



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

Monitoring termofilních organismů v odpařovacích zařízeních

Vypracovala: Michaela Válková

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Monika Bendová

České Budějovice 2015

Abstrakt

Práce se zabývá problematikou stanovení termofilních a termorezistentních mikroorganismů u vzorků odstředěného mléka. Dále pak problematikou stanovení termofilních mikroorganismů u vzorků syrovátky.

Mezi nejvýznamnější mikroorganismy způsobující kažení mléka a mléčných výrobků patří některé druhy rodů *Bacillus* a *Clostridium*.

Termofilní mikroorganismy mají optimální růstovou teplotu mezi 55 až 60 °C. Odebraný materiál (odstředěné mléko a syrovátka) byl vyočkován na GTK agar a kultivován v termostatu 3 dny, při 55 °C.

Termorezistentní mikroorganismy se vyznačují odolností vůči záhřevu. Před inokulací bylo třeba inaktivovat ostatní mikroorganismy pasterací mléka (85 °C, 10 minut). Naočkované Petriho misky byly kultivovány 3 dny, při 55 °C.

Analýzou odebraného materiálu bylo zjištěno, že počet termofilních mikroorganismů u vzorků odstředěného mléka nepřekračuje stanovenou interní hodnotu 3000 mikroorganismů na 1 mililitr nebo gram výrobku (limitní hodnota stanovena jihočeskou mlékárnou Madeta a.s.). Počet termorezistentních mikroorganismů nepřekročil limitní hodnotu 2000 mikroorganismů na 1 mililitr nebo gram výrobku.

Výsledné počty termofilních mikroorganismů u vzorků syrovátky byly téměř totožné s výsledky poskytnutými firmou Madeta a.s., závod Planá nad Lužnicí.

Z výsledků vyplývá, že po zavedení nových hygienických opatření počty termofilních a termorezistentních mikroorganismů výrazně klesly.

Klíčová slova: termofilní, termorezistentní, mikroorganismy, odstředěné mléko, syrovátka

Abstract

Study deals with the determination of thermophilic and heat-resistant microorganisms in samples of skim milk. Furthermore, the problems of determining the thermophilic microorganisms in samples of whey.

The most important microorganisms causing spoilage of milk and dairy products include certain species of the genera *Bacillus* and *Clostridium*.

Thermophilic microorganisms have optimum growth temperature between 55 and 60 ° C. Removed material (skimmed milk and whey) was plated onto agar GTK and cultured in an incubator for 3 days at 55 ° C.

Heat resistant microorganisms are characterized by resistance to heat. Prior to inoculation was necessary to inactivate other microorganisms by pasteurizing milk (85 ° C, 10 minutes). The inoculated Petri's dishes were cultured for 3 days at 55 ° C.

Analysing removed material, it was found that the number of thermophilic microorganisms in samples of skim milk does not exceed an internal limit the value of 3000 colonies per 1 ml or a gram of product (value determined Southbohemian dairy Madeta a.s.). The number of heat-resistant microorganisms has not exceeded the limit value of 2000 microorganisms per 1 milliliter or gram.

The resulting numbers of thermophilic microorganisms in samples of whey were almost identical to the results provided by Madeta a.s. factory Plana nad Luznici.

The results show that after the introduction of new sanitary measures numbers of thermophilic and heat-resistant microorganisms fell sharply.

Key words: thermophilic, heat resistant, microorganisms, skimmed milk, whey

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 10. 8. 2015

.....

Poděkování

Děkuji Ing. Monice Bendové za odborné vedení a pomoc při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla velmi poděkovat členům mikrobiologické laboratoře v Plané nad Lužnicí a v Jindřichově Hradci, za jejich ochotu a vstřícnost.

1 Obsah

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část	9
2.1 Termofilní organismy v mléce	9
2.1.1. Charakteristika	9
2.1.2. Rod Bacillus	10
2.1.3. Rod Clostridium	12
2.1.4. Zdroje kontaminace.....	13
2.2 Mléko.....	15
2.2.1. Požadavky na kvalitu syrového mléka.....	15
2.2.2. Mikrobiologie syrového mléka	16
2.3 Zpracování mléka	18
2.3.1. Svoz a příjem mléka.....	18
2.3.2. Odstředování	19
2.3.3. Standardizace tučnosti.....	20
2.3.4. Tepelné ošetření mléka	20
2.3.5. Homogenizace.....	20
2.3.6. Chlazení	21
2.4 Zahuštěné mléčné výrobky	22
2.4.1. Rozdělení	22
2.4.2. Výrobní zařízení.....	23
2.5 Sušené mléčné výrobky	25
2.5.1. Výrobní zařízení.....	25
2.6 Syrovátka a její využití	27
2.6.1. Vznik a složení.....	27
2.6.2. Laktóza jako prebiotikum	27
2.6.3. Úprava syrovátky před dalším zpracováním.....	28

2.6.4. Demineralizace.....	28
2.6.5. Zahušťování syrovátky	28
2.6.6. Krystalizace laktózy	29
2.6.7. Sušení syrovátky	29
3. Praktická část	30
3.1 Cíle práce	30
3.2 Hypotéza	30
3.3 Materiál.....	30
3.3.1. Odběr.....	30
3.3.2. Transport	31
3.4 Metodika	32
3.4.1. Stanovení termofilních mikroorganismů	33
3.4.2. Stanovení termorezistentních mikroorganismů	33
3.4.3. Metoda výpočtu	35
4. Výsledky	36
5. Diskuze	44
6. Závěr	46
7. Seznam použité literatury.....	47

1 Úvod

Díky svému biochemickému složení, velkému obsahu vody a téměř neutrálnímu pH je mléko výborným živným médiem pro růst mikroorganismů. Nehygienická manipulace s mlékem počty mikroorganismů zvyšuje, proto jsou nutná přísná hygienická opatření.

Zjišťování počtu mikroorganismů v mléce má velký význam, protože jejich přítomnost rozhoduje o vlastnostech suroviny i výrobku.

Mikroorganismy kontaminující mléko lze rozdělit podle jejich odolnosti vůči technologickým postupům a hygienické významnosti do třech základních skupin (termofilní, termorezistentní, psychrotrofní).

Termofilní bakterie se vyskytují v tepelně opracovaných mléčných konzervách a způsobují jejich kažení při nevhodných skladovacích teplotách. Termofilní mikroorganismy včetně sporotvorných bakterií převažují ve znehodnoceném mléce skladovaném pod 10 °C. Nejčastější zástupci termofilních bakterií jsou *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium thermosaccharolyticum* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Termorezistentní mikroorganismy mají schopnost přežívat pasterační teploty. Mezi termorezistentní mikroorganismy patří některé druhy rodů *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* a výjimečně i *Escherichia*. Ze sporulujících mikroorganismů jsou to např. *Ba. cereus*, *Ba. subtilis*, *Ba. coagulans*, *Cl. sporogenes*, *Cl. butyricum* a *Cl. perfringens*.

Kažení mléka a mléčných výrobků je doprovázeno výraznou změnou senzorických vlastností – změny vůně, vzhledu, chuti a konzistence. Mezi nejvýznamnější mikroorganismy způsobující kažení mléka a mléčných výrobků patří některé druhy rodů *Bacillus* a *Clostridium*.

2 Teoretická část

2.1 Termofilní organismy v mléce

2.1.1 Charakteristika

Mikroorganismy jsou schopny růstu v širokém teplotním rozmezí. Za předpokladu znalostí jejich teplotních nároků je možné zajistit účinnou ochranu potravin během výroby i skladování. Mikroorganismy lze rozdělit do několika skupin podle jejich optimální růstové teploty. (1)

Tab. 1 Rozdělení mikroorganismů podle jejich teplotních nároků. (1)

Skupina mikroorganismů	Teplota (°C)		
	minimální	optimální	maximální
psychrofilní	0 a méně	10 až 15	20
psychrotrofní	0 až +7	20 až 30	35
mezofilní	20	30 až 40	45
termofilní	45	55 až 65	90

V současné době chybí jednoznačná definice skupiny termofilních a termorezistentních bakterií. Do skupiny termofilních bakterií řadíme některé druhy rodu *Bacillus*, *Clostridium* a *Lactobacillus*. Některé druhy rodu *Bacillus* a *Clostridium* patří z potravinářského hlediska mezi důležité termofilní bakterie, jejichž spory jsou termorezistentní a jsou schopny přežívat pasterační i sterilační záhřevy. Mezi další termofilní bakterie patří druhy rodu *Lactobacillus*, který je využíván při výrobě mléčných produktů. (1)

Termorezistentní mikroorganismy jsou mikroorganismy odolné vůči záhřevu. Zařazení termorezistentních mikroorganismů do daného rodu, druhu nebo kmene zatím nebylo definováno, a proto se nejčastěji se vyskytující termorezistentní mikroorganismy přítomné v mléce u různých autorů liší. (2)

Někteří autoři řadí mezi termorezistentní mikroorganismy ty, které přežijí záhřev 63 °C/30 minut (*Microbacterium*, *Micrococcus*, *Alcaligenes* a spory rodů *Bacillus* a *Clostridium*). Jiní považují za termorezistentní mikroorganismy ty bakterie, které přežijí záhřev 72 °C/15 sekund (*Streptococcus*, *Micrococcus* a spory rodů *Bacillus* a *Clostridium*) apod. (2)

Nejčastěji se vyskytující termorezistentní mikroorganismy v mléce jsou již zmiňované druhy rodu *Bacillus* a *Clostridium*. Spory těchto rodů jsou schopny přežít pasteraci v provozních podmínkách mlékárny, a tak se mohou dostat až do finálních mléčných produktů. U výrobků, které nebyly ošetřeny UHT (Ultra-High Temperature - zahřátí 1 až 2 sekundy na teplotu 135 až 150 °C) nebo sterilací, je to velký problém. Především se jedná o sušené mléčné výrobky, pasterované mléko a další. (2)

Termofilní mikroorganismy se vyskytují v půdě, kompostech, chlévské mrvě, v uskladněném vlhkém materiálu (rašelině, seně, obilí), tzn. všude tam, kde ke zvýšení teploty na 45 až 50 °C přispěla činnost mezofilních mikroorganismů. Většina termofilních organismů má teplotní optimum růstu mezi 45 až 60 °C. (1)

Tab. 2 Teplota růstu, čas a teplota inaktivace jednotlivých sporotvorných bakterií. (3)

Sporotvorné bakterie	Teplota růstu (°C)			Čas a teplota inaktivace	
	Min.	Optimum	Max.	Vegetativní buňky (s/°C)	Spory (min/°C)
Ba. stearotherophilus	30 - 45	55 - 60	60 - 70	12 /85	8-15/121
Ba. cereus	5 - 20	30 - 37	45 - 48	10 /72	0,5/121
Ba. coagulans	15 -25	35 - 50	55 - 60	20 /72	3-5/121
Ba. licheniformis	15	30 - 45	50 - 55	20 /72	3-5/121
Ba. subtilis	6 - 20	30 - 40	45 - 55	20 /72	3-5/121
Cl. botulinum	3	25 - 40	48	20 /72	3-4/121
Cl. perfringens	8 - 20	45	50	20 /72	1-4/121

2.1.2 Rod *Bacillus*

Rod *Bacillus* náleží do čeledi Bacillaceae. (4) Rod *Bacillus* reprezentují gram-pozitivní, pohyblivé, aerobní nebo fakultativně anaerobní sporotvorné tyčinky. Jedná se o početný rod, hojně se vyskytující v přírodě. Bakterie rodu *Bacillus* mají enzymový aparát, díky kterému potraviny znehodnocují zejména štěpením škrobu a bílkovin. (1)

Většina zástupců rodu *Bacillus* roste v rozmezí teplot od 30 do 37 °C. Zástupce rodu *Bacillus* dělíme do skupin podle jejich teplotních nároků na psychrofilní (*Ba. weihenstephanensis*), mezofilní (např. *Ba. cereus*, *Ba. subtilis*) a termofilní (*Ba. licheniformis*, *Ba. stearothermophilus*). (5, 6)

Ba. cereus je technologicky nejdůležitější a současně i hygienicky rizikový bakteriální kontaminant mléka. *Ba. cereus* má teplotní optimum růstu při 30 °C, maximální teplota růstu je u jednotlivých kmenů v rozmezí od 37 °C do 48 °C. Minimální teplota růstu psychrofilních kmenů adaptovaných na mléko je 6 až 10 °C, mezofilních kmenů je 9 až 12 °C. Buňky *Ba. cereus* jsou gram-pozitivní, pohyblivé, o rozměrech 1,0 – 1,2 μm x 3 – 5 μm. Vyskytují se jednotlivě, ve dvojicích nebo řetězcích. (4)

Spory *Ba. cereus* jsou eliptické, umístěné uprostřed buňky. Vegetativní buňky nepřežívají pasterační záhřev 16 až 17 s při 72 °C, ale spory se tímto záhřevem mohou aktivovat. Tepelná aktivace klíčení spor většiny kmenů urychluje, avšak spory *Ba. cereus* aktivační záhřev k vyklíčení nepotřebují. (4) Spory *Ba. cereus* jsou termorezistentní a nejsou poškozovány obvyklým pasteračním záhřevem. Spory nepřežívají sterilizaci mléka v autoklávu při 110 °C a UHT proces při 134 °C. (6) Počet spor, které se dostanou do syrového kravského mléka při dojení, by se při dobrém hygienickém režimu měl pohybovat v rozmezí 0,2 až 10⁴ spor v litru mléka. V syrovém kravském mléce se může *Ba. cereus* vyskytovat ve formě vegetativních buněk i spor, v čerstvě pasterovaném mléce už jen ve formě spor. V sušeném rekonstituovaném nebo pasterovaném mléce se *Ba. cereus* dokáže pomnožit z původní hodnoty 1 až 100 bakterií/g na rizikovou hodnotu 10⁵/g během 6 hodin při 30 °C a během 9 až 10 hodin při 25 °C. (4)

Ba. cereus je nejznámějším zástupcem, produkující proteolytické enzymy, způsobující tzv. sladké srážení mléka. Zároveň produkuje i enzym lecitinázu, který způsobuje narušení membrány tukových kuliček a následnou agregaci tuku a srážení smetany. Rod *Bacillus* způsobuje kažení mléka ošetřeného UHT, zahuštěných mléčných výrobků nebo pasterovaného mléka. (7)

Kažení mléka a mléčných výrobků mohou způsobovat i některé další druhy rodu *Bacillus*: *Ba. sporothermodurans*, *Ba. stearothermophilus*, *Ba. subtilis*, *Ba. coagulans*, *Ba. licheniformis* a další. (8)

Ba. stearothermophilus je schopen přežít ošetření UHT, ale při teplotě menší než 30 °C není schopen růstu. (9) Nedávno objeveným druhem je *Ba. sporothermodurans*, který mléko znehodnotí pouze slabým zesvětlením. V 1 ml mléka málokdy dosáhne počtu vyššího než 10⁵. (10, 11)

Aerobní mikroorganismy se po usmrcení nesporelujících mikroorganismů zahřátím kultivují za aerobních podmínek. Metoda prokazuje počet živých spor schopných vyklíčit a tvořit kolonie. Je třeba provést inaktivaci vzorku záhřevem ve vodní lázni při teplotě 85 °C/10 minut a následně připravit vhodná ředění vzorku. Pro stanovení počtu termorezistentních mikroorganismů se používá živné medium s tryptonem a kvasničným extraktem (GTK agar). (12)

2.1.3 Rod *Clostridium*

Rod *Clostridium* náleží do čeledi Clostridiaceae. (4) Jedná se o gram-pozitivní, sporetvorné, anaerobní tyčinky. Z potravinářského hlediska jsou velmi důležité a jsou hojně rozšířeny v přírodě, v trávicím traktu zvířat a v silážích. Některé druhy jsou proteolytické a uplatňují se při anaerobním rozkladu bílkovin. (1)

Klostridia tvoří termorezistentní spory jejichž počet ani klíčivost se pasterací mléka nesníží. Pasterované mléko a z něho vyrobené mléčné výrobky mohou být kontaminovány spory ze syrového mléka, které prošlo pasterací, ale i postpasterační kontaminací z prostředí závodu, z nedostatečně vyčištěného výrobního zařízení nebo z ovzduší. Spory jsou hydrofobní, tudíž odolné k vyschnutí, v důsledku toho se snadno přenášejí vzduchem. (4)

Z konzervářského hlediska je důležitý termofilní druh *Cl. thermosaccharolyticum*, jehož optimální teplota růstu se pohybuje mezi 55 až 62 °C. Jeho velmi termorezistentní spory přežívají běžné sterilizační teploty používané u nekyselých konzerv. Při teplotách nižších 30 °C se nemůže rozmnožovat, a proto může způsobit kažení konzerv za tvorby plynu pouze při jejich skladování za vyšších teplot. (13)

Dalším zástupcem z rodu *Clostridium* je *Cl. perfringens*. *Cl. perfringens* jsou gram-pozitivní, nepohyblivé rovné tyčinky 0,9 až 1,3 μm x 3,0 až 9,0 μm. Vyskytují se jednotlivě, ve dvojicích nebo v krátkých řetězcích. Spory jsou oválné, umístěné terminálně nebo subterminálně. Vyskytuje se ve střevech člověka i hospodářských zvířat a vyskytuje se tedy i ve stolici a ve hnoji. Zdrojem kontaminace mléka spory tohoto druhu je siláž. Pro pomnožení a sporulaci klostridií siláže poskytují nutričně bohaté a anaerobní prostředí. (4)

Kažení mléka a mléčných výrobků mohou způsobovat i některé další druhy z rodu *Clostridium*: *Cl. sporogenes*, *Cl. tyrobutiricum*, a *Cl. botulinum*.

Druhy *Cl. botulinum* a *Cl. perfringens* způsobují otravy z jídla. *Cl. botulinum* produkuje nebezpečné neurotoxiny (botulotoxiny), které jsou ovšem termolabilní a lze je jednoduše inaktivovat varem. (1)

Anaerobní mikroorganismy způsobují znehodnocení jakosti v uzavřených výrobcích. Kultivace za anaerobních podmínek se provádí např. pomocí anaerostatů. Při kultivaci ve zkumavkách s parafin-vazelínovou zátkou se jako živné médium pro anaerobní bakterie používá tekutá půda nebo sterilní odstředěné mléko. Zkumavky se inkubují 5 dnů při 37 °C. Za pozitivní se posuzují zkumavky, ve kterých došlo ke koagulaci či peptonizaci mléka. Sleduje se i tvorba plynu a vytlačení zátky. Vyhodnocení se provádí podle příslušných norem (12, 14).

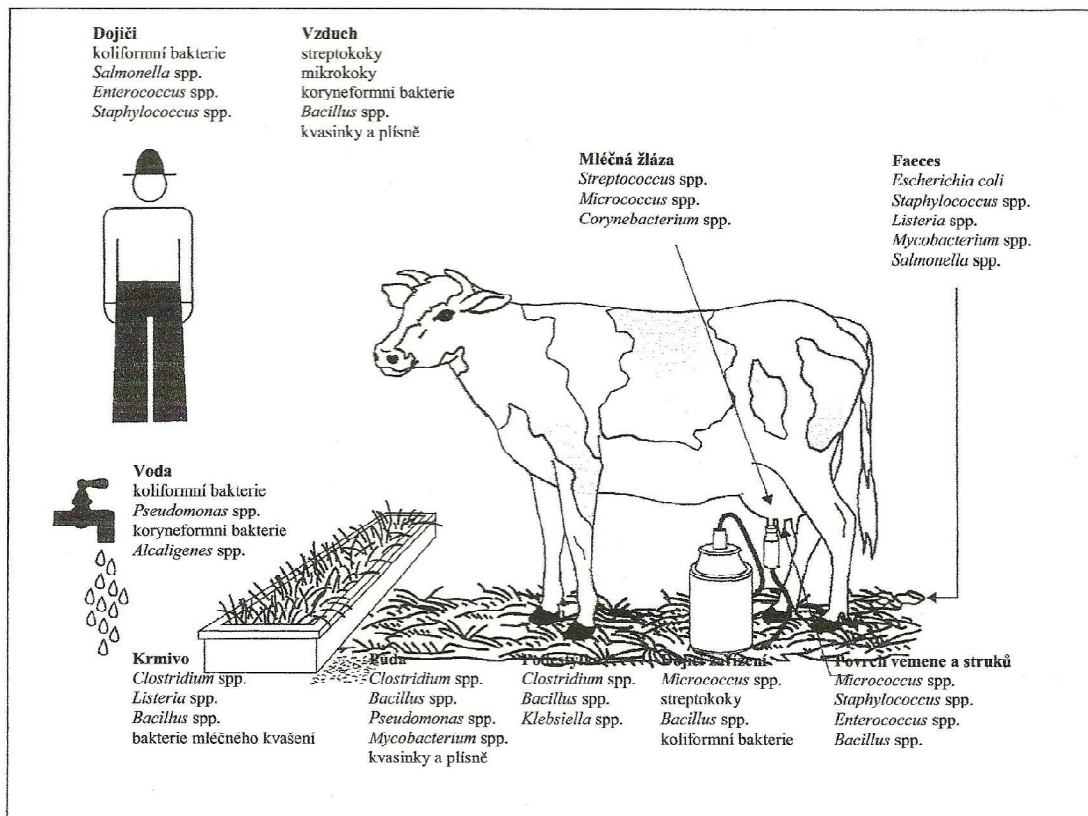
2.1.4 Zdroje kontaminace

U mléka rozeznáváme primární a sekundární mikroflóru.

Primární mikroflóra se do mléka dostává ještě před dojením a to buď krevním oběhem, nebo strukovým kanálkem. Kontaminace mléka mikroorganismy krevním oběhem je u zdravých dojnic zanedbatelná, neboť v krvi přítomné fagocytující buňky a protilátky brání průniku mikroorganismů z GIT do krve a dále do mléka. Průnik mikroorganismů strukovým kanálkem je běžnější způsob kontaminace mléka. Primární mikroflóra nemá velký vliv na jakost a trvanlivost mléka. (7)

Mikroflóra sekundární kontaminuje mléko při dojení a dále při jeho dalším zpracování. Povrchy těla dojnice, krmivo, stelivo, výkaly, dojící zařízení, úchovné tanky, vzduch, voda a dojiči jsou hlavními sekundárními zdroji kontaminace mléka. (7)

Obr. 1 Zdroje mikrobiální kontaminace syrového mléka. (7)



2.2 Mléko

Mléko je sekret mléčné žlázy savců určený k prvotní výživě mláďat. Jedná se proto o potravinu, obsahující všechny nutričně významné látky. (15) Největší význam mléka spočívá v jeho velmi dobře využitelném zdroji vápníku. Dále mléko obsahuje bílkoviny, mléčný tuk, který je zdrojem řady vitamínů a minerálních látek. (7)

Pro průmyslové zpracování a lidskou výživu se využívá především mléko kravské, v mnohem menší míře se využívá mléko buvolí, kozí a ovčí. (15)

Tab. 3 Detailní složení mléka. (1)

pH	6,5 až 6,7
Voda	87,5 %
Sušina	12,5 %
Bílkoviny	3,5 %
Laktóza	4,4 až 4,8 %
Tuk	3,5 až 4 %
Vitaminy	A, D, E, K, B1, B12 a C
Minerální látky	Ca, Mg, K

2.2.1. Požadavky na kvalitu syrového mléka

Mikrobiální čistota je nejvýznamnějším požadavkem na jakost syrového mléka.

Na trvanlivost mléka, ale i na technologické vlastnosti suroviny má mikrobiální čistota největší vliv. (15)

Při hodnocení mikrobiální kvality mléka jsou sledovány především následující skupiny:

- Koliformní bakterie – jsou inaktivovány při pasteraci.
- Termorezistentní organismy – mohou přežívat pasterační záhřev.

- Psychrofilní mikroorganismy - pasterací mléka jsou usmrceny, ale produkují termorezistentní proteázy a lipasy, které zhoršují technologické vlastnosti mléka a způsobují chuťové vady mléka a mléčných výrobků. (15)

Mezi hlavní faktory ovlivňující vlastnosti mléka patří plemeno dojnice, stadium laktace, zdravotní stav dojnice a hygiena získávání mléka. (16)

Základní požadavky na vlastnosti mléka přijímaného ke zpracování jsou:

- Mléko musí pocházet od zdravých dojnic – hodnocení podle počtu somatických buněk.
- Nesmí obsahovat inhibiční látky – rezidua antibiotik nebo dezinfekční a čistící prostředky.
- CPM by neměl překročit 100 000 KTJ/ml.
- Mléko musí mít neporušené složení, např. podle obsahu tuků a bílkovin, bodu tuhnutí vody v mléce a podle titrační kyselosti.
- Musí být dodržena teplota uchovávání při 4 až 6 °C.
- Sensorické vlastnosti mléka – barva, konzistence, vzhled, chuť a vůně musí být typické pro mléko bez zjevných změn, příchutí a pachů. (16, 15)

2.2.2. Mikrobiologie syrového mléka

Syrové mléko je mléko, které nebylo zahřáto na více než 40 °C nebo nebylo podrobena žádnému jinému ošetření majícímu srovnatelný účinek. (14)

Mikrobiologické změny jsou z hlediska důsledků (potencionální ohrožení zdraví konzumenta, snížení nutriční a sensorické hodnoty potraviny, znehodnocení potraviny) nejvýznamnějšími změnami, ke kterým v potravinách během zpracování a skladování dochází. Potravinářské suroviny a výrobky obsahují mikroorganismy, součástí každého technologického zpracování je vždy konzervační zákrok, který zastaví nebo zpomalí nežádoucí růst mikroorganismů. (17)

Mléko je vhodným médiem pro růst mikroorganismů, které mohou kvalitu mléka a mléčných výrobků ovlivnit jak kladně, tak i záporně. Při posuzování mikrobiologické jakosti mléka se klade důraz hlavně na stanovení CPM a dalších technologicky nepříznivých skupin mikroorganismů. Výskyt patogenních mikroorganismů je významný především ze zdravotnického hlediska. (18, 19)

Ke zdrojům kontaminace syrového mléka patří:

- Bakterie ze strukových kanálků (*Propionibacterium, Micrococcus, Enterococcus*)

- Mikroorganismy z povrchu vemene, z krmiva, z vody, z rukou ošetřovatelů, z prachu, z mléčného potrubí apod. (*E. coli* a rody: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* a *Clostridium*)

- Ze zánětu mléčné žlázy (*Streptococcus agalactiae*). (1, 20)

Rozvoj těchto bakterií v mléce závisí především na rychlosti zchlazení mléka po nadojení, na teplotě, při které je mléko skladováno a na celkové době skladování. (1)

2.3 Zpracování mléka

Mezi základní mlékárenské ošetření patří mechanické vyčištění a tepelné ošetření mléka. K vyčištění mléka od hrubých nečistot se používají filtry začleněné do potrubí na přívodu mléka. (21)

Aby byla zajištěna zdravotní nezávadnost a trvanlivost mléka, musí se veškeré mléko, které se zpracovává v mlékárenském závodě tepelně ošetřit. Toto ošetření se provádí na tzv. pasterační stanici, kde jsou zařazeny i další základní operace zpracování mléka společné pro řadu mlékárenských výrobků. (16)

Mezi ně patří:

- Odstředování mléka – rozdělení syrového mléka na odstředěné mléko (zbavené tuku) a smetanu.
- Standardizace tučnosti – zpětným smícháním odstředěného mléka a části smetany.
- Pasterace mléka – základní tepelné ošetření mléka.
- Pasterace smetany. (16)

V případě potřeby se provádí také:

- Homogenizace mléka – zmenšení velikosti tukových kuliček pod 1 μm za účelem minimalizace vyvstávání mléčného tuku při skladování tekutých výrobků z mléka.
- Deaerace – rozstříknutím teplého mléka nebo smetany do komory s vakuem se odstraní většina vzduchu a těkavých pachových látek Minimalizace obsahu vzduchu zmenšuje riziko oxidace tuku ve výrobcích a zlepšuje funkci celé řady zařízení.
- Baktofugace – odstranění sporotvorných mikroorganismů odstředivou silou. (15)

2.3.1. Svoz a příjem mléka

Prvním technologickým úkonem prováděným mlékárnou je svoz mléka. Kvalita mléka a mlékárenských produktů závisí na kvalitě a rychlosti svozu mléka. Jestliže není mléko svezeno do 2 hodin od nadojení, musí být zchlazeno na teplotu 4 až 8 °C/maximálně 20 hodin při denním svozu, nebo na teplotu 4 až 6 °C/maximálně 45 hodin při obdenním svozu. (22)

Mléko je sváženo v cisternách o přepravním objemu od 2 000 až do 24 000 litrů mléka. Cisternový svoz je ekonomicky efektivnější než dříve prováděný svoz mléka v konvích. Kontaminace mléka z povrchu přepravních nádrží je vzhledem k objemu přepravovaného

mléka podstatně nižší než při dopravě v konvích (je lepší možnost čištění a dezinfekce přepravní cisterny). (22)

Mléko se dostává do styku se znečištěnými povrchy (hadice, čerpadla, kohouty apod.). Během přepravy může dojít ke zhoršení mikrobiologické jakosti mléka, jestliže se podcení základní hygiena těchto částí. (23)

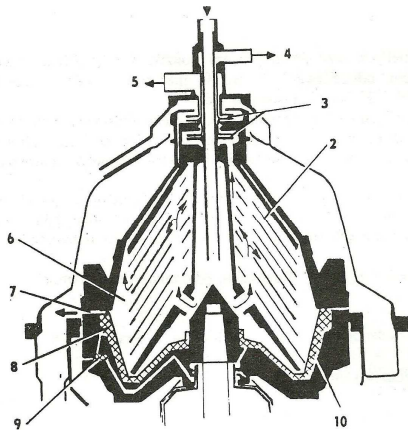
2.3.2. Odstředování

Na odstředivkách se provádí dokonalé vyčištění mléka, kde se působením odstředivé síly z mléka oddělí i nepatrné nečistoty a menší podíl mikroorganismů s vyšší měrnou hmotností než má mléko. (22)

Při odstředování plnotučného mléka se získá odstředěné mléko a smetana. Při odstředování se mléčná plasma (těžší složka mléka) soustřeďuje blízko stěny bubnu a smetana (lehčí složka mléka) je vytlačována směrem do středu k ose otáčení. Nečistoty jsou vyneseny odstředivou silou až na stěnu bubnu, kde vytvářejí kal.

V mlékárenském průmyslu se používá více druhů odstředivek – čistící, odsmetaňovací, tvarohářské a baktofugační. (21)

Obr. 2 Řez bubnem samo-odkalovací odstředivky (21)



1 - přívod mléka, 2 - talíře, 3 - sběrač mléka, 4 - výtok smetany, 5 - výtok odstředěného mléka, 6 - kalový prostor, 7 - výtok kalů, 8 - posuvný uzávěr, 9 - ventil uzávěru, 10 - závěrná komora

2.3.3. Standardizace tučnosti

Úprava obsahu tuku v mléce se nazývá standardizace. Provádí se smísením smetany a odstředěného mléka v odpovídající objemu tak, aby bylo dosaženo požadované tučnosti mléka. Nejčastěji se používá standardizační zařízení. (18)

2.3.4. Tepelné ošetření mléka

Pod pojmem pasteurace se rozumí záhřev mléka nebo smetany na teploty pod 100 °C. Při pasteuraci dochází k usmrcení převážné části vegetativních buněk mikroorganismů. K chemickým změnám suroviny projevující se změnou chuti či výživové hodnoty dochází pouze minimálně. (15)

Základní cíle pasteurace jsou:

- Zajištění zdravotní nezávadnosti mléka
- Zvýšení trvanlivosti suroviny (výrobku)

Podle výšky teploty záhřevu a doby výdrže rozlišujeme několik způsobů pasteurace:

- Dlouhodobá (nízká) pasteurace – teplota 63 °C po dobu 30 minut, při této pasteuraci se chemické vlastnosti mléka téměř nemění. Nejméně používaný způsob pasteurace.
- Šetrná pasteurace – teplota 72 °C po dobu 15 sekund, je dosahováno vysokého pasteračního efektu. Přežívají pouze sporotvorné a některé termorezistentní mikroorganismy (např. z rodu *Bacillus*). Chuť a vlastnosti mléka jsou ovlivněny pouze minimálně.
- Vysoká pasteurace – teplota 85 °C po dobu 5 sekund, je dosahováno vyššího pasteračního efektu než u šetrné pasteurace. Dochází k denaturaci sérových bílkovin, ke změně rozpustného vápníku na koloidní formu a projevují se změny v chuti mléka (vařivá chuť). (21, 15)

2.3.5. Homogenizace

Homogenizace mléčného tuku je součástí technologického postupu celé řady mléčných výrobků, nemusí být proto prováděna přímo na pasterační stanici, ale je zařazena až při dalším zpracování mléka. (16)

Homogenizace mléka je mechanická operace, která se používá k roztříštění tukových kuliček na jemné disperzní částice. Cílem je zmenšit tukové kuličky pod 10 µm a tím minimalizovat vyvstávání mléčného tuku při skladování tekutých mléčných výrobků.

Homogenizace mléka se dosahuje protlačením mléka úzkou štěrbinou (0,1 mm) pod vysokým tlakem (5 až 25 MPa). Obvykle se homogenizace provádí při 55 až 80 °C. (15)

2.3.6. Chlazení

Cyklus ošetření mléka v mlékárenských závodech končí ochlazením mléka, aby nedošlo k pomnožení mikroorganismů. Děje se tak kontinuálně v přímé návaznosti na tepelné ošetření mléka. Ochlazením mléka nejlépe na 5 °C se vytvoří podmínky, kdy ustává schopnost růstu mikroorganismů. K ochlazení mléka dochází na deskovém výměníku tepla, který je součástí pastéru. Pasterované mléko, které není ihned zpracováno je skladováno v zásobních tancích (stojaté válcovité nádoby). (21, 18)

2.4 Zahuštěné mléčné výrobky

Při výrobě sušeného mléka se dosahuje odstranění vody ve dvou stupních. Nejprve je mléko zahušťováno na odparce na sušinu např. 45 až 50 % a teprve pak je sušeno, obvykle v rozprašovací sušárně, na výslednou sušinu 96 až 98 %. Důvodem je především nižší energetická náročnost zahušťování. (16). Potřeba odpaření 1 kg vody je při zahušťování 5 až 10 krát nižší než v sušárně. (22)

2.4.1. Rozdělení

Díky částečnému odstranění vody se zahuštěné mléčné výrobky vyznačují relativně dlouhou trvanlivostí a dlouhodobou skladovatelností. (18)

Zahuštěné mléčné výrobky neslazené

Obvykle se vyrábí jako plnotučné mléko s obsahem sušiny 26 až 31 % s tučností 8 až 9 %. Hlavním problémem při výrobě je termolabilita zahuštěného mléka. Pro zlepšení termolability se využívá přídavek stabilizačních solí, které zabrání vysrážení bílkovin při sterilaci. Významný je i požadavek optimálního kyselosti syrového mléka. Mléko o vyšším pH, by se sráželo a napalovalo na trubky odparky. (15, 16)

Standardizované mléko se pasteruje po dobu 1 až 5 minut při 115 až 120 °C. Pasterované mléko se následně zahušťuje na odparkách na obsah sušiny až 31%. Zahuštěné mléko se homogenizuje (při teplotě 60 až 70 °C a tlaku 10 až 18 MPa), aby se nevytvářela kožovitá vrstva tuku na povrchu mléka. Po homogenizaci se mléko chladí na 4 až 6 °C a čerpá se do zásobních nádrží. (18)

Neslazené mléčné výrobky se naplní do plechovek, které se poté sterilují. Sterilace plechovek se provádí v autoklávu při teplotě okolo 115 °C po dobu 15 až 20 minut. Po sterilaci se plechovky chladí, aby nedošlo k jejich deformaci. (18)

Zahuštěné mléčné výrobky slazené

Nejčastěji se vyrábí jako mléko s obsahem mléčné sušiny 28 až 31 % a tučností 8 až 9%. Trvanlivost výrobku je dosažena přídavkem cukerného sirupu, který ve výrobku vytváří hypertonické prostředí. Výrobek se vyznačuje vysokou viskozitou a při skladování za zvýšené teploty má sklon k houstnutí. Při výrobě je nutné zajistit rychlou krystalizaci, aby vzniklé krystalky byly menší než 10 µm, větší způsobují písčitosť a mohou se usazovat. (15, 22)

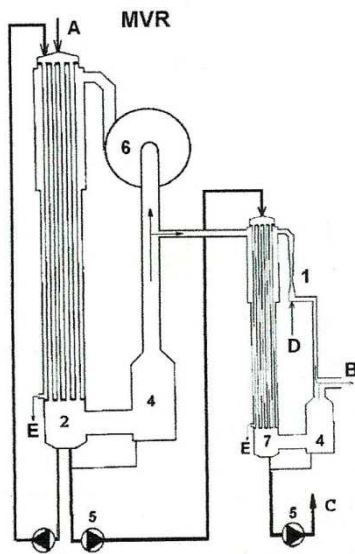
Standardizované mléko se homogenizuje (při teplotě 65 až 70 °C a tlaku 10 až 18 MPa), následuje pasteurace při teplotě 110 až 120 °C po dobu 1 až 5 minut. Pasterované mléko přechází do vyrovnávací nádrže, odkud se mléko čerpá do odparky. Mléko se zahušťuje na 35 až 40 % sušiny a následně se dohušťuje přidávkem cukerného roztoku až na 75 % sušiny. Zahuštěné mléko vystupující z odparky má teplotu 50 až 55 °C, chladí se rychle za intenzivního míchání na krystalizační teplotu 25 až 35 °C, poté se dochladí na 20 až 22 °C. Po vychlazení mléka na 22 °C a po krystalizaci laktózy se zahuštěné mléko přečerpává přes síta do uzavřených nádrží s míchadly. Produkt se zde nechá do druhého dne, kdy se dokončí krystalizace. (21, 15, 16)

Slazené zahuštěné mléčné výrobky se plní do plechovek nebo do tub. Obaly jsou ještě před plněním vysterilizovány. (18)

2.4.2. Výrobní zařízení

Nejvyužívanější zařízení na odpařování mléka jsou především vícestupňové trubkové odparky s mechanickou kompresí par a klesajícím filmem (tzv. MVR odparky - Mechanical Vapour Recompression). (21, 24)

Obr. 3 MVR odparka. (15)



A – přívod mléka, B – odvod brýdových par, C – zahuštěné mléko, D – ostrá pára, E – kondenzát

1 – termokompresor, 2 – 1. stupeň odparky, 4 - odlučovač brýdových par, 5 - čerpadlo zahuštěného mléka, 6 – mechanická komprese brýdových par, 7 – poslední stupeň odparky

Mléko stéká za sníženého tlaku v tenkém filmu po vnitřním povrchu dlouhých svislých trubek vyhříváných z druhé strany sytou parou a nastává zde rychlý odpar vody z mléka varem. Výhodou odparek s klesajícím filmem je umožnění nízkého rozdílu teplot, který by při zahušťování mléka neměl přesáhnout 5 °C, aby nedocházelo k denaturaci bílkovin mléka a jejich usazování v zařízení. (15, 24)

2.5 Sušené mléčné výrobky

Sušením mléčných surovin se dosáhne jejich konzervace a také redukce hmotnosti a objemu, která snižuje nároky na transport a skladování. Získané práškové produkty jsou snadno obnovitelné bez podstatné změny vlastností vstupní suroviny. (15)

Tab. 4 Průměrné složení sušených mlék. (21)

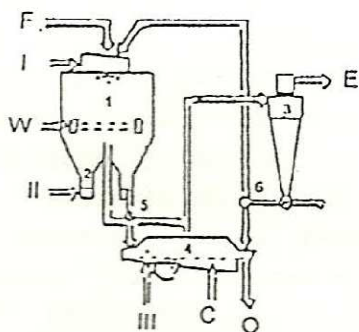
Sušené mléko	Plnotučné	Polotučné	Nízkotučné	Odtučněné
Obsah vody (%)	4	4	5	5
Obsah tuku (%)	min. 26,0	12 až 14	max. 8	max. 1,5
Obsah bílkovin (%)	26,6	29,5	33	34,9
Obsah sacharidů (%)	37,2	45,2	49,2	52

Další sušené mléčné výrobky jsou sušené mléčné výrobky pro kojeneckou výživu, sušená smetana, sušená syrovátka, sušené krmné směsi apod. (21)

2.5.1. Výrobní zařízení

Až na výjimky se mléko suší v rozprašovacích sušárnách.

Obr. 4 Kompaktní (třístupňová) sušárna. (25)



I, II a III – sušící vzduch pro 1., 2. a 3. fázi sušení

C – chladící vzduch, E – odcházející vzduch, F – přívod sušeného materiálu, O – výstup produktu, W - ofukování stěn

1 – sušící komora, 2 - stacionární fluidní lože, 3 – cyklon, 4 – vibrofluidní žlab, 5 – rotační ventil, 6 – recyklování jemných podílů

Zahuštěné mléko je rozprašeno v sušící komoře do proudu horkého vzduchu o teplotě 160 až 220 °C a během několika sekund vysušeno. Atomizace mléka se provádí rozprašovacím kotoučem nebo vysokotlakými tryskami. Většina vody (cca 70%) je odpařena během první sekundy sušení, poté se odpar vody zpomalí. Vlivem odpařené vody se teplota sušícího vzduchu snižuje. Aby nedocházelo ke změnám vlastností mléka, neměla by výstupní teplota přesáhnout 95 °C. Teplota sušeného mléka bývá o 20 až 30 °C nižší než je teplota výstupního vzduchu. (15)

Sušení je rozděleno do tří stupňů (sušící věž, pevné fluidní lože a stacionární vibrofluidní žlab). (25) V sušící věži je mléko vysušeno jen na obsah vody 10 až 12 % a pak padá na dno věže, kde je sušené ve fluidní vrstvě (integrované fluidní lože) a nakonec přechází do vibrofluidního žlabu na dosoušení a vychlazení. (16)

Vyrobený sušený produkt je skladován před balením v silech nebo je ihned balen do spotřebitelských obalů. Výrobky se skladují v suchých skladech při teplotě do 24 °C. (18)

2.6 Syrovátka a její využití

Dříve byla syrovátka považována za bezcenný odpad mlékárenského průmyslu a jediné využití měla jako součást krmiv. Vzhledem k současné vysoké koncentraci výroby sýrů a tvarohu její význam zásadně vzrostl, což souvisí s poznatky o výživové hodnotě a s rozvojem separačních metod. (26)

Syrovátku lze využít např. jako krmivo, k výživě lidí či pro technické účely. (21)

2.6.1. Vznik a složení

Při výrobě sýrů a tvarohu odpadá velké množství syrovátky, které obsahuje ještě polovinu sušiny původního mléka. Složení syrovátky kolísá v závislosti na složení mléka a na použité technologii výroby sýrů a tvarohu. Syrovátka obsahuje syrovátkové bílkoviny, látky rozpustné (laktóza a minerální látky) a látky rozpustné vzniklé při výrobě (kyselina mléčná, degradační produkty bílkovin). (21,16)

Tab. 5 Složení čerstvé syrovátky. (21)

Složka	Sladká syrovátka	Kyselá syrovátka
Voda	93 až 94 %	94 až 95 %
Sušina	5 až 7 %	5 až 7 %
Laktóza	4,5 až 5 %	3,8 až 4,2 %
Tuk	0,5	0,1
Bílkoviny	0,8 až 1 %	0,8 až 1 %
Kyselina mléčná	stopy	až 0,8 %
pH	6,45	4,8 až 5,0

2.6.2. Laktóza jako prebiotikum

Laktóza (mléčný disacharid) je z hlediska výživy důležitá v procesu trávení a znovuvytvoření střevní mikroflóry po střevních infekcích. Znamená to, že laktóza je výhodná

jako prebiotikum (substrát schopný podporovat růst probiotických bakterií – především bifidobakterií a laktobacilů). Tyto bakterie štěpí laktózu a využívají ji pro růst, přičemž se vytvářejí výživově významné látky - vitaminy B2 a B12. (26)

2.6.3. Úprava syrovátky před dalším zpracováním

Syrovátka se v mlékárnách ošetřuje podobně jako mléko. Syrovátka z výrobníků, sýrařských van, odstředivek z výroby tvarohu apod. přechází přes síta, kde dochází k zachycení hrubších částic, do zásobní nádrže. (26)

Obsahuje-li syrovátka tuk, je nezbytné ho asi při 40 °C odstředit společně se sýrařským prachem, kvůli průběhu dalšího zpracování, kvalitě a stabilitě produktu.

Dalším nezbytným krokem je pasterace syrovátky. Před pasterací musí být syrovátka uchovávána minimální dobu při teplotě do 5 °C. Pasterace syrovátky obvykle probíhá při 72 až 78 °C po dobu 15 až 50 sekund. Po pasteraci se syrovátka uchovává při teplotě pod 10 °C. (26, 21)

2.6.4. Demineralizace

Dalším zásadním požadavkem pro efektivní zpracování syrovátky je tzv. demineralizace.

Demineralizace je proces, při kterém se ze syrovátky odstraňují kationty a anionty anorganických a organických sloučenin.

Demineralizovaná syrovátka je vhodná jako součást kojenecké výživy a je použitelná do většiny potravin (dietní potraviny, pekařské, cukrářské i masné výrobky). Demineralizaci lze provádět chromatograficky, pomocí iontoměničů, elektrodialýzou nebo membránovými technikami. (26, 16) Odsolená syrovátka představuje 90 až 95 % původní suroviny, koncentrát soli 5 až 10 %. (26)

2.6.5. Zahušťování syrovátky

Moderní možností zahušťování syrovátky je membránový postup zvaný reversní osmóza. Tento postup je vhodný jako předstupeň odpařování. Reversní osmóza se využívá v sýrárnách k předběžnému zahuštění všech mléčných složek s cílem snížení přepravních nákladů. Míra zahuštění dosahuje 20 až 25 %. Dříve se používaly acetát-celulózové membrány, ale vzhledem k tomu, že byly choulostivé na čištění a na teploty vyšší než 30 °C, se začaly používat membrány z kompozitu, které snášejí teploty až 80 °C a jsou odolné vůči sanitačním prostředkům. (27, 26)

Nejrozšířenějším způsobem zahušťování syrovátky je odpařování. Odpařování probíhá v trubkových odparech s klesajícím filmem ve vícestupňovém provedení s mechanickou kompresí brýdových par. Syrovátka, která vstupuje na odparku má teplotu 72 °C. Teploty v jednotlivých stupních vícestupňových odparek bývají mezi 39 až 68 °C. Lze tak dosáhnout zahuštění na 50 až 60 % sušiny. (26)

Zahuštěná syrovátka se ochladí na 56 °C a převádí se do krystalizačního tanku, kde následně probíhá krystalizace laktózy. (15)

2.6.6. Krystalizace laktózy

Krystalizace je proces, při kterém dochází k separaci látky z roztoku, plynu, taveniny, popřípadě z emulze. Při procesu krystalizace se vytváří krystalová mřížka. (27)

Kvantitativně nejvíce je v sušině syrovátky zastoupena laktóza. Vysoký obsah laktózy způsobuje potíže při zahušťování a sušení syrovátky. Pro usnadnění sušení a kvůli zabránění lepivosti výsledného prášku se před sušením provádí krystalizace laktózy. Krystalizace probíhá v krystalizačních tancích při řízeném chlazení z 56 °C až na výsledných 12 °C s rychlostí chlazení 3 °C za hodinu, celý proces trvá 15 hodin. Zhruba ze 70 % laktózy se vytvoří krystalky, které již nejsou na závadu při následném sušení. Laktóza nachází využití v kojenecké výživě, ve farmacii, jako složka fermentačních medií apod. (26, 16)

2.6.7. Sušení syrovátky

Sušení syrovátky probíhá na rozprašovací sušárně. Proveditelnost sušení závisí na viskozitě koncentráту. Viskozita koncentráту závisí především na teplotě, koncentraci a stupni krystalizace laktózy, dále na typu syrovátky, pH, obsahu bílkovin a na množství a velikosti krystalků laktózy. (26)

Sušicí zařízení tvoří rozprašovací sušárna s diskovým nebo s tryskovým rozprašovačem a vibrofluidní žlab, který je určený k dosoušení a chlazení. Výsledná sušená syrovátka obsahuje cca 95 % sušiny. (26)

Sušením syrovátky se sníží její původní objem a hmotnost (snížení nákladů na transport a skladování) a zároveň se dosáhne její konzervace. (15)

3 Praktická část

3.1 Cíle práce

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo shromáždit a předložit informace o současné problematice výskytu termofilních organismů v odpařovacím zařízení.

Mezi další cíle patří:

- Seznámení se s mikrobiologickými postupy v oblasti potravinářství.
- Příprava vzorků syrovátky a odstředěného mléka před vlastní mikrobiologickou analýzou.
- Porovnání výsledných počtů termofilních a termorezistentních mikroorganismů u odstředěného mléka s výsledky poskytnutými firmou Madeta a.s., závod Jindřichův Hradec.
- Porovnání výsledných počtů termofilních mikroorganismů u syrovátky s výsledky poskytnutými firmou Madeta a.s., závod Planá nad Lužnicí.

3.2 Hypotéza

Domnívám se, že po zavedení nových hygienických opatření budou výsledné počty termofilních a termorezistentních mikroorganismů nižší než před zavedením těchto opatření.

3.3 Materiál

Veškerý materiál, který byl použit pro mikrobiologické stanovení počtu termofilních a termorezistentních mikroorganismů, byl nasbírán pod odborným dohledem vedoucí mé bakalářské práce. Vzorky odstředěného mléka byly nasbírány v průběhu zahušťování a sušení v jihočeské mlékárně Madeta a.s., v závodě Jindřichův Hradec. V závodě Planá nad Lužnicí byly nasbírány vzorky syrovátky v průběhu zahušťování.

3.3.1. Odběr

Vzorky odstředěného mléka i syrovátky byly odebírány z 5 různých částí během procesu zahušťování a sušení.

Odstředěné mléko bylo odebíráno:

1. ze zásobních tanků
2. za odparkou
3. z tanku T₁ či T₂
4. před předeříváčem
5. sušené odstředěné mléko (produkt)

Tanky T₁ a T₂ slouží k přepouštění zahuštěného mléka. Po přepuštění tanku T₁ do T₂, tank T₁ prochází procesem čištění, aby nedocházelo k pomnožování bakterií. Střídání nádrží probíhá nejdéle po 3,5 hodinám bez ohledu na množství mléka v tanku.

Syrovátka byla odebírána:

1. z výrobníku
2. za odstředivkou
3. pasterovaná 6 % syrovátka
4. zahuštěná 18 % syrovátka
5. krystalizovaná syrovátka (60 %)

3.3.2. Transport

Odebrané vzorky byly převezeny v chladicím boxu o teplotě 4 až 6 °C do laboratoře firmy Madeta a.s. v Českých Budějovicích. Odebrané vzorky byly vždy zpracovány nejpozději do 24 hodin od náběru.

3.4 Metodika

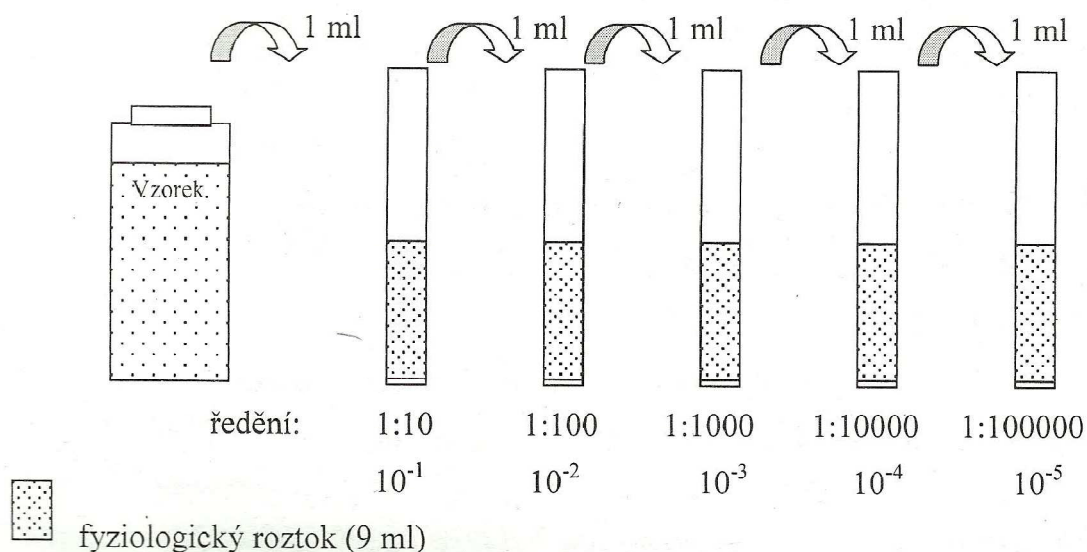
Podle druhu sledovaných mikroorganismů byla vybrána neselektivní nutričně bohatá živná půda GTK agar.

Tab. 6 Složení GTK agaru. (28)

Složka	Hmotnost složky (g)
Trypton	5,0
Kvasničný extrakt	2,5
Glukóza	1,0
Agar	15

Živná půda se uchovává v temnu při teplotě od 2 do 8 °C ne déle než 3 měsíce za podmínek, které neumožňují jakoukoli změnu jejího složení a vlastností. Před začátkem mikrobiologického zkoušení se půda úplně roztaví a před použitím se ochladí na teplotu 44 až 47 °C. Rozehřátý agar se použije co nejdříve, neměl by být uchováván déle než 4 hodiny. Vlastní rozbor vzorku byl proveden přelivem, přičemž byly naočkovány 4 po sobě jdoucí ředění.

Obr. 5 Příprava desetinásobného ředění vzorku. (29)



Naočkované misky se musí přelit nejdéle do 20 minut po naočkování, aby nedošlo ke znehodnocení vzorku (vyschnutí, usmrcení bakterií).

Petriho misky se v termostatu kultivují dnem vzhůru, jinak by kondenzovaná voda z víčka kapala na kolonie a mohla je znehodnotit. Po kultivaci se odpad likviduje autoklávováním (120 °C/30 minut), přičemž se musí takto likvidovat i plotny, na kterých nic nenarostlo.

3.4.1. Stanovení termofilních mikroorganismů

Termofilní mikroorganismy tvoří počítatelné kolonie při růstové teplotě 55 až 60 °C.

Příprava vzorku sušeného odstředěného mléka

Bylo naváženo 10 g vzorku sušeného odstředěného mléka a následně obnoveno v 9 ml fyziologického roztoku a důkladně promícháno na třepačce. Do Petriho misky byl sterilní pipetou vyočkován 1 ml takto připraveného naředěného vzorku (ředění 10^{-1}). Do další sterilní Petriho misky byl novou sterilní pipetou přenesen 1 ml ředění 10^{-2} . Tento postup byl opakován až do ředění 10^{-3} vždy s novou sterilní pipetou.

Příprava vzorku zahuštěného odstředěného mléka a syrovátky

Do sterilní zkumavky bylo odměřeno 10 ml vzorku zahuštěného odstředěného mléka nebo syrovátky. Sterilní pipetou byl přenesen 1 ml vzorku do sterilní zkumavky s 9 ml fyziologického roztoku, vzorek (ředění 10^{-1}) byl promíchán na třepačce a vyočkován na Petriho misku. Dále byl postup očkování jednotlivých ředění stejný jako u vzorku sušeného odstředěného mléka.

Inokulum v každé Petriho misce se přelije 12 až 15 ml agaru o teplotě 44 až 47 °C. Inokulum se s půdou pečlivě promíchá kolébáním Petriho misek a směs se nechá utuhnout ponecháním Petriho misek na chladné vodorovné ploše. Po úplném ztuhnutí půdy se plotny obrátí dnem vzhůru a umístí se do termostatu o teplotě 55 °C. Vzorky se v termostatu inkubují aerobně 72 hodin, po 3 dnech se počítají narostlé kolonie. (30)

3.4.2. Stanovení termorezistentních mikroorganismů

Termorezistentní mikroorganismy jsou mikroorganismy odolné vůči záhřevu. Před inokulací je třeba inaktivovat ostatní mikroorganismy záhřevem při 85 °C po dobu 10 minut. Tento záhřev se nejvíce přibližuje požadavku, aby přítomné spory přežily v původním počtu, zatímco vegetativní buňky a nesporetvorné mikroorganismy byly záhřevem usmrceny.

Aby se při přípravě vzorku zamezilo vyklíčení spor, nesmí doba mezi přípravou prvního ředění a tepelnou inaktivací vzorku přesáhnout 10 minut a teplota ředících roztoků by měla být co nejnižší. (2)

Metoda prokazuje počet živých spor schopných vyklíčit a tvořit kolonie. (12)

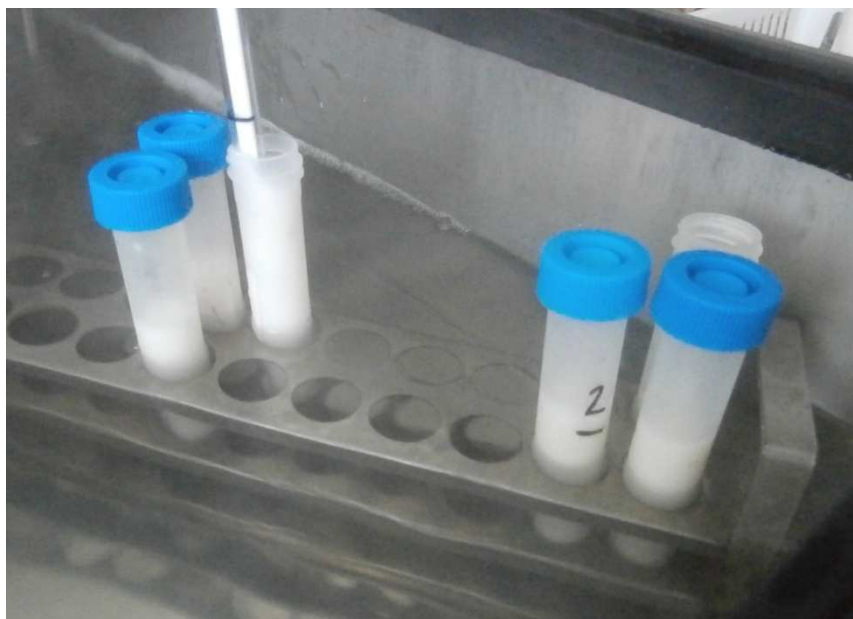
Příprava vzorku sušeného odstředěného mléka

Do zkumavky bylo odměřeno 10 ml obnoveného vzorku mléka. Takto odměřený vzorek byl vložen do vyhřáté vodní lázně. Současně byla měřena teplota v duplikátní zkumavce, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku mléka mikroorganismy z nesterilního teploměru. Když teplota vzorku dosáhla na 85 °C, vzorek byl zahříván při této teplotě s výdrží 10 minut. Po uplynutí 10 minut, byl vzorek inaktivován a následně ochlazen ve vodní lázni na 10 °C.

Příprava vzorku zahuštěného odstředěného mléka

Do zkumavky bylo odměřeno 10 ml vzorku zahuštěného odstředěného. Takto připravený vzorek byl vložen do vyhřáté vodní lázně a zahříván na 85 °C (teplota byla též měřena teploměrem v duplicitní zkumavce se vzorkem zahuštěného odstředěného mléka nebo syrovátky). Když teplota vzorku dosáhla na 85 °C, vzorek byl zahříván při této teplotě s výdrží 10 minut. Po uplynutí 10 minut byl vzorek též inaktivován a ochlazen ve vodní lázni na 10 °C.

Obr. 6 Inaktivace vzorku ve vodní lázni.



Díky vysoké hustotě zahuštěného vzorku odstředěného mléka došlo při záhřevu na 85 °C k utužení vzorku. Byl odvážen 1 g tuhého vzorku a důkladně roztřepán s 9 ml fyziologického roztoku.

Inokulum v každé Petriho misce je následně též přelito 12 až 15 ml agaru a krouživými pohyby promícháno. Po utužení půdy se plotny obrátí dnem vzhůru a umístí se do termostatu o teplotě 55 °C. (30)

Vzorky se inkubují aerobně 72 hodin, po uplynutí této doby se počítají narostlé kolonie. (2).

3.4.3. Metoda výpočtu

Pro výpočet byly použity misky obsahující ne více než 300 kolonií ve dvou po sobě jdoucích ředěních. Je nutné, aby jedna z těchto misek obsahovala alespoň 15 kolonií.

Počet mikroorganismů N na mililitr nebo gram výrobku byl vypočten podle tohoto vzorce:

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

kde ΣC je součet všech kolonií spočítaných na vybraných plotnách

n_1 je počet ploten použitých pro výpočet z prvního ředění

n_2 je počet ploten použitých pro výpočet ze druhého ředění

d je faktor prvního pro výpočet použitého ředění.

Výsledek se vyjádří jako počet termofilních mikroorganismů nebo počet termorezistentních mikroorganismů na mililitr nebo gram výrobku. (30)

4 Výsledky

Práce byla zaměřena na stanovení počtu termofilních a termorezistentních mikroorganismů u vzorků odstředěného mléka a stanovení počtu termofilních mikroorganismů u vzorků syrovátky.

V případě odstředěného mléka byly nabírány vzorky v průběhu zahušťování a sušení, vzorky syrovátky byly nabírány v průběhu zahušťování. Zahuštěná krystalická syrovátka se v závodě Planá nad Lužnicí dále nezpracovává, její další zpracování (sušení) probíhá ve firmě Meggle s.r.o.

Vzorky odstředěného mléka byly nabírány v rozmezí dvou týdnů v letním měsíci červen, v závodě Jindřichův Hradec. První odběr byl proveden 15. 6. 2015, druhý byl proveden následující týden 24. 6. 2015. Mé naměřené výsledky byly porovnány s výsledky ze dne 20. 12. 2013 poskytnutými firmou Madeta a.s. před zavedením přísnějších hygienických opatření. Celkem bylo naměřeno 40 vzorků odstředěného mléka a porovnáno se 40 vzorky poskytnutými firmou Madeta a.s.

Vzorky syrovátky byly pořízeny dne 30. 6. 2015 a porovnány s výsledky naměřenými v závodě Planá nad Lužnicí, dne 14. 1. 2014. Celkem bylo naměřeno 20 vzorků syrovátky a porovnáno s 20 vzorky syrovátky poskytnutými firmou Madeta a.s.

Výsledné počty udávají počet termofilních mikroorganismů nebo počet termorezistentních mikroorganismů na mililitr nebo gram výrobku.

Tab. 7 Výsledné počty termofilních mikroorganismů u odstředěného mléka.

Vzorek	Popis	Čas (h)	Prosinec *	Červen **
1.	Mléko pasterované S ₁ /S ₂	1.	85	250
2.	Mléko zahuštěné za odparkou	1.	425	980
3.	Mléko zahuštěné tank T ₂ /T ₁	1.	135	330
4.	Mléko zahuštěné před předeříváčem	1.	30	410
5.	Mléko sušené odstředěné	1.	500	990
6.	Mléko pasterované S ₁ /S ₂	2.	125	420
7.	Mléko zahuštěné za odparkou	2.	330	990
8.	Mléko zahuštěné tank T ₁ /T ₂	2.	350	580
9.	Mléko zahuštěné před předeříváčem	2.	100	700
10.	Mléko sušené odstředěné	2.	600	950
11.	Mléko pasterované S ₁ /S ₂	3.	50	500
12.	Mléko zahuštěné za odparkou	3.	100	790
13.	Mléko zahuštěné tank T ₁ /T ₂	3.	105	1 030
14.	Mléko zahuštěné před předeříváčem	3.	245	790
15.	Mléko sušené odstředěné	3.	30 000	1 300
16.	Mléko pasterované S ₂ /S ₂	4.	30 000	580
17.	Mléko zahuštěné za odparkou	4.	210	1 200
18.	Mléko zahuštěné tank T ₁ /T ₂	4.	100	870
19.	Mléko zahuštěné před předeříváčem	4.	80	620
20.	Mléko sušené odstředěné	4.	500	1 450
21.	Mléko pasterované S ₂ /S ₄	5.	30 000	410
22.	Mléko zahuštěné za odparkou	5.	360	1 350
23.	Mléko zahuštěné tank T ₁ /T ₁	5.	4 100	1 500
24.	Mléko zahuštěné před předeříváčem	5.	1 350	1 500
25.	Mléko sušené odstředěné	5.	320	2 050
26.	Mléko pasterované S ₂ /S ₄	6.	30 000	870
27.	Mléko zahuštěné za odparkou	6.	760	1 700
28.	Mléko zahuštěné tank T ₂ /T ₁	6.	3 700	1 700
29.	Mléko zahuštěné před předeříváčem	6.	30 000	1 240
30.	Mléko sušené odstředěné	6.	30 000	1 200
31.	Mléko pasterované S ₂ /S ₄	7.	30 000	700

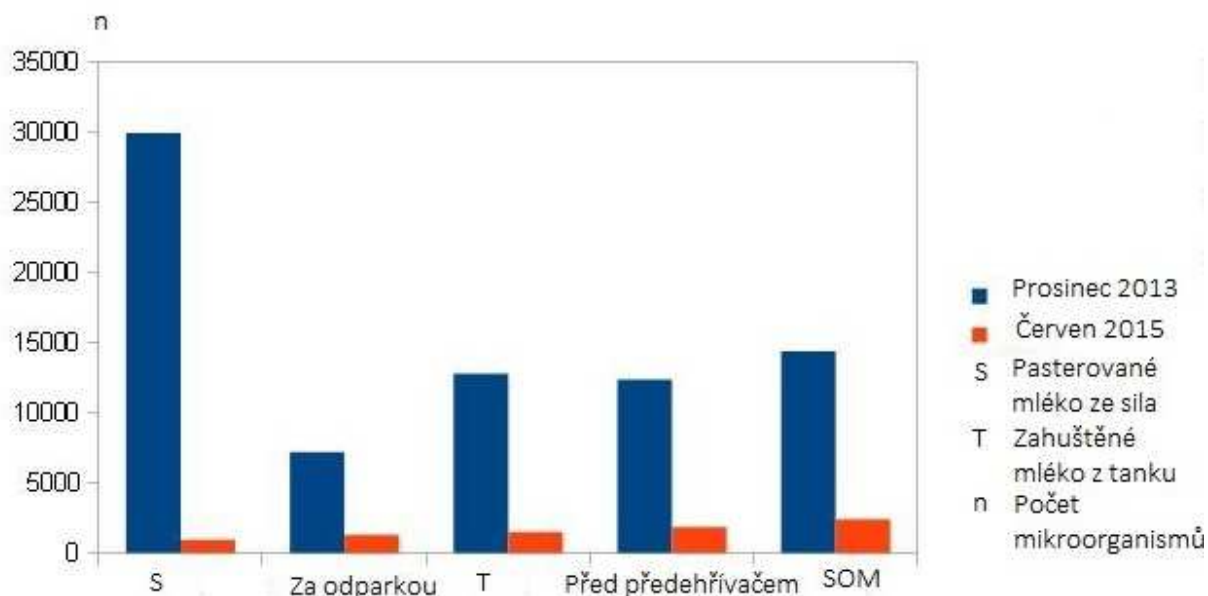
Vzorek	Popis	Čas (h)	Prosinec *	Červen **
32.	Mléko zahuštěné za odparkou	7.	20 400	2 000
33.	Mléko zahuštěné tank T ₂ /T ₁	7.	1 100	1 500
34.	Mléko zahuštěné před přehříváčem	7.	3 100	2 200
35.	Mléko sušené odstředěné	7.	9 800	1 200
36.	Mléko pasterované S ₂ /S ₄	8.	30 000	950
37.	Mléko zahuštěné za odparkou	8.	7 200	1 300
38.	Mléko zahuštěné tank T ₂ /T ₂	8.	12 800	1 500
39.	Mléko zahuštěné před přehříváčem	8.	12 400	1 850
40.	Mléko sušené odstředěné	8.	14 400	2 400

* naměřené vzorky jihočeské mlékárny Madeta a.s. za prosinec 2013

** mé naměřené vzorky za červen 2015

V Tab. 7 jsou porovnány mé naměřené výsledné počty termofilních mikroorganismů s výsledky naměřenými firmou Madeta a.s., Jindřichův Hradec.

Graf 1 Přehled kolísání počtu termofilních mikroorganismů během 8. hodiny sušení odstředěného mléka.



Z grafu č. 1 je patrné, že počty termofilních mikroorganismů naměřené v červnu 2015 jsou výrazně nižší, než v prosinci 2013. Zatímco v prosinci 2013 byla naměřena hodnota 14 400 mikroorganismů v 1 mililitru vzorku sušeného odstředěného mléka, v červnu byla naměřena hodnota pouze 2 400 mikroorganismů v 1 mililitru vzorku odstředěného mléka.

Tab. 8 Výsledné počty termorezistentních mikroorganismů u odstředěného mléka.

Vzorek	Popis	Čas (h)	Prosinec *	Červen **
1.	Mléko pasterované S ₁ /S ₂	1.	200	410
2.	Mléko zahuštěné za odparkou	1.	630	540
3.	Mléko zahuštěné tank T ₂ /T ₁	1.	140	290
4.	Mléko zahuštěné před přehříváčem	1.	30 000	330
5.	Mléko sušené odstředěné	1.	4 800	450
6.	Mléko pasterované S ₁ /S ₂	2.	100	620
7.	Mléko zahuštěné za odparkou	2.	100	410
8.	Mléko zahuštěné tank T ₁ /T ₂	2.	200	540
9.	Mléko zahuštěné před přehříváčem	2.	100	620
10.	Mléko sušené odstředěné	2.	400	650
11.	Mléko pasterované S ₁ /S ₂	3.	400	540
12.	Mléko zahuštěné za odparkou	3.	100	450
13.	Mléko zahuštěné tank T ₁ /T ₂	3.	100	620
14.	Mléko zahuštěné před přehříváčem	3.	90	580
15.	Mléko sušené odstředěné	3.	300	700
16.	Mléko pasterované S ₂ /S ₂	4.	500	330
17.	Mléko zahuštěné za odparkou	4.	130	410
18.	Mléko zahuštěné tank T ₁ /T ₂	4.	100	700
19.	Mléko zahuštěné před přehříváčem	4.	400	450
20.	Mléko sušené odstředěné	4.	100	750
21.	Mléko pasterované S ₂ /S ₄	5.	1 100	450
22.	Mléko zahuštěné za odparkou	5.	1 100	170
23.	Mléko zahuštěné tank T ₁ /T ₁	5.	800	250
24.	Mléko zahuštěné před přehříváčem	5.	1 700	250
25.	Mléko sušené odstředěné	5.	200	540
26.	Mléko pasterované S ₂ /S ₄	6.	500	410
27.	Mléko zahuštěné za odparkou	6.	900	120
28.	Mléko zahuštěné tank T ₂ /T ₁	6.	2 900	660
29.	Mléko zahuštěné před přehříváčem	6.	4 700	790
30.	Mléko sušené odstředěné	6.	3 200	830
31.	Mléko pasterované S ₂ /S ₄	7.	900	660
32.	Mléko zahuštěné za odparkou	7.	4 200	370

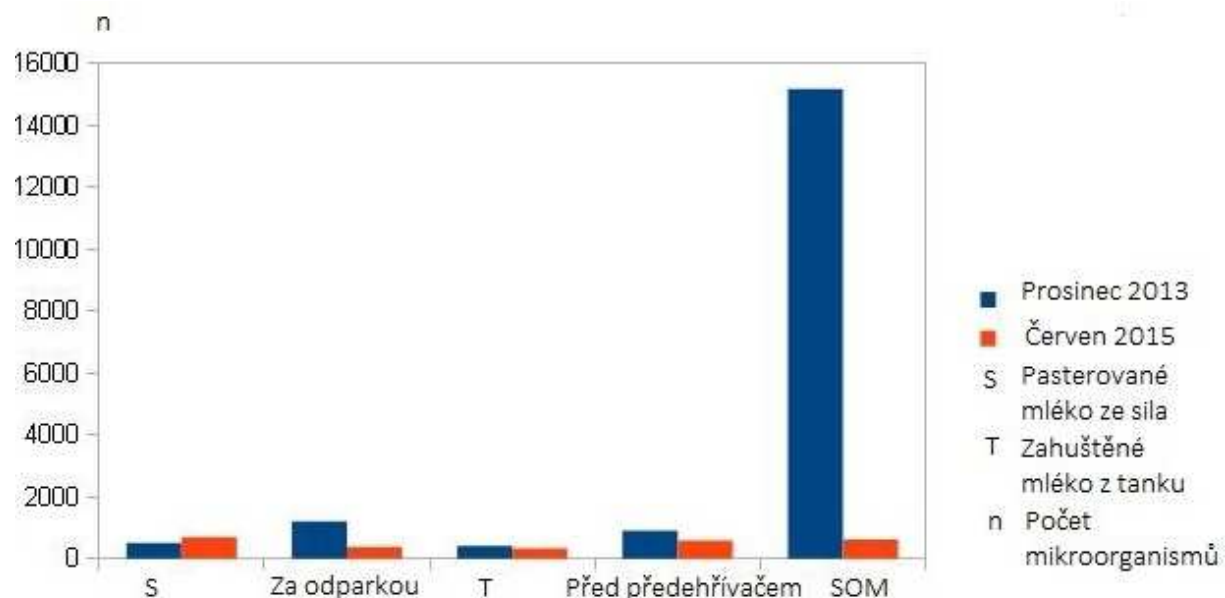
Vzorek	Popis	Čas (h)	Prosinec *	Červen **
33.	Mléko zahuštěné tank T ₂ /T ₁	7.	3 300	620
34.	Mléko zahuštěné před předeříváčem	7.	4 800	900
35.	Mléko sušené odstředěné	7.	2 800	1 150
36.	Mléko pasterované S ₂ /S ₄	8.	500	700
37.	Mléko zahuštěné za odparkou	8.	1 200	370
38.	Mléko zahuštěné tank T ₂ /T ₂	8.	400	330
39.	Mléko zahuštěné před předeříváčem	8.	900	580
40.	Mléko sušené odstředěné	8.	15 200	620

* naměřené vzorky jihočeské mlékárny Madeta a.s. za prosinec 2013

** mé naměřené vzorky za červen 2015

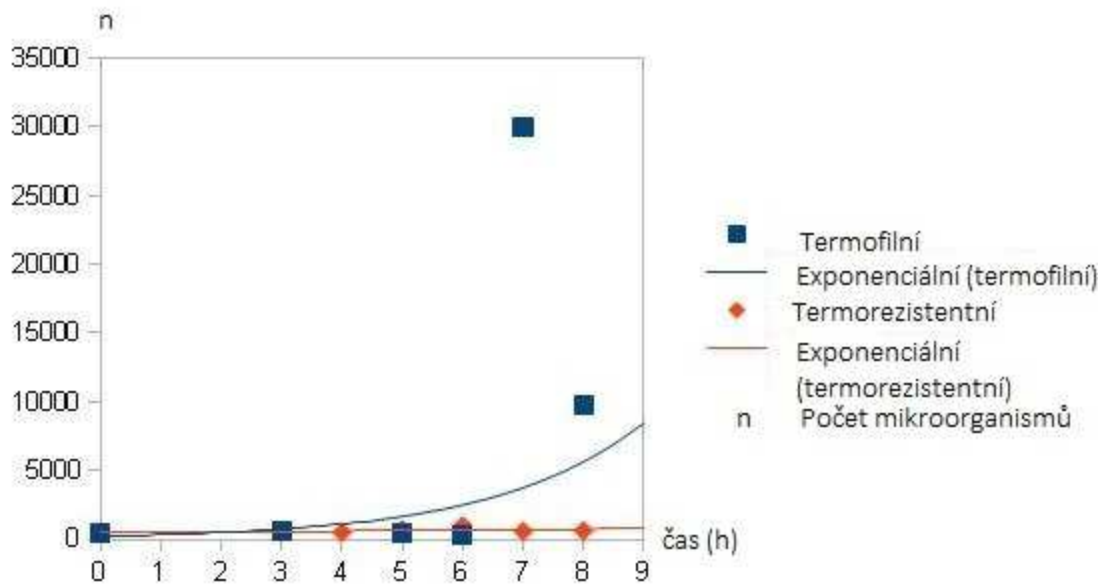
V Tab. 8 jsou porovnány mé naměřené výsledné počty termorezistentních mikroorganismů s výsledky naměřenými firmou Madeta a.s., Jindřichův Hradec.

Graf 2 Přehled kolísání počtu termorezistentních mikroorganismů během 8. hodiny sušení odstředěného mléka.

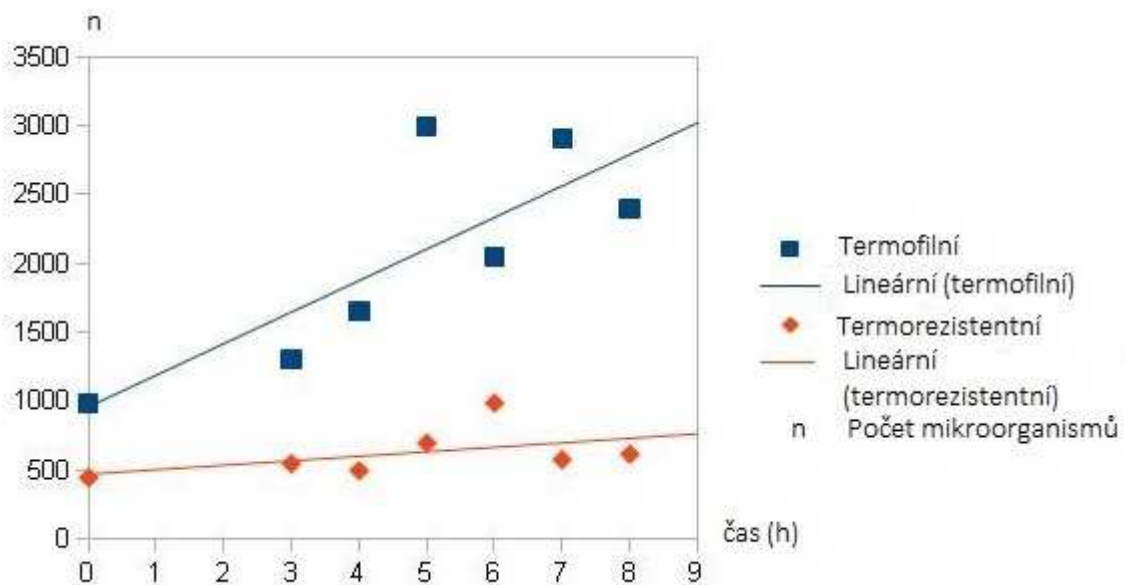


Z grafu č. 2 je patrné, že počty termorezistentních mikroorganismů naměřené v červnu 2015 (během 8. hodiny sušení) jsou nižší, než v prosinci 2013. Zatímco v prosinci 2013 byla naměřena hodnota 15 200 mikroorganismů v 1 mililitru vzorku sušeného odstředěného mléka, v červnu byla naměřena hodnota pouze 620 mikroorganismů v 1 mililitru vzorku odstředěného mléka.

Graf 3 Závislost počtu termofilních a termorezistentních mikroorganismů na době sušení za prosinec 2013.



Graf 4 Závislost počtu termofilních a termorezistentních mikroorganismů na době sušení za červen 2015.



Z grafu č. 3 a č. 4 je patrné, že počty termofilních i termorezistentních mikroorganismů, po zavedení nových sanitačních opatření, výrazně klesly. Zavedení těchto opatření mělo kladnou odezvu na snížení počtů těchto mikroorganismů.

Tab. 9 Výsledné počty termofilních mikroorganismů u syrovátky.

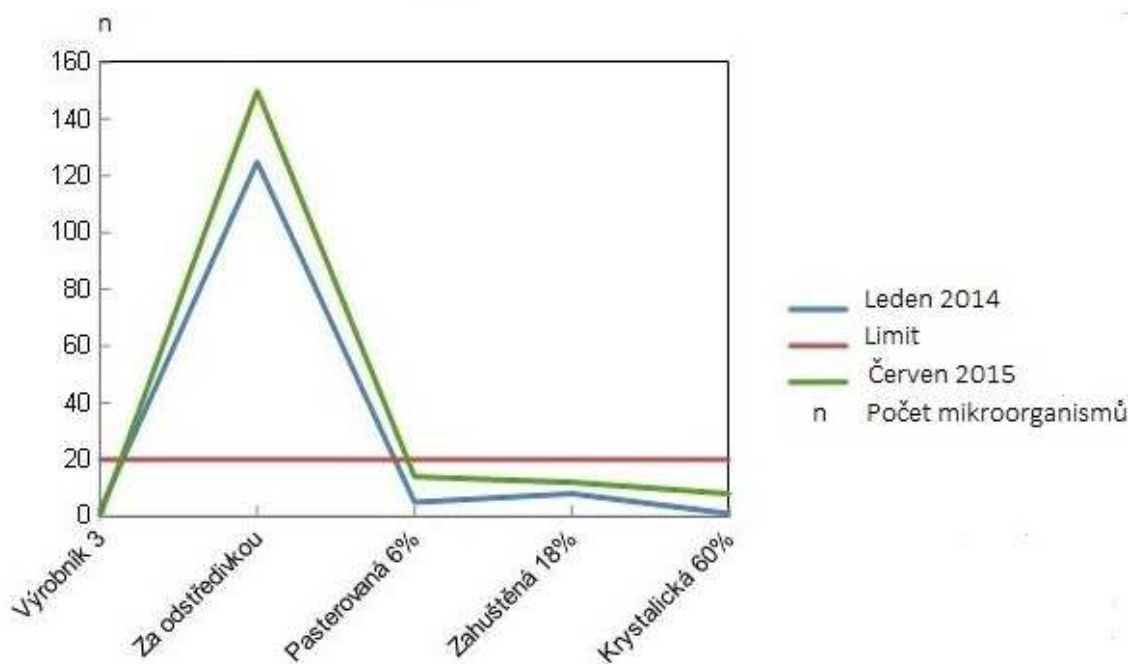
Vzorek	Popis	Leden *	Červen **
1.	Syrovátka z výrobce 3	2	1
2.	Syrovátka za odstředivkou	90	120
3.	Syrovátka pasterovaná 6 %	2	1
4.	Syrovátka zahuštěná 18 %	0	4
5.	Syrovátka krystalická 60 %	2	12
6.	Syrovátka z výrobce 1	0	3
7.	Syrovátka za odstředivkou	105	300
8.	Syrovátka pasterovaná 6 %	0	1
9.	Syrovátka zahuštěná 18 %	0	0
10.	Syrovátka krystalická 60 %	4	10
11.	Syrovátka z výrobce 2	1	1
12.	Syrovátka za odstředivkou	130	120
13.	Syrovátka pasterovaná 6 %	6	28
14.	Syrovátka zahuštěná 18 %	10	16
15.	Syrovátka krystalická 60 %	8	9
16.	Syrovátka z výrobce 3	2	0
17.	Syrovátka za odstředivkou	125	150
18.	Syrovátka pasterovaná 6 %	5	14
19.	Syrovátka zahuštěná 18 %	8	12
20.	Syrovátka krystalická 60 %	1	8

* naměřené vzorky jihočeské mlékárny Madeta a.s. za leden 2014

** mé naměřené vzorky za červen 2015

V Tab. 9 jsou porovnány mé naměřené výsledné počty termofilních mikroorganismů s výsledky naměřenými firmou Madeta a.s., Planá nad Lužnicí.

Graf 5 Přehled počtu termofilních mikroorganismů v syrovátce za měsíc leden (2014) a červen (2015).



Z grafu č. 5 je patrné, že rozdíly počtů termofilních mikroorganismů naměřené v lednu 2014 a v červnu 2015 jsou zanedbatelné. Výsledná krystalická syrovátka nepřesahuje limit 20 mikroorganismů na 1 mililitr nebo gram.

5 Diskuze

Cílem mé bakalářské práce bylo stanovení počtu termofilních a termorezistentních mikroorganismů u vzorků odstředěného mléka a stanovení počtu termofilních mikroorganismů u vzorků syrovátky.

Všechna data potřebná k porovnání a vyhodnocení mé práce mi poskytla jihočeská mlékárna Madeta a.s.. Byly porovnány výsledné počty termofilních a termorezistentních mikroorganismů u 40 vzorků odstředěného mléka, po zavedení přísnějších hygienických opatření, se 40 vzorky odstředěného mléka poskytnutými firmou Madeta a.s. ze dne 20. 12. 2013 (před zavedením těchto opatření).

Předložené výsledky mou hypotézu potvrdily. Po zavedení nových sanitačních opatření výsledné počty termofilních a termorezistentních mikroorganismů významně klesly.

Potrubní cesty, tanky na mléko S1 – S5, kondenzátní tank S6, nádrže na zahuštěné mléko T1 a T2, předehřivač zahuštěného mléka, trasa zahuštěného mléka (homogenizátor a rozprašovač) musí nejlépe 16 hodin před použitím projít čištěním CIP (Cleaning In Place). Podstatou čisticí stanice CIP je soustava čisticích prostředků. Čisticí roztoky cirkulují určitou dobu v uzavřeném obvodu technologického zařízení a po dokončení procesu se vracejí do nádob CIP stanice.

Nádrže na zahuštěné mléko se střídají (včetně filtrů) nejdéle po 3,5 hodinách bez ohledu na množství mléka v tanku. Toto opatření se provádí z toho důvodu, aby se předcházelo zvýšenému množení mikroorganismů v mléce.

Systém sušení byl upraven tak, aby se při jednom kole sušení spotřebovalo maximálně 220 000 litrů mléka, tj. 4 tanky po 55 000 litrech v případě sušeného odstředěného mléka. V případě plnotučného mléka se na jedno kolo sušení spotřebuje maximálně 110 000 litrů mléka, tj. 2 tanky po 55 000 litrech.

Vitamíny se přestaly přidávat na pasterační stanici, ale přímo do tanků S1 – S5 na sušárně, aby nedocházelo k jejich částečné destrukci. Do plnotučného mléka se přidávají vitamíny jako antioxidanty tuku.

Dalším možným vysvětlením snížených výsledných počtů termofilních a termorezistentních mikroorganismů (v červnu 2015) jsou sezónní výkyvy. Dojnice jsou v zimních měsících chované v neprovzdušněných kravínech, kde hrozí zvýšené riziko množení těchto mikroorganismů. Zvýšené množení termofilních a termorezistentních

mikroorganismů je možným vysvětlením zvýšených počtů těchto mikroorganismů v prosinci 2013.

Dalším cílem bylo porovnat výsledné počty termofilních mikroorganismů u vzorků syrovátky s výslednými počty poskytnutými mlékárnou Madeta a.s., Planá nad Lužnicí. Bylo porovnáno celkem 40 vzorků syrovátky.

Z výsledných počtů termofilních mikroorganismů u syrovátky je patrné, že rozdíly v lednu 2014 a červnu 2015 jsou zanedbatelné. Počty termofilních mikroorganismů za odstředivkou jsou výrazně nižší a to z důvodu účinné pasterace syrovátky. Výsledná krystalická syrovátka nepřesahuje limit 20 mikroorganismů na 1 mililitr nebo gram, tudíž je firmou Meggle s.r.o. považována za surovinu vhodnou pro další zpracování, tj. sušení.

6 Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši o problematice výskytu termofilních a termorezistentních mikroorganismů v mléce a mléčných výrobcích. Monitoring termofilních a termorezistentních mikroorganismů má velký význam, protože přítomnost těchto mikroorganismů rozhoduje o vlastnostech suroviny i výsledného produktu.

Celkem bylo odebráno 60 vzorků, z toho bylo 40 vzorků odstředěného mléka a 20 vzorků syrovátky. Mé naměřené výsledky u vzorků odstředěného mléka byly porovnány s výslednými počty termofilních a termorezistentních mikroorganismů poskytnutými jihočeskou mlékárnou Madeta a.s.

Po zavedení nových hygienických opatření (na počátku roku 2014) počty termofilních i termorezistentních mikroorganismů u vzorků odstředěného mléka výrazně klesly. Za limitní hodnotu pro termorezistentní mikroorganismy se považuje 2000 mikroorganismů na 1 mililitr nebo gram výrobku. V případě naměřených počtů termorezistentních mikroorganismů u odstředěného mléka byl tento limit splněn. Pro termofilní mikroorganismy není stanovena limitní hodnota. Limitní hodnota byla interně stanovena jihočeskou mlékárnou Madeta a.s. na 3000 mikroorganismů na 1 mililitr nebo gram výrobku.

V případě splnění limitních hodnot je mléčný výrobek vhodný k distribuci do obchodních řetězců.

Výsledné počty termofilních mikroorganismů naměřených u vzorků syrovátky se výrazně neliší od výsledků poskytnutých jihočeskou mlékárnou Madeta a.s., závod Planá nad Lužnicí. Výsledné počty termofilních mikroorganismů u vzorků krystalické syrovátky nepřekračují limitní hodnotu 20 mikroorganismů na 1 mililitr nebo gram výrobku, tudíž se jedná o surovinu vhodnou pro další zpracování.

7 Seznam použité literatury

1. VLKOVÁ, Eva, Vojtěch RADA a Jiří KILLER. *Potravinářská mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2006, 168 s. ISBN 80-213-1583-0.
2. NĚMEČKOVÁ, I., SCHMIDTOVÁ, M., ROHACKÁ, H., ROUBAL, P., DRBOHLAV, J.: *Methods for determinativ and characterization of heat-resistant micro-organisms in milk*. Mlékařské listy, č. 125, 2011.
3. PISECKY, J., WESTERGAARD, V., REFSTRUP, E. *Handbook of Milk powder manufacture*. Vyd. 2. Denmark, 2012.
4. JIČÍNSKÁ, Eva a Jana HAVLOVÁ. *Patogenní mikroorganismy v mléce a mlékárenských výrobcích*. Vyd. 1. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1995, 106 s. ISBN 80-85120-47-x.
5. FOLTYS, V., KIRCHNEROVÁ, K.: *Occurence and detection of aerobic sporulating microorganisms in raw cow's milk*. Slovak Journal of Animal Science. 2010, ISSN 1337-9984.
Dostupné na www: http://www.cvzv.sk/slju/10_2/Foltys.pdf.
6. JANŠTOVÁ, B., LUKÁŠOVÁ, J.: *Heat resistance of Bacillus spp. spores isolated from cow's milk and farm environment*. Acta Veterinaria Brno. 2001, ISSN 1801-7576.
Dostupné na www: <http://actavet.vfu.cz/pdf/200170020179.pdf>.
7. NAVRÁTILOVÁ P. *Hygienu produkce mléka*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2012, 129 s. ISBN 978-80-7305-625-4.
8. FAILLE, C., F. FONTAINE a T. BENEZECH. *Potential occurrence of adhering living Bacillus spores in milk product processing lines*. Journal of Applied Microbiology. 2001, 90(6): 892-900. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01321.x. ISSN 1364-5072.
Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2001.01321.x>.

9. FLINT, S., J. PALMER, K. BLOEMEN, J. BROOKS a R. CRAWFORD. *The growth of Bacillus stearothermophilus on stainless steel*. Journal of Applied Microbiology. 2001, 90(2): 151-157. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01215.x. ISSN 1364-5072.

Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2001.01215.x>.

10. TAMINE, A. Y.: *Milk Processing and Quality Management*. Blackwell Publishing Ltd. 2009. 343 s. ISBN 978-1-405-14530-5.

11. SCHELDEMAN, P., L. HERMAN, S. FOSTER a M. HEYNDRICKX. *Bacillus sporothermodurans and other highly heat-resistant spore formers in milk*. Journal of Applied Microbiology. 2006, 101(3): 542-555. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.02964.x. ISSN 1364-5072.

Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2006.02964>.

12. JANŠTOVÁ, Bohumíra. *Hygiena a technologie mléka a mléčných výrobků: praktická cvičení*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2009, 2 sv. (84, 65 s.). ISBN 978-80-7305-061-0.

13. ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.

14. KOUŘIMSKÁ, L. *Úvod do mlékařství: laboratorní cvičení*. Vyd. 1. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, katedra kvality zemědělských produktů, 2007, 99 s. ISBN 978-80-213-1665-2.

15. KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2012, 569 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-145-0.

16. KADLEC, Pavel. *Technologie potravin II*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002, 236 s. ISBN 80-7080-510-2.

17. KADLEC, Pavel. *Technologie potravin I*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002, 300 s. ISBN 80-7080-509-9.

18. JANŠTOVÁ, Bohumíra a Pavlína NAVRÁTILOVÁ. *Produkce mléka a technologie mléčných výrobků*. Vyd. 1. Brno: VFU Brno, 2014, 109 s. ISBN 978-80-7305-712-1.
19. GIFFEL, M. C. te, A. WAGENDORP, A. HERREWEGH a F. DRIEHUIS. *Bacterial spores in silage and raw milk*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2002, 81(1/4): 625-630. DOI: 10.1023/A:1020578110353. ISSN 00036072.
Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1020578110353>.
20. QUIGLEY, Lisa, Orla O'SULLIVAN, Catherine STANTON, Tom P. BERESFORD, R. Paul ROSS, Gerald F. FITZGERALD a Paul D. COTTER. *The complex microbiota of raw milk*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2013, 37(5): 664-698. DOI: 10.1111/1574-6976.12030. ISSN 1574-6976.
Dostupné také z: <http://femsre.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1111/1574-6976.12030>.
21. LUKÁŠOVÁ, J. *Hygiena a technologie mléčných výrobků*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2001, 180 s. ISBN 80-7305-415-9.
22. GAJDŮŠEK, Stanislav. *Mlékařství II*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1998, 135 s. ISBN 80-7157-342-6.
23. SAMKOVÁ, Eva. *Mléko: produkce a kvalita: Milk: production and quality* : vědecká monografie. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2012, 240 s. ISBN 978-80-7394-383-7.
24. WESTERGAARD, V. *Milk Powder Technology: Evaporation and Spray Drying*. Vyd. 5. Denmark: Niro A/S, 2004, 337 s.
25. FORMAN, Ladislav. *Mlékárenská technologie II*. 1. Vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1994, 217 s. ISBN 80-7080-214-6.
26. SUKOVÁ, Irena. *Syrovátka v potravinářství*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2006, 60 s. Potravinářské informace. ISBN 80-7271-173-3.

27. KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Procesy a zařízení v potravinářství a biotechnologiích*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2013, 496 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-163-4.

28. ČSN 57 0850 (2012): Sušené mléko – Stanovení počtu zvláště termorezistentních spor termofilních bakterií.

29. JANŠTOVÁ, Bohumíra a Josef HOLEC. *Hygiena a technologie mléka a mléčných výrobků: návody k praktické výuce v mlékařské dílně*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2004, 71 s. ISBN 80-7305-486-8.

30. ČSN 56 0083 (1999): Všeobecné pokyny pro stanovení celkového počtu mikroorganismů - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C.