarium*, *Hanseniaspora*, *Mucor*, *Neosartorya*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Talaromyces*, *Zygosaccharomyces* atd. V ovocných šťávách mohou být přítomny některé bakterie mléčného kvašení a bakterie octového kvašení. V ovocných šťávách mohou být přítomny také některé patogenní bakterie, jako *Cryptosporidium*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, enterokoky a některé sporulující bakterie, jako *Clostridium pasteurianum* a *Weizmannia coagulans* (dříve *Bacillus coagulans*). [22], [23]

Autoři v článku [24] uvádějí příklady mikroorganismů způsobujících kažení ovocných šťáv:

kvasinky: *Brettanomyces intermedius*, *Candida maltosa*, *Candida sake*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellata*, *Candida krusei*, *Dekkera bruxellensis*, *Dekkera naardenensis*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia membranifaciens*, *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces bailii*, *Saccharomyces bisporus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces bayanus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Torulopsis holmii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces microellipsoides*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces bailli*

plísně: *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tamari*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Byssochlamys fulva*, *Byssochlamys nivea*, *Neosartorya fischeri*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium expansum*, *Penicillium citrinum*, *Talaromyces* spp.

bakterie: *Acetobacter* spp., *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Alicyclobacillus hesperidium*, *Alicyclobacillus acidophilus*, *Alicyclobacillus cycloheptanicus*, *Alicyclobacillus fastidiosus*, *Alicyclobacillus pomorum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum*, *Gluconobacter* spp., *Gluconacetobacter* spp., *Escherichia coli*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Leuconostoc dextranicum*, *Weissella paramesenteroides* (dříve *Leuconostoc paramesenteroides*), *Propionibacterium cyclohexanicum*, *Salmonella* spp., *Serratia marcescens*, *Shigella* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptomyces* spp., *Weizmannia coagulans*

V ovocných šťávách může být přítomna řada dalších mikroorganismů. Mnoho rodů, které zde nejsou uvedeny, se nám podařilo detekovat v rámci praktické části této práce při mikrobiologické analýze višňové a jablečné šťávy.

V následující podkapitole je věnován trochu větší prostor zajímavému bakteriálnímu rodu *Alicyclobacillus*.

2.1 Rod *Alicyclobacillus*

Alicyclobacillus je spolurující rod, který kolonizuje ovocné šťávy. Jde o acidorezistentní a termorezistentní bakterii z čeledi *Alicyclobacillaceae*, což je čeleď sporulujících aerobních grampozitivních bakterií. Zahrnuje rody *Alicyclobacillus*, *Effusibacillus*, *Kyrpidia* a *Tumebacillus*.

Kažení ovocných šťáv působením mikroorganismů rodu *Alicyclobacillus* bylo poprvé zaznamenáno v Německu v roce 1982 v pasterovaných jablečných šťávách. Druhy rodu *Alicyclobacillus* mají široký rozsah růstu pH (1,5-6,5) a obsahu rozpustné sušiny 5,4-16,2 Brix. Přítomnost a růst alicyklobacilů je obtížné zjistit, jelikož netvoří zákal, ani neprodukuje žádný plyn. Na přítomnost *Alicyclobacillus* může upozornit fenolický odér a příchut', které jsou způsobeny metabolity 2-methoxyfenolem (guajakol) a halofenoly: 2,6-dibromofenolem (2,6-DBP) a 2,6-dichlorofenolem (2,6-DCP). Guajakol, který je hlavním původcem zápachu v produktech kontaminovaných alicyklobacilem, je těkává organická sloučenina vznikající neoxidativní dekarboxylací kyseliny vanilové a dalších přírodních složek ovocné šťávy. Hlavním problémem je tvorba termorezistentních endospor, které odolávají běžným pasteračním teplotám 90-95 °C po dobu 20 sekund. [25], [26]

Existuje řada detekčních postupů, které jsou založeny právě na zjišťování přítomnosti guajakolu a halofenolů. [25], [27], [28]

Jedná se např. o senzorické metody detekce pachutí nebo chromatografické metody detekce pachutí, zejména plynová chromatografie s následným stanovením a identifikací těkávých látek pomocí hmotnostní spektrometrie nebo olfaktometrie. Dalším způsobem detekce guajakolu je peroxidázová kolorimetrická zkouška založena na oxidaci guajakolu peroxidem vodíku v přítomnosti enzymu peroxidázy za vzniku červenohnědého tetraguajakolu, který lze detekovat vizuálně nebo spektrofotometricky při vlnové délce 420 nebo 470 nm. [25]

2.2 Růst mikroorganismů v ovocných šťávách

Růst mikroorganismů v ovocné šťávě závisí na mnoha faktorech, na pH ovocné šťávy, teplotě skladování, jak ovoce, tak ovocné šťávy, vlhkosti vzduchu při skladování ovoce, vodní aktivitě ovocné šťávy, obsahu cukru, případně kvalitě vody použité ve šťávě, kvalitě

lisovacích a jiných zařízení, která dojdou do kontaktu s ovocem nebo ovocnou šťávou, surovinách, kvalitě ovoce atd. Velkým zdrojem kontaminujících mikroorganismů nalezených v ovocných šťávách je především nesprávné mytí ovoce, hlavně kontaminovanou vodou. [3]

Modelování růstu mikroorganismů lze obecně rozdělit na dva přístupy, využívající metody a modely matematické analýzy, zejména obyčejných diferenciálních rovnic, a metody stochastické, založené na analýze časových řad, speciálně pomocí Gompertzova modelu. [29]

Modelování pomocí Gompertzova modelu je v článku [29] dobře zpracováno. Je zde modelován růst bakterií *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, a *Listeria monocytogenes* v čerstvých ovocných a zeleninových šťávách pomocí modifikovaného Gompertzova modelu:

$$Y=N_0+C.\exp(-\exp(2,718.\mu_e/C.(Lag-X)+1))$$

Y je logaritmus počtu buněk (log CFU/ml), X je doba inkubace, N_0 je počáteční počet buněk, C je rozdíl mezi počátečním a konečným počtem buněk, μ_e je hodnota rychlosti růstu a Lag odpovídá délce lag fáze před růstem.

V experimentální části pak naočkovali 10 ml ovocných a zeleninových šťáv z citronu, grapefruitu, červené řepy, mrkve, kapusty, celeru, zelí a červeného zelí 0,1 ml koktejlu bakteriálních kultur (konečná koncentrace 10^{6-7} CFU/ml). Vzorčky šťávy byly skladovány při teplotě 10 °C po dobu 144 h a počet bakterií byl stanoven po 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120 a 144 h. Na základě konfrontace experimentálně získaných dat s modifikovaným Gompertzovým modelem byl stanoven koeficient determinace R^2 v rozmezí 0,82 – 0,99. U citronové a grapefruitové šťávy nebylo možné prediktivním modelováním získat žádné parametry, protože u žádného patogenu nebyl pozorován růst. *L. monocytogenes* a *E. coli* O157:H7 nerostly v mrkvové šťávě a kapustové šťávě.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍLE PRÁCE

Cílem praktické části této práce byla mikrobiologická analýza ovocných šťáv (višňové a jablečné) vyrobených ve firmě LINEA NIVNICE a.s. v průběhu technologického zpracování výchozího ovoce na výslednou ovocnou šťávu a koncentrát ovocné šťávy. Přítomné mikroorganismy byly následně stanoveny pomocí molekulárně-biologických nástrojů izolace DNA, především sekvenace DNA.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Analyzované vzorky šťáv

4.1.1 Višňová šťáva

Byly odebrány 4 vzorky ze tří šarží. První vzorek byl vždy čerstvá vylisovaná šťáva přímo z lisu. Druhý vzorek byl vždy po pasteraci. Třetí po filtraci a vyčeření. Čtvrtý vzorek byl již koncentrát po odparce. Vzorky byly odebírány přímo v průběhu technologického procesu a uchovávány v chladící místnosti při teplotě cca 5 °C.

Tabulka 1: Charakterizace analyzovaných vzorků višňových šťáv

Popis vzorku	Odběr	Mikrobiologická analýza	Refraktometrická sušina (Brix)	Kyseliny (hm. %)
Šarže 1	18. 7. 2022	19. 7. 2022	14,92	1,57
Šarže 1 – koncentrát	18. 7. 2022	19. 7. 2022	66,2	
Šarže 2	20. 7. 2022	28. 7. 2022	16,63	1,86
Šarže 2 – koncentrát	20. 7. 2022	28. 7. 2022	66,4	
Šarže 3	21. 7. 2022	28. 7. 2022	16,84	1,85
Šarže 3 – koncentrát	21. 7. 2022	28. 7. 2022	66,2	

4.1.2 Jablečná šťáva

Stejně jako u višni byly odebrány 4 vzorky ze tří šarží. První vzorek byl vždy čerstvá vylisovaná šťáva přímo z lisu. Druhý vzorek byl vždy po pasteraci. Třetí po filtraci a vyčeření. Čtvrtý vzorek byl již koncentrát po odparce.

Tabulka 2: Charakterizace analyzovaných vzorků jablečných šťáv

Popis vzorku	Odběr	Mikrobiologická analýza	Refraktometrická sušina (Brix)	Kyseliny (hm. %)
Šarže 1	7. 10. 2022	11. 10. 2022	10,32	0,44
Šarže 1 – koncentrát	7. 10. 2022	11. 10. 2022	68,4	
Šarže 2	8. 10. 2022	14. 10. 2022	10,29	0,44
Šarže 2 – koncentrát	8. 10. 2022	14. 10. 2022	68,4	
Šarže 3	10. 10. 2022	14. 10. 2022	10,76	0,38
Šarže 3 – koncentrát	10. 10. 2022	14. 10. 2022	68,4	

4.2 Pomůcky, zařízení, chemikálie

4.2.1 Pomůcky a zařízení

Mikrobiologická analýza:

Petriho misky, kličky, hokejky, kahan, zkumavky, pipety, běžné laboratorní sklo a plasty, Biohazard box, termostat, vodní lázeň

Izolace DNA a příprava na sekvenaci:

DNeasy PowerSoil Kit, DNeasy mericon Food Kit, pipety, zkumavky eppendorf 2 ml a 1,5 ml, mikrofiltr, injekční stříkačka 20 ml, běžné laboratorní sklo a plasty, míchadlo vortex, centrifuga, termostat, mechanická třepačka, PCR cycler, přístroj pro stanovení koncentrace DNA TECAN, zařízení pro elektroforézu, UV transiluminátor

4.2.2 Chemikálie

Mikrobiologická analýza:

fyziologický roztok, destilovaná voda, ethanol, PCA agar, MRS agar, CHYGA agar, Acetobacter agar, Endo agar

Izolace DNA a příprava na sekvenaci:

DNeasy PowerSoil Kit, DNeasy mericon Food Kit, chloroform, destilovaná voda, ethanol, primery pro PCR, Taq polymeráza pro PCR, mix nukleotidů pro PCR, gel pro elektroforézu, fluorescenční barvička

4.3 Kultivační stanovení mikroorganismů

Očkovali jsme vždy roztěrem 100 μ l neředěné šťávy na Petriho misky, ve kterých byly připraveny selektivně diagnostické půdy HIMEDIA: Plate count agar (PCA; pro zjištění počtu aerobních a/nebo fakultativně anaerobních mesofilních mikroorganismů), Lactobacillus MRS agar (pro zjištění přítomnosti bakterií mléčného kvašení), Chloramphenicol yeast glucose agar (CHYGA; pro zjištění kvasinek a plísní), Acetobacter Agar (pro stanovení octových bakterií) a Endo Agar (pro stanovení enterobakterií).

Kultivace enterobakterií probíhala 24 – 48 hodin při teplotě 37 °C, kvasinek a plísní při 23 °C po dobu 3 – 7 dnů a ostatních indikátorových skupin při teplotě 30 °C po dobu 24 – 72 hodin.

Po příslušné době byly misky vyjmuty z termostatu, spočítány narostené kolonie a vyjádřeny jako CFU/ml.

4.4 Izolace DNA

4.4.1 DNeasy PowerSoil Kit

Odebrali jsme 2 ml vzorku a 15 minut centrifugovali na maximum otáček 14500 za minutu. Dále jsme pokračovali pouze se získanou peletkou podle návodu v kitu DNeasy PowerSoil.

1. Přidali jsme 800 μ l roztoku CD1 a zběžně zamíchali pomocí vortexu.
2. Dále jsme míchali na vortexu za maximální rychlosti po dobu 10 minut a poté centrifugovali na maximální počet otáček 14500 rpm po dobu 1 minuty
3. Převodili jsme supernatant do čisté zkumavky. Přidali jsme 200 μ l roztoku CD2 a míchali pomocí vortexu po dobu cca 5 sekund
4. Centrifugovali jsme 1 minutu při 14500 rpm a pak převodili supernatant do čisté zkumavky
5. Přidali jsme 600 μ l roztoku CD3 a míchali pomocí vortexu 5 sekund.
6. Napipetovali jsme 650 μ l do MB spin kolonky a centrifugovali jsme 1 minutu při 14000 RPM.
7. Filtrát jsme vylili a zopakovali bod 8, filtrát jsme opět vylili.
8. MB spin kolonku jsme přemístili do nové 2 ml zkumavky, přidali 500 μ l Solution EA a centrifugovali 1 minutu při 14000 rpm.
9. Filtrát jsme vylili, přidali 500 μ l Solution C5 a centrifugovali 1 minutu při 14000 rpm. Opět jsme filtrát vylili a přemístili MB spin kolonku do nové 2 ml zkumavky.
10. Centrifugovali 2 minuty při 14000 rpm, přemístili MB spin kolonku do nové 1,5 ml eluční zkumavky a přidali 50 μ l Solution C6 do středu membrány.
11. Centrifugovali jsme 5 minut při 14000 rpm. MB spin kolonky jsme vyjmuli a získali výsledný eluční roztok DNA.

4.4.2 DNeasy mericon Food Kit

Přes filtr jsme přefiltrovali injekční stříkačkou 20 ml vzorku. Filtrování nebylo vůbec jednoduché (filtr se zanášel, pravděpodobně molekulami (poly)sacharidů). Museli jsme vynaložit velkou sílu, abychom vzorek přes filtr protlačili. Dále jsme pokračovali pouze s filtračním koláčem včetně filtračního papíru a filtrát jsme vylili.

1. Do zkumavky jsme přenesli filtrační papír s filtračním koláčem. Přidali jsme 1 ml Food lysis buffer a 2,5 μ l proteinkinasy K. Do směsi jsme přidali několik kuliček k lepšímu rozmělnění směsi. Zběžně jsme směs promíchali pomocí vortexu. Dále jsme směs zahřívali při 60 °C a protřepávali na shakeru po dobu 30 minut. Poté jsme nechali vychladnout na pokojovou teplotu.
2. Směs jsme centrifugovali 5 minut při 7000 rpm
3. Do čisté zkumavky jsme napipetovali 500 μ l chloroformu a přidali supernatant z předchozího kroku, promíchali pomocí vortexu po dobu 15 sekund a centrifugovali 15 minut při 14000 rpm.
4. Napipetovali jsme 350 μ l PB pufru do čisté 2 ml zkumavky a přidali 350 μ l vrchní vodné fáze z kroku 3 a zběžně promíchali pomocí vortexu.
5. Napipetovali jsme roztok z bodu 4 do QIAquick spin kolonky umístěné v 2 ml sběrné zkumavce. Následně jsme centrifugovali po dobu 1 minuty při 14000 rpm. Filtrát jsme vylili. Znovu centrifugovali po dobu 1 min při 14000 rpm a filtrát opět vylili.
6. QIAquick spin kolonku jsme přemístili do čisté 2 ml zkumavky a napipetovali 100 μ l EB pufru přímo na membránu kolonky. Inkubovali jsme 1 minutu při pokojové teplotě a poté zcentrifugovali po dobu 1 minuty při 14000 rpm, abychom získali výsledný eluční roztok obsahující DNA.

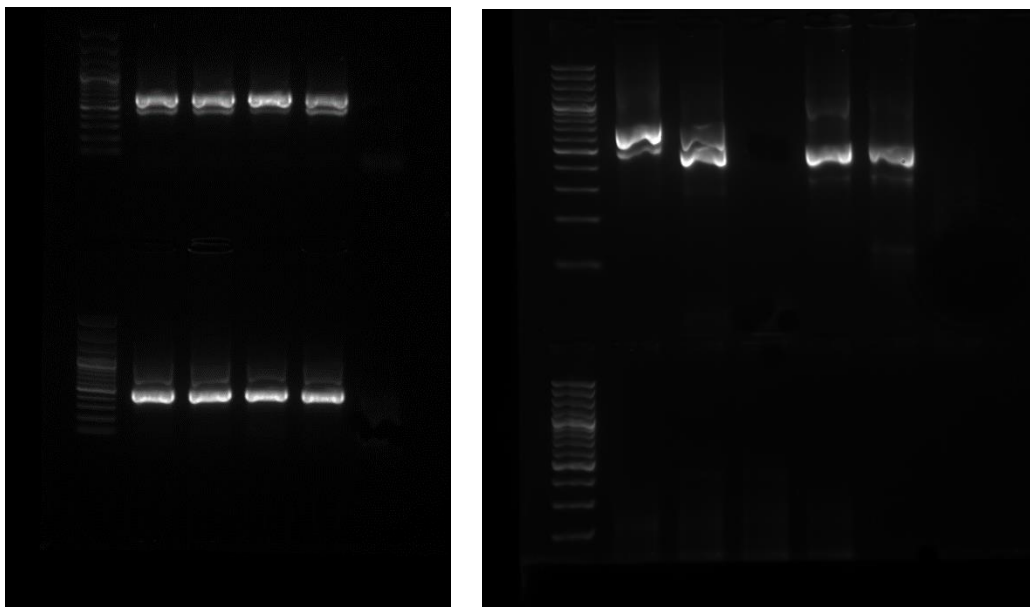
4.5 Polymerázová řetězová reakce

Vyizolované vzorky DNA jsme amplifikovali pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), abychom získali dostatečné množství DNA pro sekvenaci. Nejprve jsme si připravili roztok polymerázy, nukleotidů a vhodných primerů pro bakterie i eukaryotické mikroorganismy (houby)). Do každé eppendorfkové mikrozkušavky jsme pipetovali 9,5 μ l PCR vody, 12,5 μ l MIX (polymeráza a nukleotidy), forward primer 1 μ l, reverse primer 1 μ l a 1 μ l vzorku DNA. U DNA z višňové šťávy jsme získali 5 vzorků s bakteriálními primery

(4 obsahovaly DNA, plus 1 slepý vzorek bez DNA) a 5 vzorků s primery pro houby (4 obsahující DNA, plus 1 slepý vzorek). U DNA z jablečné šťávy jsme získali 3 vzorky s bakteriálními primery (2 obsahovaly DNA, plus 1 slepý vzorek bez DNA) a 3 vzorky s primery pro houby (2 s přítomnou DNA, plus 1 slepý vzorek).

Amplifikovali jsme tedy čtyři vzorky DNA získané z višňové šťávy a po cca třech měsících dva vzorky DNA získané z jablečné šťávy. Vyšší počet vzorků višňové šťávy je dán použitím obou výše uvedených kitů. Pro izolaci mikrobiální DNA z jablečné šťávy byl použit pouze "Food Kit".

Obrázek 17: UV detekce DNA po PCR, vlevo višňová šťáva, vpravo jablečná šťáva



4.6 Sekvence DNA

Amplifikované vzorky byly poslány na sekvenaci NGS (Next generation sequencing). Přehled sekvenovaných vzorků je v Tabulce 3.

Tabulka 3: Přehled sekvenovaných vzorků

Číslo vzorku	Vzorek	Použitá metoda izolace DNA	Mikroorganismy
1.	Višňová šťáva 18.7.2022	PowerSoil Kit	bakterie
2.	Višňová šťáva 20.7.2022	PowerSoil Kit	bakterie
3.	Višňová šťáva 18.7.2022	Food Kit + filtrace	bakterie
4.	Višňová šťáva 20.7.2022	Food Kit + filtrace	bakterie
5.	Jablková šťáva 7.10.2022	Food Kit + filtrace	bakterie
6.	Jablková šťáva 8.10.2022	Food Kit + filtrace	bakterie
7.	Višňová šťáva 18.7.2022	PowerSoil Kit	houby
8.	Višňová šťáva 20.7.2022	PowerSoil Kit	houby
9.	Višňová šťáva 18.7.2022	Food Kit + filtrace	houby
10.	Višňová šťáva 20.7.2022	Food Kit + filtrace	houby
11.	Jablková šťáva 7.10.2022	Food Kit + filtrace	houby
12.	Jablková šťáva 8.10.2022	Food Kit + filtrace	houby

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Konvenční mikrobiologická analýza

5.1.1 Višňové šťávy

Z tabulek 4-6 je patrné, že u vzorků, které nebyly naočkovány ihned po odběru (vzorky 2. a 3. šarže), došlo k výraznému nárůstu mikroorganismů, přestože byly skladovány při chladírenské teplotě. Např. kvasinky zastavují svůj metabolismus a rozmnožování při teplotách pod 5°C.

Tabulka 4: Počet mikroorganismů (CFU/ml) ve višňové šťávě šarže 1

	šťáva	šť. po pasteraci	šť. po filtraci a vyčerení	koncentrát
CPM	$3,6 \cdot 10^6$	ND*	$7,3 \cdot 10^2$	$3,9 \cdot 10^2$
BMK	ND	ND	ND	ND
kvasinky, plísně	$2,9 \cdot 10^5$	ND	$1,9 \cdot 10^2$	$1,7 \cdot 10^2$
octové bakterie	ND	ND	ND	ND
enterobakterie	$2,6 \cdot 10^4$	ND	ND	ND
sporuláty	ND	ND	ND	ND

* mikroorganismy nedetekovány

Tabulka 5: Počet mikroorganismů (CFU/ml) ve višňové šťávě šarže 2

	šťáva	šť. po pasteraci	šť. po filtraci a vyčerení	koncentrát
CPM	$1,7 \cdot 10^7$	ND*	$7,5 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^2$
BMK	ND	ND	ND	ND
kvasinky, plísně	$1,1 \cdot 10^7$	ND	$3,8 \cdot 10^5$	30
octové bakterie	ND	ND	ND	ND
enterobakterie	$1,7 \cdot 10^4$	ND	ND	ND
sporuláty	ND	ND	ND	ND

* mikroorganismy nedetekovány

Tabulka 6: Počet mikroorganismů (CFU/ml) ve višňové šťávě šarže 3

	šťáva	šť. po pasteraci	šť. po filtraci a vyčerení	Koncentrát
CPM	$2,1 \cdot 10^7$	ND*	$7,5 \cdot 10^5$	40
BMK	ND	ND	ND	ND
kvasinky, plísně	$1,5 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^2$	$5,4 \cdot 10^5$	10
octové bakterie	ND	ND	ND	ND
enterobakterie	$4,4 \cdot 10^4$	ND	ND	ND
koliformní bakt.	$3 \cdot 10^3$	ND	ND	ND
sporuláty	ND	ND	ND	ND

* mikroorganismy nedetekovány

Vyšší kontaminace višňi oproti jablkům je dána charakterem plodu a způsobem sběru. Višně mají měkčí slupku než jablka a jsou náchylnější k mechanickému poškození. Sběr probíhá kartáčovými sběrači ze stromů bez selekce nahnilých nebo jinak defektních plodů. Višně jsou skladovány v chladicí místnosti. Jakmile je nasbíráno dostatečné množství, jsou transportovány do lisovny. Višně pochází z Jihočeského kraje, konkrétně z obce Lhenice nedaleko Prachatic. Převoz do lisovny v obci Nivnice ve Zlínském kraji trvá asi 4 hodiny. Přejímka a příprava višňi k lisování zabere cca hodinu. Zpracování celé přivezené várky trvá cca 4 hodiny. Po celou tuto dobu může docházet k rozmnožování mikroorganismů. Další faktor, který má vliv na rozdílnou kontaminaci mikroorganismy višňi a jablek je teplota. Višně jsou zpracovávány v červenci, jablka v měsících září-listopad. Za sezónu vylisuje firma 300 tun višňi.

5.1.2 Jablečné šťávy

V tabulkách 7 až 9 jsou uvedeny výsledky mikrobiologické analýzy jablečných šťáv. Z výsledků je patrné, že jablečné šťávy jsou výrazně méně kontaminovány mikroorganismy než šťávy višňové.

Tabulka 7: Počet mikroorganismů (CFU/ml) v jablečné šťávě šarže 1

	šťáva	šť. po pasteraci	šť. po filtraci a vyčeření	koncentrát
CPM	$2,1 \cdot 10^5$	ND*	$9,5 \cdot 10^4$	ND
BMK	ND	ND	ND	ND
kvasinky, plísňe	$1,1 \cdot 10^6$	ND	$1,3 \cdot 10^5$	ND
octové bakterie	ND	ND	ND	ND
enterobakterie	$6,7 \cdot 10^3$	ND	ND	ND
koliformní bakt.	$8,1 \cdot 10^2$	ND	ND	ND
sporuláty	ND	ND	ND	ND

* mikroorganismy nedetekovány

Tabulka 8: Počet mikroorganismů (CFU/ml) v jablečné šťávě šarže 2

	šťáva	šť. po pasteraci	šť. po filtraci a vyčeření	koncentrát
CPM	$2,8 \cdot 10^5$	ND*	$1,4 \cdot 10^5$	50
BMK	ND	ND	ND	ND
kvasinky, plísňe	$1,2 \cdot 10^6$	ND	$1,3 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^2$
octové bakterie	ND	ND	ND	ND
enterobakterie	$3,7 \cdot 10^3$	ND	ND	ND
koliformní bakt.	$1,8 \cdot 10^2$	ND	ND	ND
sporuláty	ND	ND	ND	ND

* mikroorganismy nedetekovány

Tabulka 9: Počet mikroorganismů (CFU/ml) v jablečné šťávě šarže 3

	šťáva	šť. po pasteraci	šť. po filtraci a vyčeření	koncentrát
CPM	$1,8 \cdot 10^5$	ND*	$1,2 \cdot 10^5$	ND
BMK	ND	ND	ND	ND
kvasinky, plísně	$9,1 \cdot 10^4$	ND	$1,1 \cdot 10^5$	ND
octové bakterie	ND	ND	ND	ND
enterobakterie	$1,2 \cdot 10^3$	ND	ND	ND
koliformní bakt.	70	ND	ND	ND
sporuláty	ND	ND	ND	ND

* mikroorganismy nedetekovány

Důvodem menší kontaminace jablečných šťáv je jak charakter ovoce, tak proces sběru. Jablka disponují tuhou slupkou, višně mají slupku i celý plod měkký, náchylný k mechanickému poškození i mikrobiálnímu napadení. Jablka jsou sbírány ze země, přičemž zde probíhá jakási první selekce plodů, další selekce probíhá pak na lisovně na pásovém dopravníku před vstupem do lisu. Tužší a celistvější plody jablek také dovolují mytí a čištění při transportu plavením ze skládky do lisovny. Na druhou stranu dochází do kontaktu se zemí, což je pravděpodobně zdrojem koliformních bakterií, které u višni detekovány nebyly, Jablka jsou sbírána ručně, což může být také zdrojem určité kontaminace. Než se jablka dostanou do lisovny, uběhne nějaká doba. Firma disponuje sítí vlastních výkupních míst a také kupuje např. celou produkci jiných výkupních sítí nebo sadů apod. Za sezónu vylisuje až 10.000 tun jablek.

5.1.3 Srovnání nárůstu mikroorganismů u višňových a jablečných šťáv

Višňová šťáva obsahovala až o řád více mikroorganismů než jablečná. Je to dáno charakterem plodu a způsobem sběru. Dužnina jablka je lépe chráněna před mikrobiálním napadením než dužnina višně. Višně jsou sbírány kartáčovým sběrem bez selekce defektních plodů. U jablek probíhá selekce při samotném sběru, ať už při sběru ze stromu nebo jablek padaných. Další selekce probíhá na pásovém dopravníku na lisovně. Významné pro počet mikroorganismů je také mytí jablek při procesu plavení. U jablečné šťávy z lisu (tj. vzorek 1) u všech tří šarží byla zjištěna mírná kontaminace koliformními bakteriemi, které se tam dostaly zřejmě při kontaktu s půdou. U višni byla přítomnost koliformních bakterií zjištěna jen v případě jedné šarže, ale zato ve větším množství (až o řád). Příčinou této kontaminace mohou být špatné skladovací podmínky nebo přeprava. U višňové šťávy z lisu (vzorek č. 1) byl zaznamenán veliký rozdíl v počtu kvasinek mezi jednotlivými šaržemi. Je to pravděpodobně dáno rozdílnou prodlevou mezi odběrem vzorku a jeho očkovaním.

U višňové šťávy první šarže to byl jeden den, u zbylých týden. Přestože byly vzorky skladovány v chladící místnosti, bylo zaznamenáno cca 40ti násobné zvýšení počtu mikroorganismů..

U pasterovaných šťáv ve všech šaržích jablečných i višňových šťáv nebyly dle očekávání detekovány žádné mikroorganismy, s výjimkou jablečné šťávy 3. šarže, což se pravděpodobně stalo v důsledku špatného odběru vzorku, anebo kontaminací při očkování a manipulaci se vzorkem v laboratoři.

U vzorků šťáv po filtraci a vyčeřování došlo zřejmě ke vzdušné kontaminaci kvasinkami a následnému pomnožení. Višňová i jablečná šťáva zbavená všech mikroorganismů v předchozím technologickém kroku je vyčeřována po dobu cca 10 hodin ve vyčeřovacích tancích. Toto neprobíhá asepticky, navíc je v lisovně ve vzduchu přítomno velké množství kvasinek. Při zpracování višni v létě je otevřeno několikero dveří a vrat a zvýšená cirkulace vzduchu snižuje množství kvasinek, v zimě při zpracování jablek je vše uzavřeno a množství kvasinek ve vzduchu je větší. Při vyčeřování může docházet k významné kvasinkové kontaminaci, nicméně po následném zahřevu a odpaření vody na odparce by měl výsledný koncentrát bez mikroorganismů.

Přítomnost mikroorganismů v koncentrátu (4. vzorku) byla zjištěna u višňových šťáv všech šarží u višni a jablečné šťávy šarže. Zde je možné usuzovat na to, že došlo ke kontaminaci při odběru vzorků. Koncentrát je následně skladován při teplotě nižší než 5 °C hlavně z důvodu stability barviv.

Pro detailní zjištění konkrétních druhů mikroorganismů jsme provedli sekvenaci DNA z prvních vzorků.

5.2 Využití molekulárně-biologických metod k detekci mikroorganismů v ovocných šťávách

5.2.1 Izolace DNA

Ukázalo se, že izolovat DNA z ovocné šťávy není vůbec jednoduché. První pokus s využitím DNeasy mericon Food Kitu se nezdařil vůbec. Postupovali jsme přesně podle návodu a u všech 12 vzorků višňové šťávy jsme zjistili nedetekovatelná množství DNA.

Při druhém pokusu jsme vyšli z předpokladu, že kámen úrazu bude v úvodním kroku lytického rozrušení buněk. Ve šťávě je hodně cukru a právě sacharidy by mohly lyzi buněk inhibovat. Pracovali jsme již jen se dvěma vzorky višňové šťávy získanými přímo po lisování ve dnech 18. 7. 2023 a 20. 7. 2023. Vyhodnotili jsme, že případně vyizolovaná DNA bude dostatečně reprezentativním vzorkem pro představu o výskytu mikroorganismů ve višňové šťávě a není potřeba provádět izolaci z višňových šťáv všech 3 šarží. Vzorky po pasteraci, filtraci a vzorek koncentráту jsme vzhledem k nízkému nebo žádnému obsahu mikroorganismů rovněž vyloučili. Postup jsme mírně upravili. Vzorky jsme významně naředili vodou, která přítomné sacharidy rozpustila. Po následné centrifugaci jsme dále pracovali s peletkou, která již sacharidy neobsahovala nebo jich obsahovala výrazně méně. Další postup zůstal stejný. Každopádně výsledkem bylo opět nedetekovatelné množství DNA.

Další pokus se nesl ve znamení úpornější snahy o mechanické rozbití buněk – proběhlo více třepání, více zahřívání. Pracovali jsme opět pouze se dvěma vzorky višňové šťávy získanými přímo po lisování ve dnech 18. 7. 2023 a 20. 7. 2023. Zkusili jsme použít dva různé kity – DNeasy PowerSoil Pro Kit a DNeasy mericon Food Kit. Vzorek, na který jsme použili Food Kit, jsme nejprve zfiltrovali přes membránový filtr, kvůli odstranění sacharidů. Dále jsme pracovali pouze s filtračním koláčem, který jsme přenesli včetně filtru do ependorfkové mikrozkušavky a dále pokračovali podle návodu výrobce kitu s upraveným prvním krokem lyze buněk – více třepání a více zahřívání. Třetí pokus izolace DNA byl konečně úspěšný. V Tabulce 10 uvádím získané koncentrace DNA jednotlivých vzorků. Koncentrace DNA se zjišťuje při 260 nm a proteinů při 280 nm. Ratio pak vyjadřuje čistotu DNA ve vzorku poměrem koncentrace DNA ke koncentraci proteinů.

Tabulka 10: Koncentrace DNA izolované z višňové šťávy

dsDNA		260 nm	280 nm	koncentrace ng/μl	Ratio	Sample ID
	A1 18.7.	0,0008	0,0004	0,8	2	Višně Power Soil Kit
	A2 20.7.	0,0045	0,0026	4,5	1,73	Višně Power Soil Kit
	B1 18.7.	0,0047	0,0026	4,7	1,81	Višně filtr Food Kit
	B2 20.7.	0,01	0,0088	10	1,14	Višně filtr Food Kit

Stejný osvědčený postup jsme použili při izolaci DNA z jablečné šťávy o 3 měsíce později. Použili jsme pouze Food Kit kombinovaný s filtrací, který se nám u višni osvědčil více než PowerSoil Kit. DNA jsme izolovali zase ze dvou vzorků jablečné šťávy získaných přímo

po lisování ve dnech 7. 10. 2023 a 8. 10. 2023. V Tabulce 11 uvádím získané koncentrace DNA jednotlivých vzorků.

Tabulka 11: Koncentrace DNA izolované z jablečné šťávy

dsDNA		260 nm	280 nm	koncentrace ng/μl	Ratio	Sample ID
	A1 7.10.	0,0022	0,0009	2,2	2,44	Jablka filtr Food Kit
	A2 8.10.	0,001	0,0003	1	3,33	Jablka filtr Food Kit

5.2.2 Výsledky sekvenace DNA višňové šťávy - bakterie

Většina osekvenovaných bakterií spadala do kmene *Proteobacteria* (Tabulka 12). Tento kmen je dělen do pěti tříd *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gamaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* a *Epsilonproteobacteria*. Ve višňové šťávě byly zastoupeny zejména bakterie třídy *Gamaproteobacteria*, méně třídy *Alphaproteobacteria* (Tabulka 13). Dalším významně zastoupeným kmenem se jeví kmen *Cyanobacteria*. Nicméně se nejedná o bakteriální DNA, ale o chloroplastovou DNA, což je uvedeno v Tabulce 14 jako řád "*Chloroplast*". Podle endosymbiotické teorie vznikly chloroplasty pohlcením sinice eukaryotní buňkou [30]. Chloroplastová DNA je prokaryotního původu, tudíž použité bakteriální primery nasedly i na chloroplastovou DNA. NGS vyhodnotil na vyšší taxonomické úrovni příslušnou DNA jako *Cyanobacteria*, na úrovni řádu tuto DNA označil jako "*Chloroplast*" a u nižších taxonomických úrovní jako "*Unknown*".

Tabulka 12: Bakterie identifikované ve višňové šťávě – procentuální zastoupení kmenů

Kmen	vzorek powersoil kit 18.7.2023	vzorek powersoil kit 20.7.2023	vzorek food kit 18.7.2023	vzorek food kit 20.7.2023
<i>Actinobacteriota</i>	0,08	0,14	0,1	0,08
<i>Bacteroidota</i>	0,13	0,05	0,09	0,02
<i>Cyanobacteria</i>	0,07	0,15	4,68	8,39
<i>Firmicutes</i>	0,08	0,3	0,18	0,02
<i>Other</i>	0,08	0,21	0,37	0,04
<i>Planctomycetota</i>	0,02	0,12	0,05	0,01
<i>Proteobacteria</i>	99,49	98,84	94,43	91,44
<i>Synergistota</i>	0,04	0,18	0,1	0

Tabulka 13: Bakterie identifikované ve višňové šťávě – procentuální zastoupení tříd

Třída	vzorek powersoil kit 18.7.2023	vzorek powersoil kit 20.7.2023	vzorek food kit 18.7.2023	vzorek food kit 20.7.2023
<i>Actinobacteria</i>	0,08	0,11	0,06	0,08
<i>Alphaproteobacteria</i>	0,21	0,06	4,26	11,4
<i>Bacilli</i>	0,04	0,3	0,17	0
<i>Bacteroidia</i>	0,13	0,05	0,09	0,02
<i>Cyanobacteriia</i>	0,07	0,15	4,68	8,39
<i>Gammaproteobacteria</i>	99,28	98,78	90,17	80,04
<i>Other</i>	0,14	0,36	0,47	0,07
<i>Synergistia</i>	0,04	0,18	0,1	0

Na taxonomické úrovni řádu stojí za zmínku řád *Enterobacterales*, který je zde zastoupen dvěma čeleděmi *Enterobacteriaceae* a *Erwiniaceae* (Tabulka 14 a 15). Řád "*Chloroplast*" je zmíněn výše, jedná se o chloroplastovou DNA sinic. Řád *Rickettsiales* a jemu odpovídající čeleď "*Mitochondria*" jsou obdobným případem. Mitochondrie vznikly podle endosymbiotické teorie pohlcením rickettsie eukaryotní buňkou [30]. Mitochondriální DNA je prokaryotního původu, tudíž použité bakteriální primery nasedly i na mitochondriální DNA. NGS vyhodnotil na vyšší taxonomické úrovni příslušnou DNA jako *Rickettsiales*, na úrovni čeledi tuto DNA označil jako "*Mitochondria*" a u nižších taxonomických úrovní jako "*Unknown*". Za zmínku stojí také řád *Pseudomonadales*.

Tabulka 14: Bakterie identifikované ve višňové šťávě – procentuální zastoupení řádů

řád	vzorek powersoil kit 18.7.2023	vzorek powersoil kit 20.7.2023	vzorek food kit 18.7.2023	vzorek food kit 20.7.2023
<i>Acetobacteriales</i>	0,07	0	0,23	0,16
<i>Bacillales</i>	0,01	0	0	0,01
<i>Bacteroidales</i>	0,11	0	0,02	0,01
<i>Burkholderiales</i>	0,03	0,15	0,39	0,01
<i>Enterobacteriales</i>	98,91	98,01	85,96	77,62
<i>Flavobacteriales</i>	0,02	0,02	0,03	0
<i>Chloroplast</i>	0,07	0,15	4,68	8,39
<i>Lactobacillales</i>	0	0,21	0,17	0
<i>Other</i>	0,19	0,41	0,45	0,12
<i>Propionibacteriales</i>	0,07	0,11	0,06	0,06
<i>Pseudomonadales</i>	0,34	0,58	3,76	2,39
<i>Rhizobiales</i>	0,07	0,03	0,17	0,02
<i>Rickettsiales</i>	0	0	3,35	11,06
<i>Sphingobacteriales</i>	0	0,03	0	0
<i>Sphingomonadales</i>	0,06	0	0,49	0,12
<i>Synergistales</i>	0,04	0,18	0,1	0
<i>Unknown</i>	0,01	0,11	0,1	0,03
<i>Xanthomonadales</i>	0	0	0,06	0

Tabulka 15: Bakterie identifikované ve višňové šťávě – procentuální zastoupení čeledí

čeleď	vzorek powersoil kit 18.7.2023	vzorek powersoil kit 20.7.2023	vzorek food kit 18.7.2023	vzorek food kit 20.7.2023
<i>Acetobacteraceae</i>	0,07	0	0,23	0,16
<i>Bacillaceae</i>	0,01	0	0	0
<i>Beijerinckiaceae</i>	0	0,03	0,17	0
<i>Comamonadaceae</i>	0,03	0,05	0,16	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	31,67	33,54	69,42	3,55
<i>Erwiniaceae</i>	67,24	64,45	16,54	74,07
<i>Flavobacteriaceae</i>	0,01	0,02	0	0
<i>Gallionellaceae</i>	0	0,1	0,1	0
<i>Lactobacillaceae</i>	0	0,21	0,17	0
<i>Mitochondria</i>	0	0	3,35	11,06
<i>Other</i>	0,32	0,36	0,44	0,18
<i>Propionibacteriaceae</i>	0,07	0,11	0,06	0,06
<i>Pseudomonadaceae</i>	0,34	0,58	3,76	2,37
<i>Rhizobiaceae</i>	0,02	0	0	0
<i>Sphingomonadaceae</i>	0,06	0	0,49	0,12
<i>Synergistaceae</i>	0,04	0,18	0,1	0
<i>Unknown</i>	0,11	0,36	4,93	8,44
<i>Weeksellaceae</i>	0	0	0,03	0
<i>Xanthomonadaceae</i>	0	0	0,06	0

V Tabulce 16 je uveden přehled zjištěných rodů bakterií ve višňové šťávě. Rody *Escherichia* a *Shigella* mají velmi podobný genom, ve výsledcích NGS nebyly tyto rody rozlišeny. Při mikrobiologickém rozboru nebyly na ENDO agaru žádné koliformní bakterie detekovány, takže se bude pravděpodobně jednat o příslušníky rodu *Shigella*. U višňové šťávy byly nejvíce zastoupeny rody ze skupiny "Escherichia-Shigella" a rod *Tatumella*. Zřejmě kvalitativně efektivnější pro izolaci DNA se jeví Food Kit, pomocí kterého bylo zachyceno širší spektrum mikroorganismů. Výtěžnost izolace byla také vyšší 4,7 ng/μl u vzorku č. 3 a 10 ng/μl u vzorku č. 4 oproti 0,8 ng/μl u vzorku č. 1 a 4,5 ng/μl u vzorku č. 2 (tab. 10 a 11). Z tohoto pohledu se jeví jako nejvíce signifikantní vzorek č. 4. Je potřeba si uvědomit, že velkou část získané DNA u tohoto vzorku tvoří chloroplastová a mitochondriální DNA, a to až 20%. Výtěžek bakteriální DNA nebude tím pádem 10 ng/μl, ale spíše 8 ng/μl. U tohoto vzorku převažuje výrazně *Tatumella* nad "Escherichia-Shigella". Za zmínku stojí také přítomné rody *Erwinia* a *Pseudomonas*. I tady se opět ukazuje vyšší účinnost Food Kitu oproti PowerSoil Kitu.

Bakterie rodu *Tatumella* jsou gramnegativní, oxidáza negativní, fermentující tyčinky, které rostou na MacConkey agaru. Rod *Tatumella* je oportunní patogen. [31]

Tabulka 16: Bakterie identifikované ve višňové šťávě – procentuální zastoupení rodů

rod	vzorek powersoil kit 18.7.2023	vzorek powersoil kit 20.7.2023	vzorek food kit 18.7.2023	vzorek food kit 20.7.2023
<i>Acetobacter</i>	0	0	0,19	0,09
<i>Allorhizobium- Neorhizobium- Pararhizobium- Rhizobium</i>	0,02	0	0	0
<i>Aminobacterium</i>	0,02	0	0,1	0
<i>Candidatus Nitrotoga</i>	0	0,1	0	0
<i>Cutibacterium</i>	0,07	0,1	0,06	0,06
<i>EBM-39</i>	0	0,1	0	0
<i>Erwinia</i>	0	0	0,67	0,35
<i>Escherichia-Shigella</i>	31,66	33,53	69,39	3,55
<i>Flavobacterium</i>	0,01	0	0	0
<i>Gallionella</i>	0	0	0,1	0
<i>Gluconobacter</i>	0,07	0	0	0,06
<i>Chryseobacterium</i>	0,01	0	0,03	0
<i>Lacticaseibacillus</i>	0	0,21	0,17	0
<i>Methylibium</i>	0	0	0,16	0
<i>Methylobacterium- Methylorubrum</i>	0	0,03	0,17	0
<i>Novosphingobium</i>	0	0	0,06	0
<i>Other</i>	0,27	0,29	0,38	0,15
<i>Pantoea</i>	0,25	0	0	0,28
<i>Pseudomonas</i>	0,34	0,58	3,76	2,37
<i>Sphingobium</i>	0	0	0	0,1
<i>Sphingomonas</i>	0,06	0	0,43	0,02
<i>Stenotrophomonas</i>	0	0	0,06	0
<i>Tatumella</i>	66,98	64,42	15,87	73,41
<i>Unknown</i>	0,24	0,63	8,41	19,56

Tabulka 17: Taxonomické zařazení bakterií identifikovaných u višňové šťávy

<i>Kmen</i>	<i>Třída</i>	<i>Řád</i>	<i>Čeleď</i>	<i>Rod</i>
<i>Actinobacteriota</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Propionibacteriales</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Cutibacterium</i>
<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>		
		<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Flavobacterium</i>
			<i>Weeksellaceae</i>	<i>Chryseobacterium</i>
		<i>Sphingobacteriales</i>		
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	
		<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lacticaseibacillus</i>
<i>Planctomycetota</i>				
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Acetobacterales</i>	<i>Acetobacteraceae</i>	<i>Acetobacter</i> <i>Gluconobacter</i>
		<i>Rhizobiales</i>	<i>Beijerinckiaceae</i>	
			<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Allorhizobium</i> - <i>Neorhizobium</i> - <i>Pararhizobium</i> - <i>Rhizobium</i>
			<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>
				<i>Novosphingobium</i> <i>Methylobacterium</i> - <i>Methylorubrum</i>
	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escher.- Shigella</i>
			<i>Erwiniaceae</i>	<i>Erwinia</i> <i>Pantoea</i> <i>Tatumella</i>
		<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
		<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Stenotrophomonas</i>
		<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i> <i>Gallionellaceae</i>
<i>Synergistota</i>	<i>Synergistia</i>	<i>Synergistales</i>	<i>Synergistaceae</i>	<i>Aminobacterium</i> <i>EBM-39</i>

5.2.3 Výsledky sekvenace DNA višňové šťávy - houby

V Tabulce 18 jsou uvedeny výsledky sekvenace s primery pro houby. Největší zastoupení mají dvě čeledě *Saccharomycetaceae* a *Saccharomycodaceae*. Spolu s *Metschnikowiaceae* patří do řádu *Saccharomycetales*. Také do těchto taxonů spadají všechny deklarované rody uvedené v Tabulce 19 – rod *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* a *Saccharomyces*.

V minimálním množství byly detekovány také čeledi *Aureobasidiaceae* a *Glomerellaceae*, jejichž zástupci nebyli dále na taxonomické úrovni rodu identifikovány a byly rodově zařazeny jako "Other". Typickým zástupcem *Aureobasidiaceae* je rod *Aureobasidium*, konkrétně druh *Aureobasidium pullulans* se často vyskytuje u jablek [32]. Jediným rodem čeledi *Glomerellaceae* je fytopatogenní rod *Colletotrichum*. Např. druh *Colletotrichum acutatum* se běžně vyskytuje na ovoci [33].

Tabulka 18: Houby identifikované ve višňové šťávě – procentuální zastoupení čeledí

čeleď	vzorek powersoil kit 18.7.2023	vzorek powersoil kit 20.7.2023	vzorek food kit 18.7.2023	vzorek food kit 20.7.2023
<i>Aureobasidiaceae</i>	0	0,01	0,02	0,02
<i>Glomerellaceae</i>	0	0	0	0,02
<i>Metschnikowiaceae</i>	0,02	0	0	0,02
<i>Saccharomycetaceae</i>	95,41	92,12	97,58	89,8
<i>Saccharomycodaceae</i>	4,47	7,79	1,9	9,33
<i>Other</i>	0	0	0,01	0,01
<i>Unknown</i>	0,1	0,07	0,49	0,79

Tabulka 19: Houby identifikované ve višňové šťávě – procentuální zastoupení rodů

rod	vzorek powersoil kit 18.7.2023	vzorek powersoil kit 20.7.2023	vzorek food kit 18.7.2023	vzorek food kit 20.7.2023
<i>Hanseniaspora</i>	4,47	7,79	1,9	9,33
<i>Metschnikowia</i>	0,02	0	0	0,02
<i>Saccharomyces</i>	95,4	92,12	97,57	89,73
<i>Other</i>	0,01	0,01	0,04	0,12
<i>Unknown</i>	0,1	0,07	0,49	0,79

Tabulka 20: Taxonomické zařazení bakterií identifikovaných u višňové šťávy

Řád	Čeleď	Rod
<i>Dothideales</i>	<i>Aureobasidiaceae</i>	
<i>Hypocreomycetidae incertae sedis</i>	<i>Glomerellaceae</i>	
<i>Saccharomycetales</i>	<i>Metschnikowiaceae</i>	<i>Metschnikowia</i>
	<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Saccharomyces</i>
	<i>Saccharomycodaceae</i>	<i>Hanseniaspora</i>

5.2.4 Výsledky sekvenace DNA jablečné šťávy - bakterie

U jablečné šťávy byla zjištěna pestřejší mikrobiální skladba než u višňové šťávy. Na úrovni kmene byl oproti višňové šťávě detekován navíc kmen *Firmicutes* a to dosti výrazně, 5,38% u prvního vzorku a 7,62% u druhého vzorku (Tabulka 21). Byl také zaznamenán vyšší podíl kmenů *Actinobacteriota* a *Bacteroidota*. *Cyanobacteria* opět reprezentuje chloroplastovou DNA. Kmen *Proteobacteria* je opět zastoupen svými dvěma třídami *Alphaproteobacteria* a *Gammaproteobacteria*. Procentuální zastoupení jednotlivých tříd bakterií jsou uvedena v Tabulce 22.

Tabulka 21: Bakterie identifikované v jablečné šťávě – procentuální zastoupení kmenů

kmen	Vzorek 7.10.2023 [%]	Vzorek 8.10.2023 [%]
<i>Actinobacteriota</i>	0,02	0,26
<i>Bacteroidota</i>	0,94	0,37
<i>Cyanobacteria</i>	0,61	4,19
<i>Firmicutes</i>	5,38	7,62
<i>Other</i>	0,03	0,1
<i>Planctomycetota</i>	0	0,01
<i>Proteobacteria</i>	93,02	87,41
<i>Synergistota</i>	0	0,04

Tabulka 22: Bakterie identifikované v jablečné šťávě – procentuální zastoupení tříd

třída	Vzorek 7.10.2023 [%]	Vzorek 8.10.2023 [%]
<i>Actinobacteria</i>	0,02	0,25
<i>Alphaproteobacteria</i>	16,32	27,51
<i>Bacilli</i>	5,37	7,51
<i>Bacteroidia</i>	0,94	0,37
<i>Cyanobacteriia</i>	0,61	4,19
<i>Gammaproteobacteria</i>	76,71	59,9
<i>Other</i>	0,04	0,24
<i>Synergistia</i>	0	0,04

Na taxonomické úrovni řádu dominuje řád *Enterobacterales* s cca 50% u obou vzorků, který je zde zastoupen dvěma čeleděmi *Enterobacteriaceae* a *Erwiniaceae* (Tabulka 23 a 24). Dalšími významně zastoupenými řády byly *Acetobacterales* s čeledí *Acetobacteraceae*, *Bacillales* s čeledí *Bacillaceae*, *Burkholderiales* s čeleděmi *Alcaligenaceae*, *Comamonadaceae* a *Oxalobacteraceae*, *Pseudomonadales* s čeledí *Pseudomonadaceae*,

Rhizobiales s čeledí *Rhizobiaceae*, *Sphingomonadales* a *Xanthomonadales*. Pozice řádu "*Chloroplast*" je vysvětlena výše, jedná se o chloroplastovou DNA. Řád *Rickettsiales* a jemu odpovídající čeleď "*Mitochondria*" jsou obdobným případem jako řád "*Chloroplast*".

Tabulka 23: Bakterie identifikované v jablečné šťávě – procentuální zastoupení řádů

řád	Vzorek 7.10.2023 [%]	Vzorek 8.10.2023 [%]
<i>Acetobacteriales</i>	9,85	10,36
<i>Bacillales</i>	5,14	7,22
<i>Burkholderiales</i>	2,14	0,56
<i>Enterobacteriales</i>	50,28	52,07
<i>Flavobacteriales</i>	0,3	0,12
<i>Chloroplast</i>	0,61	4,19
<i>Lactobacillales</i>	0,15	0,2
<i>Other</i>	0,33	0,6
<i>Propionibacteriales</i>	0,02	0,12
<i>Pseudomonadales</i>	10,94	4,06
<i>Rhizobiales</i>	3,09	0,79
<i>Rickettsiales</i>	1,85	15,37
<i>Sphingobacteriales</i>	0,53	0,19
<i>Sphingomonadales</i>	1,46	0,91
<i>Synergistales</i>	0	0,04
<i>Unknown</i>	0,01	0
<i>Xanthomonadales</i>	13,31	3,19

Tabulka 24: Bakterie identifikované v jablečné šťávě – procentuální zastoupení čeledí

čeleď	Vzorek 7.10.2023 [%]	Vzorek 8.10.2023 [%]
<i>Acetobacteraceae</i>	9,85	10,36
<i>Alcaligenaceae</i>	0,94	0,18
<i>Bacillaceae</i>	5,11	7,22
<i>Beijerinckiaceae</i>	0,05	0,045
<i>Comamonadaceae</i>	0,56	0,18
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,1	1,05
<i>Erwiniaceae</i>	34,36	44,58
<i>Flavobacteriaceae</i>	0,17	0,017
<i>Gallionellaceae</i>	0	0,01
<i>Lactobacillaceae</i>	0,15	0,16
<i>Mitochondria</i>	1,85	15,37
<i>Morganellaceae</i>	1,89	0,69
<i>Other</i>	0,56	0,61
<i>Oxalobacteraceae</i>	0,53	0,19
<i>Pectobacteriaceae</i>	1,06	0,36
<i>Propionibacteriaceae</i>	0,019	0,12
<i>Pseudomonadaceae</i>	10,83	4
<i>Rhizobiaceae</i>	3,02	0,74
<i>Rhodanobacteraceae</i>	0,91	0,46
<i>Sphingobacteriaceae</i>	0,53	0,19
<i>Sphingomonadaceae</i>	1,46	0,91
<i>Synergistaceae</i>	0	0,037
<i>Unknown</i>	0,66	4,75
<i>Weeksellaceae</i>	0,13	0,11
<i>Xanthomonadaceae</i>	12,41	2,73
<i>Yersiniaceae</i>	11,85	4,93

V Tabulce 25 je uvedeno procentuální zastoupení jednotlivých identifikovaných rodů bakterií v jablečné šťávě. Za zmínku stojí rody *Tatumella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Gluconobacter*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas* a *Yersinia*. *Gluconobacter* je bakterie octového kvašení, identifikovány byly ještě další bakterie octového kvašení, *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* a *Komagataeibacter*. U jablečné šťávy bylo zjištěno výrazně vyšší procentuální zastoupení octových bakterií než u šťávy višňové, a to cca stonásobně. Nicméně vzhledem k celkovým počtům mikroorganismů (u višňové šťávy řádově 10^7 a u jablečné řádově 10^5), je možné usuzovat na to, že absolutní počty octových bakterií byly obdobné u obou ovocných šťáv. U višni byly z octových bakterií identifikovány pouze rody *Acetobacter* a *Gluconobacter*.

Rody *Tatumella* a *Pantoea* jsou fylogeneticky velmi podobné. Dokonce z ovoce a půdy získané druhy *Pantoea citrea*, *Pantoea punctata* a *Pantoea terrea* mají vyšší příbuznost k rodu *Tatumella* než k rodu *Pantoea*, a to jednak fylogenetickou na základě sekvenace DNA, ale i fenotypovou. [34]

Velkou příbuznost k rodu *Pantoea* vykazuje také rod *Erwinia*. V roce 1993 byly přesunuty do rodu *Pantoea* druhy *Erwinia ananas* a *Erwinia stewartii*. [34]

Tyto tři rody *Erwinia*, *Pantoea* a *Tatumella* jsou společně zahrnuty do čeledě *Erwiniaceae*.

Relativně výrazně byl také zastoupen rod *Yersinia* reprezentující řadu patogenních druhů.

Tabulka 25: Bakterie identifikované v jablečné šťávě – procentuální zastoupení rodů

rod	Vzorek 7.10.2023 [%]	Vzorek 8.10.2023 [%]
<i>Acetobacter</i>	0,56	0,45
<i>Achromobacter</i>	0,24	0
<i>Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium</i>	2,7	0,64
<i>Aminobacterium</i>	0	0,04
<i>Bacillus</i>	5,08	7,22
<i>Caenimonas</i>	0,13	0
<i>Candidatus Nitrotoga</i>	0	0,01
<i>Cutibacterium</i>	0,02	0,12
<i>Duganella</i>	0,32	0,05
<i>Erwinia</i>	2,67	1,63
<i>Falsochrobactrum</i>	0,14	0,02
<i>Flavobacterium</i>	0,17	0,02
<i>Frateuria</i>	0,7	0,33
<i>Gibbsiella</i>	2,25	0,07
<i>Gluconacetobacter</i>	0,22	0,08
<i>Gluconobacter</i>	8,62	8,98
<i>Chryseobacterium</i>	0,13	0,11
<i>Incertae Sedis</i>	1,89	0,69
<i>Komagataeibacter</i>	0,35	0,8
<i>Lelliottia</i>	0,6	0
<i>Leuconostoc</i>	0,05	0,13
<i>Liquorilactobacillus</i>	0,1	0,02
<i>Lonsdalea</i>	0,94	0,36
<i>Luteibacter</i>	0,21	0,14
<i>Methylobacterium-Methylorubrum</i>	0,03	0,03
<i>Novosphingobium</i>	0,56	0,08
<i>Other</i>	1,06	1,09
<i>Pantoea</i>	14,07	4,97
<i>Pectobacterium</i>	0,11	0
<i>Pedobacter</i>	0,41	0,1
<i>Pseudomonas</i>	10,83	4
<i>Pseudoxanthomonas</i>	0,98	0,1
<i>Serratia</i>	0	0,15
<i>Sphingomonas</i>	0,62	0,57
<i>Stenotrophomonas</i>	8,97	1,72
<i>Tatumella</i>	17,24	37,98
<i>Unknown</i>	5,36	21,63
<i>Variovorax</i>	0,29	0
<i>Verticiella</i>	0,71	0,16
<i>Xanthomonas</i>	0,81	0,57

<i>Yersinia</i>	9,61	4,7
<i>Zymomonas</i>	0,28	0,26

Tabulka 26: Taxonomické zařazení bakterií identifikovaných u jablečné šťávy

Kmen	Třída	Řád	Čeleď	Rod
<i>Actinobacteriota</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Propionibacteriales</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Cutibacterium</i>
<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Flavobacterium</i>
			<i>Weeksellaceae</i>	<i>Chryseobacterium</i>
		<i>Sphingobacteriales</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Pedobacter</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>
		<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Liquorilactobacillus</i>
				<i>Leuconostoc</i>
<i>Planctomycetota</i>				
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Acetobacterales</i>	<i>Acetobacteraceae</i>	<i>Acetobacter</i> <i>Gluconobacter</i> <i>Gluconacetobacter</i> <i>Komagataeibacter</i>
		<i>Rhizobiales</i>	<i>Beijerinckiaceae</i>	<i>Falsochromobacterium</i>
			<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Allorhizobium</i> - <i>Neorhizobium</i> - <i>Pararhizobium</i> - <i>Rhizobium</i>
			<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>
				<i>Novosphingobium</i>
				<i>Zymomonas</i>
				<i>Methylobacterium</i> - <i>Methylorubrum</i>
		<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
	<i>Erwiniaceae</i>			<i>Erwinia</i> <i>Pantoea</i> <i>Tatumella</i>
	<i>Morganellaceae</i>			
	<i>Pectobacteriaceae</i>			<i>Lonsdalea</i> <i>Pectobacterium</i>
	<i>Yersiniaceae</i>			<i>Serratia</i> <i>Yersinia</i>
	<i>Pseudomonadales</i>		<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Xanthomonadales</i>		<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Frateuria</i> <i>Xanthomonas</i>

				<i>Pseudoxanthomonas</i> <i>Stenotrophomonas</i>
			<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Luteibacter</i>
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Caenimonas</i> <i>Variovorax</i>
			<i>Gallionellaceae</i>	<i>Candidatus Nitrotoga</i>
			<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Achromobacter</i> <i>Verticiella</i>
			<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Duganella</i>
<i>Synergistota</i>	<i>Synergistia</i>	<i>Synergistales</i>	<i>Synergistaceae</i>	<i>Aminobacterium</i>

5.2.5 Výsledky sekvenace DNA jablečné šťávy - houby

Kvasinky a plísňe byly u jablečné šťávy zastoupeny rody *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* a *Metschnikowia*. Marginálně byly zastoupeny také rody *Candida*, *Monilinia* a *Pichia*. Jednotlivé procentuální zastoupení čeledí je uvedeno v Tabulce 27 a procentuální zastoupení rodů v Tabulce 28.

Tabulka 27: Houby identifikované v jablečné šťávě – procentuální zastoupení čeledí

čeleď	Vzorek 7.10.2023 [%]	Vzorek 8.10.2023 [%]
<i>Aspergillaceae</i>	0	0,04
<i>Metschnikowiaceae</i>	7,05	11,58
<i>Pichiaceae</i>	0	0,83
<i>Rhynchogastremataceae</i>	0	0,05
<i>Saccharomycetaceae</i>	75,08	17,61
<i>Saccharomycetales_fam_Incertae_sedis</i>	0,06	0,68
<i>Saccharomycodaceae</i>	17,35	68,04
<i>Sclerotiniaceae</i>	0	0,18
Unknown	0,47	0,98

Tabulka 28: Houby identifikované v jablečné šťávě – procentuální zastoupení rodů

rod	Vzorek 7.10.2023 [%]	Vzorek 8.10.2023 [%]
<i>Candida</i>	0,06	0,68
<i>Hanseniaspora</i>	17,35	68,04
<i>Metschnikowia</i>	7,05	11,58
<i>Monilinia</i>	0	0,18
<i>Pichia</i>	0	0,83
<i>Saccharomyces</i>	75,05	17,61
<i>Other</i>	0,03	0,1
<i>Unknown</i>	0,47	0,98

Tabulka 29: Taxonomické zařazení hub identifikovaných u jablečné šťávy

Řád	Čeleď	Rod
<i>Eurotiales</i>	<i>Aspergillaceae</i>	
<i>Tremellales</i>	<i>Rhynchogastremataceae</i>	
<i>Saccharomycetales</i>	<i>Metschnikowiaceae</i>	<i>Metschnikowia</i>
	<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Saccharomyces</i>
	<i>Saccharomycodaceae</i>	<i>Hanseniaspora</i>
	<i>Pichiaceae</i>	<i>Pichia</i>
	<i>Saccharomycetales_fam_Incertae_sedis</i>	<i>Candida</i>
<i>Helotiales</i>	<i>Sclerotiniaceae</i>	<i>Monilinia</i>

5.3 Diskuse

Vzorky višňové šťávy vykazují z hlediska mikrobiální skladby mezi sebou větší podobnost než vzorky jablečné šťávy. Višně, ze kterých se višňové šťávy jednotlivých šarží lisovaly, pocházely od jednoho dodavatele, pravděpodobně ze stejného sadu. Jednalo se o stejnou odrůdu. Sběr probíhal vždy stejným způsobem. Naopak jablečné šťávy se po mikrobiologické stránce v rámci jednotlivých šarží lišily výrazněji. Jablka pocházela z různých výkopen a z různých lokalit. Zcela určitě se jednalo také o různé odrůdy jablek, především padaných. Někdy spadla do trávy, někdy se ušpinila od hlíny, někdy tráva mohla být posekaná s počínajícím rozkladem. Mikrobiální skladba, kterou si s sebou jablka odvezla

do lisovny, mohla být hodně různá. Tam samozřejmě dochází k čištění a mytí při plavení jablek ze skládky do lisovny, ale voda se vyměňuje jednou za 8 hodin. Dalo by se tedy předpokládat, že se mezi sebou budou lišit jednak jednotlivé osmihodinové cykly, ale bude i rozdíl mezi šťávou na začátku tohoto cyklu a na konci tohoto osmihodinového cyklu. Jinak samozřejmě jablka jsou více odolná vůči mikrobiálnímu kažení. Oproti višním mají tužší slupku a vodní aktivita dužiny je u višně vyšší. Jablka navíc dozrávají v chladnějších měsících než višně.

Tepelné ošetření ovocných šťáv se ukazuje jako nejjistější způsob likvidace mikrobiální kontaminace ovocných šťáv, ale způsobuje určitou senzoryckou degradaci šťávy. Existují i netermální technologie, ale z nejrůznějších důvodů se používají minimálně. Hlavním důvodem je vysoká pořizovací cena, která pramení i z toho, že tyto technologie nejsou příliš rozšířeny a mají tudíž vysoké fixní náklady při jejich výrobě. Může z tohoto vyplývat i horší poskytovaný servis. V neposlední řadě mají tyto technologie oproti klasickým pasteračním zařízením nesrovnatelně nižší kapacitu. Může nastat také problém s kompatibilitou, např. tetrapakových linek. V české republice využívají dva producenti paskalizaci. KOFOLA a.s. takto ošetřuje čerstvě vylisovanou ovocno-zeleninovou šťávu UGO. Beskyd Fryčovice a.s. ošetřuje pomocí této technologie čerstvé šťávy REFIT.

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala výskytem mikroorganismů v ovocných šťávách a termálními i netermálními metodami ošetření ovocných šťáv a termálními i netermálními metodami výroby koncentrátů ovocných šťáv. Zvláštní pozornost byla věnována nepatogennímu sporulujícímu rodu *Alicyclobacillus*, který způsobuje kažení ovocných šťáv.

V praktické části byla provedena mikrobiologická analýza tří šarží višňové šťávy a tří šarží jablečné šťávy z produkce firmy LINEA NIVNICE a.s. V každé šarži se odebíraly čtyři vzorky. Surová šťáva po lisu, šťáva po pasteraci, šťáva po vyčeření a filtraci a koncentrát ovocné šťávy.

Z výsledků mikrobiologické analýzy je patrné, že oběma zkoumaným ovocným šťávám, višňové i jablečné, dominují kvasinky. Prostředí ovocných šťáv se svým nízkým pH a dostatkem zkvasitelných cukrů pro kvasinky ideální prostředí. Po tepelném ošetření pasterací nebyly detekovány žádné mikroorganismy. Vzhledem k tomu, že následující technologické kroky vyčeřování a filtrování neprobíhají asepticky, byla u obou šťáv po vyčeření a filtraci detekována významná kvasinková kontaminace. Určitá kvasinková kontaminace byla detekována i u konečného produktu koncentráту ovocné šťávy. Nicméně to připisují na vrub špatně provedenému odběru vzorku. Na odparce dochází k mnohem intenzivnějšímu tepelnému působení než u pasterace na začátku procesu, a tudíž výsledný koncentrát musí být sterilní.

Následně byla provedena izolace DNA ve šťávách přítomných mikroorganismů a po následné amplifikaci polymerázovou řetězovou reakcí, byly vzorky DNA odeslány na sekvenaci NGS, odkud jsme získali přehled procentuálního zastoupení jednotlivých rodů mikroorganismů ve višňové a jablečné šťávě. Ve višňové šťávě bylo detekováno velké množství bakteriálních i kvasinkových rodů. Mezi nejvíce procentuálně zastoupené patřily bakteriální rody *Tatumella*, skupina rodů *Escherichia-Shigella* a *Pseudomonas*, a rody kvasinek *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* a *Saccharomyces*. V jablečné šťávě byla skladba mikroorganismů ještě pestřejší. Zde dominovaly především bakteriální rody *Bacillus*, *Gluconobacter*, *Pantoea*, *Tatumella* a *Yersinia*, a stejně jako u višňové šťávy rody kvasinek *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* a *Saccharomyces*.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY 2012/12/EU, <https://esipa.cz/sbirka/sbsrv.dll/sb?DR=AZ&CP=02012L0012-20120427>
2. BATES R. P., MORRIS J. R., CRANDALL P. G., Principles and practises of small and medium scale processing, FAO Řím, 2001
3. RENARD Catherine M. G. C., MAINGONNAT Jean Francois, Thermal processing of fruits and fruit juices, Thermal Food Processing: New technologies and qualities issues, CRC Press Boca Raton, 2020
4. MOSQUEDA-MELGAR J. et al., Microbiological shelf life and sensory evaluation of fruit juices treated by high intensity electric fields and antimicrobials, Food and Bioproducts Processing, vol. 90, no. 2, pp. 205– 214, 2012
5. JIN Tony Z., ABOELHAGGAG Ramadan M., GUO Mingming, Apple Juice Preservation Using Combined Nonthermal Processing and Antimicrobial Packaging, Journal of Food Protection, Vol. 84, NO. 9, 2021
6. www.paskalizace.cz
7. McKAY A. M. et al. A comparative study of changes in the microbiota of apple juice treated by high hydrostatic pressure (HHP) or high pressure homogenisation (HPH), Food Microbiology, vol. 28, no. 8, pp. 1426–1431, 2011.
8. SCHOENBACH K. H. et al., Bacterial decontamination of liquids with pulsed electric fields. IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul. 7:637–645., 2000
9. MENDES-OLIVEIRA G., JIN T. Z., CAMPANELLA O. H., Modeling the inactivation of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium in juices by pulsed electric fields: the role of the energy density. J. Food Eng. 282, 2020
10. GÓMEZ-LÓPEZ V. M. et al., Pulsed light for food decontamination: a review. Trends Food Sci. Technol. 18:464–473, 2007
11. ANEJA Kamal Rai, Emerging Preservation Techniques for Controlling Spoilage and Pathogenic Microorganisms in Fruit Juices, International Journal of Microbiology, 2014

12. BEVILACQUA A., CORBO M. R., SINIGAGLIA M., Use of natural antimicrobials and high pressure homogenization to control the growth of *Saccharomyces bayanus* in apple juice,” *Food Control*, vol. 24, no. 1-2, pp. 109–115, 2012
13. RUPASINGHE H. P. V., YU L. J., Emerging preservation methods for fruit juices and beverages, v publikaci *Food Additive*, InTech, 2012, <http://www.intechopen.com/books/food-additive/emerging-preservation-methods-3-for-fruit-juices-and-beverages>
14. KOUTCHMA T., KELLER S., CHIRTEL S., PARISI B., Ultraviolet disinfection of juice products in laminar and turbulent flow reactors, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 5, no. 2, pp. 179–189, 2004.
15. TRAN T., FARID M., Ultraviolet treatment of orange juice, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 5, no. 4, pp. 495–502, 2004
16. CHENG C. et al., Comparison of the effects of novel processing technologies and conventional thermal pasteurisation on the nutritional quality and aroma of mandarin (*Citrus unshiu*) juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 64(June), Article 102425, 2020
17. VAN LUONG T. S. et al., Combined high pressure and heat treatment effectively disintegrates spore membranes and inactivates *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in acidic fruit juice beverage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 66(September), Article 102523, 2020
18. ZHAO Shuzhen et al., Evaluation of hybrid pressure-driven and osmotically-driven membrane process for non-thermal production of apple juice concentrate, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2022
19. BAGCI P. O., Effective clarification of pomegranate juice: A comparative study of pretreatment methods and their influence on ultrafiltration flux. *Journal of Food Engineering*, 141, 58–64, 2014
20. DOULIA D. S. et al., Removal of pesticides from white and red wines by microfiltration. *Journal of Hazardous Materials*, 317, 135–146, 2016
21. ZHANG K. et al., Exploration of food preservatives as draw solutes in the forward osmosis process for juice concentration. *Journal of Membrane Science*, 635(March), Article 119495, 2021

22. VANTARAKIS A. et al., Occurrence of microorganisms of public health and spoilage significance in fruit juices sold in retail markets in Greece, Anaerobe, 2011
23. SOSPEDRA I. et al., Incidence of microorganisms from fresh orange juice processed by squeezing machines, Food Control, 2012
24. AHMED Tasnia, DAS Kamal Kanta, UDDIN Md. Aftab, The Microbiological Quality of Commercial Fruit Juices-Current perspectives, Bangladesh Journal of Microbiology 2018
25. OSOPALE B. A. et al., A review of innovative techniques for rapid detection and enrichment of Alicyclobacillus during industrial processing of fruit juices and concentrates, Food control, 2019
26. SMIT Yvette et al., Alicyclobacillus spoilage and isolation - A review, Food Microbiology, 2011
27. CONCINA I. Et al., Alicyclobacillus spp.: Detection in soft drinks by Electronic Nose, Food Research International, 2010
28. SOURRI P. et al., Fruit Juice Spoilage by Alicyclobacillus: Detection and Control Methods - A Comprehensive Review, Foods, 2022
29. LEE S. et al., Growth evaluation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in fresh fruit and vegetable juices via predictive modelling. LWT – Food Science and Technology, 2022
30. https://cs.wikipedia.org/wiki/Endosymbiotick%C3%A1_teorie
31. HOLLIS D. G. et al., *Tatumella ptyseos* gen. nov., sp. nov., a Member of the Family Enterobacteriaceae Found in Clinical Specimens, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 1981
32. https://en.wikipedia.org/wiki/Aureobasidium_pullulans
33. https://en.wikipedia.org/wiki/Colletotrichum_acutatum
34. BRADY Carrie L., Transfer of *Pantoea citrea*, *Pantoea punctata* and *Pantoea terrea* to the genus *Tatumella* emend. as *Tatumella citrea* comb. nov., *Tatumella punctata* comb. nov. and *Tatumella terrea* comb. nov. and description of *Tatumella morbirosei* sp. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CFU	Colony Forming Unit
HPP	High Pressure Processing (paskalizace)
PEF	Pulsed Electric Field (pulzní el. pole)
HPH	High Pressure Homogenization (vysokotlaká homogenizace)
FO	Forwar Osmosis (dopředná osmóza)
NGS	New Generation Sequencing (sekvencování nové generace)
DNA	DeoxyriboNucleic Acid (deoxyribonukleová kyselina)
CHYGA	Chloramphenicol Yeast Glucose Agar
PCA	Plate Count Agar
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)
UV	UltraViolet (ultrafialové)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vzhled višně před lisováním.....	16
Obrázek 2: Skladování višně před lisováním.....	16
Obrázek 3: Sypání višně do drtiče.....	17
Obrázek 4: Detail drtiče.....	17
Obrázek 5: Detail drtiče.....	18
Obrázek 6: Transportní kamion po vyložení višně na váze.....	19
Obrázek 7: Skládka jablek před lisovnou.....	20
Obrázek 8: Detail skládky jablek před lisovnou.....	20
Obrázek 9: Vstup jablek do plavící komory.....	21
Obrázek 10: Lis Bucher HP5000.....	22
Obrázek 11: Lis Bucher HP5000i.....	22
Obrázek 12: Jímač aromatických látek značky Unipektin.....	23
Obrázek 13: Odparka značky Unipektin.....	24
Obrázek 14: Odparka značky Unipektin.....	25
Obrázek 15: Baterie čeřících tanků.....	26
Obrázek 16: Filtrační zařízení od firmy Destila.....	26
Obrázek 17: UV detekce DNA po PCR, vlevo višňová šťáva, vpravo jablečná šťáva.....	36

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Charakterizace analyzovaných vzorků višňových šťáv.....	32
Tabulka 2: Charakterizace analyzovaných vzorků jablečných šťáv.....	32
Tabulka 3: Přehled sekvenovaných vzorků.....	37
Tabulka 4: Počet mikroorganismů (CFU/ml) ve višňové šťávě šarže 1.....	38
Tabulka 5: Počet mikroorganismů (CFU/ml) ve višňové šťávě šarže 2.....	38
Tabulka 6: Počet mikroorganismů (CFU/ml) ve višňové šťávě šarže 3.....	38
Tabulka 7: Počet mikroorganismů (CFU/ml) v jablečné šťávě šarže 1.....	39
Tabulka 8: Počet mikroorganismů (CFU/ml) v jablečné šťávě šarže 2.....	39
Tabulka 9: Počet mikroorganismů (CFU/ml) v jablečné šťávě šarže 3.....	40
Tabulka 10: Koncentrace DNA izolované z višňové šťávy.....	42
Tabulka 11: Koncentrace DNA izolované z jablečné šťávy.....	43
Tabulka 12: Bakterie identifikované ve višňové šťávě – procentuální zastoupení kmenů...43	
Tabulka 13: Bakterie identifikované ve višňové šťávě – procentuální zastoupení tříd.....44	
Tabulka 14: Bakterie identifikované ve višňové šťávě – procentuální zastoupení řádů.....45	
Tabulka 15: Bakterie identifikované ve višňové šťávě – procentuální zastoupení čeledí...46	
Tabulka 16: Bakterie identifikované ve višňové šťávě – procentuální zastoupení rodů.....47	
Tabulka 17: Taxonomické zařazení bakterií identifikovaných u višňové šťávy.....48	
Tabulka 18: Houby identifikované ve višňové šťávě – procentuální zastoupení čeledí.....49	
Tabulka 19: Houby identifikované ve višňové šťávě – procentuální zastoupení rodů.....49	
Tabulka 20: Taxonomické zařazení bakterií identifikovaných u višňové šťávy.....49	
Tabulka 21: Bakterie identifikované v jablečné šťávě – procentuální zastoupení kmenů...50	
Tabulka 22: Bakterie identifikované v jablečné šťávě – procentuální zastoupení tříd.....50	
Tabulka 23: Bakterie identifikované v jablečné šťávě – procentuální zastoupení řádů.....51	
Tabulka 24: Bakterie identifikované v jablečné šťávě – procentuální zastoupení čeledí...52	
Tabulka 25: Bakterie identifikované v jablečné šťávě – procentuální zastoupení rodů.....54	

Tabulka 26: Taxonomické zařazení bakterií identifikovaných u jablečné šťávy.....	56
Tabulka 27: Houby identifikované v jablečné šťávě – procentuální zastoupení čeledí.....	57
Tabulka 28: Houby identifikované v jablečné šťávě – procentuální zastoupení rodů.....	58
Tabulka 29: Taxonomické zařazení hub identifikovaných u jablečné šťávy.....	58