

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2018

Bc. Petra Boudková

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

**Mikrobiologické hodnocení mléka při jeho skladování za různých
podmínek**

Bc. Petra Boudková

Diplomová práce

2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petra Boudková**
Osobní číslo: **C16600**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Mikrobiologické hodnocení mléka při jeho skladování za různých podmínek**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

1. Seznamte se s literárními prameny v dané oblasti a vypracujte rešerši vztahující se k zadanému tématu. V úvodu práce se věnujte shrnutí základních informací o mléce a technologii mléka.
2. Zpracujte literární rešerši o potenciálním antimikrobiálním účinku stříbra v jeho různých formách.

Experimentální část:

1. Dodané vzorky mléka skladujte po určitou dobu za přírodních podmínek experimentů.
2. Kultivačním vyšetřením sledujte změny v mikrobiologické kvalitě mléka v průběhu jeho skladování, a to v případě plastových a skleněných lahví (vnitřní povrch bez speciální modifikace/s Ag modifikací). Všimněte si také dalších znaků vypovídajících mj. o údržnosti vzorku. Otestujte vhodnost dalších potenciálních metod, které by byly využitelné v daném experimentálním hodnocení (reduktázová zkouška, orientační mikrobitesty pro posouzení mikrobiální kontaminace).
3. Získané výsledky vhodným způsobem interpretujte.
4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí č. 9/2012 Univerzity Pardubice a dále ve znění Dodatku č. 1 ke Směrnicí č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravou".


Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. David Šilha, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Ing. Tomáš Bajer, Ph.D.**
Katedra analytické chemie
Datum zadání diplomové práce: **20. února 2018**
Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 3.5.2018

.....
Bc. Petra Boudková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce panu Ing. Davidu Šilhovi, Ph.D. za tematicky velmi zajímavou diplomovou práci, za cenné rady a ochotu v průběhu experimentů a při zpracování mé práce. Zároveň bych chtěla poděkovat mlékárně Juliana Tuněchody za dodávání vzorků a firmě Ego 93 s.r.o. za dodávku postříbřených lahví. Nadále děkuji své rodině za velkou trpělivost, podporu a pochopení jak při psaní diplomové práce, tak během celého mého studia.

ANOTACE

Diplomová práce je věnována mikrobiologickému hodnocení mléka při skladování za různých podmínek. Jedná se především o skladovatelnost mléka v lahvích s povrchovou úpravou pomocí stříbrných iontů a zároveň lahvích, ve kterých je mléko distribuováno do obchodního řetězce. Práce se zabývá vlivem těchto podmínek na možné prodloužení trvanlivosti mléka.

KLÍČOVÁ SLOVA

mléko, stříbro, nanotechnologie, antibakteriální účinky

TITLE

The microbiological evaluation of milk during of storage under different conditions

ANNOTATION

The diploma thesis is devoted to the microbiological research of milk during the storage under different conditions. This is primarily about storaging of milks in coated bottles with silver ions and at the same time of storaging in bottles, in which the milk is distributed to the chain of commerce. The thesis deals with the influence of these conditions on prolonging the durability of milk.

KEYWORDS

milk, silver, nanotechnology, antimicrobial effects

OBSAH

ÚVOD	15
1 TEORETICKÁ ČÁST	16
1.1 Složení syrového mléka	16
1.1.1 Bílkoviny	17
1.1.1.1 Kaseiny.....	17
1.1.1.2 Syrovátkové bílkoviny	19
1.1.2 Lipidy.....	19
1.1.2.1 Mastné kyseliny	20
1.1.3 Sacharidy	21
1.1.3.1 Laktóza.....	21
1.1.4 Minerální látky.....	22
1.1.4.1 Fosfor	22
1.1.4.2 Vápník.....	23
1.1.4.3 Draslík.....	23
1.1.5 Vitamíny	24
1.1.5.1 Vitamíny rozpustné v tucích	24
1.1.5.2 Vitamíny rozpustné ve vodě.....	25
1.2 Hygienické požadavky a technologie mléka	27
1.2.1 Dojnice.....	27
1.2.2 Dojení.....	27
1.2.3 Uchování a chlazení mléka	27
1.2.4 Příjem mléka v mlékárně	28
1.2.5 Odstředění mléka	28
1.2.6 Tepelné ošetření mléka	29
1.2.6.1 Pasterace.....	30
1.2.6.2 Sterilace.....	30
1.2.6.3 Terminace.....	30
1.2.7 Standardizace a homogenizace	31
1.2.8 Plnění a balení.....	31
1.3 Mikrobiologie mléka	33

1.3.1	Psychrofilní mikroorganismy	34
1.3.2	Koliformní mikroorganismy	35
1.3.3	Sporotvorné a mléčné bakterie	35
1.3.3.1	<i>Streptococcus</i>	35
1.3.3.2	<i>Lactobacillus</i>	36
1.3.3.3	<i>Leuconostoc</i>	36
1.3.4	Patogenní mikroorganismy	36
1.3.4.1	<i>Bacillus cereus</i>	36
1.3.4.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	37
1.3.4.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	38
1.4	Nanotechnologie.....	40
1.4.1	Nanočástice	40
1.4.1.1	Top-down technika.....	40
1.4.1.2	Bottom-up technika	41
1.4.2	Stříbro	41
1.4.2.1	Nanočástice stříbra	41
1.4.2.2	Antimikrobiální působení stříbra	42
1.4.3	Nanotechnologie v potravinářství	43
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44
2.1	Použité chemikálie, živné půdy, přístroje a pomůcky	44
2.1.1	Chemikálie	44
2.1.2	Živná média a pracovní roztoky	44
2.1.3	Přístroje a vybavení	46
2.1.4	Pomůcky	46
2.2	Analyzované vzorky	47
2.3	Pracovní postupy	48
2.3.1	Provedení reduktázové a kvasné zkoušky	48
2.3.2	Provedení mikrobitestů	49
2.3.3	Stanovení CPM	49
2.3.4	Přežívání vybraných bakterií v mléce.....	50
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	51
3.1	Mléko uchovávané v plastové lahvi (koncentrace Ag⁺ 20 mg/m²).....	51

3.1.1	Senzorické hodnocení mléka	51
3.1.2	Reduktázová a kvasná zkouška.....	52
3.1.2.1	Hodnocení mléka v 1. dni	52
3.1.2.2	Hodnocení mléka ve 2. dni.....	52
3.1.2.3	Hodnocení mléka ve 3. dni.....	52
3.1.2.4	Hodnocení mléka ve 4. dni.....	53
3.1.2.5	Hodnocení mléka v 7. dni	53
3.1.2.6	Hodnocení mléka v 8. dni	54
3.1.3	Hodnocení mléka dle mikrobitešť	54
3.1.4	Stanovení CPM u vzorků mléka	55
3.2	Mléko uchovávané v plastové lahvi (koncentrace Ag⁺ 10 mg/m²).....	56
3.2.1	Senzorické hodnocení mléka	56
3.2.2	Hodnocení mléka dle mikrobitešť	57
3.2.3	Stanovení CPM u vzorků mléka	59
3.3	Mléko uchovávané ve skleněné lahvi (koncentrace Ag⁺ 20 mg/m²).....	60
3.3.1	Senzorické hodnocení mléka	60
3.3.2	Reduktázová a kvasná zkouška.....	61
3.3.2.1	Hodnocení mléka v 1. dni	61
3.3.2.2	Hodnocení mléka ve 2. dni.....	61
3.3.2.3	Hodnocení mléka ve 3. dni.....	62
3.3.2.4	Hodnocení mléka ve 4. dni.....	62
3.3.2.5	Hodnocení mléka v 7. dni	62
3.3.2.6	Hodnocení mléka v 8. dni	63
3.3.3	Hodnocení mléka dle mikrobitešť	64
3.3.4	Stanovení CPM u vzorků mléka	64
3.4	Mléko uchovávané ve skleněné lahvi (koncentrace Ag⁺ 10 mg/m²).....	66
3.4.1	Senzorické hodnocení mléka	66
3.4.2	Hodnocení mléka dle mikrobitešť	67
3.4.3	Stanovení CPM u vzorků mléka	67
3.5	Srovnávací pokus: Mléko uchované v plastové a skleněné lahvi (koncentrace Ag⁺ 10 mg/m²)	68
3.5.1	Senzorické hodnocení mléka	68

3.5.2	Stanovení CPM u vzorků mléka	70
3.6	Modelový experiment s mlékem zaočkovaným definovanou bakteriální kulturou	73
3.6.1	Inokulace bakterií <i>S. aureus</i>	73
3.6.2	Inokulace bakterií <i>L. ivanovii</i>	74
4	ZÁVĚR	76
	SEZNAM LITERATURY.....	77
	PŘÍLOHY.....	83

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Struktura kaseinové micely (Gaucheron, 2005)	18
Obrázek 2: Schéma odstředivky (Kadlec, 2002).....	29
Obrázek 3: Lahvárenská linka.....	32
Obrázek 4: Odbarvené vzorky mléka.....	53
Obrázek 5: mikrobitesty CH-1 pro plastové lahve bez modifikace/s modifikací Ag ⁺ 10 mg/m ²	58
Obrázek 6: mikrobitesty PRPM-1 pro plastové lahve bez modifikace/s modifikací Ag ⁺ 10 mg/m ²	58
Obrázek 7: Reduktázová a kvasná zkouška pro skleněné lahve bez modifikace/s modifikací Ag ⁺ 20 mg/m ²	62
Tabulka I: Základní složení mléka.....	17
Tabulka II: Obsah minerálních látek v kravském mléce (Navrátilová <i>et al.</i> , 2012).....	24
Tabulka III: Kritéria CPM u tříd mléka (Görner <i>and</i> Valík, 2004).....	34
Tabulka IV: Doplnkové mikrobiologické znaky jakosti (Görner <i>and</i> Valík, 2004).....	34
Tabulka V: Hodnocení výsledků reduktázové zkoušky	48
Tabulka VI: Hodnocení výsledků kvasné zkoušky	48
Tabulka VII: Sensorický popis mléka v plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag ⁺ 20 mg/m ²	51
Tabulka VIII: Shrnutí reduktázové zkoušky pro plastové lahve bez modifikace/s modifikací Ag ⁺ 20 mg/m ²	54
Tabulka IX: Hodnocení mikrobitesů pro plastové lahve bez modifikace/s modifikací Ag ⁺ 20 mg/m ²	55
Tabulka X: Sensorický popis mléka v plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag ⁺ 10 mg/m ²	57
Tabulka XI: Hodnocení mikrobitestů pro plastové lahve bez modifikace/s modifikací Ag ⁺ 10 mg/m ²	58
Tabulka XII: Sensorický popis mléka ve skleněných lahvích bez modifikace/s modifikací Ag ⁺ 20 mg/m ²	60
Tabulka XIII: Shrnutí reduktázové zkoušky pro skleněné lahve bez modifikace Ag ⁺ 20 mg/m ²	63

Tabulka XIV: Shrnutí reduktázové zkoušky pro skleněné lahve s modifikací Ag ⁺ 20 mg/m ²	63
Tabulka XV: Sensorický popis mléka ve skleněných lahvích bez modifikace/s modifikací Ag ⁺ 10 mg/m ²	66
Tabulka XVI: Srovnávací pokus - Sensorický popis mléka v plastových a skleněných lahvích bez modifikace/s modifikací Ag ⁺ 10 mg/m ²	69
Graf 1: CPM u mléka v plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag ⁺ 20 mg/m ²	56
Graf 2: CPM u mléka v plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag ⁺ 10 mg/m ²	59
Graf 3: CPM u mléka ve skleněných lahvích bez modifikace/s modifikací Ag ⁺ 20 mg/m ² ...	65
Graf 4: CPM u mléka ve skleněných lahvích bez modifikace/s modifikací Ag ⁺ 10 mg/m ² ...	68
Graf 5: Srovnávací pokus - CPM u mléka ve skleněných a plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag ⁺ 10 mg/m ²	71
Graf 6: Srovnávací pokus - CPM u mléka v plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag ⁺ 10 mg/m ²	72
Graf 7: Srovnávací pokus - CPM u mléka ve skleněných lahvích bez modifikace/s modifikací Ag ⁺ 10 mg/m ²	72
Graf 8: Přežívání <i>S. aureus</i> v mléce uchovávaném v plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag ⁺ 10 mg/m ²	74
Graf 9: Přežívání <i>L. ivanovii</i> v mléce uchovaném v plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag ⁺ 10 mg/m ²	75

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

CLA	konjugovaná kyselina linolová
CPM	celkový počet mikroorganismů
DAG	diacylglycerol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
FMN	flavinmononukleotid
FAD	flavinadenindinukleotid
LAT	Law admission test
MO	mikroorganismy
SEB	stapfylokokový enterotoxin B
SEE	stapfylokokový enterotoxin E
TAG	tryacylglycerol
UHT	Ultra-high temperature

ÚVOD

Součástí denní konzumace potravin jsou i mléčné výrobky, především konzumace syrového mléka. Tento druh potravin je zdrojem důležitých živin, jak pro člověka v dospělém věku, tak kategorii dětské populace. V této věkové skupině mléko zaujímá nezbytnou roli pro správný vývoj jedince a funkci jeho metabolických dějů (**Gajdůšek, 2003; Kučera, 2008**). Zároveň může konzumace mléka přispět ke zlepšení sportovního i fyzického výkonu dospělého jedince a to díky nutričním hodnotám mléčného výrobku. I přes to, že menší procento populace konzumaci mléčných produktů začíná ztrácet, stále se najde mnoho lidí, kteří mléko a mléčné výrobky konzumují často a rádi (**Pawlas, 2011**).

Na českých trzích se stále více objevují různé druhy mléčných produktů. Pokud se zaměříme na mléka tekutá, v nynějším obchodním řetězci se setkáváme s mléky ochucenými, nízkotučnými, polotučnými, plnotučnými, dále do této kategorie můžeme zařadit mléka trvanlivá a mléka určená k rychlé spotřebě. Pokud bychom se ohlédli v oddělení mléčných produktů v supermarketech i menších obchodech, jistě bychom narazili na další nabídky různých druhů mlék.

Česká i zahraniční populace se neustále snaží vybírat co nejvíce kvalitní potraviny. Právě v dnešní době, kdy je trendem zdravá výživa, různé druhy diet a fitness menu, se čím dál tím více populace ohlíží na kvalitu potravin a tím i jejich trvanlivost.

V mé práci se tedy budu zabývat syrovým mlékem, které je určené k rychlé spotřebě a jeho minimální trvanlivost nepřesahuje více, než šest dní. Vzhledem ke zlepšení doby trvanlivost tohoto mléka budou v této práci předmětem zkoumání lahve ošetřené stříbrnými ionty. Tyto částice byly na lahve nanášeny pomocí nanotechnologie a měly by přispět k prodloužení trvanlivosti mléčného výrobku.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Složení syrového mléka

Pokud se na mléko zadíváme z pohledu fyziologie, můžeme říci, že je to vlastně sekret mléčné žlázy samice, např. krávy, které slouží jako potrava pro novorozená mláďata po příchodu na svět. Pokud vezmeme v potaz celkové složení mléka, je ovlivněno několika faktory. Těmi jsou například druh zvířete a jeho genetický profil, podmínky prostředí, ve kterém zvíře žije, etapa kojení, zdravotní stav zvířete a jeho výživa a další (Gajdůšek, 2003; Březina, 1990; Pereira, 2014). Složení mléka lze tedy rozdělit na původní a nepůvodní složky (Březina, 1990). Nadále se mléko odděluje na dvě hlavní frakce a to lipidovou a vodnou (Ontsouka *et al.*, 2003). Když se zaměříme na rozdělení na základě původních a nepůvodních složek, můžeme říci, že mezi původní část patří látky, které vznikly během látkové přeměny při sekreci mléčné žlázy, oproti tomu složky nepůvodní se dostaly do tekutiny jinou cestou, především krevním oběhem savce, stykem s technickým zařízením při plnění mléka do lahví či působením okolního prostředí. Dělení mléka z pohledu zralosti je rozděleno na nezralé mléko nazývané mlezivo a zralé mléko (Gajdůšek, 2003; Březina, 1990; Čepička, 1995).

Jak již bylo řečeno, mléko obsahuje řadu živin důležitých pro rozvoj a fungování jedince. Jedná se tedy o koloidní systém, který je na jedné straně složen především z bílkoviny, lehce stravitelného tuku, laktózy a vody (Gajdůšek, 2003; Březina, 1990; Jost, 2011). Tyto složky spadají do hlavních látek obsažených v mléce. Na straně druhé lze zmínit složky vedlejší, a to některé minerální látky, stopové prvky a především vitamíny skupiny B a A. Tyto výživové složky se v mléku vyskytují v různém poměru (Gajdůšek, 2003; Březina, 1990). Podíl jednotlivých složek je rozdělen následovně: 87 % zaujímá voda, druhou nejvíce zastoupenou složkou je laktóza 4-5 %, následuje tuk s hodnotou 3-4 %, dále 3 % bílkovin, 0,8 % minerály a nakonec pouhých 0,1 % zastupuje skupina vitamínů (Pereira, 2014). V mléku ale můžeme naleznout i další vedlejší látky, které se podílejí na udržování fyziologických funkcí, a to imunoglobuliny, antimikrobiální látky, enzymy a jejich inhibitory, růstové faktory, ale i hormony. Bohužel čím dál častěji dochází v mléku k detekci cizorodých látek, jimiž jsou například pesticidy, veterinární léčiva, herbicidy, dezinfekční látky a další (Gajdůšek, 2003; Březina, 1990; Ingr, 2003; Janštová *et al.*, 2014).

V tabulce č. I je patrný rozdíl mezi složením kravského, koziho a ovčího mléka z hlediska výše uvedených živin. Můžeme si povšimnout, že kravské mléko má nejnižší podíl tuku, oproti zbývajícím dvěma savcům. Proto je tedy i vhodnější a zároveň dostupnější pro naše laboratorní pokusy.

Tabulka I: Základní složení mléka

Zvíře	Tuky	Bílkoviny	Sacharidy	Minerální látky	Sušina
Kráva	3,9	2,6	4,6	0,7	12,7
Koza	4,5	3,0	4,3	0,8	13,3
Ovce	7,5	4,6	4,6	1,0	32,8

1.1.1 Bílkoviny

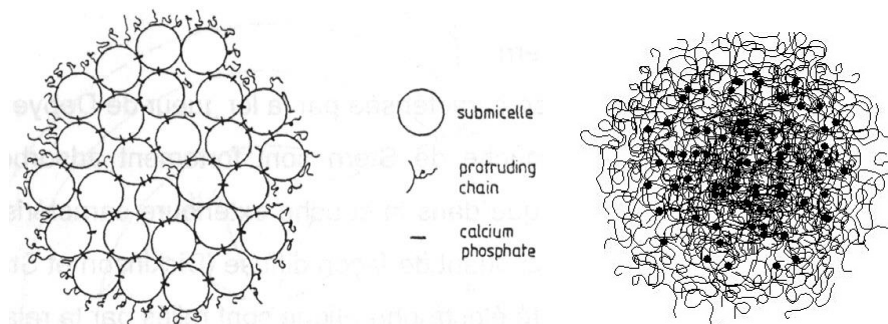
Bílkoviny v mléku spadají do skupiny dusíkatých látek. Jsou to vysokomolekulární polymerní sloučeniny, které jsou složeny z aminokyselin (**Březina, 1990**). K jejich syntéze dochází na drsném endoplazmatickém retikulu buňky a později jsou zpracovány v Golgiho komplexu (**Linzell and Peaker, 1972**). Tvoří nejrozšířenější skupinu látek v mléce, kterou lze ještě rozdělit na dvě části z hlediska jejich biologických účinků a primární struktury (**Březina, 1990; Pereira, 2014**). První částí jsou kaseiny a druhou bílkoviny syrovátky. Pokud bychom chtěli bílkoviny obecně rozdělit dle molekulové formy, mluvili bychom o fibrilárních bílkovinách a sféroproteinech, mezi které patří právě bílkoviny mléka. Kravské mléko a již výše zmiňované mléko ovčí a kozi spadají do tzv. kaseinových mlék. Je tomu tak z důvodu, že kasein, jakožto bílkovina mléka zaujímá v tomto produktu největší podíl. Tvoří až 75% z celkového obsahu bílkovin v mléce. Pokud bychom se zaměřili na změnu bílkovin v mléce při procesu fermentace, zjistili bychom, že se celkový obsah aminokyselin a jejich složení příliš neliší (**Březina, 1990; Janštová et al., 2014; Forman, 1994**). Obsah bílkovin v mléce se mění pouze o 1,4 – 1,8 % za den (**Ferneborg, 2016**).

1.1.1.1 Kaseiny

V kravském mléku zaujímá kasein 75 – 79 % celkových dusíkatých látek. Ve své molekule obsahuje C, H, O, N, S a P a je uspořádán do frakcí, které tvoří komplexy uspořádané ve formě micel. Zajímavostí je, že v jednom mililitru mléka můžeme nalézt až

10^{15} micel. Tato kaseinová micela je zpravidla tvořena koloidním fosforečnanem vápenatým, protože je zde 300 až 500 komplexů, které jsou vzájemně provázány právě díky fosforečnanu vápenatému. K tomu, aby došlo k vytvoření micel, je třeba teploty vyšší jak $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Díky jeho složení se tedy kasein řadí mezi fosfoproteiny. Micely jsou silně hydratované a váží na sebe až čtyřnásobek hmotnosti vody. Díky tomu jsou kaseinové micely otevřené a mají houbovitou strukturu. Kasein též obsahuje aminokyseliny serin a threonin, které jsou na kyselinu vázané pomocí esterové vazby. Pokud vezmeme v potaz jednotlivé frakce kaseinu, uvidíme, že se liší ve vlastnostech, jako je například molekulová hmotnost, elementární složení, obsah aminokyselin a také hodnota izoelektrického bodu. Na základě frakcí dělíme kaseiny na alfa, beta a kappa. Obecně kaseiny jako takové jsou výsledkem selektivního štěpení, kterého se účastní látka zvaná plazmin (Březina, 1990; Janštová *et al.*, 2014; Spread, 1995; Jost, 2011).

Na Obrázku 1 můžeme vidět strukturu kaseinové micely, jejíž součástí je fosforečnan vápenatý, který má odpovědnost za strukturu a stabilitu těchto micel.



Obrázek 1: Struktura kaseinové micely (Gaucheron, 2005)

Alfa kaseiny obsahují nejvíce fosforu ze všech výše uvedených frakcí a dělí se na podskupiny jedna a dva. Zajímavostí je, že alfa kaseiny nikdy neobsahují aminokyselinu cystein. Beta kaseiny jsou druhou nejvíce zastoupenou frakcí, obsahují méně fosforu a je u nich známo devět genetických variant této beta skupiny. Zároveň je tato frakce nejhydrofobnější, a to právě díky nižšímu obsahu fosforu. Na jedné straně obsahuje vysoký obsah valinu, prolinu, leucinu, ale může obsahovat i methionin. Na straně druhé tyto frakce kaseinu nikdy neobsahují aminokyseliny cystein a cystin. Vezmeme-li v potaz poslední frakci, a to kappa kaseiny, setkáme se se skutečností, že tato frakce má charakter ochranného

koloidu a stabilizuje frakce předchozí (**Březina, 1990; Janštová et al., 2014; Spreed, 1995; Jost, 2011**).

1.1.1.2 Syrovátkové bílkoviny

Syrovátkové bílkoviny, též zvané jednoslovně jako syrovátka, zastupují 15-18 % z celkového množství bílkovin v mléce. Syrovátka je tedy mléčné sérum, které je získáváno během výroby sýrů po odstranění kaseinu a mléčného tuku v průběhu koagulace. Ta může být provedena buď pomocí enzymatických, nebo kyselých dějů. Na rozdíl od kaseinů je syrovátková bílkovina rozpustná (**Březina, 1990; Jost, 2011**). V dnešní době jsme schopni rozlišit syrovátku sladkou, jejímž zástupcem je sýr a syrovátku kyselou, kterou většina lidí zná pod názvem tvaroh. Mezi těmito produkty je značný rozdíl, co se týče obsahu jednotlivých složek.

Syrovátkové bílkoviny jsou látky globulárního charakteru, které mají rozdílné vlastnosti a na základě této skutečnosti se dělí na laktoglobuliny, laktalbuminy, sérový albumin, imunoglobuliny, proteosopeptonové frakce a sekreční složky. Stejně jako tomu bylo u kaseinu, mohou se jednotlivé frakce těchto bílkovin nacházet v různých genetických druzích (**Březina, 1990; Forman, 1994; Jost, 2011**).

1.1.2 Lipidy

Lipidy v mléce mají poměrně složité strukturní zastoupení (**Jost, 2011**). Jejich obsah se může měnit z celkového množství od 7 do 7,7 % (**Ferneborg, 2016**). Lipidy se v mléce nacházejí ve formě tzv. globulí, které jsou obklopeny lipoproteinovou membránou. Díky jejich struktuře a tím dobrému rozptylu světla na těchto částicích se podílejí právě globule na bělosti mléka. Tyto útvary jsou odolné vůči trávicím enzymům pocházejících z pankreatu, ale pouze tehdy, nejsou-li před tím podrobeny procesu trávení v žaludečních šťávách. Mluvíme tedy o triglyceridech (TAG), které zaujímají 98 - 99 % frakce mléčného tuku a tvoří tedy převládající skupinu (**Pereira, 2014; Jost, 2011**). Jsou složeny ze tří mastných kyselin, které tvoří jednu glycerolovou molekulu. Mastné kyseliny, které nejsou navázány na glycerol, můžeme pojmenovat jako volné mastné kyseliny (**Jensen, 1995**). Další částí tuku mléka jsou 2 % diacylglyceridů, zvaných také jako DAG. Jako poslední složku nesmíme opomenout monoglyceridy, jako je 1% fosfolipidů, 0,5 % cholesterolu a pouhých 0,1 % zastupujících volných mastných kyselin. Vzhledem k výživě zvířat se mohou v tucích vyskytovat stopová

množství uhlovodíků, vitamínů, které jsou v tucích rozpustné a další látky, jež byly zavedeny do zvířecích krmiv (**Pereira, 2014; Jost, 2011**).

1.1.2.1 Mastné kyseliny

Mléčný tuk tvoří přibližně 400 různých mastných kyselin a z tohoto důvodu je mléčný tuk považován za vůbec nejsložitější přírodní tuk z hlediska tuků přírodních (**Pereira, 2014**). Mastné kyseliny s krátkým řetězcem mají vliv na rozhodující chuťové vlastnosti mléka. Mají vliv též na jeho žluklost (**Jost, 2011**). Tyto kyseliny se převážně nacházejí v mléčné plazmě, ale pokud dojde k poklesu pH, jsou schopné přecházet právě do tukové fáze (**Březina, 1990**). Množství a složení mastných kyselin vyskytujících se v mléce závisí na původu zvířete, stádiu laktace, fermentace nebo výše uvedených krmivech. Většina mastných kyselin je získána právě z krmiv nebo mikrobiální aktivity z žaludku krav, přesněji části zvané bachor. S ohledem na celkovou tukovou frakci se zde vyskytuje 70 % nasycených mastných kyselin, detailněji kyselina palmitová, myristová, stearová a kapronová (**Pereira, 2014; Jost, 2011**).

Zbylé procento se skládá z mastných kyselin nenasycených, tedy kyseliny olejové, linolenové a linolové. Díky konjugované kyselině linolové, která spadá do skupiny *trans* mastných kyselin, stojí za zmínku proces biohydrogenačních reakcí, kterých se účastní gastrointestinální mikroby přežvýkavců. Díky těmto reakcím dochází k pozitivnímu přínosu těchto látek na lidský organismus, jako je například pozitivní vliv na kardiovaskulární systém, imunitní funkci těla a též tyto látky mají protirakovinné vlastnosti. Děje se tomu tak z důvodu, že kyselina linolenová a linolová mají schopnost zvyšovat HDL cholesterol. Konzumace mléčného výrobku tedy představuje až 70 % zkonsumované CLA za den (**Pereira, 2014; Jost, 2011; Nadeem et al., 2015**).

Jak již bylo řečeno, celkový tuk se vyznačuje vyšším obsahem nasycených mastných kyselin, které s sebou samozřejmě nesou i nějaká zdravotní rizika, jako například zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění. Toto onemocnění zvyšuje především kyselina myristová a laurová, vzhledem k jejich aterogenitě. Tyto složky mléčného tuku může chovatel regulovat především krměním. Výbornou strategií je přidávání rostlinných olejů, různých slunečnicových a lněných semen do výživy dojnic. Tím se zvýší obsah nenasycených mastných kyselin a bioaktivních sloučenin v mléce (**Nadeem et al., 2015**).

Pokud vezmeme v potaz mléčný tuk a jeho změnu během procesu fermentace, zjistíme u něho jisté změny, a to především v zastoupení volných mastných kyselin. Jejich množství se mění v závislosti na druhu a složení mléka, svou roli hrají také enzymový proces laktózy a

aminokyselinová degradace. Nadále může docházet k jistým změnám v poměru volných mastných kyselin při mikrobiologických a technologických procesech během výroby mléka **(Forman, 1994)**.

1.1.3 Sacharidy

Složkami sacharidů v mléce mohou být jak jednoduché, tak složené sacharidy. Mezi jednoduché řadíme glukózu a galaktózu, ze kterých jsou následně tvořeny sacharidy složené, jako je například laktóza. Některé sacharidy jsou v mléce vázané na bílkoviny. Příkladem jsou imunoglobuliny kravského mléka, které obsahují jak galaktózu, fukózu, ale i manózu **(Březina, 1990)**.

1.1.3.1 Laktóza

Tento sacharid se nachází pouze v mléce **(Pereira, 2014)**. Je tedy nazýván jako mléčný cukr. Ten je obsažen přibližně v 50 % z celkového obsahu sušiny odstředěného kravského mléka **(Jost, 2011)**. Laktóza má vliv na vlastní chuť a barvu mléčných výrobků, které jsou zpracovávány za vysoké teploty, jako jsou například UHT mléko, mléko zahuštěné a jiné produkty **(Březina, 1990)**. Oproti výše uvedenému tuku se koncentrace laktózy v mléce téměř nemění. Denní odchylka činí maximálně 0,9 % **(Ferneborg, 2016)**. Nesmíme opomenout složky, ze kterých se laktóza skládá.

Jsou jimi jedna molekula glukózy a jedna galaktózy **(Jost, 2011)**. Obě tyto složky spadají do sacharidů zvané hexózy **(Březina, 1990)**. Laktóza je syntetizovaná v mléčné žláze reakcí zvanou fosforylací, kdy ze dvou molekul glukózy dojde ke vzniku jedné molekuly galaktózy. Můžeme tedy říci, že k syntéze jedné molekuly laktózy je potřeba dvou molekul glukózy **(Jost, 2011; 14)**. Celý tento děj probíhá v Golgiho aparátu buňky a pro tuto syntézu jsou kromě glukózy třeba ještě další proteiny, jako je například výše uvedený laktalbumin. V mléce má především regulační funkci, protože se podílí na udržování osmotického tlaku, který má za úkol do mléka přivádět vodu **(Ferneborg, 2016)**. Nejčastějším rozkladem laktózy je fermentativní mléčné kvašení, které následuje po její enzymové hydrolýze **(Forman, 1994)**.

Co se týče vstřebávání laktózy po požití mléčného produktu, dochází k němu díky enzymu laktáza, který obsahuje sliznice tenkého střeva. Díky tomu dojde k hydrolýze laktózy, následnému vstřebání a transportu do jater ve formě dvou monosacharidových podjednotek glukózy a galaktózy. Pomocí portální žíly je galaktóza převedena na glukózu. Zajímavostí je,

že při nedostatku tohoto enzymu se může již u jedinců dětského věku objevit tzv.: intolerance laktózy (**Pereira, 2014**).

1.1.4 Minerální látky

Minerální látky spadají do látek zvaných také jako soli mléka. Můžeme se tak setkat s výskytem tzv. makroelementů a mikroelementů v mléce. Látky, jako jsou chloridy, citráty, hořčík a další, se řadí v mléce mezi makroelementy, oproti tomu selen se zinkem jsou řazeny do skupiny druhé, a to mikroelementů (**Gajdůšek, 2003; Navrátilová et al., 2012**). Obě tyto skupiny látek mají velký význam ve výživě, protože jsou zdrojem fosforu a vápníku. Pokud bychom se podívali na vztah minerálních látek a bílkovin, zjistili bychom, že soli mléka významně ovlivňují fyzikální stav a stabilitu bílkovin v mléce. Nadále existuje vztah mezi solemi a mléčnými lipidy ve smyslu, že díky katalytické činnosti mléčných solí může docházet k oxidaci lipidů (**Březina, 1990**).

Obsah solí v mléce kolísá, protože není lehké stanovit přesný obsah solí daného mléčného výrobku. V mléce se ale nacházejí v množství 0,6 – 1,1 % (**Navrátilová et al., 2012**). Jednotlivé soli se v mléce nacházejí buď v roztoku, nebo koloidní formě, jsou ale vázané na organické sloučeniny mléka a přechází do mléka z krevní plazmy savce (**Březina, 1990; Marbook and Pretty, 2003**). Pokud bychom vzali v potaz proces fermentace, nemá žádný významný vliv na obsah minerálních látek v mléce a to především i z výše uvedeného důvodu, že obsah těchto látek v mléce kolísá (**Forman, 1994**). Jak již bylo zmíněno výše, vápník a fosfor zastupují složky, které se podílí na nutričním složení mléka. Jsou proto závislé na obsahu dané bílkoviny, která je přenáší. V tomto případě se zmiňujeme o kaseinu a vzhledem k tomu, že množství kaseinu je závislé na zdravotním stavu, stravě a životosprávě dojníc. (**Březina, 1990**).

1.1.4.1 Fosfor

Fosfor se v mléce nachází ve formě pravého roztoku a roztoku koloidního. Ve formě pravého roztoku může být obsažen v anorganických solích, esterech a kaseinovém komplexu. Zaujímá 33 % z celkového obsahu fosforu ve formě pravého roztoku v anorganických solích. V kaseinovém komplexu zaujímá 20 % a v organických esterech je to poté pouze 7 %. Ve formě koloidního roztoku se nachází v lipidech a to v množství 1,5 %, ale také v anorganických solích s hodnotou 39 %. V čerstvém mléce se nachází společně s vápníkem ve formě suspenze (**Březina, 1990**).

1.1.4.2 Vápník

Vápník se v mléce nachází v množství 1200 mg/l a je rozdělen mezi micelární a vodnou fázi mléka. Jak již bylo řečeno výše, s micelami se setkáváme u tuků, z čehož vyplývá že micelární fáze vápníku bude navázána právě na lipidy. Oproti tomu vodná fáze je oddělena pomocí syrovátkových bílkovin. Pokud by ale došlo ke změně pH mléka, změně teploty či dalších fyzikálně chemických podmínek, byl by možný přechod vápníku z fáze micelární do fáze vodné a naopak (**Pereira, 2014**). Vápník je stejně tak jako fosfor důležitý pro správnou funkci krevní srážlivosti, svalovou činnost, správný růst kostí a zubů (**Gajdůšek, 2003**). K jeho vstřebávání dochází ve střevní stěně, což je pozitivní účinek především při výživě dětí. V syrovém čerstvém mléce je vázán s kyselinou fosforečnou, citronovou a v podobě kaseinátu vápenatého. Stejně jako fosfor se v mléce nachází v koloidní formě, kde tvoří 30 % ve vazbě na fosforečnan vápenatý a 40 % v kaseinovém komplexu. Působením sířidla je vápník schopen, pokud je přítomen v dostatečné formě vytvářet pevnou sraženinu. Z tohoto důvodu je obsah vápníku důležitý pro tvorbu sýrů (**Březina, 1990**).

1.1.4.3 Draslík

Draslík je minerál obsažený v mléce, který má značnou fyziologickou funkci pro udržování krevního tlaku (**Franzoi et al., 2018**). Rotterdamská studie prokázala, že konzumace syrového mléka je z hlediska prevence hypertenze efektivnější, než příjem doplňků stravy (**Pereira, 2014**). Zároveň příjem draslíku, který je součástí mléčného výrobku poskytuje přibližně jednu čtvrtinu celkového draslíku důležitého pro denní příjem (**O'Halloran et al., 2016**). Kromě fosforu, se vápník i draslík v mléce mohou objevovat i ve vazbě na chloridy, které mají za úkol udržování osmotického tlaku mléka (**Březina, 1990**).

V níže uvedené Tabulce II je uveden obsah jednotlivých minerálů v jednom litru mléka. Jak si můžeme povšimnout, nejvíce zastoupený je zde draslík, poté vápník a následují chloridy. Minerální prvek, který v mléce zaujímá nejmenší část, je dle uvedené tabulky hořčík.

Tabulka II: Obsah minerálních látek v kravském mléce (Navrátilová *et al.*, 2012)

Minerální látka	Obsah (mg/l)
Fosfor	930
Vápník	1180
Draslík	1440
Hořčík	130
Sodík	500
Chloridy	1100

1.1.5 Vitamíny

Mléko je obvykle bohaté na vitamíny rozpustné v tucích. Těmito vitamíny jsou vitamíny skupiny A, D, E a K. Nachází se v něm ale i vitamíny rozpustné ve vodě (**Bosenau and Boston, 1921**). Mezi tyto vitamíny patří především tzv.: komplex vitamínů B a C. Vitamíny rozpustné v tucích jsou závislé na obsahu mléčného tuku. Právě z toho důvodu mléko odtučněné obsahuje menší podíl vitamínů A, D, E a K. V některých zemích se odtučněné mléko obohacuje o složky vitamínu A a D, právě z důvodu zlepšení jeho nutriční bohatosti (**Pereira, 2014**). Některé vitamíny mají vliv na oxidačně-redukční reakce mléka. Nadále mají roli antioxidantů lipidů. Mléko je bohaté především na vitamín B₂, který je užíván jako přirozené barvivo daného mléčného výrobku (**Březina, 1990**).

1.1.5.1 Vitamíny rozpustné v tucích

Vitamín A se také nazývá retinol (**Debier *et al.*, 2005**). Je silně závislý na množství karotenoidů v krmivech (**Březina, 1990**). Jeho obsah se mění v závislosti na ročním období. Přes zimu je oproti letnímu období značný úbytek tohoto vitamínu v mléce (**Lindmark *et al.*, 2003**). Retinol a karoteny do mléka přechází z krve živočichů. Největší aktivitu má β-karoten, ze kterého se pomocí oxidačního štěpení vytvoří dvě molekuly vitamínu A. Typické zbarvení mleziva je právě díky karotenům, protože obsahuje až desetkrát více karotenů a vitamínu A, než samotné klasické mléko (**Březina, 1990**). Tento vitamín je důležitý pro správný růst a vývoj a má značný vliv na zdraví očí, proto při hypovitaminóze hrozí šeroslepost či rohovatění oční sliznice (**Debier *et al.*, 2005**).

Vitamín D je též nazývaný jako kalciferol. Jeho forma D₂ vzniká UV ozářením rostlinného ergosterolu, oproti tomu vitamín D₃ je nazývaný jako cholekalciferol. Jeho syntéza oproti vitamínu D₂ probíhá v organismu živočichů. Při tepelné úpravě mléka jsou obě formy stálé (**Březina, 1990**). Vitamín D je důležitý ve výživě, protože zapříčiňuje vstřebávání vápníku a fosforu ve střevě a tím jejich ukládání do kostí. Část tohoto vitamínu se během zpracování mléka ztrácí. Záleží ale na formě obalu mléčného produktu (**Labronici et al., 2016**).

Vitamíny E řadíme mezi antioxidanty, protože chrání lipidy před oxidací a zároveň mitochondrie před inhibicí mastných kyselin z lipidů. V mléce mají především význam pro jeho termostabilitu (**Březina, 1990**). Ze zdravotního hlediska se vitamín E spojuje se snižováním rizika rakoviny a koronární srdeční příhodou. Též může stimulovat imunitní systém a zvýšit jeho obranyschopnost (**Haug et al., 2007**).

Vitamín K tvoří dvě hlavní formy. Je jím vitamín K₁ a vitamín K₂. Často se o vitamínu K v souvislosti s mlékem nemluví právě z toho důvodu, že je v něm obsažen pouze ve stopovém množství (**Březina, 1990**).

1.1.5.2 Vitamíny rozpustné ve vodě

Vitamín B₂ má hořkou chuť a je součástí některých enzymů, jako jsou například FMN a FAD. Zároveň má schopnost účastnit se procesů při opravě DNA. Jeho vodný roztok má fluorescenci do zelenožluté barvy, díky tomu je i syrovátka nažloutlého zbarvení. Vzniká působením mikroflóry v bacheru, může zasahovat do oxidace kyseliny askorbové. Jeho zastoupení v mléce je celé 2 mg/l, ale při slunečním záření může docházet i k jeho ztrátám.

Kyselina listová (B₉) je sloučenina kyseliny glutamové s kyselinou pteroovou. Je také syntetizována v bacheru dojnic. Její nedostatek může působit ztráty krátkodobé paměti, v těhotenství nedostatečný vývoj plodu. Oproti tomu její zvýšený příjem snižuje riziko hypertenze.

Vitamín B₁₂ (kobalamin) ve své molekule obsahuje kobalt. Jeho obsah v kravském mléce značně kolísá. Celková hladina je 4 µg/l. Opět se vyskytuje ve vazbě na bílkoviny a zajímavostí je, že se nachází pouze v potravinách živočišného původu.

V čerstvém mléce nalezneme také vitamín C, který za působení enzymů, kovů, světla a vzduchu přechází na dehydroaskorbovou kyselinu. Ta v mléce tvoří až 33 % z celkového množství vitamínu C obsaženého v mléce. Pokud v okolí tohoto vitamínu není k dispozici měď či železo, působí jako antioxidant. V opačném případě dochází ke tvorbě komplexů, díky

nimž později dojde k oxidaci mléčného tuku. Pokud vitamín C vystavíme světlu, zapříčiníme tím jeho úbytek. Na základě tohoto poznatku lze odhadnout, jak dlouho na vitamín světlo působilo. Z tohoto důvodu se řadí mezi nejméně stálé vitamíny. Obsah vitamínu v mléce kolísá na základě druhu dojnic, jejich laktaci a samozřejmě zdravotním stavu mléčné žlázy dojnice (**Gajdůšek, 2003; Březina, 1990; Pereira, 2014; Navrátilová *et al.*, 2012; Haug *et al.*, 2007**).

1.2 Hygienické požadavky a technologie mléka

1.2.1 Dojnice

Syrové mléko má bílou či lehce nažloutlou barvu, je mléčné chuti bez dalších pachů (Čepička, 1995). Dojnice, které poskytují syrové mléko či mlezivo nesmí trpět žádným nakažlivým onemocněním. Zvíře musí být v dobrém zdravotním stavu, bez příznaků nákazy, jež by mohla zapříčinit kontaminaci a znehodnocení mléka. Zároveň nesmí trpět pohlavní nemocí, mít zraněné vemeno, užívat nepovolené léky (Janštová *et al.*, 2012). Kvalitu a obsah jednotlivých složek je závislý na plemenu dojnice, jejím krmení a zdravotním stavu. Na hygienickém hledisku záleží především doba před a během jednotlivého dojení (Čepička, 1995).

1.2.2 Dojení

Před zahájením dojení je třeba dbát velké čistoty. Zároveň je od každé dojnice prováděna kontrola mléka tak, aby se zamezilo abnormalitám jeho kvality a zároveň byly pohlídány jeho fyzikálně-chemické a organoleptické vlastnosti. Mlezivo je dojeno odděleně, aby nedocházelo k jeho mísení se samotným mlékem syrovým. Z použitelnosti mlék do prodeje a k lidské konzumaci jsou vyloučena mléka, která pochází od dojnic do pěti dní po otelení. Právě z toho důvodu není mlezivo mícháno s mlékem. Další druh mléka, který se nezpracovává do konzumní složky, je mléko od dojnic, které dojí méně jak dva litry, dále mléko z prvních stříků a další (Čepička, 1995; Janštová *et al.*, 2012).

1.2.3 Uchování a chlazení mléka

Pro uchování mléka je vyhrazeno takové místo, aby se zamezilo jeho kontaminaci a zároveň dalším změnám, které by mohly ovlivnit jeho samotné složení. Díky tomu se i mléko ihned po nadojení chladí, aby se zabránilo výskytu kontaminujících mikroorganismů. Samotné mléko má po nadojení 33 °C a co nejrychleji musí být vychlazené na předepsanou teplotu. Toto chlazení probíhá v místnosti (mléčnice), která je od dojírny a stájí oddělena a vybavena za těmito účely. Stěny takové místnosti musí být snadno omyvatelné, stejně tak jako podlahy, které jsou navíc proloženy odtokovým systémem. Zároveň je místnost dle předpisů větrána, osvětlena a oddělena od prostor, kde by mohlo dojít ke snadné kontaminaci mléčného produktu (Janštová *et al.*, 2012). Další požadavky jsou vzneseny na stáje dojnic, které musí být světlé a vzdušné, zároveň čisté. Hlavním požadavkem je přívod pitné a teplé

vody. Vedle umývárny by se měl nacházet sklad dezinfekčních prostředků a sklad pro umyté nádoby a dojicí zařízení.

Hotové produkty jsou uskladněny ve vhodných čistých skladech a chladírnách, popřípadě mrazírnách. Tyto prostory jsou chráněny proti hmyzím škůdcům, hlodavcům, roztočům a dalším případným pachům. Při jejich manipulaci je třeba dbát na to, aby nedošlo k ručnímu kontaktu s výrobky (**Forman, 1994**).

V případě, že je mléko každý den sváženo, musí být hned chlazeno na teplotu maximálně 8 °C. Oproti tomu mléko, u něhož není svoz každodenní, je chlazeno na nejvýše 6 °C. V případě mleziva jsou skladovací podmínky stejné. Mlezivo navíc může být i mrazeno a především musí být skladováno odděleně od samotného syrového mléka. Chlazení je prováděno v nádrži, kde je buď chladio odpařeno, nebo dochází k akumulaci chladu do ledové vody, která obklopuje danou nádobu. Tento styl chlazení je jak ekonomický, tak ekologický. Nádrže jsou vyrobeny z nerezové oceli, mají broušený povrch a jsou dvouplášťové, kde se v prostoru mezi stěnami nachází právě ledová voda. V horní části je umístěno míchadlo i napouštěcí otvor, v dolní části pak vypouštěcí zařízení. Sanitace nádob se provádí pokaždém vypuštění (**Janštová et al., 2012**).

1.2.4 Příjem mléka v mlékárně

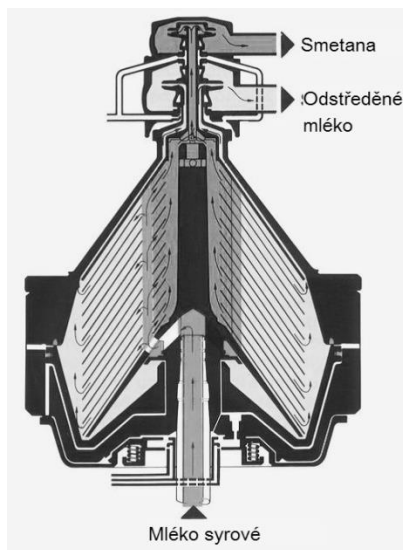
Mléko se dopraví do mlékárny pomocí cisteren, ve kterých je mléko uchováno za určité teploty. Tyto cisterny jsou označeny nápisem mléko či potraviny. Uvnitř cisteren se nacházejí vlnolamy, které při transportu brání mechanické činnosti mléka. Takto vybavený automobil může obsahovat i autosamplery, které jsou určeny k automatickému odběru vzorku, jež je potřebný pro mlékárnu, kam je mléko dováženo.

U takto odebraného vzorku je kontrolována teplota a přítomnost reziduí. V případě pozitivního testu na rezidua inhibičních látek mlékárna nemůže dovezené mléko přijmout. Nadále se stanovuje titrační kyselost, popřípadě měrná hmotnost, obsah tuku, bílkovin a kaseinu a termostabilní bílkoviny. V případě příjmu je mléko pomocí čerpadel přečerpáno do nerezových tanků.

1.2.5 Odstředění mléka

Odstředění je prováděno pomocí filtrů a odstředivek. Principem je, že mléko obsahuje rozdílné částičky s měrnou hmotností. Tím dojde k separaci tuku a samotného mléka, čímž se mléko očistí od mechanických nečistot, buněčných částic, ale i od části mikroorganismů.

Vhodná teplota pro tento proces je 40 – 50 °C. V odstředivce se odstředěné mléko situuje blízko stěny bubny, lehčí tuková část je vytlačována do středu, hovoříme tedy o smetaně a těžké částice, které tvoří nečistoty a výše uvedené buněčné složky a mikroorganismy jsou zachytávány na stěně bubny. Těmto částicím říkáme kal. Odstředivky mohou být diskontinuální nebo kontinuální. Kontinuální odstředivky jsou samoodkalovací. V dnešní době může být využívána i tzv. baktofuga, díky které dochází k odstranění bakterií z mléka, také pomocí odstředivé síly (**Janštová, 2012**).



Obrázek 2: Schéma odstředivky (Kadlec, 2002)

1.2.6 Tepelné ošetření mléka

Díky tepelnému ošetření se mléko stane zdravotně nezávadné, je tedy díky této technice zbaveno patogenních mikroorganismů a nežádoucí technické mikroflóry. Tímto zásahem se prodlouží i doba trvanlivosti mléka (**Březina, 1990**). Zároveň se díky tepelnému ošetření zlepší vlastnosti mléčných složek, jako je například vývoj požadované chuti (**Jost, 2011**). Nejprve je teplota postupně zvyšována, díky tomu dojde ke zpomalení růstu mikroorganismů, až jejich úplnému usmrcení. Letální teploty jsou pro jednotlivé druhy mikroorganismů různé. Tepelným ošetřením nedochází jen ke zbavení nežádoucích mikroorganismů, ale také k potlačení funkce některých enzymů v mléce, jako je především lipáza, oxidoreduktáza a proteáza. Jsou dva hlavní způsoby, jimiž můžeme mléko tepelně ošetřit - pasterace, sterilace, ale můžeme se setkat i s technikou terminace (**Březina, 1990**).

1.2.6.1 Pasterace

Pasterace je proces, kdy je mléko zahříváno na 100 °C a tím dochází ke zničení vegetativních mikroorganismů, ale zároveň je zachována nutriční hodnota mléčného produktu. Jak již bylo řečeno výše, dochází k inaktivaci některých enzymů, u pasterace konkrétně ke snížení aktivity lipázy (**Rolf, 2011**). Pasterace dělíme do několika druhů. Je to především pasterace dlouhodobá, kde dochází k záhřevu na přibližně 65 °C po dobu 30 minut. Další pasterací je pasterace šetrná, kdy se zahřívá na maximální teplotu 75 °C po dobu 15-20 minut. Při tomto druhu pasterace je možné přežití sporotvorných či termorezistentních mikroorganismů. Dochází k denuraci pouze 15 % syrovátkových bílkovin a z toho důvodu není nikterak narušena chuť mléka. Poslední pasterací je vysoká pasterace, kdy je mléko zahříváno na teplotu 85 °C, ale lze teplotu zvýšit i nad 100 °C. Doba tohoto záhřevu je pouhých 5 sekund. Denurace syrovátkových bílkovin činí celých 50 %, vápník přechází na koloidní formu a již se mění sensorické vlastnosti (**Buňka et al., 2013; Kadlec, 2002**). Mléko je po pasteraci chlazeno na teplotu nižší než 6 °C. Pokud není možné mléko ihned po pasteraci zpracovat, je skladováno v tzv. tancích. Jsou to nerezové nádoby válcovitého tvaru, které mají vypouklé přední stěny. Pro pasteraci jsou nezbytná pasterační zařízení, jako je například kotlový, trubkový nebo deskový pastér (**Janštová, 2012**).

1.2.6.2 Sterilace

Mléko je při tomto procesu ošetřeno v hermeticky uzavřených nádobách. Dochází zde k nepřímému ohřevu až na teplotu 100 °C. Sterilace je prováděna již ve spotřebitelských obalech. Uzávěr musí být neporušený, tím dojde k likvidaci všech mikroorganismů, spor a enzymů. Zároveň je prodloužena trvanlivost mléka na několik týdnů. Rozlišujeme dva druhy sterilací, a to diskontinuální a kontinuální. U diskontinuální sterilizace hraje roli vyhřívání pára, oproti tomu kontinuální je optimalizována o složku regulace tlaku (**Janštová, 2012**).

1.2.6.3 Terminace

Tento proces zahrnuje ošetření mléka na teploty, které jsou pod rozmezím teplot při pasteraci. Rozmezí těchto teplot se nachází mezi 57-68 °C. Při této teplotě je tedy mléko terminováno, a to po dobu 10-15 sekund. Požadavkem ale je, že u takto zpracovaného mléka nesmí být inaktivován enzym fosfatáza (**Rolf, 2011**).

1.2.7 Standardizace a homogenizace

Tyto dva kroky zahrnují úpravu tukové části mléka. Standardizace probíhá tak, že se do tanku napustí přímo vypočtený objem odstředěného mléka a smetany. Výhodou tohoto kroku je, že lze mísit mléka různé tučnosti a druhu. Dalším druhem standardizace je využití zařízení, kdy měřicí linka měří tučnost obou složek před smícháním. Měří se i teplota a lze regulovat průtok jednotlivých složek.

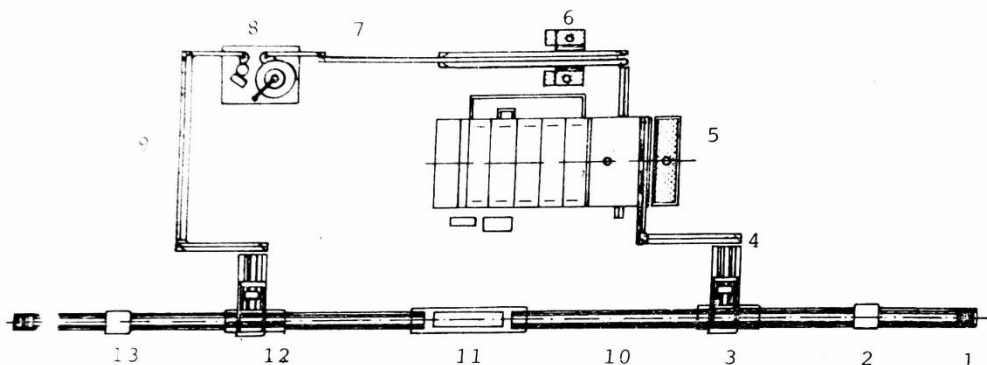
Při průběhu homogenizace dochází ke zmenšení tukových kuliček a díky tomu nedochází k vyvstávání mléčného tuku při skladování mléka. Pro tento proces se používají homogenizátory, kdy se mléko nasaje do čerpadla a pomocí vysokého tlaku se vytvoří malá štěrbinová v homogenizační hlavě, kterou je pak mléko schopné proudit vysokou rychlostí. V tomto ději dochází k rozbití tukových kuliček, kdy navíc dojde ještě k nárazovému poklesu tlaku. Složení mléka ale musí být následovné - mléko musí obsahovat dostatečné množství bílkovin a tuk pak musí být jako kapalina. Dvoustupňové homogenizační hlavy se využívají pro optimalizaci homogenizace (**Buňka et al., 2013; Březina, 1990, II. část; Kadlec, 2002**).

1.2.8 Plnění a balení

Pokud je distribuce mléka směřována do maloobchodní sítě, mléko se balí do vratných nebo nevratných obalů. V případě velké distribuce se mléko balí do konví.

Mezi vratné obaly můžeme řadit například skleněné lahve. Sklo má v mlékárenském potravinářství mnoho výhod. Povrch skla totiž nevstupuje do chemické reakce mléka, je výborně omyvatelný, lze ho desinfikovat a při jeho rozbití ho lze využít pro výrobu nových lahví. Oproti tomu má i své nevýhody. Jsou jimi průniky slunečních paprsků, díky nimž mléčný tuk rychleji žlukne, obal je těžší a hrozí jeho rozbití (**Březina, 1990, II. část**). Na základě průniku paprsků mohou být rozloženy i některé vitamíny, jako například vitamín C nebo B₂ (**Buňka et al., 2013**).

Na Obrázku 3 je zobrazena lahvárenská linka, která je využívána pro výrobu a plnění skleněných lahví. Je zde umístěna myčka lahví, vakuový plnič současně s uzavíratelným zařízením.



Lahvárenská linka

(1-gravitační válečková dráha, 2-odstohovač přepravek, 3-vykládač lahví, 4-zdvojený destičkový dopravník, 5-myčka lahví, 6-prosvěcovač lahví, 7-akumulační pás, 8-monoblok, 9-zdvojený destičkový dopravník, 10-řetězový dopravník, 11-myčka přepravek, 12-vkládač lahví, 13-stohovač přepravek)

Obrázek 3: Lahvárenská linka

Nevratné obaly jsou čím dál častější oproti obalům vratným. Mezi jejich výhody patří například snížená nákladnost na strojní zařízení, vymizení skladů s vratnými lahvemi, snadnější sterilizace lahví, lepší odolnost vůči teplotě, malá hmotnost, nerozbitnost. Stejně jako vratné obaly mají i obaly nevratné své nevýhody. Jsou jimi náklady, které jsou vyšší, než u skla. Může se objevit reakce mezi výrobkem a plastem, což se projeví změnou chuti a vůně výrobku. V této kategorii mluvíme především o plastových a papírových obalech. Plastové lahve jsou vyrobeny z polyethylenu, polypropylenu, polystyrenu nebo PVC a jsou zhotoveny buď těsně před plněním mléka, nebo jsou dováženy hotové (Březina, 1990, II. část).

Vezmeme-li v potaz mléko trvanlivé, je nutné ho balit do sterilních obalů a asepticky. Většinou se zde uplatňují techniky, které využívají nevratných obalů. Jsou to tedy Tetra Pack, Tetra Brik nebo Pure-Pack. Tetra znamená, že jsou obaly několikavrstvé, především čtyřvrstvé, protože obsahují vnější a vnitřní vrstvu zhotovenou z polyethylenu, dále laminovaný papír a hliníkovou folii. Díky tomu nedochází k průniku světla do mléčného výrobku, a tudíž nedochází k rozkladu vitamínů. Zároveň jsou obaly pevné a mají stálý tvar (Bylung, 1995; Březina *et al.*, 1990, II. část).

1.3 Mikrobiologie mléka

Mléko je výborným výživovým médiem pro většinu mikroorganismů, jakou jsou mikroorganismy žádoucí, například mléčné bakterie, které se využívají při výrobě fermentovaného mléka, ale také nežádoucí mikroorganismy, mezi které spadají bakterie patogenní. I když klasické mléko obsahuje většinou méně jak 10^3 životaschopných bakterií v 1 ml mléka, může dojít ke kontaminaci ve vývodních kanálcích, při udržování mléka v určité teplotě, během procesu dojení, atd. (**Jost, 2011**).

Kontaminace mléka mohou být primární a sekundární. Mezi primární kontaminaci patří:

- Bakterie pocházející z dutiny a kanálků vemena
- Mikroorganismy vyskytující se na povrchu vemena, krmiv a prachu, rukou dojiče
- Mikroorganismy kontaminující plochy, se kterými mléko přijde do styku jak při dojení, tak dopravě, filtrování, chlazení
- Kontaminace patogenními mikroorganismy pocházejícími z infikovaného vemena dojnice

Mezi sekundární kontaminace můžeme zahrnout mikroorganismy, které se množí po předchozí primární kontaminaci. Ta závisí na:

- Době, kdy dojde ke chlazení mléka po jeho nadojení
- Teplotě chlazení mléka
- Na době, po kterou mohou mikroorganismy v mléce růst
- Na době, po kterou jsou v mléce prováděny metabolické děje

Do vemena se můžou dostat různé druhy mikroorganismů, ale přežijí zde pouze ty, které jsou schopny adaptovat se na jeho vnitřní prostředí, jako je *Lactococcus lactis*. Na mikroflóru má vliv jak zdravotní stav dojnic, tak jejich výživa. Tyto faktory přispívají k přirozené obranyschopnosti vemene (**Görner and Valík, 2004**). Celkové počty a druhy mikroorganismů závisí na jeho manipulaci mléka během výrobního procesu a času jeho zpracování. Mikroflóra mléka se mění v čase od jeho opuštění z farmy, dále hraje roli skladovací teplota. Ukazatelem těchto problémů je právě stanovení CPM (**Chambers, 2002**).

Mikrobiologické požadavky na syrové mléko a tím pádem jeho příslušná jakost jsou uvedeny v Tabulce III. Počet mikroorganismů je vztažen na CPM při zachovaných

předepsaných podmínkách, jakými jsou například chlazení mléka do 150 minut po začátku dojení a uchování mléka při teplotě 4-7 °C, popřípadě 4-6 °C (**Görner and Valík, 2004**).

Tabulka III: Kritéria CPM u tříd mléka (Görner and Valík, 2004)

Třída jakosti mléka	Počet mikroorganismů (cfu/ml)
Q	$< 5 \times 10^4$
I	$< 1 \times 10^5$

Mléko, které již přesahuje hodnotu cfu/ml přes výše uvedených 1×10^5 a tedy již vybočuje ze třídy jakosti I, se hodnotí jako mléko nestandardní a jsou u něho sledovány počty psychrotrofních, termorezistentních a koliformních bakterií. Tyto počty jsou uvedeny v Tabulce IV.

Tabulka IV: Doplňkové mikrobiologické znaky jakosti (Görner and Valík, 2004)

Druh mikroorganismu	Počet mikroorganismů [cfu / ml]
Psychrotrofní	$< 5 \times 10^4$
Termorezistentní	$< 2 \times 10^3$
Koliformní	$< 1 \times 10^3$
Anaerobní sporotvorné bakterie	$< 1 \text{ cfu}/0,1 \text{ ml}$

Dalšími rody či skupinami mikroorganismů, které můžeme v mléce naleznout a jejichž některé druhy, spadají právě do výše uvedených psychrofilních či termorezistentních skupin, jsou mikrokoky, enterokoky, laktokoky, streptokoky, nesporulující grampozitivní tyčinky, sporotvorné gramnegativní tyčinky, kvasinky a plísně (**Görner and Valík, 2004**). Zastoupení těchto mikroorganismů je u nesporulujících grampozitivních tyčinek (*Bacillus* spp.), gramnegativních tyčinek (oxidáza pozitivní i negativní), kvasinek a plísní menší jak 10 %. U enterokoků se zastoupení pohybuje v hodnotách od 0 do 50 % a u mikrokoků 30-99 % (**Robinson, 1990**).

1.3.1 Psychrofilní mikroorganismy

Psychrofilní mikroorganismy tvoří v čerstvém stavu mléka pouze nepatrný podíl mléčné mikroflóry, ale mohou proliferovat až po skladování mléka, například v chladničce.

Tento proces je typický pro bakterie rodu *Pseudomonas*, *Alcaligenes* a *Flavobacterium*. Dochází k produkci extracelulárních enzymů (proteázy, lipázy) a následným vadám chuti či porušení stability UHT mléka (**Jost, 2011**).

1.3.2 Koliformní mikroorganismy

Mezi koliformní druhy spadají bakterie *Enterobacteriaceae*, kam řadíme především rody *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* a *Klebsiella*. Jsou to rody znehodnocující mikroflóru mléka, kdy dochází ke zhoršení chutě a vůně mléka, tvorbě slizu nebo přeměně barvy. Tyto mikroorganismy se do mléka dostávají kontaminací syrového mléka v důsledku jeho manipulace nebo nečistého vybavení při jeho technologickém zpracování.

1.3.3 Sporotvorné a mléčné bakterie

Sporotvorné bakterie, kam řadíme rody *Bacillus* a *Clostridium*, přežívají i pasterizační procesy mléka. *Bacillus cereus* je bakterie schopná přežít i v chladničkových teplotách. Představuje závažný problém především v čerstvém mléce, ale i pasterizovaných výrobcích. Oproti tomu *Clostridium tyrobutyricum* způsobuje potíže spíše tvrdých sýrů.

Mléčné bakterie spadající do rodu *Streptococcus*, *Lactobacillus* a *Leuconostoc* jsou bakterie, které mohou zapříčinit problémy v nedostatečně zamraženém mléce, protože působí jeho rychle kvašení (**Görner and Valík, 2004**).

1.3.3.1 *Streptococcus*

Jedná se o mléčné bakterie, které mají kokovitý tvar, jsou uspořádané do řetízků či dvojic, které jsou po Gramově barvení v mikroskopu patrné v modro-fialovém zbarvení. Z toho plyne, že je tento mikroorganismus gram-pozitivní, dále není pohyblivý a netvoří spory. Díky této bakterii dochází k fermentaci kyseliny mléčné právě na základě mléčného cukru. Optimální teplota růstu je 37 °C a nižší. Výjimkou jsou však termofilní druhy *Streptococcus salivarius* ssp. *termophilus*, jehož některé varianty působí na krevním agaru hemolýzu (**Görner and Valík, 2004**). *Streptococcus agalactiae* je druh patogenní pro člověka, ale pokud je bovinního typu, nezpůsobuje žádné lidské infekce (**Jičínská and Havlová, 1995**).

1.3.3.2 *Lactobacillus*

Do tohoto rodu mikroorganismů spadají druhy, které jsou fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní, nevykazující pohyb. Mají tvar paliček, fermentují sacharidy na kyselinu mléčnou, stejně tak jako tomu je u rodu *Streptococcus*. Procesem fermentace jsou schopné též tvořit ethanol a oxid uhličitý.

Do syrového mléka se tyto bakterie dostávají především z povrchu mlékárenského zařízení. Oproti rodu *Lactococcus*, který se v mléce rozmnožuje rychleji, je poměr rodu *Lactobacillus* rozhodně menší. Druhy *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a *L. delbrueckii* ssp. *lactis* se z rodu *Lactobacillus* využívají pro výrobu sýrů. Optimální teplota růstu je při mezofilních teplotách s hranicí do 40 °C (**Görner and Valík, 2004**).

1.3.3.3 *Leuconostoc*

Tyto bakterie jsou gram-pozitivní, nepohyblivé, netvoří spory, mají negativní katalázu a netvoří hemolýzu. Jejich optimální teplota růstu je v rozmezí 20-30 °C, ale některé jsou schopné růst i v 5 °C. Vyžadují přítomnost vitamínu skupiny B a zároveň obsah sacharidu, který je nezbytný pro jejich růst. Stejně jako výše uvedené mikroorganismy tvoří fermentací kyselinu mléčnou, ethanol a oxid uhličitý. Při obohacení mléka glukózou zde výborně roste také *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* (**Görner and Valík, 2004**).

1.3.4 Patogenní mikroorganismy

Mezi patogenní bakterie, které mohou působit závažné zdravotní problémy po požití mléka, patří například *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus*, *Coxiella burnetii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, druhy *Salmonella*, *Campylobacter* a *Listeria monocytogenes* i *Bacillus cereus*. Většina patogenní mikroflóry je částečně zničena při pasteraci mléka (**Jost, 2011**).

1.3.4.1 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus je psychrofilní mikroorganismus schopný tvořit termorezistentní spory. Jedná se o fakultativně anaerobní, gram-pozitivní tyčinku. Optimální teplota pro jeho růst je 30 °C, minimální 6 - 10 °C. Zároveň produkuje diarrhogení a emetický toxin (**Granum, 1997**). Dalšími virulenními faktory jsou fosfolipáza, hemolyzin a další. Diarrhogení toxin je možno inaktivovat při 56 °C po dobu 5 minut, avšak toxin emetický je vysoce termostabilní. K jeho inaktivaci dochází až při záhřevu na 128 °C po dobu 90 minut.

Z tohoto důvodu plyne, že při pasteraci není možné tento emetický toxin inaktivovat, ale spíše dojde k jeho aktivaci (**Jičínská and Havlová, 1995**). *Bacillus cereus* můžeme například najít na rostlinách, hnoji a různých krmivech. Ke kontaminaci konzumního mléka dochází právě v jeho syrovém stavu při dojení (**Helgason, et al., 2000**).

Ke stanovení počtů *Bacillus cereus* dochází nárustem kolonií při teplotě 30 °C na selektivně-diagnostické půdě MYP. Tato půda obsahuje mannitol, žloutkovou emulzi a polymyxin. Pro průkaz *Bacillus cereus* v mlékárenském průmyslu jsou tyto metody málo citlivé, proto se musí provést „nahromadění“ tohoto mikroorganismu buď pomocí membránové filtrace, nebo pomocí tekutého selektivního média a následným stanovením metodou MPN (**Jičínská and Havlová, 1995**). Dále byl *Bacillus cereus* využíván k vývoji HACCP, kdy se zjišťovala daná teplota a místo časté kontaminace této bakterie (**Zwietering et al., 1996**).

1.3.4.2 *Listeria monocytogenes*

Stejně jako *Bacillus cereus* je *Listeria monocytogenes* gram-pozitivní bakterie ve tvaru tyčky (**Jičínská and Havlová, 1995**). Byly prokázány minimálně dva patogenní druhy. Jsou jimi *Listeria monocytogenes* a *Listeria ivanovii*. U *Listeria ivanovii* bylo prokázáno, že je patogenní pouze pro přežvýkavce, oproti tomu *Listeria monocytogenes* je patogenní jak pro přežvýkavé savce, tak pro člověka (**Gillet et al., 2010**). *Listeria monocytogenes* je osmotolerantní. U lidí se listeriózy projevují různými symptomy, ale většinou postihuje především osoby se sníženou imunitou. Mezi rizikové skupiny patří i těhotné ženy (**Jičínská and Havlová, 1995**). *Listeria monocytogenes* je vnitrobuněčný parazit. Tato bakterie je schopna napadat buňky imunitního systému a množí se v nich (**Guillet et al., 2010**). Hlavním virulenčním faktorem je hemolyzin O, tedy listeriolyzin. Mezi další virulenční faktory spadá též fosfolipáza C, lecitináza, aktin, internaliny a další.

Listeria monocytogenes se do mléka dostává především z odpadních vod, půdy, hnoje, krmiv a vodních zdrojů. Bylo zjištěno, že u 52 % vzorků výkalů hospodářských zvířat se tento mikroorganismus vyskytoval (**Jičínská and Havlová, 1995**). Mléko se tedy kontaminuje mj. skrze exkrementy dojníc. Tento způsob kontaminace je samozřejmě zamezitelný především při správné hygienické prevenci (**Gelbíčová et al., 2011**). Zajímavostí je, že listerie byly prokázány ve stružkách, kanálech a odvodňovacích zařízeních. Je tomu proto, že tato zařízení prochází téměř všemi prostorami výroby a listerie se takto mohou šířit. *Listeria monocytogenes* fermentuje cukry na kyselinu mléčnou. Její optimální teplota růstu je

30-37 °C, ale je schopná růst ještě při 4 °C. K inaktivaci jejích buněk je dostačující záhřev na 72 °C po dobu 15 sekund, čehož se dosahuje při tepelné úpravě mléka.

Pro průkaz *Listeria monocytogenes* se využívá předmnožení ve zředěném bujónu dle Fräsera, následném pomnožení v selektivním bujónu dle Fräsera a vyočkování na dvě selektivně-diagnostické půdy, jakými jsou například PALCAM nebo Oxford. Pro mléko se ale většinou využívá selektivní bujón dle Lovetta a předpomnožení se neprovádí. K dispozici jsou ale i některé imunotesty, které značně zrychlí detekci této bakterie (**Jičínská and Havlová, 1995**).

1.3.4.3 *Staphylococcus aureus*

Tato bakterie znemožňuje zdravotní nezávadnost mléka a také ovlivňuje jeho jakost. Je to nepohyblivá bakterie kokovitého tvaru, typickým znakem jsou shluky do „hroznů“. Jedná se o gram-pozitivní, fakultativně anaerobní bakterie. Optimální teplota růstu je v rozmezí 30-37 °C. Optimální pH pro růst této bakterie je 7,0-7,5. Intoxikace tímto druhem mikroorganismu se projevují bolestmi hlavy, průjmem, zvracením, někdy i svalovými křečemi. Příčinou je enterotoxin, který je produkován právě toxigenními kmeny. Otravy nejčastěji způsobují sérotypy produkující SEB a SED. Geny, které kódují toxiny B, jsou lokalizovány na plasmidech, zatímco geny pro toxiny D jsou kódovány v chromosomu. Problémem je, že tyto toxiny nejsou inaktivovány pasterací, jsou rezistentní k enzymům, jež se tvoří v trávicím traktu a zároveň jsou rezistentní k proteázám, které tvoří mléčné bakterie. Dávka staphylokokového enterotoxinu, která je minimální pro vyvolání onemocnění, je stanovena na množství 1 – 100 mg. Tomu odpovídá nárůst *Staphylococcus aureus* v počtu 10^6 cfu/g. Mezi další virulenční faktory tohoto kmene patří plazmakoaguláza, staphylokináza, lipáza, fosfolipáza, hyaluronidáza a fosfatáza. Těchto virulenčních faktorů se využívá při identifikačních testech, pro potvrzení *Staphylococcus aureus*. Body pro posouzení zdravotní nezávadnosti výrobku jsou shrnuty takto:

- Výrobek může způsobit onemocnění a být toxický, ale *Staphylococcus aureus* nemusí být pomocí kultivace ve výrobku prokázán
- Výrobek může být zdravotně nezávadný, i přes fakt, že v něm byl nalezen *Staphylococcus aureus* ve vysokém množství, například 10^6 cfu/g a více.

Tyto druhy jsou vegetativními komenzály na respiračním ústrojí, intestinálním a urogenitálním traktu a zároveň jsou běžnou součástí mikroflóry vemene. Po usídlení při

otvoru struku dojde k jejich kolonizaci otvoru a následné produkci toxinů, tímto způsobem se rozvine onemocnění tzv. mastitida (**Chambers, 2002**). Na částicích prachu se mohou dále šířit vzduchem a tím kontaminují další povrchy. Syrové mléko je tedy kontaminováno především ve fázi dojení z vemene, ovzduší, ale může dojít k jeho kontaminaci i personálem. Dalším rizikem jsou dojnice nakažené mastitidou, které vylučují vysoký počet mikroorganismů do mléka. Mléko špatné jakosti, které obsahuje druh *Staphylococcus aureus*, obsahuje také nepatogenní mikroflóru, která je schopna potlačovat množení tohoto toxinogenního druhu. Pro jeho množení je ale výborným prostředím právě mléko pasterované (**Jičínská and Havlová, 1995**). V mléce kromě druhu *Staphylococcus aureus* můžeme nalézt také *Staphylococcus epidermidis* (**Jičínská and Havlová, 1995**).

Všeobecné stanovení *Staphylococcus aureus* je prováděno kultivačním postupem, kdy je vzorek vyočkován na:

- GTK agar pro zjištění celkového počtu mikroorganismů (CPM). Tato kultivace je prováděna při 30 °C po dobu až 72 hodin s následnou biochemickou nebo molekulárně-biochemickou identifikací (**Němečková et al., 2017**).
- selektivně-diagnostickou půdu Baird-Parkerův agar. Tento agar obsahuje teluričitan draselný, chlorid litný, glycin a vaječný žloutek (**Jičínská and Havlová, 1995**).

Nadále se *Staphylococcus aureus* potvrzuje pomocí testů na plasmakoagulázu. U mléka, kdy jsou očekávány nízké počty tohoto mikroorganismu, stanovujeme metodou MPN, kdy kultivujeme na selektivní bujón s teluričitanem draselným a chloridem sodným. Pokud ale máme vzorky, kde je již *Staphylococcus aureus* předpokládán, tedy očekáváme jeho určitý počet, počítáme opět kolonie na Baird-Parkerově agaru. Při podezření na mastitidy lze vyočkovat vzorek mléka přímo na krevní agar. Z hlediska imunologického testování, jsou čím dál tím více využívány testy ELISA a LAT (**Jičínská and Havlová, 1995**).

1.4 Nanotechnologie

1.4.1 Nanočástice

Nanočástice se v dnešní době vyrábějí ve velkém měřítku a je o ně zvýšený zájem, především v průmyslu. Čím dál více se začínají nanočástice používat jak ve zdravotnictví, tak potravinářství. Ve zdravotnictví nabízí tyto technologie velkou škálu využití především při onemocnění rakovinou či Alzheimerovou chorobou, jsou přidávány také do některých léků. V současnosti se využívají především konstruované nanočástice. Z hlediska materiálů se nanočástice mohou přidávat do plastů, kde by měly zajistit jejich větší trvanlivost. Zároveň byl u stříbrných nanočástic zjištěn antimikrobiální účinek (**Winchester *et al.*, 2010**). Oproti jiným částicím obsahují jejich nanostruktury velký počet atomů na jednotku objemu a mají specifické optické, katalytické a biologické vlastnosti (**Cao, 2004; Kvítek *and* Panáček, 2007**). Čím menší nanočástice, tím větší počet vnějších atomů oproti atomům, které jsou zastoupeny ve vnitřní části této struktury. Díky povrchu nanočástic roste i jejich povrchová energie. Tato skutečnost může ale způsobovat značné problémy právě při výrobě nanočástic. Je tedy třeba překonat jejich povrchovou energii. Právě kvůli této skutečnosti mohou být nanočástice termodynamické nebo metastabilní. Stabilizace nanočástic se provádí pomocí dvou metod. První je elektrostatická stabilizace, kde je využíváno adsorpce iontů a jejich odpuzování. Tyto ionty mají stejný náboj a váží se na povrch nanočástic. Systém je pak kineticky stabilní, oproti druhému systému, který je stabilizován termodynamicky a je jím sterická stabilizace, kde je využíváno sorpce makromolekul (**Cao, 2004**).

V současné době se využívají dvě techniky pro syntézu nanočástic. Jsou jimi Top-down a Bottom-up technika.

1.4.1.1 Top-down technika

Principem Top-down techniky je syntéza nanočástic, která využívá fyzikálních procesů zmenšování částic až do třídy nanometrů. Především se zde využívá laserové ablace, kde je důležité sledovat počet pulzů, výkon a velikost laserového paprsku. Na základě těchto informací lze připravit nanočástice s různými vlastnostmi. Pokud je tato metoda prováděna v tekutém prostředí, výsledkem jsou čistější nanočástice, než je tomu u typu metody, kdy je využíváno jako prostředí vakuum (**Brito-Silva *et al.*, 2010; Tilaki *et al.*, 2006; Tolaymat *et al.*, 2010**).

1.4.1.2 Bottom-up technika

Oproti první uvedené technice, je Bottom-up technika založena na principu chemických vlastností nanočástic. I díky této skutečnosti a chemickému průmyslu je tato metoda více využívána. Využívá se zde chemické redukce. Společně ovšem tyto techniky mají, že velikost a tvar výsledné nanočástice je závislý na experimentálních podmínkách jejího vzniku, tedy redukčních činidlech, stabilizátorech a dalších látek, které jsou do reakcí přidávány. Vzhledem k využitelnosti silných redukčních činidel, jakým je například tetrahydridoboritan, nelze tyto částice využívat u biologických metod.

K této technice se dá přiřadit i výroba elektrolytická. Tato metoda je nejstarší ze všech metod, ale vzhledem k optimalizaci a vývoji jiné technologie a pokroku, se již často elektrolýza v tomto oboru nepoužívá (**Cheon *et al.*, 2011; Panáček *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2009**).

1.4.2 Stříbro

Využití stříbra se datuje již do dob dávno minulých. Nejprve bylo stříbro využíváno jako měna, později se z něho začaly vyrábět šperky, ale již ve starém Římě obyvatelé upozorovali jeho antimikrobiální vlastnosti, což bylo příčinou výroby nádob a dalších stříbrných pomůcek. Ještě v době, kdy nebylo popsáno využití antibiotik pro terapii se právě stříbro ve formě koloidu využívalo pro léčbu choroboplodných onemocnění. Nadále se stříbrné ionty ve zdravotním průmyslu rozmohly a využití našly i materiály, které se používají na drobné oděrky a popáleniny (**Chen *and* Schluesener, 2008**). Koloidní částice stříbra lze připravit pomocí oxidačně-redukčních reakcí kovů a nekovů. U stříbra se jedná detailněji o mechanismus, kdy dochází k redukci stříbrné soli pomocí železnatých iontů. Tyto částice jsou následně využívány jako součásti nanostříbra.

1.4.2.1 Nanočástice stříbra

Jak již bylo řečeno výše, základním principem přípravy částic stříbra je redukce stříbrné soli v tzv. komplexujícím prostředí. Je ale nutný výběr vhodného činidla, ligandu a také určité koncentrace systému, kde bude k reakci docházet. Ligandem je ve většině případů redukující cukr. V potaz se bere i hodnota pH, kde díky těmto parametrům je výrobce schopný řídit velikost vznikající částice stříbra. Po vzniku nanočástice ve vodné disperzi se měří právě její výsledná velikost, kdy je využíváno rozptylu světla na povrchu této částice. Pro měření velikosti lze též využít transmisní elektronové mikroskopie či UV/VIS

spektroskopie. Pokud chceme zjistit obsah stříbra v nanočástici, lze využít také atomové absorpční spektrometrie (**Kvítek and Panáček, 2007**).

Vlastnosti nanočástice neurčuje pouze její velikost, ale také její tvar. Můžeme se zde setkat jak s tvarem koule, tyče nebo drátu, tak i tvarem krychle a dalších mnohostěnů. Jak již bylo uvedeno výše, při zmenšení rozměru částice dochází ke zvětšení jejího povrchu, tím se naskytuje velký prostor pro další reakce, což je základem pro antimikrobiální působení. Teorie tedy říká, že čím menší povrch částice, tím lepší antimikrobiální účinky (**Chen and Schluesener, 2008; Hájková and Šmejkal, 2010**).

1.4.2.2 Antimikrobiální působení stříbra

V případě nanočástic stříbra se předpokládá, že stříbrné ionty působí na disulfidové vazby buněčných membrán některých bakterií a tím dochází k jejich denaturaci. Zároveň je velkým přínosem studie, která dokázala, že bakterie si nedokáží vůči stříbrným iontům vytvořit rezistenci, jako je tomu například u antibiotik. Jak již bylo řečeno výše, antimikrobiální aktivita stříbra značně souvisí s povrchem dané nanočástice a tím tedy i jejím tvarem (**Zheng et al., 2004**). Pro zkoumání antimikrobiálních vlastností stříbra se využívají jednotlivé bakterie, jakými jsou například *Bacillus subtilis* či *Escherichia coli* (**Lee and Lee, 2006**). V současné době vystávají na povrch různé teorie, jak stříbro působí na buňky takových mikroorganismů. Faktem je, že při antimikrobiálním působení stříbra se téměř vždy setkáme se změnou struktury a morfologie na buňce daného mikroorganismu. První teorií je tedy hypotéza, že díky těmto změnám dochází ke smrti buňky. Druhou hypotézou je průnik stříbrných iontů do buňky mikroorganismu, tímto procesem se naruší DNA, přesněji dojde k její kondenzaci, následně ztrátě replikačních schopností a tím i smrti buňky. Další teorie tvrdí, že se částice stříbra naváží na membránu buňky, tato membrána ztratí svou funkci, což je permeabilita buněčné membrány a postupem času buňka odumře. Může se také jednat o narušení dýchacího řetězce v těle buňky, narušení buněčného dělení a tím samotnému zániku daného mikroorganismu (**Feng et al., 2000; Morones et al., 2005; Sondi and Salopek-Sondi, 2004**).

V praxi se můžeme setkat i s účinky nanočástic zlata, titanu a dalších, ale oproti stříbrným nanočásticím jsou ty zlaté značně méně reaktivní. Tím pádem je i jejich antimikrobiální účinek nižší. Jak již bylo řečeno, u antimikrobiálního účinku nanočástic se bere zřetel na jejich povrch a velikost. Čím menší nanočástice jsou, tím vyšší mají tento účinek a zároveň čím více ploch a hran obsahují, tím větší tento účinek je. Záleží samozřejmě

i na povrchu, na který se nanočástice nanáší. Čím více záhybů tento povrch má, tím více ploch jsou nanočástice schopny vytvořit a tím silnější antimikrobiální účinek mají (**Allaker and Memarzadeh, 2014; Seil and Webster, 2012**). Stříbro má ale oproti ostatním prostředkům značné výhody především v jeho širokospektrnosti, protože působí jak na různé kmeny bakterií, tak i houby, řasy a viry. Oproti jiným prvkům je především dlouho stabilní (**Duncan, 2011**).

1.4.3 Nanotechnologie v potravinářství

Využití nanotechnologií v potravinářství nachází stále většího rozvoje. Jedná se především o obalové techniky a materiály, které zahrnují zdokonalení obalu především z plastických hmot, kdy se do takového materiálu přidávají různé složky právě v podobě nanočástic. Jedná se tedy o aktivní obaly, které mohou působit prodloužení trvanlivosti spotřebního produktu, zlepšit jeho bezpečnost, zamezit kontaminaci či znehodnocení výrobku a další (**Sekhon, 2010**). Funkcí obalového materiálu je především ochrana produktu, udržení jejího kvalitního složení a zamezení další kontaminace takového produktu, kdy dochází k zamezení kazivosti potraviny. Zároveň je obalový materiál formou ochrany před vnějšími vlivy, především chemickými, biologickými a fyzikálními. Druhým faktorem je, že samozřejmě závisí také na skladování dané potraviny. Vývoj nanotechnologie v potravinářství se zabývá technikami aktivních obalů, které by nějakým způsobem reagovaly s potravinou uvnitř a zapříčinili její výše uvedenou stálost (**Bradley, 2011; Marsh, 2007; Sekhon, 2010**).

Jak již bylo řečeno, začíná se v dnešní době využívat tzv.: aktivních obalů, nebo také inteligentních obalových materiálů. Principem těchto materiálů je aplikace nanočástic do materiálu případně jeho potah, kdy tyto částice mají antimikrobiální vlastnosti a jsou postupně vypouštěny do zabalené potraviny. Zároveň samozřejmě nesmí docházet ke zdravotní závadnosti takového produktu (**Bradely, 2011**). Mezi inteligentními obaly se můžeme setkat s funkcí monitoringu dané potraviny a tím i informacemi o kvalitě potraviny a její změně v době přepravy a skladování. Mezitím aktivní obaly slouží zejména k prodloužení skladovatelnosti a zachování či zlepšení složení dané potraviny (**Dainelli et al., 2008; Kruijff et al., 2002; Sekhon, 2010**). Otázkou ale stále zůstává budoucí likvidace těchto obalových materiálů a jejich recyklovatelnost (**Bradley, 2011**).

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie, živné půdy, přístroje a pomůcky

2.1.1 Chemikálie

- **Methylenová modř**

Příprava: Methylenová modř byla připravena smícháním 5 ml methylenové modře a 195 ml destilované vody.

- **70 % ethanol**

2.1.2 Živná média a pracovní roztoky

- **Roztok citranu sodného**

Příprava: Roztok citranu sodného byl připraven smícháním 10 g citranu sodného a 500 ml destilované vody. Sterilizace probíhala při 121 °C po dobu 15 minut.

- **GTK agar**

(Tryptone Glucose Extract Agar)

HiMedia

<i>Složení:</i>	enzymatický hydrolyzát kaseinu	5 g
	kvasničný extrakt	3 g
	glukóza	1 g
	agar	15 g

Příprava: Bylo naváženo 24 g komerčně dostupné dehydratované práškové směsi živného média na 1000 ml destilované vody. Sterilizace probíhala v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

- **Baird-Parker agar**

(Bair Parker Agar Base)

HiMedia

<i>Složení:</i>	enzymatický hydrolyzát kaseinu	10g
	hovězí extrakt	5g
	kvasničný extrakt	1g
	glycin	12g
	pyrohroznán sodný	10g
	chlorid lithný	5g
	agar	20g

Příprava: Bylo naváženo 63 g přípravku do 950 ml destilované vody. Sterilizace probíhala v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Následně byla směs ochlazená na 45 – 50 °C a asepticky bylo přidáno 50 ml žloutkové emulze s teluricitanem draselným (FD 046 Egg Yolk Tellurite Emulsion).

- **PALCAM agar**

(Listeria Identification Agar Base)

HiMedia

<i>Složení:</i>	pepton speciál	23g
	Škrob	1g
	Chlorid sodný	5
	Kvasničný extrakt	3g
	D-mannitol	10g
	Dextrosa	0,50g
	Citran železito-amonný	0,50g
	Eskulin	0,80
	Chlorid lithný	15g
	Fenolová červeň	0,08g
	Agar	10g

Příprava: Bylo naváženo 34,44g přípravku do 500 ml destilované vody. Sterilizace proběhla při 121 °C po dobu 15 minut v autoklávu. Následně byla směs ochlazená na 50 °C a asepticky přidán obsah lahvičky Listeria Selective Supplement (FD 061).

- **Mikrobitesty CH-1** (MILCOM a.s., Česká republika)
- **Mikrobitesty K-1** (MILCOM a.s., Česká republika)
- **Mikrobitesty P-1** (MILCOM a.s., Česká republika)
- **Mikrobitesty PRPM-1** (MILCOM a.s., Česká republika)

2.1.3 Přístroje a vybavení

Analytické váhy KERN KB	(KERN, Německo)
Analytické váhy KERN ALS 120-4N	(KERN, Německo)
Autokláv PS 20A	(BMT, Česká republika)
BACMED 6iG2	(ASPIAG s.r.o., Česká republika)
Biologický termostat ST 3 COMF/S	(POL-EKO, Polsko)
Biologický termostat BT 120	(Laboratorní přístroje Praha, Česká republika)
Denzitometr McFarland	(Biosan, Litva)
Horkovzdušný sterilizátor STERIMAT 5104.2	(BMT, Česká republika)
Chladnička Gorenje RK 6201 BW	(Gorenje, Slovinsko)
Chladnička Zanussi ZRA 40100 WA	(Zanussi, Itálie)
Sterimat 5104.2	(BMT, Česká republika)
Vortex Reax top	(Heidolph, Německo)

2.1.4 Pomůcky

Běžné laboratorní sklo
Běžné plastové a kovové pomůcky
Centrifugační zkumavky 50 ml
Centrifugační zkumavky 15 ml
Mikropipety automatické
Pipety plastové 50 ml
Pipety plastové 10 ml

2.2 Analyzované vzorky

Pro účely diplomové práce byly vzorky neodstředěného mléka dodávány z mlékárny Juliana Tuněchody. Mléko bylo dopravováno v nestandardizované podobě, v syrovém stavu, ihned po nadojení a pasteraci při 74 °C po dobu 20 s. V experimentální části bylo pracováno s těmito šaržemi mléka:

- **Šarže: 7484**
Datum spotřeby: 7.10.2017
(plněno do plastových lahví ošetřených stříbrem v koncentraci 20 mg/m²)
- **Šarže: 7529**
Datum spotřeby: 27. 10. 2017
(plněno do plastových lahví ošetřených stříbrem v koncentraci 10 mg/m²)
- **Šarže: 7561**
Datum spotřeby: 11. 11. 2017
(plněno do skleněných lahví ošetřených stříbrem v koncentraci 20 mg/m²)
- **Šarže: 7605**
Datum spotřeby: 1. 12. 2017
(plněno do skleněných lahví ošetřených stříbrem v koncentraci 10 mg/m²)
- **Šarže: 7632**
Datum spotřeby: 15. 12. 2017
(plněno do plastových i skleněných lahví ošetřených stříbrem v koncentraci 10 mg/m²)

Plastové a skleněné modifikované lahve, byly dodány od firmy Ego 93 s.r.o. Stříbrné ionty byly připraveny metodou vyloučení kovového stříbra z amoniakálního komplexu, po nanesení těchto iontů na povrch lahve byly obaly ošetřeny saponátem a vypláchnuty destilovanou vodou. Pro další experimenty byly zakoupeny vzorky UHT mléka v běžné obchodní síti v ČR.

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Provedení reduktázové a kvasné zkoušky

Reduktázová a kvasná zkouška slouží pro sledování produktů metabolismu daných mikroorganismů. Tyto zkoušky spadají do zkoušek enzymatických a díky nim je možné orientačně vyhodnotit mikrobiologickou jakost mléka. Bakterie, které se nachází v mléce, jsou schopny produkovat enzymy, tzv. reduktázy. Tyto látky zapříčiní odbarvení methylenové modři na bezbarvou leukoformu. Dochází zde k reakci indikátoru na změnu redoxního potenciálu na základě spotřeby kyslíku bakteriemi. Čím větší metabolická aktivita daných mikroorganismů v mléce je, tím rychlejší je odbarvení methylenové modři.

Do sterilních zkumavek bylo pipetováno 10 ml syrového mléka, následně došlo k vytemperování zkumavek na teplotu 37 °C a poté bylo přidáno 250 µl methylenové modři. Směs byla promíchána na vortexu a inkubována při 37 °C do odbarvení. Následně byly vyhodnoceny výsledky reduktázové zkoušky dle Tabulky V:

Tabulka V: Hodnocení výsledků reduktázové zkoušky

Doba odbarvení methylenové modři	Jakost mléka	Odhad počtu MO (cfu/ml)
> 5	dobrá	$1-2 \times 10^5$
2-4	vyhovující	$2 \times 10^{5-6}$
< 2	špatná	$2 \times 10^{6-7}$

Pro hodnocení kvasné zkoušky byl vzorek ponechán při kultivaci 37 °C a dle doby kultivace a vzhledu sraženiny bylo posouzeno složení mikroflóry. Tento test byl proveden společně s reduktázovou zkouškou v jedné zkumavce. Hodnocení kvasné zkoušky nám ukazuje Tabulka VI.

Tabulka VI: Hodnocení výsledků kvasné zkoušky

Jakost mléka	Hodnocení výsledků
Velmi dobrá	Celistvá sraženina, porcelánovitý vzhled, 1-2 bublinky
Méně dobrá	Sraženina s více bublinkami, trhliny
Špatná	Klkovitá sraženina, peptonizace mléka, patrna tvorba plynu

2.3.2 Provedení mikrobitestů

Mikrobitesty představují levnou, jednoduchou a především praktickou metodu pro určení základních mikroorganismů. Využívají se především při sledování sanitace a dodržování technologických procesů. Tyto testy se skládají z proužku speciálního papíru, který je napuštěn vhodnou živnou půdou s přidávkem indikátoru, a jeho nasákavost činí 0,5 ml. Proužky jsou uloženy v polyetylenových obalech, které jsou nadále využity jako kultivační prostředí. Kultivace probíhá klasicky v termostatu při daných parametrech, které vyžaduje stanovovaný mikroorganismus. Mikrobitesty jsou rozděleny na určité druhy dle skupiny stanovovaných mikroorganismů. Zároveň se vyrábějí v modifikacích ke stanovení v běžných tekutinách, viskózních tekutinách či pro otiskové metody.

Proužek mikrobitestu byl namočen ve vzorku mléka (nasákavost 0,5 ml), následně zataven do polyetylenového sáčku a kultivován při teplotě 25 °C po dobu 24 hodin pro stanovení kvasinek a plísní a při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin pro skupiny koliformních a redukujících mikroorganismů. Vyhodnocení spočívalo v zaznamenání počtu přítomných suspektních kolonií MO na testačním proužku. Stejný postup byl proveden jak u lahví s modifikací, tak lahví bez modifikace. Pro pokusy byly použity mikrobitesty s označením 1, vzhledem k tomu, že se jedná o mikrobitesty, používající se pro stanovení v běžných tekutinách. Tyto testy byly typu:

• CH-1	koliformní bakterie a <i>E. coli</i>	č. výr.:	7
• K-1	kvasinky v tekutinách	č. výr.:	30 3
• P-1	plísně v tekutinách	č. výr.:	40 6
• PRPM-1	redukující mikroby v tekutinách	č. výr.:	70 3

2.3.3 Stanovení CPM

Pro stanovení celkového počtu mikroorganismů, byla použita půda GTK. Objem vzorku 100μl (mléko, popřípadě vhodná ředění vzorku) byl inokulován na živnou půdu GTK. Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 24 hodin. Následně byly zjišťovány počty mikroorganismů, a to v jednotkách cfu/ml. Všechny tyto experimenty byly provedeny minimálně v dubletu. Stanovení bylo prováděno vždy simultánně ve dvou nezávislých vzorcích mléka, a to v lahvích bez vnitřní modifikace stříbrem a zároveň v lahvích s ošetřeným povrchem (mléko vždy ze stejné šarže kvůli porovnatelnosti). Značení jednotlivých vzorků bylo provedeno následovně:

- VZ1 lahev bez modifikace vnitřního povrchu 1
- VZ2 lahev bez modifikace vnitřního povrchu 2
- VZ1-Ag lahev se stříbrnými ionty 1
- VZ2-Ag lahev se stříbrnými ionty 2

2.3.4 Přežívání vybraných bakterií v mléce

Pro účely diplomové práce byly použity kmeny *Staphylococcus aureus* a *Listeria ivanovii*. Tyto kmeny byly nejprve kultivovány na MPA agaru, a to pro *Staphylococcus aureus* při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin a pro *Listeria ivanovii* při 37 °C po dobu 48 hodin.

Po kultivaci byla připravena bakteriální suspenze ve sterilním roztoku citranu sodného odpovídající densitě 0,5 stupně McFarlandovy zákalové stupnice. Tato suspenze byla následně naředěna na požadovanou buněčnou densitu tak, aby výsledná buněčná densita v mléku byla 10^4 cfu/ml. Takto připravená buněčná suspenze byla tedy pipetována do vzorku mléka pro následné testování. Počty kolonií byly zaznamenávány každý den a na základě toho se odvíjely další úpravy ředění vzorků, jako tomu bylo u stanovení CPM.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem diplomové práce bylo prokázat antimikrobiální účinky stříbrných iontů, nanesených na povrch lahví, kdy tyto ionty o různých koncentracích působily na syrové mléko. Na základě této reakce byly popsány účinky stříbra v rámci jednotlivých koncentrací a materiálů. Výsledky této laboratorní práce jsou uvedeny níže.

3.1 Mléko uchovávané v plastové lahvi (koncentrace Ag^+ 20 mg/m^2)

Den dodání: 3. 10. 2017
Den plnění: 3. 10. 2017
Číslo šarže: 7483
Datum trvanlivosti: do 7. 10. 2017
Doba výzkumu: 3. 10. – 11. 10. 2017

3.1.1 Senzorické hodnocení mléka

V této části, je uvedeno senzorické hodnocení modifikovaných plastových lahví o koncentraci Ag^+ 20 mg/m^2 a lahví bez modifikace. V Tabulce VII, jsou uvedeny výsledky ze senzorické analýzy, do které bylo zahrnuto pouze čichové a vizuální posouzení. Hodnocení vzorků nebylo možné provádět během víkendu, proto je záznam výsledků uveden pouze v pracovních dnech.

Tabulka VII: Senzorický popis mléka v plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag^+ 20 mg/m^2

Den	Lahev bez modifikace Ag^+	Lahev s modifikací Ag^+
1	Bílá barva, mléčný zápach, tekutá konzistence	Nažloutlá barva, mléčný zápach, tekutá konzistence, na styku mléka s lahví hnědožluté skvrny
2 - 4	Bílá barva, mléčný zápach, tekutá konzistence, tvorba menších sraženin	Nažloutlá barva, mléčný zápach, tekutá konzistence, menší tvorba sraženin
7	Bílá barva, zkyslý zápach, tekutá konzistence, nažloutlé sraženiny	Nažloutlá barva, zkyslý zápach, tekutá konzistence, nažloutlé sraženiny
8	Bílá barva, zkyslý zápach, hustá konzistence, sraženiny po celém objemu	Nažloutlá barva, zkyslý zápach, sraženiny nejsou po celém objemu
9	Bílá až nažloutlá barva, zkyslý zápach, sraženiny potrhane po celém objemu	Nažloutlá barva, zkyslý zápach, celistvá sraženina u povrchu, jinak tekutá konzistence

Z Tabulky VII uvedené níže je patrné, že se sensorika mléka jednotlivých lahví značně měnila. U lahví s Ag⁺ modifikací mělo mléko v celém objemu této lahve nažloutlou barvu. Z toho důvodu byl proveden pokus, zda je díky stříbrnými iontům změněna barva mléka, nebo jde pouze o odstín modifikované lahve. Po odlití mléka do zkumavky bylo zjištěno, že je mléko bílé, z čehož plyne úsudek, že nažloutlé zbarvení je způsobeno pouze úpravou povrchu plastové lahve. Nadále byl charakter jak modifikované, tak lahve bez modifikace téměř stejný. Rozdíl byl pouze ve tvorbě sraženiny.

3.1.2 Reduktázová a kvasná zkouška

Reduktázová a kvasná zkouška byly provedeny jak u lahví s modifikovaným vnitřním povrchem, tak lahví bez vnitřní úpravy. Toto testování bylo prováděno každý den s výjimkou víkendu a nadále po něm. Hodnocení těchto zkoušek je uvedeno dále.

3.1.2.1 Hodnocení mléka v 1. dni

Ihned po dodání vzorků do laboratoře, byly zkumavky naplněné mlékem pro reduktázovou a kvasnou zkoušku vytemperovány a následně přidána methylenová modř. Po 4,5 hodinách, byla u zkumavek methylenová modř stále neodbarvená. K jejímu odbarvení došlo tedy za více jak 5 hodin, což poukazuje na dobrou jakost mléka. Sraženina, která byla hodnocena jako ukazatel kvasné zkoušky vykazovala celistvost, porcelánovitý vzhled s malým počtem bublin. Toto hodnocení kvasné zkoušky též poukazovalo na velmi dobrou kvalitu mléka. U výše uvedených hodnocení nebyl mezi neošetřenými a ošetřenými lahvemi znatelný rozdíl.

3.1.2.2 Hodnocení mléka ve 2. dni

Jak u mléka z lahví bez modifikace, tak s modifikací opět po 4,5 hodinách od přidání methylenové modře, nebyla modř stále odbarvena. Z toho plyne, že k odbarvení methylenové modře ve zkumavkách došlo znovu za více jak 5 hodin, což stále poukazuje na dobrou jakost mléka. Sraženina byla opět porcelánovitého vzhledu, celistvá, s malým počtem bublin. Výsledky kvasné zkoušky opět ukazovaly na velmi dobrou kvalitu mléka.

3.1.2.3 Hodnocení mléka ve 3. dni

K odbarvení methylenové modři došlo opět za více jak 5 hodin, jakost mléka byla tedy stále dobrá. Sraženina pro hodnocení kvasné zkoušky byla stále celistvá, porcelánovitého

vzhledu. Objevil se však větší počet bublinek. Díky tomu můžeme hodnotit kvalitu mléka na hranici s velmi dobrou jakostí a méně dobrou jakostí. Opět mezi vzorky z modifikovaných a nemodifikovaných lahví nebyl zaznamenán rozdíl.

3.1.2.4 Hodnocení mléka ve 4. dni

Methylenová modř byla přidána v ranních hodinách, po 2 hodinách od přidání byla methylenová modř již odbarvena. Vzhled odbarvení najdeme na Obrázku 4. Kvůli tomu, že sraženina nebyla úplně patrná, proběhlo její hodnocení až den sedmý, z důvodu víkendu. Následně byly sraženiny ohodnoceny jako potrhané po celém objemu, s velkým počtem bublin. Jakost mléka se tedy pohybovala na hranici vyhovující a špatné kvality u všech vzorků pro redukující zkoušku a na hranici méně dobré a špatné kvality mléka pro kvasnou zkoušku.



Obrázek 4: Odbarvené vzorky mléka po reductázové zkoušce

3.1.2.5 Hodnocení mléka v 7. dni

Přidání methylenové modři bylo problematické, kvůli zhoršené mísitelnosti mléka. Zkumavky, v nichž byla methylenová modř, byly odbarveny již za necelé 2 hodiny, což ukazuje na špatnou jakost mléka. Sraženiny, které byly hodnoceny až následující den, byly potrhané po celém objemu zkumavky, což též značí o špatné jakosti mléka.

3.1.2.6 Hodnocení mléka v 8. dni

Po přidání methylenové modři bylo opět problematické její promísení. Odbarvení se uskutečnilo znovu do 2 hodin, což je stálým ukazatelem na špatnou jakost mléka. Sraženina poukazující na hodnocení kvasné zkoušky byla též potrhána po celém svém objemu. Jakost mléka byla tedy celkově hodnocena jako špatná.

Shrnutí reduktázové zkoušky pro vzorky mléka z modifikované lahve i lahve bez modifikace, je patrné v Tabulce VIII. V obou případech je hodnocení shodné. Pokud výsledky porovnáme se studií ve článku Görner *and* Valík (2004), kdy se počty mikroorganismů pro ještě vyhovující jakost mléka (třída I) pohybují v řádech do 1×10^5 , můžeme říci, že ve vyhovující třídě I se mléko pohybovalo dle reduktázové zkoušky do třetího dne. Ve stejném stylu se pohybovalo i hodnocení kvasné zkoušky. Žádné významné rozdíly mezi modifikacemi tedy nebyly zaznamenány. Ovšem může to být důkaz, že koncentrace Ag^+ 20 mg/m^2 nevykazuje tak vysoké antimikrobiální účinky, jako koncentrace nižší. Tento poznatek byl již uveden u senzorického hodnocení vzorků.

Tabulka VIII: Shrnutí reduktázové zkoušky pro plastové lahve bez modifikace/s modifikací Ag^+ 20 mg/m^2

Den	Jakost mléka	Přibližný počet cfu/ml
1	Dobrá	$1-2 \times 10^5$
2	Dobrá	$1-2 \times 10^5$
3	Dobrá	$1-2 \times 10^5$
4	Vyhovující/špatná	$2 \times 10^{5-6} / 2 \times 10^{6-7}$
7	Špatná	$2 \times 10^{6-7}$
8	Špatná	$2 \times 10^{6-7}$

3.1.3 Hodnocení mléka dle mikrobitestů

Vzhledem k ověření hodnocení mléka, byly provedeny mikrobitesty na jednotlivé mikroorganismy, uvedené v experimentální části výše. Na základě výsledků mikrobitestů, lze konstatovat, že ve všech případech byly přítomny redukující a kolidformní mikroorganismy. Oproti tomuto zjištění nebyly v žádném vzorku zaznamenány kvasinky a plísňe. Výsledky mikrobitestů byly stejné jak u vzorků nemodifikovaných lahví, tak i vzorků z modifikovaných lahví. Konečné shrnutí výsledků jednotlivých kultur jsou popsány v tabulce IX. níže.

Tabulka IX: Hodnocení mikrobitesů pro plastové lahve bez modifikace/s modifikací Ag⁺ 20 mg/m²

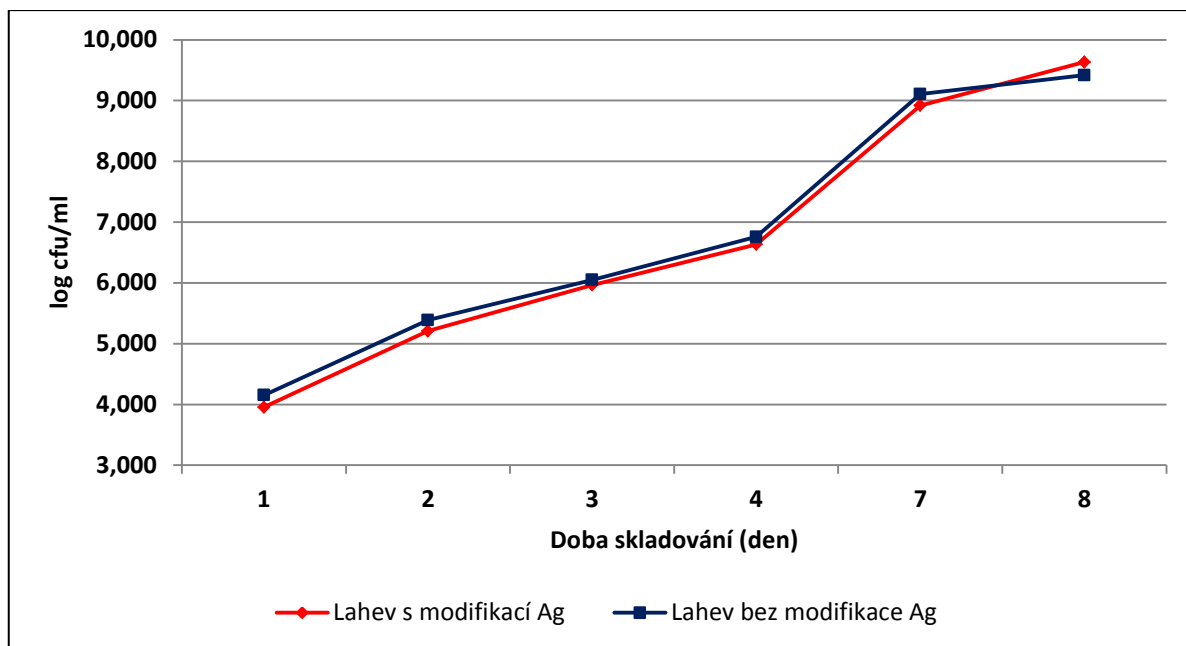
Den	CH-1	K-1	P-1	PRPM-1
1	+	-	-	+
2	+	-	-	+
3	+	-	-	+
4	+	-	-	+
7	+	-	-	+
8	+	-	-	+

CH-1: koliformní bakterie a *E. coli*, **K-1:** kvasinky v tekutinách, **P-1:** plísňe v tekutinách, **PRPM-1:** redukující mikroby v tekutinách, +: pozitivní nález, -: negativní nález

3.1.4 Stanovení CPM u vzorků mléka

Stanovení CPM na GTK agaru bylo prováděno každý den po dobu trvanlivosti mléka a následně ještě další dny po uplynutí této expirace. Výsledky byly vztaženy vždy na jednotky cfu/ml. Tímto stylem byla práce provedena pro jednotlivé typy šarží i srovnávací vzorky. Pro lepší orientaci byly výsledky uspořádány do tabulek, uvedených v jednotlivých přílohách.

V Příloze č. 1 je patrné, že v průběhu 1.-3. dne vykazovaly modifikované lahve svůj antimikrobiální účinek, ale další dny došlo ke srovnání počtu mikroorganismů mezi modifikovanými a nemodifikovanými lahvemi. Pokud bychom vzali v potaz výsledky reduktázové zkoušky u těchto lahví v Tabulce VIII, všimli bychom si, že též 1. a 2. den se počet MO počítaných na GTK shoduje s hodnotou dobré jakosti mléka uvedené v této tabulce. Nadále i další dny dochází ke shodě těchto výsledků. Grafické znázornění výsledků na GTK můžeme vidět v Grafu 1.



Graf 1: CPM u mléka v plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag^+ 20 mg/m^2

Jak je patno, výpočtem CPM na GTK byl ověřen fakt, že koncentrace Ag^+ 20 mg/m^2 není vhodná pro prodloužení trvanlivosti mléka. Z toho důvodu tedy nevyhovuje požadavkům pro naše další pokusy právě z důvodu, že funkce antimikrobiálního účinku stříbra trvá pouze pár dní. Tento efekt je patrný i na výše uvedeném Grafu 1 a zároveň nemá žádný výsledný efekt na celkovou trvanlivost výrobku, čehož si můžeme povšimnout na výsledcích z posledního dne analýzy. Zde se počet MO v lahvi s modifikací navýšil, oproti počtům MO v lahvi bez modifikace Ag^+ .

3.2 Mléko uchovávané v plastové lahvi (koncentrace Ag^+ 10 mg/m^2)

Den dodání: 23. 10. 2017
 Den plnění: 23. 10. 2017
 Číslo šarže: 7529
 Datum trvanlivosti: do 27. 10. 2017
 Doba výzkumu: 23. 10. – 31. 10. 2017

3.2.1 Senzorické hodnocení mléka

V této části, stejně tak jako tomu bylo u vzorků plastových lahví s modifikací Ag^+ 20 mg/m^2 , je uvedeno senzorické hodnocení modifikovaných plastových lahví a lahví bez

modifikace o koncentraci Ag^+ 10 mg/m^2 . Níže v Tabulce X, jsou opět uvedeny výsledky ze sensorické analýzy, do které bylo zahrnuto pouze čichové a vizuální posouzení. Hodnocení vzorků nebylo možné provádět během víkendu, proto je záznam výsledků uveden pouze v pracovních dnech.

Tabulka X: Sensorický popis mléka v plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag^+ 10 mg/m^2

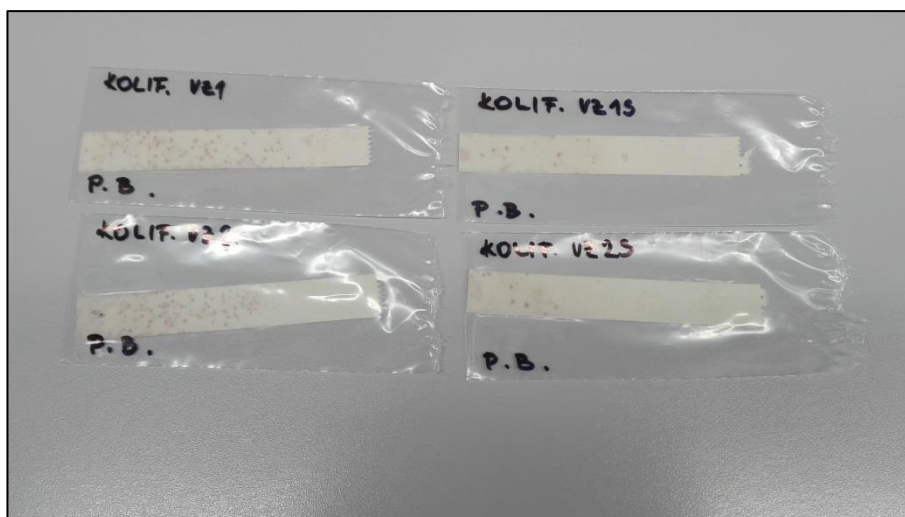
Den	Lahev bez modifikace Ag^+	Lahev s modifikací Ag^+
1	Bílá barva, mléčný zápach, tekutá konzistence	Bílá barva, mléčný zápach, tekutá konzistence
2 - 5	Bílá barva, mléčný zápach, tekutá konzistence, menší sraženina u povrchu	Bílá barva, mléčný zápach, tekutá konzistence, menší sraženina u povrchu
8	Bílá barva, zkyslý zápach, hustá konzistence, u povrchu žlutá sraženina	Bílá barva, mléčný zápach, tekutá konzistence, u povrchu bílá sraženina
9	Bílá barva, zkyslý zápach, hustá konzistence, zřetelné oddělení vodné fáze a sraženiny	Bílá barva, mléčný zápach, smetanová konzistence

U koncentrace Ag^+ 10 mg/m^2 si můžeme povšimnout, že byl rozdíl jednotlivých lahví znatelnější. Vzhled mléka v lahvi byl již i u postříbřeného materiálu bílý, což bylo nejspíše způsobeno poloviční koncentrací stříbrných iontů. Nadále mléko v lahvích ošetřených stříbrnými ionty vykazovalo jiný charakter, oproti mléku v lahvích bez modifikace. Nejen, že vydrželo déle tekuté, ale zároveň vykazovalo po delší dobu mléčný zápach.

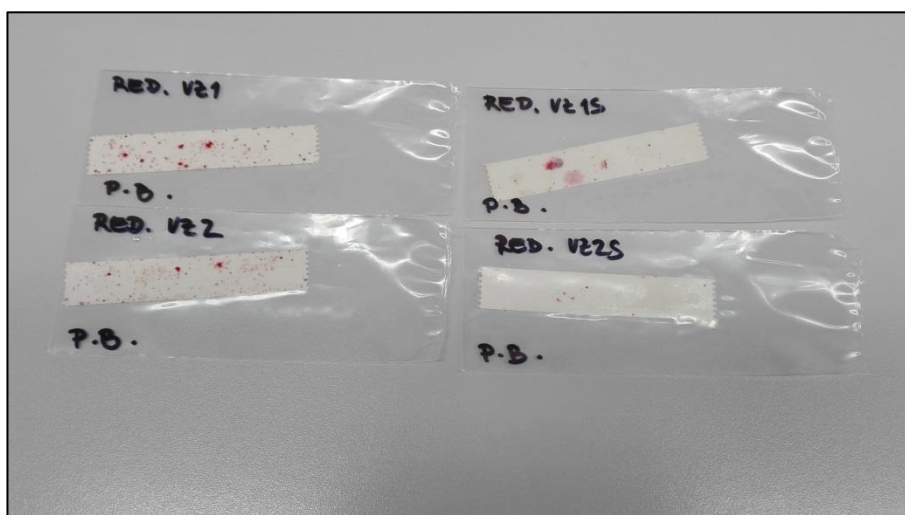
Pokud porovnáme plastové modifikované lahve obou koncentrací, je vidno, že na první pohled by se plastové lahve s koncentrací Ag^+ 10 mg/m^2 zdály vhodnější pro další pokusy.

3.2.2 Hodnocení mléka dle mikrobitešť

Ve stejném stylu, jako bylo provedeno hodnocení mikrobitešť u modifikovaných lahví koncentrace Ag^+ 20 mg/m^2 , byly provedeny i mikrobitešty u koncentrace Ag^+ 10 mg/m^2 . Vzhledem k faktu, že hodnocení mikrobitešť u lahví modifikovaných koncentrací Ag^+ 20 mg/m^2 nebyly zaznamenány rozdíly v hodnocení, bylo rozhodnuto provádět testy u koncentrace Ag^+ 10 mg/m^2 jednou za dva dny. Z výsledků bylo možno opět konstatovat, že ve všech případech byly koliformní a redukující mikroorganismy přítomny, ovšem u vzorků z lahví modifikovaných, obsahovaly papírky značně menší nárůst kolonií, než vzorky z nemodifikovaných lahví. Důkazem této skutečnosti je Obrázek 5, pro koliformní MO a následně Obrázek 6 pro redukující MO.



Obrázek 5: Mikrobitesty CH-1 pro mléko z plastové lahve bez modifikace/s modifikací Ag⁺ 10 mg/m²



Obrázek 6: Mikrobitesty PRPM-1 pro mléko z plastové lahve bez modifikace/s modifikací Ag⁺ 10 mg/m²

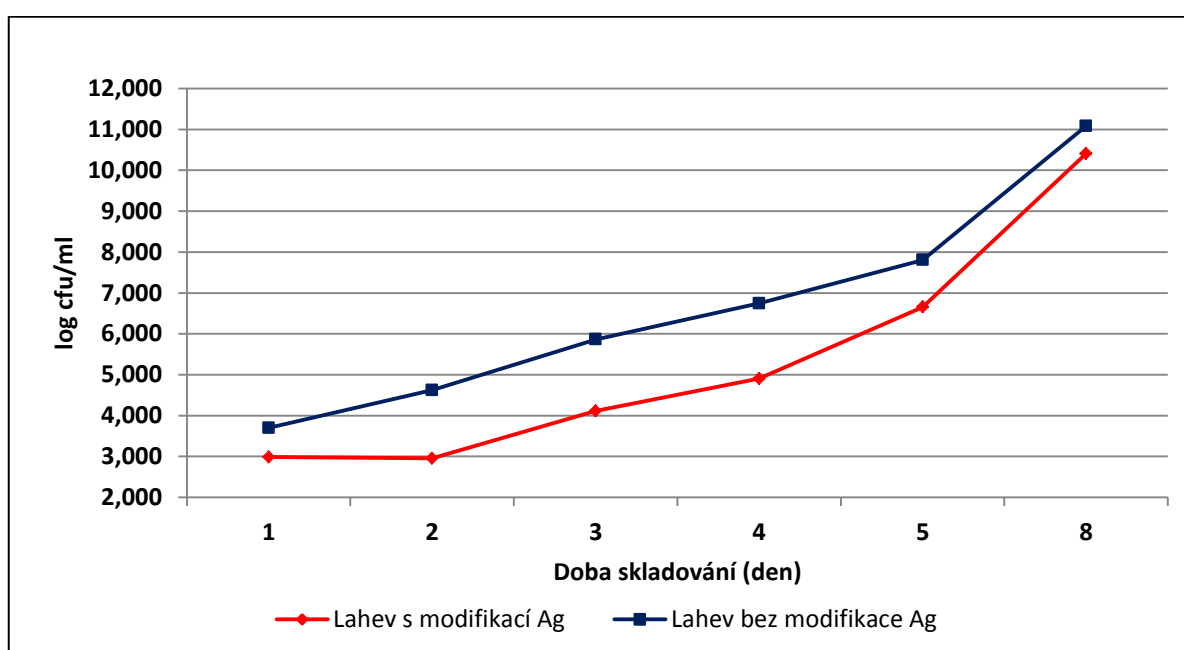
Plísně a kvasinky nebyly opětovně zaznamenány v žádném ze vzorků. Shrnutí celkových výsledků pro mikrobitesty je uvedeno v Tabulce XI. níže.

Tabulka XI: Hodnocení mikrobitestů pro mléko z plastové lahve bez modifikace/s modifikací Ag⁺ 10 mg/m²

Den	CH-1	K-1	P-1	PRPM-1
1	+	-	-	+
3	+	-	-	+
5	+	-	-	+

3.2.3 Stanovení CPM u vzorků mléka

Stanovení CPM na GTK agaru bylo prováděno stejným způsobem, jako u vzorků mléka uchovávaných v lahvích o dvojnásobné koncentraci. Záchyt MO v mléce probíhal tedy opět každý den po dobu trvanlivosti mléka a následně ještě další dny po uplynutí této lhůty. Výsledky byly vztaženy vždy na jednotky cfu/ml pro lepší přehlednost a srovnání jednotlivých výsledků. Pro lepší orientaci byly výsledky uspořádány do tabulek, uvedených v jednotlivých přílohách a z nich pro lepší přehlednost vytvořeno grafické zpracování dané šarže, které je patrné v Grafu 2.



Graf 2: CPM u mléka v plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag^+ 10 mg/m^2

Z Grafu 2 je tedy patrné, že v průběhu 1. a 2. dne se počty mikroorganismů u klasických lahví zvýšily, oproti tomu počty u lahví s upraveným vnitřním povrchem zůstaly na stejné hodnotě. Tento záchyt je patrný na obrázku v Příloze č. 2. Nadále se jejich počet MO sice zvýšil, ale oproti nárůstu MO u vzorků z nemodifikovaných lahví byl poloviční. I na základě grafického znázornění výsledků, si můžeme povšimnout značného rozdílu, mezi Grafem 1 a Grafem 2. Detailnější informace CPM jednotlivých vzorků jsou uvedeny v Příloze č. 3.

Na základě hodnocení výsledků můžeme říci, že antimikrobiální účinek stříbra v koncentraci Ag^+ 10 mg/m^2 na plastových lahvích byl prokázán a může být příčinou prodloužení trvanlivosti mléka. Zároveň si opět ověřujeme, že tato koncentrace a plastové lahve jsou velmi vhodné pro naše další pokusy.

3.3 Mléko uchovávané ve skleněné lahvi (koncentrace Ag^+ 20 mg/m^2)

Den dodání:	7. 11. 2017
Den plnění:	7. 11. 2017
Číslo šarže:	7561
Datum trvanlivosti:	do 11. 11. 2017
Doba výzkumu:	7. 11. – 15. 11. 2017

3.3.1 Senzorické hodnocení mléka

V senzorickém hodnocení mléka u skleněných lahví s modifikací Ag^+ 20 mg/m^2 , jsou opět uvedeny výsledky ze senzorické analýzy, do které bylo zahrnuto pouze čichové a vizuální posouzení. Hodnocení vzorků nebylo možné provádět během víkendu, stejně tak jako u vzorků plastových lahví, proto je záznam výsledků uveden pouze v pracovních dnech. Senzorické hodnocení je shrnuto v Tabulce XII.

Tabulka XII: Senzorický popis mléka ve skleněných lahvích bez modifikace/s modifikací Ag^+ 20 mg/m^2

Den	Lahev bez modifikace Ag^+	Lahev s modifikací Ag^+
1	Bílá barva, mléčný zápach, tekutá konzistence	Bílá barva, mléčný zápach, tekutá konzistence
2 - 4	Bílá barva, zkyslý zápach, tekutá konzistence, menší tvorba sraženin	Bílá barva, mléčný zápach, tekutá konzistence, menší sraženina u povrchu
7	Bílá barva, zkyslý zápach, tekutá konzistence, nažloutlá sraženina	Bílá barva, zkyslý zápach, tekutá konzistence, narůžovělý proužek pod sraženinou
8	Bílá barva, zkyslý zápach, sražené mléko	Bílá barva, zkyslý zápach, sražené mléko, bez proužku
9	Bílá barva, zkyslý zápach, sražené mléko, málo patrný rozdíl sražené a vodné fáze	Bílá barva, zkyslý zápach, sražené mléko, bez proužku, patrná vodná fáze a sraženina

Z této tabulky je patrné, že mléko z lahve ošetřené stříbrnými ionty vykazovalo delší dobu mléčný zápach, oproti mléku pocházejícím z lahví bez modifikace. Zároveň se u mléka z lahví modifikovaných Ag^+ objevil sedmý den narůžovělý proužek, který u lahví bez modifikace nebyl zaznamenán. Tento záchyt proužku je vidět v Příloze č. 4. Dle Tabulky XII je však patrné, že tento proužek již nebyl další den pozorován.

3.3.2 Reduktázová a kvasná zkouška

Vzhledem k tomu, že byly tyto zkoušky provedeny u mléka z lahví o modifikaci koncentrace Ag^+ 20 mg/m² i plastových lahví bez vnitřní úpravy, byly tyto testy provedeny i u vzorků ve skleněných lahvích z důvodu srovnání.

3.3.2.1 Hodnocení mléka v 1. dni

V den odběru u skleněných lahví, byla přidána k mléku methylenová modř opět ihned po dodání mléka do laboratoře a jeho vytemperování na požadovanou teplotu. Po 8 hodinách, byla methylenová modř odbarvena, a to u lahví bez modifikace. Oproti tomu mléko obsahující methylenovou modř a pocházející z modifikovaných lahví odbarveno zatím nebylo a zůstávalo modré. I přes to došlo k odbarvení za více jak 5 hodin u obou případů, což značí na dobrou kvalitu mléka, ale u mléka z postříbřených lahví na kvalitu lepší. Zároveň byla u tohoto mléka celistvá sraženina, porcelánovitého vzhledu. Toto hodnocení potvrzuje jeho dobrou jakost. U mléka z nemodifikované lahve byla sraženina potrhaná po celém objemu zkumavky, což značí špatnou jakost mléka.

3.3.2.2 Hodnocení mléka ve 2. dni

Přidání methylenové modři proběhlo v ranních hodinách, u vzorků z lahví bez modifikace došlo k odbarvení již po necelých 4 hodinách. Výsledkem je tedy vyhovující jakost mléka. Oproti tomu vzorky z modifikovaných lahví byly odbarveny za více jak 5 hodin. Jakost mléka je tedy stále dobrá. Kvasná zkouška probíhala stejným způsobem jako předchozí den. Výsledky reduktázové i kvasné zkoušky jsou zachyceny na Obrázku 7. Mléko v lahvích bez modifikace bylo tedy hodnoceno jako mléko špatné kvality, oproti lahvím se stříbrnými ionty, které vykazovaly velmi dobrou jakost mléka.



Obrázek 7: Reduktázová a kvasná zkouška pro skleněné lahve bez modifikace/s modifikací Ag^+ 20 mg/m^2

3.3.2.3 Hodnocení mléka ve 3. dni

Třetí den bylo hodnocení jak kvasné, tak reduktázové zkoušky stejné, jako předchozí den.

3.3.2.4 Hodnocení mléka ve 4. dni

Od přidání methylenová modři byly vzorky z lahví bez modifikace již po necelých 3 hodinách částečně odbarveny, oproti tomu methylenová modř z vzorků, pocházejících z modifikovaných lahví, nejevila známky odbarvení. Vzhledem k tomu, že sraženiny byly hodnoceny opět po víkendu, byly u obou případů potrhané po celém objemu, z čehož nelze soudit správnou kvalitu mléka díky zkreslení hodnocení. Reduktázová zkouška ale poukazovala u vzorků z lahví bez povrchové útravy na vyhovující až špatnou kvalitu, oproti dobré kvalitě mléka z lahví s povrchovou úpravou.

3.3.2.5 Hodnocení mléka v 7. dni

Sedmý den vykazovaly vzorky z lahví neošetřených stříbrnými ionty po přidání methylenové modře odbarvení z jedné třetiny již po 30 minutách. Po jedné hodině bylo odbarvení celistvé. Oproti tomu u vzorků z modifikovaných lahví methylenová modř, stále nevykazovala svůj odbarvovací efekt. Z toho soudíme, že mléko z neupravených lahví se

nacházelo již ve špatné jakosti, oproti tomu mléko z upravených lahví mohlo vykazovat vyhovující jakost i vzhledem k posouzení kvasné zkoušky, kdy u obou vzorků byly sraženiny potrhané u povrchu zkumavky.

3.3.2.6 Hodnocení mléka v 8. dni

Odbarvení methylenové modři u vzorků mléka z nemodifikovaných lahví, proběhlo do méně jak jedné hodiny, zároveň sraženina byla potrhaná po celém objemu zkumavky. Díky těmto výsledkům byla jakost mléka hodnocena jako špatná. Zkumavky s mlékem pocházejícím z lahví modifikovaných, vykazovaly odbarvení v rozmezí 2-4 hodin, sraženina byla též potrhaná a s bublinami. Z tohoto výsledku bylo usouzeno, že kvalita mléka zůstává na vyhovující úrovni.

Shrnutí výsledků pro reduktázové zkoušky provedené u vzorků mléka z jednotlivých lahví, je patrné v Tabulce XIII a Tabulce XIV níže.

Tabulka XIII: Shrnutí reduktázové zkoušky pro mléko ze skleněné lahve bez modifikace Ag^+ 20 mg/m²

Den	Jakost mléka	Přibližný počet MO / 1 ml
1	Dobrá	$1-2 \times 10^5$
2	Vyhovující	$2 \times 10^{5-6}$
3	Vyhovující	$2 \times 10^{5-6}$
4	Vyhovující / špatná	$2 \times 10^{5-6} / 2 \times 10^{6-7}$
7	Špatná	$2 \times 10^{6-7}$
8	Špatná	$2 \times 10^{6-7}$

Tabulka XIV: Shrnutí reduktázové zkoušky pro mléko ze skleněné lahve s modifikací Ag^+ 20 mg/m²

Den	Jakost mléka	Přibližný počet MO / 1 ml
1	Dobrá	$1-2 \times 10^5$
2	Dobrá	$1-2 \times 10^5$
3	Dobrá	$1-2 \times 10^5$
4	Dobrá	$1-2 \times 10^5$
7	Vyhovující	$2 \times 10^{5-6}$
8	Vyhovující	$2 \times 10^{5-6}$

Z těchto uvedených tabulek můžeme vidět rozdíl mezi skleněnými lahvemi bez modifikace a lahvemi s modifikací Ag^+ . U druhého případu zůstává jakost mléka stále ve vyhovujících mezích až do osmého dne, oproti mléku z lahví bez modifikace Ag^+ , jež se na základě reduktázové i kvasné zkoušky zdá být nekonzumovatelné již od dne čtvrtého. Tento experiment můžeme porovnat i s teorií uvedenou ve článku Görner *end* Valík (2004), kde počty MO pohybující se do řádu 1×10^5 vykazují na jakost mléka v třídě I. Tato třída je ještě vyhovující třída jakosti mléka. U lahví bez modifikovaného povrchu vyhovovalo mléko této třídě jakosti pouze do třetího dne. U lahví, které prošly modifikací splňovalo mléko třídu jakosti I až do dne osmého, což je značný rozdíl. I díky tomuto srovnání můžeme soudit, že rozdíl mezi těmito lahvemi experiment vykazuje. Zároveň ale bylo zhodnoceno na základě diskuze s vedoucím diplomové práce, že provedení kvasné a reduktázové zkoušky není vhodným ukazatelem hodnocení celkové jakosti. Je tomu z důvodu, že do experimentu zasahují dny, kdy není možné odbarvení hodnotit. Právě proto byly následně reduktázové a kvasné zkoušky u plastových a skleněných lahví s koncentrací Ag^+ 10 mg/m^2 vynechány.

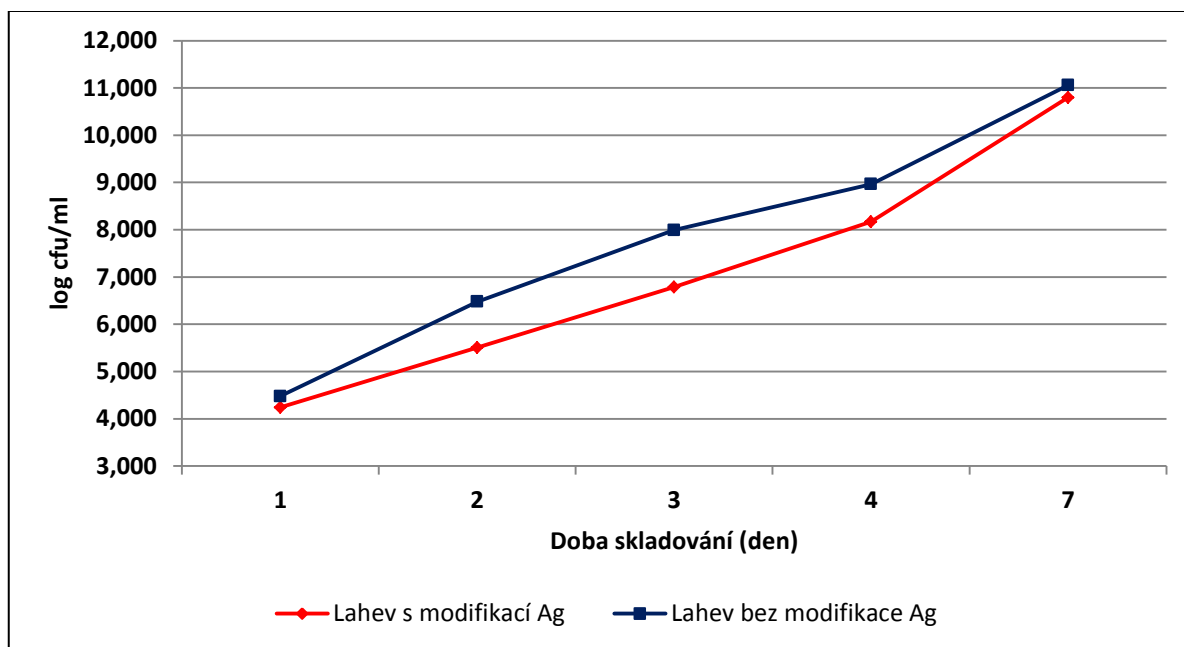
3.3.3 Hodnocení mléka dle mikrobitestů

Díky provedeným mikrobitestům u mléka plastových lahví s modifikovaným i nemodifikovaným povrchem jednotlivých koncentrací stříbrných iontů, bylo usouzeno, že z hlediska nepřítomnosti plísní a kvasinek v průběhu těchto hodnocení, budou tyto mikrobitesty u lahví skleněných vynechány. Pro ověření, zda se výjimečně ve vzorcích plísně nebo kvasinky nevyskytují, byly tyto testy provedeny v prvních dvou dnech. Mikrobitesty pro redukující a koliformní mikroorganismy byly nadále prováděny denně, kvůli porovnání nárůstů jak pro modifikované a nemodifikované plastové lahve, tak lahve skleněné. Hodnocení pro koliformní i redukující mikroorganismy bylo opět pozitivní.

3.3.4 Stanovení CPM u vzorků mléka

Stanovení celkového počtu mikroorganismů bylo hodnoceno opět stejným způsobem, jako u vzorků předchozího materiálu. I interpretace výsledků se kvůli porovnání jednotlivých materiálů a šarží neměnila. Z tabulky vyhodnocené v Příloze č. 5 je patrný efekt antimikrobiální aktivity stříbrných iontů a jejich účinku. Pokud bychom měly výsledky z CPM porovnat s výsledky reduktázové zkoušky, viděli bychom, že první dva dny se s výsledky reduktázové zkoušky shodují jak u lahví bez úpravy vnitřního povrchu, tak u lahví modifikovaných. Ovšem u dalších dní dochází již k velmi znatelnému rozdílu výsledků. I

z tohoto důvodu opět potvrzujeme rčení, že pokračování v reduktázové zkoušce nemělo efektivní vliv na celkové hodnocení výsledků. Grafické znázornění počtu MO v mléce je vizualizováno v Grafu 3 níže.



Graf 3: CPM u mléka ve skleněných lahvích bez modifikace/s modifikací Ag⁺ 20 mg/m²

Jak je vidět z grafického vyjádření, antimikrobiální účinek stříbra je patrný i ve skleněných modifikovaných lahvích, ovšem porovnáme-li Graf 3 s Grafem 2, usoudíme, že antimikrobiální účinky stříbra jsou v plastových modifikovaných lahvích lepší, vzhledem k CPM. Tento fakt můžeme vysvětlit tvrzením, jež je sepsáno v části teoretické. Tedy, že čím více záhybů a ploch, tím efektivnější antimikrobiální účinek stříbro prokazuje. Toto tvrzení by vyzdvihovalo lahve plastové, vzhledem k jejich materiálu a zároveň tvaru, ve kterém jsou vyráběny. Ve střední části obalu se totiž nachází „zvlněný“ povrch, který nejspíše pozitivně přispívá k antimikrobiálnímu účinku stříbra.

Nadále si v hodnocení výsledků tohoto experimentu můžeme povšimnout, že je koncentrace částic modifikovaného povrchu u skleněných lahví dvojnásobná, oproti plastové lahvi, kde byl prokázán lepší antimikrobiální účinek. Proto skleněné lahve o koncentraci Ag⁺ 20 mg/m² nebudou dále pro experimenty využity. Je tomu i z důvodu ekonomického hlediska. Zamysleme se nad tím, proč by měly být využívány lahve, které mají vyšší náklady na pořízení a menší efektivnost, než lahve, které mají menší nákladovost na pořízení a lepší antimikrobiální účinek.

3.4 Mléko uchovávané ve skleněné lahvi (koncentrace Ag^+ 10 mg/m^2)

Den dodání: 27. 11. 2017
Den plnění: 27. 11. 2017
Číslo šarže: 7605
Datum trvanlivosti: do 1. 12. 2017
Doba výzkumu: 27. 11. – 5. 12. 2017

3.4.1 Senzorické hodnocení mléka

V této části, jsou u skleněných lahví s modifikací Ag^+ 10 mg/m^2 , opět uvedeny výsledky ze sensorické analýzy, do které bylo zahrnuto pouze čichové a vizuální posouzení. Hodnocení vzorků nebylo možné provádět během víkendu, stejně tak jako tomu bylo v ostatních případech, a proto je záznam výsledků uveden pouze v pracovních dnech. Shrnutí hodnocení ukazuje tabulka XV.

Tabulka XV: Sensorický popis mléka ve skleněných lahvích bez modifikace/s modifikací Ag^+ 10 mg/m^2

Den	Lahev bez modifikace Ag^+	Lahev s modifikací Ag^+
1	Bílá barva, mléčný zápach, tekutá konzistence	Bílá barva, mléčný zápach, tekutá konzistence
2 - 4	Bílá barva, mléčný zápach, tekutá konzistence	Bílá barva, mléčný zápach, tekutá konzistence
5	Bílá barva, mléčný zápach, tekutá konzistence	Bílá barva, mléčný zápach, tekutá konzistence, na povrchu pěna
8	Bílá barva, zkyslý zápach, hustá konzistence, na povrchu sraženina s narůžovělou proužkou	Bílá barva, mléčný zápach, tekutá konzistence, na povrchu sraženina s narůžovělou proužkou
9	Bílá barva, zkyslý zápach, sraženina v celém objemu	Bílá barva, mléčný zápach, smetanová konzistence, na povrchu sraženina

U těchto vzorků vykazovalo mléko též delší dobu mléčný zápach, ale zároveň vydrželo déle v tekutějším stavu. Nedošlo k jeho zhoustnutí v celém objemu, ani poslední den experimentu. Mělo pouze smetanovitou konzistenci.

Právě z tohoto důvodu bylo vyhodnoceno, že skleněné lahve ošetřené stříbrnými ionty o koncentraci 10 mg/m^2 budou pro další pokusy opět vhodnější. Na základě toho bylo v další experimentální části použito mléko stejné šarže, které bylo plněno jak do plastových, tak skleněných lahví. V obou případech byly lahve modifikovány Ag^+ o koncentraci 10 mg/m^2 . Zároveň k těmto lahvím byly dodány i vzorky bez modifikace.

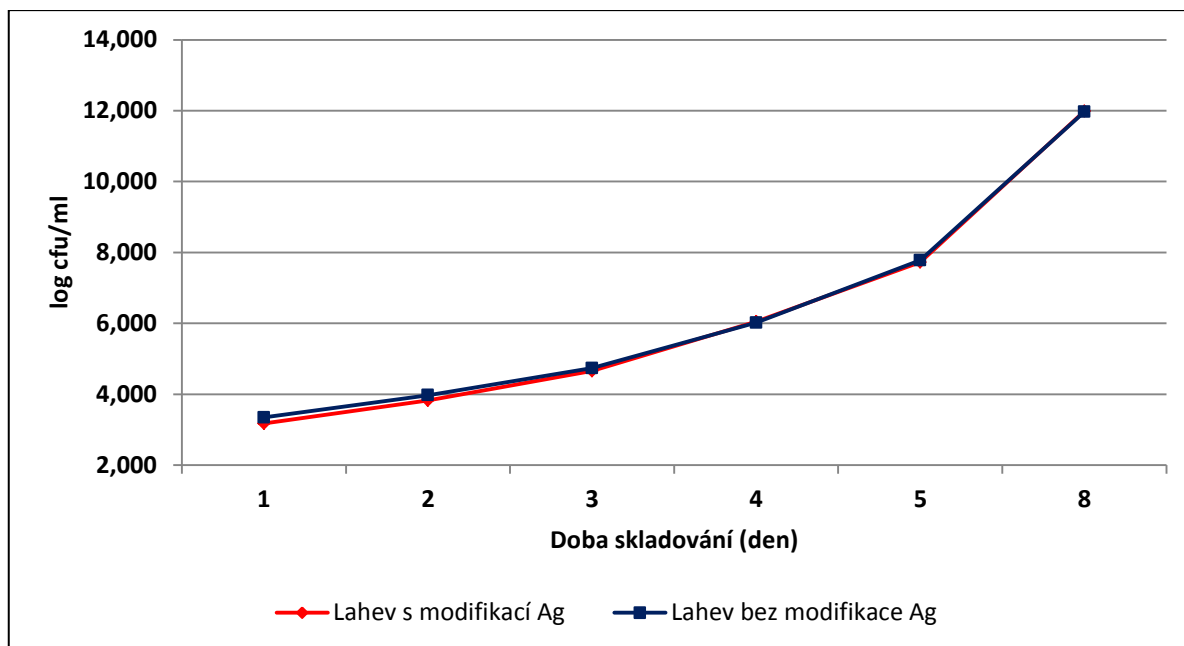
3.4.2 Hodnocení mléka dle mikrobitestů

Vzhledem k jednotlivým hodnocením mikrobitestů pro vzorky z plastových lahví a pro vzorky ze skleněných lahví s dvojnásobnou modifikací, bylo usouzeno, že další mikrobitesty pro hodnocení mléka ze skleněných lahví o modifikaci Ag^+ 10 mg/m², je zbytečné provádět. Je tomu z důvodu, že nejsou úplně vhodnými ukazateli mléčné mikroflóry, na čemž se shodují i uvedená hodnocení z předchozích experimentů na skleněných lahvích.

3.4.3 Stanovení CPM u vzorků mléka

Stanovení celkového počtu mikroorganismů bylo hodnoceno opět stejným způsobem, jako u předchozích vzorků. Interpretace výsledků po celou dobu zůstávala stejná. Z tabulky vyhodnocené v Příloze č. 6 je patrný efekt antimikrobiální aktivity stříbrných iontů a jejich účinku ve skleněných lahvích o modifikace poloviční koncentrace.

Z Grafu 4, uvedeném níže, můžeme vidět, že se počty mikroorganismů již od třetího dne téměř srovnaly, avšak po několika dnech počty u modifikovaných lahví překročily počty MO u lahví bez úpravy vnitřního povrchu. Z tohoto důvodu plyne, že skleněné lahve nejsou vhodné pro další pokusy. Můžeme si ale všimnout, že v průběhu čtvrtého dne byl počet $1,1 \times 10^6$ cfu/ml, kdy tento výsledek je součástí shrnutí CPM v Příloze č. 6. Pokud se podíváme na tabulku v Příloze č. 1, kde jsou hodnoceny výsledky z plastových lahví, zjistíme, že téměř stejný počet vykazovaly modifikované lahve s koncentrací Ag^+ 20 mg/m² již třetí den. Z tohoto hlediska lze usuzovat, že tedy nižší koncentrace stříbrných iontů má větší antimikrobiální účinky, což bylo řečeno již výše.



Graf 4: CPM u mléka ve skleněných lahvích bez modifikace/s modifikací Ag^+ 10 mg/m^2

3.5 Srovnávací pokus: Mléko uchované v plastové a skleněné lahvi (koncentrace Ag^+ 10 mg/m^2)

Den dodání: 11. 12. 2017
 Den plnění: 11. 12. 2017
 Číslo šarže: 7632
 Datum trvanlivosti: do 15. 12. 2017
 Doba výzkumu: 11. 12. – 20. 12. 2017

Pokusy s mlékem, uchovaném v plastových lahvích byly prováděny na různých šaržích mléka a stejně tak tomu bylo i u lahví skleněných. Z tohoto důvodu bylo třeba provést srovnávací pokus s mlékem stejné šarže, který nám nadále pomohl pro celkové zhodnocení antimikrobiálního účinku stříbra.

3.5.1 Senzorické hodnocení mléka

Jak již bylo uvedeno výše, koncentrace Ag^+ 10 mg/m^2 byla vybrána, jako optimální pro další pokus. Z tohoto důvodu, bylo do laboratoře dovezeno mléko výše uvedené šarže, které

bylo naplněno jak do plastových modifikovaných i nemodifikovaných lahví, tak skleněných lahví. Sensorické hodnocení mléka v obou případech, je popsáno v Tabulce XVI níže.

Tabulka XVI: Srovnávací pokus - Sensorický popis mléka v plastových a skleněných lahvích bez modifikace/s modifikací Ag^+ 10 mg/m²

Den	Plastová lahev		Skleněná lahev	
	Bez modifikace Ag^+	S modifikací Ag^+	Bez modifikace Ag^+	S modifikací Ag^+
1	Bílá barva Mléčný zápach Tekutá konzistence	Bílá barva Mléčný zápach Tekutá konzistence	Bílá barva Mléčný zápach Tekutá konzistence	Bílá barva, patrný šedé skvrny na lahvi Mléčný zápach Tekutá konzistence
2	Bílá barva Mléčný zápach Tekutá konzistence	Bílá barva Mléčný zápach Tekutá konzistence	Bílá barva Mléčný zápach Tekutá konzistence	Bílá barva, patrný sraženiny Mléčný zápach Tekutá konzistence
3	Bílá barva Mléčný zápach Tekutá konzistence	Bílá barva Mléčný zápach Tekutá konzistence	Bílá barva Mléčný zápach Tekutá konzistence	Bílá barva, bez šedých skvrn Patrný sraženiny Mléčný zápach Tekutá konzistence
4	Bílá barva Mléčný zápach Tekutá konzistence	Bílá barva Mléčný zápach Tekutá konzistence	Bílá barva Mléčný zápach Tekutá konzistence	Bílá barva, bez šedých skvrn Patrný sraženiny Mléčný zápach Tekutá konzistence
5	Bílá barva Mléčný zápach Tekutá konzistence	Bílá barva Mléčný zápach Tekutá konzistence	Bílá barva Mléčný zápach Tekutá konzistence	Bílá barva, bez šedých skvrn Patrný sraženiny Mléčný zápach Tekutá konzistence
8	Bílá barva Zkyslý zápach Tekutá konzistence	Bílá barva Mléčný zápach Naruž. Sraženina Tekutá konzistence	Bílá barva Zkyslý zápach Tekutá konzistence	Bílá barva, bez šedých skvrn Naruž. Sraženina Zkyslý zápach Tekutá konzistence
9	Bílá barva Zkyslý zápach Sražená konzistence	Bílá barva Mléčný zápach Bez naruž. sraženiny Tekutá konzistence	Bílá barva Zkyslý zápach Sražená konzistence	Bílá barva, bez šedých skvrn, bez naruž. Sraženiny Zkyslý zápach Tekutá konzistence
10	Bílá barva Zkyslý zápach Sražená konzistence	Bílá barva Mléčný zápach Bez naruž. sraženiny Tekutá konzistence	Bílá barva Zkyslý zápach Sražená konzistence	Bílá barva, bez šedých skvrn, bez naruž. Sraženiny Zkyslý zápach Tekutá konzistence

Jak je patrné z této Tabulky XVI, mléko v plastových lahvích vykazovalo téměř stejný charakter, jako v předchozích případech. Vydrželo delší dobu tekuté a zároveň si stále drželo mléčnou vůni. Zajímavostí je, že jak u plastové lahve, tak i skleněné lahve ošetřené stříbrnými ionty došlo k vytvoření narůžovělé sraženiny ve stejný den (den 6). Z tohoto důvodu můžeme hodnotit, že na vznik sraženiny mají vliv právě stříbrné ionty. Dalo by se říci, že vznik

narůžovělé sraženiny by mohl být prekurzorem pro začínající kazivost mléka u postříbřených lahví. Tento fakt by ale bylo třeba ověřit v jiné výzkumné práci, vzhledem k tomu, že toto nebylo náplní této diplomové práce a dále jsem se v práci tímto nezabývala.

U vzorků mléka ve skleněných lahvích bez modifikace vnitřního povrchu, byl pozorován podobný vývoj, jako v předchozích případech. Oproti tomu lahve ošetřené stříbrnými ionty, obsahovaly již od začátku sensorického hodnocení mléčné sraženiny. Zároveň byl patrný šedý vzhled lahve, kvůli modifikaci vnitřního povrchu. Tento vzhled již druhý den nebyl pozorován. Nadále byl jak v lahvích bez modifikace, tak i v lahvích s modifikací patrný zkyslý zápach ve stejný den. Jediný pozitivní vliv na mléko ve skleněných lahvích se stříbrnými ionty byl na mléčnou konzistenci, která po celou dobu zůstala tekutá.

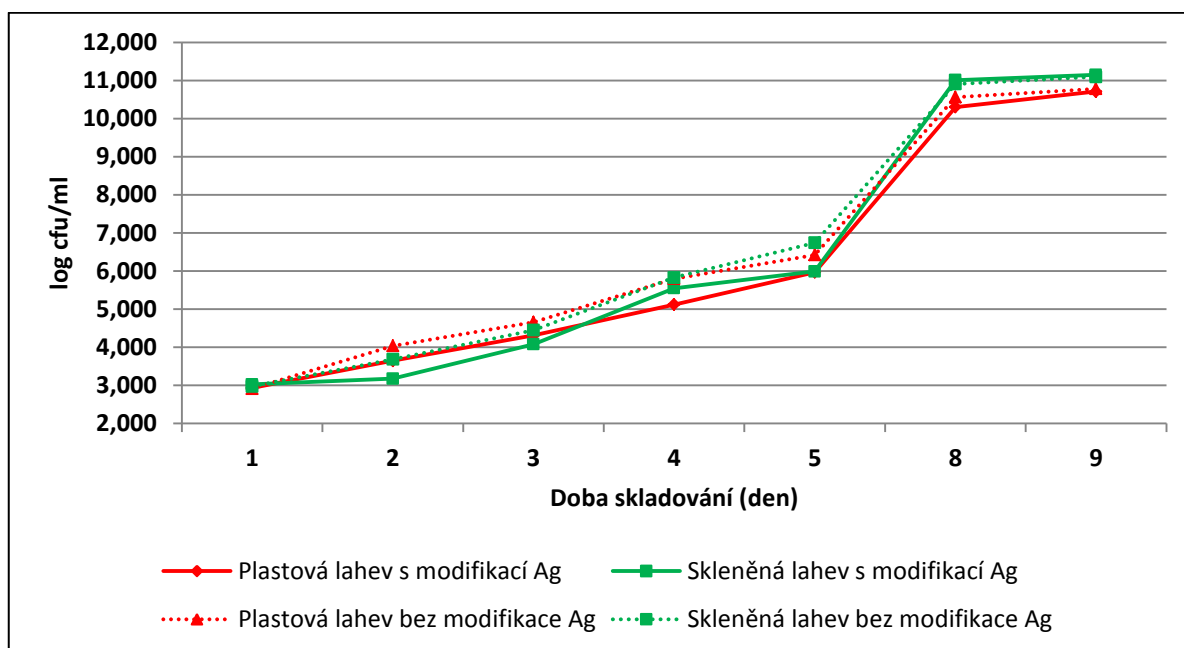
Z těchto poznatků, díky nimž došlo k ověření předchozích výsledků je patrné, že plastové lahve ošetřené stříbrnými ionty Ag^+ o koncentraci 10 mg/m^2 jsou vhodnější z hlediska sensorického hodnocení mléka, ale také z hlediska dalších pokusů. I když v těchto lahvích vykazovalo mléko delší dobu mléčný zápach a zároveň vydrželo delší dobu tekuté (i po trvanlivosti), nebylo možné zatím hodnotit, zda je mléko vhodné pro konzumaci. Zároveň nebylo možné hodnotit, zda mají stříbrné ionty vliv na prodloužení trvanlivosti daného produktu. I z tohoto důvodu byly současně hodnoceny ještě další parametry mléka v lahvích bez modifikace i ošetřených lahvích, které budou uvedeny v dalším průběhu diplomové práce.

3.5.2 Stanovení CPM u vzorků mléka

Jak již bylo řečeno výše, pokusy s mlékem, uchovaném v plastových lahvích byly prováděny na různých šaržích mléka. Stejně tak tomu bylo i u lahví skleněných. Z tohoto důvodu bylo třeba provést srovnávací pokus s mlékem ze stejné šarže, aby mikroflóra mléka byla v obdobných počtech. Tento experiment nám nadále pomohl pro celkové zhodnocení antimikrobiálního účinku stříbra. Pro tento experiment byly tedy vybrány plastové lahve, protože z hlediska antimikrobiálního efektu stříbra se jeví jako vhodnější a jejich vnitřní povrch byl upraven koncentrací Ag^+ 10 mg/m^2 též z důvodu, že se tato koncentrace jeví jako účinnější.

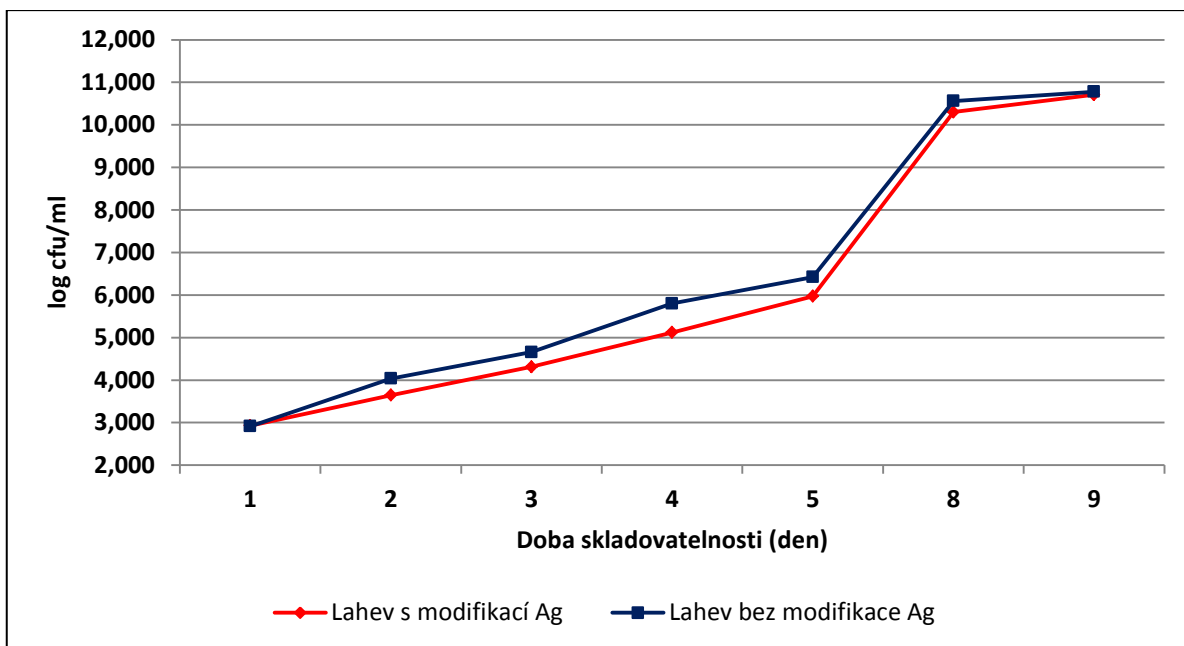
V Grafu 5 můžeme vidět rozdíly mezi CPM v mléce plastových a skleněných lahví. Je zde i patrné, že se opět plastová lahev s modifikací Ag^+ jeví jako lepší ukazatel antimikrobiální aktivity stříbra, oproti modifikované skleněné lahvi. Zajímavostí však je, že se

v průběhu skladování mléka CMP celkově u skleněných lahví navyšovaly rychleji, než u lahví plastových, a to jak u modifikovaných, tak nemodifikovaných.

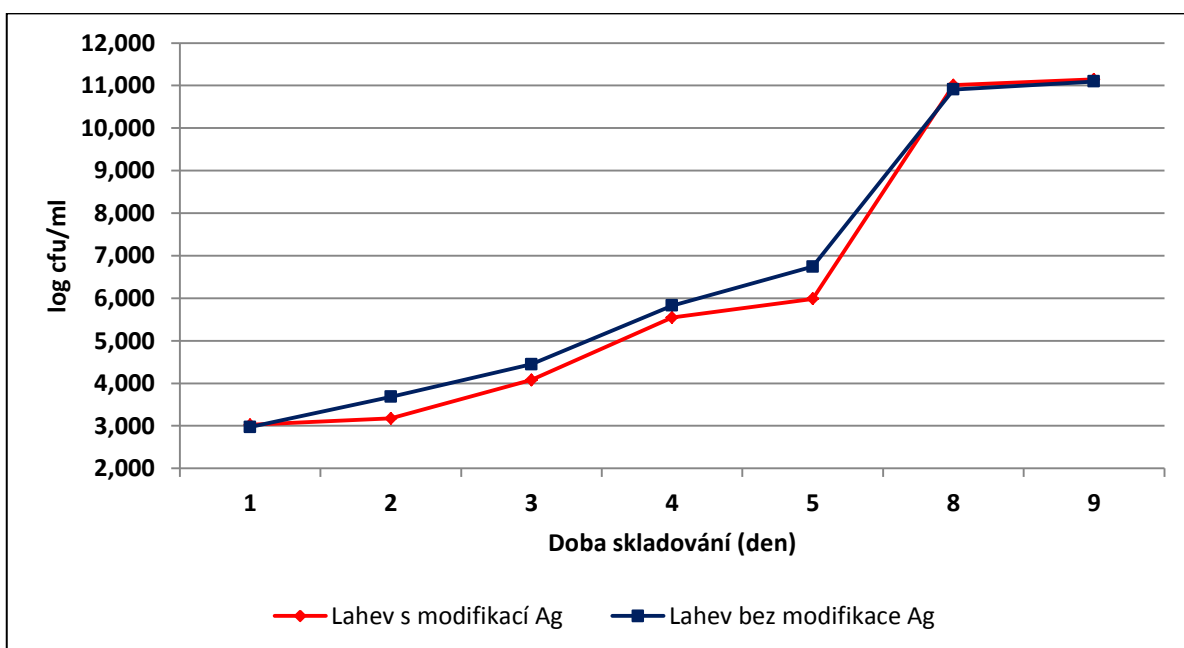


Graf 5: Srovnávací pokus - CPM u mléka ve skleněných a plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag⁺ 10 mg/m²

Pro lepší přehlednost jednotlivých materiálů a rozdílnost mezi jejich modifikacemi, byly zpracovány ještě další dva grafy uvedené níže. Graf 6 tedy poukazuje na mléko z lahve vyrobené z plastu a Graf 7 na mléko z lahve skleněné. Zde si můžeme povšimnout, že v obou případech antimikrobiální aktivita stříbra udržovala mléko v modifikovaných lahvích v nižších počtech CPM, než tomu bylo u lahví bez úpravy vnitřního povrchu. Zároveň ale došlo k menšímu navýšení CPM u skleněných modifikovaných lahví během skladovatelnosti v posledním dni. Přesný počet CPM můžeme dohledat v Příloze č. 7.



Graf 6: Srovnávací pokus - CPM u mléka v plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag^+ 10 mg/m^2



Graf 7: Srovnávací pokus - CPM u mléka ve skleněných lahvích bez modifikace/s modifikací Ag^+ 10 mg/m^2

Příloha č. 7 také ukazuje detailnější pohyb CPM v průběhu skladovatelnosti mléka. Můžeme si zde ověřit, že CPM se pohybují v předpokládaných počtech, čímž můžeme soudit, že jde tedy o stejný trend jako v předchozích experimentech. Tímto můžeme předpokládat, že se osvědčila koncentrace Ag^+ 10 mg/m^2 v plastových lahvích jako vhodná úprava pro průkaz

antimikrobiální aktivity stříbra. Nyní vezmeme v potaz studii od Necidové *et al.*, (2010), kde je uvedena tabulka pro CPM, jehož vyhovující limit je do $1,5 \times 10^6$. Vzhledem k tomu, že se ve studii jedná o mléko kozí, budeme naše výsledky srovnávat pouze v rámci řádových jednotek. Z toho je tedy patrné, že ve srovnávacím pokusu se v tomto limitu pohybovalo mléko u nemodifikovaných lahví do pátého dne jak v plastových, tak skleněných lahvích. Je zřejmé, že mléko z modifikovaných lahví splňovalo tento limit také do pátého dne. Vzhledem k tomu, že jeho CPM byly v řádech 10^5 cfu/ml a lineárně stoupaly, dá se tvrdit, že mléko nejspíše plnilo limit i ve dni šestém. V tomto dni ale jeho záchyt nebyl možný, vzhledem k víkendů. Nicméně celkového hodnocení srovnávacího pokusu je takové, že plastové lahve s modifikací o této koncentraci jsou tedy vhodnější než lahve skleněné. Z tohoto důvodu byly modifikované plastové lahve o koncentraci Ag^+ 10 mg/m^2 použity pro modelový experiment s mlékem zaočkovaným definovanou bakteriální kulturou.

3.6 Modelový experiment s mlékem zaočkovaným definovanou bakteriální kulturou

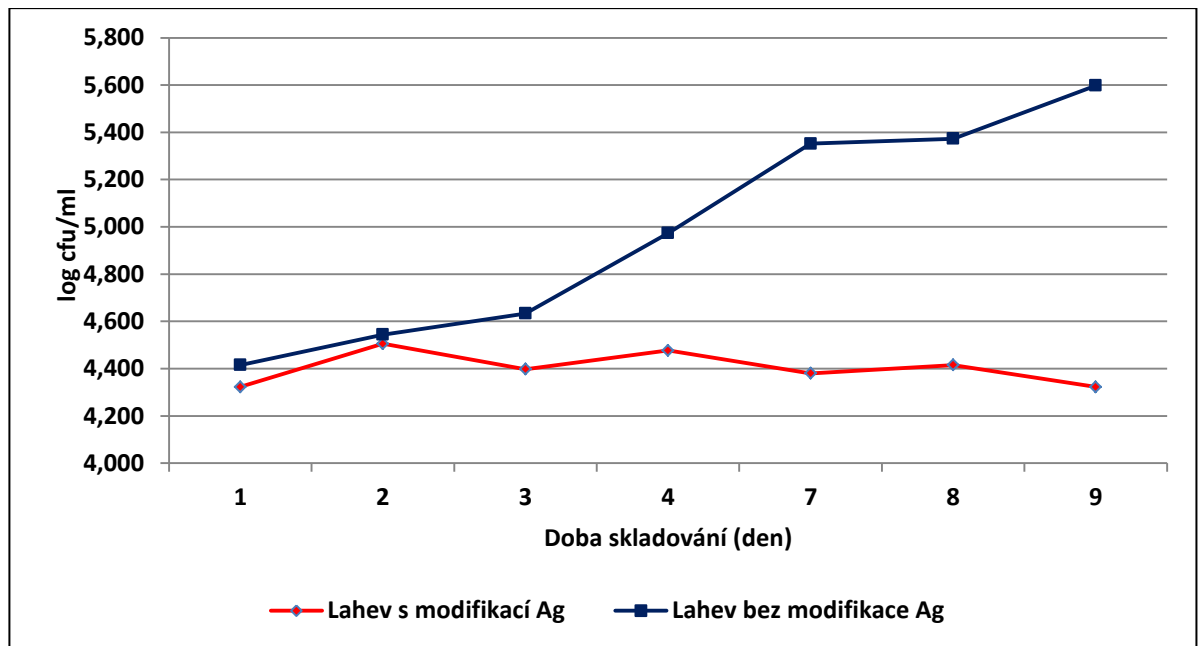
Jak již bylo řečeno, vzhledem k výsledkům z předchozích experimentů byly vybrány pro další pokusy plastové modifikované lahve o koncentraci Ag^+ 10 mg/m^2 . Mléko v těchto lahvích bylo následně zaočkováno definovanou bakteriální kulturou *S. aureus* a *L. ivanovii*. Následně byl sledován nárůst těchto kultur na příslušných agaroch a z toho usouzena antimikrobiální aktivita stříbrných iontů.

V obou případech byla pro zaočkování mléka použita bakteriální suspenze odpovídající stupnici 0,5 McFarlanda. Její následnou úpravou byl do mléka zaočkován 1 ml suspenze $1,5 \times 10^7$ cfu/ml. Výsledná hodnota počtu mikroorganismů byla tedy $1,5 \times 10^4$ cfu/ml.

3.6.1 Inokulace bakterií *S. aureus*

Jak již bylo uvedeno výše, do mléka v plastové lahvi jak bez modifikace, tak s modifikací Ag^+ byla zaočkována daná suspenze *S. aureus*. Doba skladování tohoto mléka probíhala po dobu devíti dní. Výsledky byly hodnoceny v jednotkách cfu/ml a z nich usuzována antimikrobiální aktivita stříbrných iontů.

Z grafu, který je uveden níže můžeme usuzovat, že stříbro na vybraný mikroorganismus vyvíjí značné antimikrobiální účinky. Je zde i patrné, že počty *S. aureus* v lahvích bez modifikace postupně stoupaly, oproti tomu počty v lahvích s ošetřeným vnitřním povrchem zůstávaly téměř na stejné hodnotě.



Graf 8: Přežívání *S. aureus* v mléce uchovávaném v plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag^+ 10 mg/m²

Nadále je z grafického vyjádření patrné, že lahve, které byly modifikovány stříbrnými ionty si udržely počty *S. aureus* téměř ve stejné hodnotě cfu/ml, v jaké byla tato kultura do mléka zaočkována, tedy počty v řádech 10^4 . Oproti tomu nárůst mikroorganismů u lahví bez modifikace se navýšil téměř 26× oproti výchozí densitě. Počty *S. aureus* se zde tedy pohybovaly též v řádech 10^4 . Vzhledem k postupnému množení této bakterie by bylo možné brzy dosáhnout počtů MO v řádech 10^6 . To je minimální dávka pro vyvolání onemocnění pomocí stafylokokového enterotoxinu, což zmiňuje i článek Chambers (2002) citovaný v literatuře. Přesné počty *S. aureus* jsou zaznamenány v Příloze č. 8. Z této tabulky jsou přesněji patrné antimikrobiální účinky stříbra, které byly do diplomové práce přidány i formou fotografií, které jsou patrné v Příloze č. 9 a Příloze č. 10

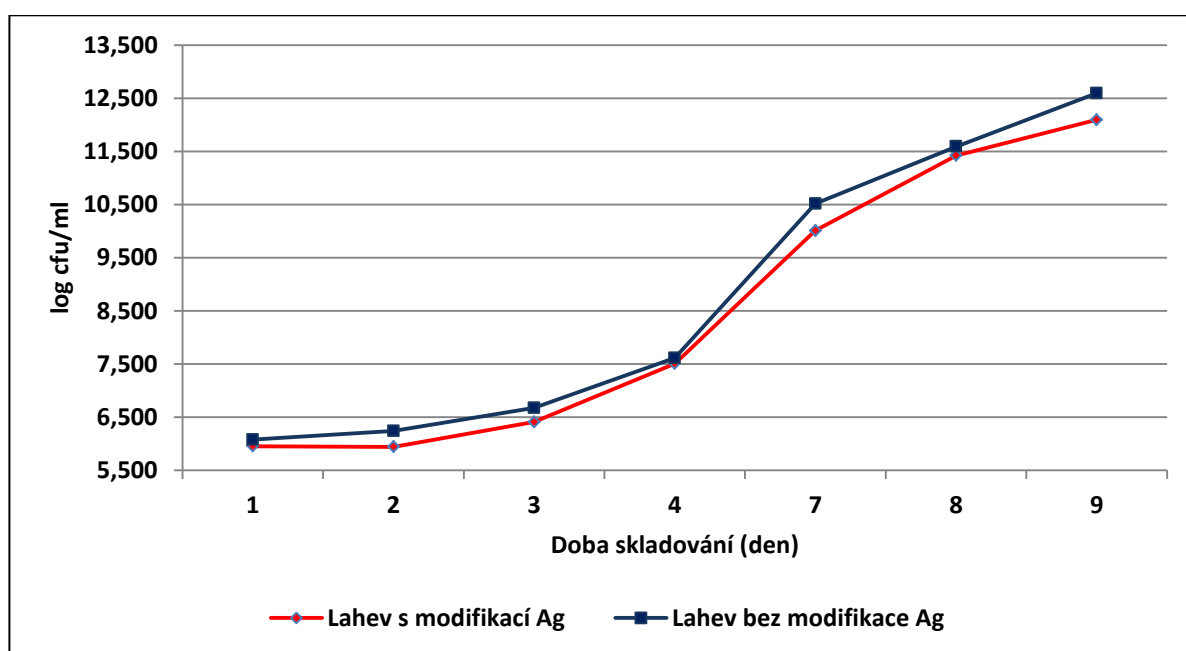
Závěrem lze tedy říci, že stříbrné ionty značně působí na tuto mikrobiální kulturu a zamezují jejímu případnému množení. Pokud vezmeme v potaz i výše uvedený článek, můžeme vyslovit rčení, že lahve s vnitřní úpravou povrchu pomocí Ag^+ o koncentraci 10 mg/m², prodlouží trvanlivost mléka.

3.6.2 Inokulace bakterií *L. ivanovii*

Jak již bylo uvedeno výše, do mléka v plastové lahvi jak bez modifikace, tak s modifikací Ag^+ byla zaočkována daná suspenze, tentokrát *L. ivanovii*. Bylo tomu z důvodu, že tato bakterie dokáže nejen přežít chladničkové teploty, ale také se při nich přirozeně množit.

Doba skladovatelnosti tohoto mléka probíhala opět po dobu devíti dní. Výsledky byly hodnoceny v jednotkách cfu/ml a z nich usuzována antimikrobiální aktivita stříbrných iontů, která již v přechozím případě *S. aureus* byla značně prokazatelná.

Pohyb počtů *L. ivanovii* na půdě PALCAM je patrný v příloženém Grafu 9 níže. Můžeme si zde povšimnout, že u této kultury docházelo k výrazně lepšímu množení a tím i přežívání této bakterie v mléce. Je to díky tomu, že se jedná o bakterii, která bez problému dokáže přežít chladničkové teploty a ještě se při nich dokáže rychle rozmnožovat, čímž má krátkou generační dobu. Stále je zde ale vidět antimikrobiální účinek modifikované lahve, i když kvůli přirozenému množení bakterie není tak značný, jako tomu bylo u bakterie předchozí.



Graf 9: Přežívání *L. ivanovii* v mléce uchovaném v plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag^+ 10 mg/m²

U bakterie *L. ivanovii* docházelo tedy po celou dobu k postupnému nárůstu této kultury, ale zároveň nárůst této bakterie byl v modifikovaných lahvích potlačen. Tento fakt je patrný v Příloze č. 11. Z toho můžeme usuzovat dobré antimikrobiální účinky stříbra a tím i možnost zamezení množení některých patogenních bakterií. Důkazem je tomu i pořízená fotografie ze sedmého dne kultivace, která je zobrazena v Příloze č. 12 a Příloze č. 13. Vzhledem k prokazatelnosti antimikrobiálního účinku i u této bakterie, se může i samotná trvanlivost mléka prodloužit. Vzhledem ke skutečnosti, že nebyly dohledány studie, které by se zabývaly vlivem stříbrných iontů na syrové mléko, byly veškeré výsledky, hodnocení a postupy vedeny formou diskuze s vedoucím diplomové práce.

4 ZÁVĚR

Hlavním cílem diplomové práce bylo prokázat antimikrobiální účinky stříbrných iontů na povrchu lahví z různých materiálů, do nichž bylo plněno syrové neodstředěné mléko. Z tohoto důvodu byly nejprve porovnány koncentrace Ag^+ , kdy materiálem a nosičem byly plastové lahve a následně tytéž koncentrace porovnány u lahví skleněných. Na základě výsledků byly porovnány jednotlivé materiály mezi příslušnými koncentraci a z toho konstatován závěr, že plastové lahve s modifikací vnitřního povrchu o koncentraci Ag^+ 10 mg/m^2 byly vhodnější jak z hlediska efektivnosti účinku stříbrných iontů, tak i z hlediska ekonomického.

Důkazem nám byly i jednotlivé zkoušky, které doprovázely dané experimenty u různých materiálů a koncentrací Ag^+ . Byly jimi sensorické hodnocení mléka, které ukázalo, že při modifikaci Ag^+ o koncentraci 20 mg/m^2 dochází k optické změně barvy mléka, ale pouze z důvodu uchování mléka v lahvi. Samotná barva mléka je tedy nezměněna. Zároveň mléko z modifikovaných lahví o nižší koncentraci vykazovalo z hlediska sensorického hodnocení delší trvanlivost, což se prokázalo i na příslušných testech pro reductázovou a kvasnou zkoušku a stejně tak byly hodnoceny i samotné mikrobity.

Stěžejním ukazatelem byly však CPM, které byly hlavním ukazatelem antimikrobiálního účinku stříbrných iontů. Proto tyto pokusy byly následně samostatně využity pro ověření účinnosti stříbra jak v experimentech porovnání mezi materiály, tak v modelových experimentech při inokulaci *S. aureus* a *L. ivanovii*. *S. aureus* v průběhu experimentu vykazoval viditelnější známky potlačení jeho růstu díky Ag^+ , než *L. ivanovii*. Bylo tomu ale také z důvodu, že *L. ivanovii* se dokáže bez problému množit při chladničkové teplotě, oproti *S. aureus*, pro kterého tyto podmínky nejsou úplně ideální. Nicméně díky modelovým experimentům na těchto bakteriích byl stanoven závěr, že antimikrobiální účinky Ag^+ jsou opravdu prokazatelné a efektivnější v plastových lahvích o koncentraci Ag^+ 10 mg/m^2 . Takto modifikované lahve mohou být tedy případným důvodem pro prodloužení expirace syrového mléka a případnému potlačení jeho patogenní mikroflóry.

Zároveň je třeba zmínit, že tyto experimenty s mlékem, využívající antimikrobiální aktivitu stříbra, nebyly v jiné literatuře pojednány. Z toho důvodu by bylo třeba stanovit a vyhodnotit další laboratorní experimenty, které by dosavadní výsledky této pilotní studie potvrdily a navíc i dále objasnily.

SEZNAM LITERATURY

- Allaker R. P., Memarzadeh K. (2014) Nanoparticles and the control of oral infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43: 95-104.
- Bhupinder S. S. (2010) Food nanotechnology - an overview. *Nanotechnology, Science and Applications*, 3: 1-15.
- Bosenau M. J., a Boston M. D. (1921) Vitamins in milk. *The Boston medical and surgical journal*, 5: 456-458.
- Bradley E. L., Castle L., Chaudhry Q. (2011) Applications of nanomaterials in food packaging with a consideration of opportunities for developing countries: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Trends in Food Science*, (22), 11: 604-610.
- Brito-Silva A., Gomez L., Araujo de C., Galembeck A. (2010) Laser Ablated Silver Nanoparticles with Nearly the Same Size in Different Carrier Media. *Journal of Nanomaterials*.
- Březina P., CSC., doc. Ing., Jelínek J., Ing., CSC. (1990) *Chemie a technologie mléka I. 1*. Praha: VN MON, ISBN 80-7080-075-5.
- Březina P., CSC., doc. Ing., Jelínek J., Ing., CSC. (1990) *Chemie a technologie mléka II. 1*. Praha: VN MON, ISBN 80-7080-075-5.
- Buňka F., Pachlová V., Buňková L., Černíková M. (2013) *Mlékárenská technologie I.*, Zlín: UTB.
- Bylund G. (1995) „Dairy Processing Handbook,“ *Tetra Pak Processing Systems*, Lund.
- Cao G. (2004) *Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications*, Imperial College Press, Londýn.
- Čepička J. (1995) *Technologie mléka a mléčných výrobků. Obecná potravinářská technologie*. Praha: VŠCHT.
- Dainelli D., Gontard N., Spyropoulos D., Tobback P. (2008) Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science*, (19), 103-112.

- Debier C., Pottier J., Goffe Ch., Larondelle Y. (2005) „Present knowledge and unexpected behaviours of vitamins A and E in colostrum and milk,“ *Livestock Production Science*, 98: 135-147.
- Duncan T. V. (2011) Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, (363), 1: 1-24.
- Feng Q. L., Wu J., CHen G. Q., Cui F. Z., Kim T. N., Kim J. O. (2000) A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52: 662-668.
- Ferneborg S. (2016) Effect on Milk Yield, Milk Composition and Milking Efficiency in Dairy Cows. Swedish University of Agricultural Sciences. Doctoral Thesis. Swedish University.
- Forman L., Csc., Doc. Ing. (1994) Mlékárenská technologie II. Praha: VŠCHT Praha, ISBN 80-7080-214-6.
- Franzoi N., Cassandro P. (2018). Technical note: Development and validation of a new method for the quantification of soluble and micellar calcium, magnesium, and potassium in milk. *Journal of Dairy Science*, (3), 101: 1883-1888.
- Gajdůšek S. (2003) Laktologie. Brno: MZLU, ISBN 8071576573.
- Gaucheron F. (2005) The minerals of milk. *EDP Sciences*, (4), 45: 473-483.
- Gelbíčová T., Karpíčková R., Demnerová K. (2011) Mléko a prostředí mlékárenské výroby: Zdroje a cesty šíření *Listeria monocytogenes*. *Mlékárenské listy*, (128), 12-15.
- Görner F., Valík L. (2004) Aplikovaná mikrobiologie požívatín. 9. Bratislava: Malé Centrum, ISBN 80-967064-9-7.
- Granum P. E. (1997) *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *Microbiology Letters*, (157), 223-228.
- Guillet Ch. (2010) Human Listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases*, (1), 16: 136-138.
- Hájková Z., Šmejkal P. (2010) Nanotechnologie pro život, 52.

Haug A., Høstmark A. T., Harstad O. M. (2007) Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids in Health and Disease*, (25), 6: 1-16.

Helgason E. (2000) *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—One Species on the Basis of Genetic Evidence. *Applied and environmental microbiology*, (6), 66: 2627-2630.

Chambers, J. V. (2002) The microbiology of raw milk. 3. Indiana: John Wiley, ISBN 0-471-38596-4.

Chen X., Schluesener H. J. (2008) Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters*, 176: 1-12.

Cheon J. M., Lee J. H., Song Y., Kim J. (2011) Synthesis of Ag nanoparticles using an electrolysis method and application to inkjet printing. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 389: 175-179.

Ingr I. (2003) Zpracování zemědělských produktů. Brno: MZLU, ISBN 8071575208.

Janštová B., Ph.D., Doc. MVDr., Navrátilová P., Ph.D., MVDr. (2014) Produkce mléka a technologie mléčných výrobků. Brno: VFU Brno, ISBN 978-80-7305-713-8.

Janštová B., Ph.D., Doc. MVDr., Navrátilová P., Ph.D., MVDr. (2012) Technologie mléka a mléčných výrobků. Brno, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno.

Jičínská E., Havlová J. (1995) Patogenní mikroorganismy v mléce a mlékárenských výrobcích. 1. Praha: ÚZPI, ISBN 80-85120-47-X.

Jost R. (2011) Milk and Dairy products. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. WCH: Weinheim, 23: 316.

Jensen R. G. (2002) The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, (2), 85: 295-350.

Kadlec P. (2002) Technologie potravin II., Praha: VŠCHT.

Kruijff N., D., Beest M. V., Losada P. P. (2002) Active and intelligent packaging: applications and regulatory aspects. *Food Additives and Contaminants*, (19), 1: 144-162.

- Kučera J. (2008) Význam mléka a mléčných výrobků ve výživě. Brno, Bakalářská práce. Masarykova Univerzita. Vedoucí práce Mgr. Jana Juříčková, Ph.D.
- Kvítek L., Panáček A. (2007) Základy koloidní chemie. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Labronici B. R., Mayara S., Amante E. R. (2016) Estabilidade de vitaminas no processamento de alimentos: uma revisao. *Curitiba*, (2), 34: 1-14.
- Lee Y. H., Lee B.U. (2006) Inactivation of airborne *E-coli* and *B-subtilis* bioaerosols utilizing thermal energy. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16: 1684-1689.
- Lindmark - Månsson H., Fondén R., Pettersson H. E. (2003) Composition of Swedish diary milk. *International Dairy Journal*, 13: 409-425.
- Linzell J., Peaker M. (1972) Day-to-day variations in milk composition in the goat and cow as a guide to the detection of subclinical mastitis. *British Veterinary Journal*, (6), 128: 284-295.
- Mabrook M. F., Petty M. C. (2003) Effect of composition on the electrical conductance of milk. *Journal of food Engineering*, 60: 321-325.
- Marsh K., Bugusu B. (2007) Food Packaging-Roles, Materials, and Environmental Issues. *Journal of Food Science*, (72), 3.
- Morones J. R., Elechiguerra J. L., Camacho A., Holt K., Kouri J. B., Ramirez J. T., Yacaman M. J. (2005) The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16: 2346-2353.
- Nadeem M., Abdullah M., Hussain I. (2015) *Food Sci Technol*, 52: 1061.
- Navrátilová P., Králová M., Janštová B., Cupáková Š., Vorlová L. (2012) *Hygiena produkce mléka*, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno.
- Necidová L., Cupáková Š., Janštová B. (2010) Mikrobiologické parametry syrového a tepelně ošetřeného ovčího mléka. Brno: *Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin*, 4.
- Němečková I. (2017) Kultivační metody stanovení staphylokoků v syrovém mléce a jejich porovnání: Zdroje a cesty šíření *Listeria monocytogenes*. *Mlékárenské listy*, (5), 28: 22-28.

- O'Halloran S. A., Grimes C. A., Lacy K. E., Campbell K. J., Nowson C. A. (2016) Dietary Intake and Sources of Potassium and the Relationship to Dietary Sodium in a Sample of Australian Pre-School Children. *Nutrients*, 8: 496.
- Ontsouka C., Bruckmaier R., Blum J. (2003) Fractionized milk composition during removal of colostrum and mature milk. *Journal of Dairy Science*, (6), 86: 2005-2011.
- Panáček A., Kvítek L., Pucek R., Kolář M., Večeřova R., Pizurova N., Sharma V. K., Nevěčná T., Zbořil R. (2006) Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *Journal of Physical Chemistry B*, (33), 110: 16248-53.
- Pawlas J. (2011) Mléko ano či ne?. Brno., Bakalářská práce. Masarykova Univerzita. Vedoucí práce Ing. Iva Hrnčířiková Ph.D.
- Pereira C. P. (2014) Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, (6), 30: 619-627.
- Robinson R. K. (1990) Dairy Microbiology: The Microbiology of milk products., London and New York, *Else vier Applied Science*, (2), 1: 409.
- Rolf J. (2011) „Milk and dairy products,“ v *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*, Germany, VCH, 316-346.
- Seil J. T., Webster T. J. (2012) Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. *International Journal of Nanomedicine*, 7: 2767-2781.
- Sharma V. K., Yngard R. A., Lin Y. (2009) Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145: 83-96.
- Sondi I., Goia D. V., Matijevic E. (2003) Preparation of highly concentrated stable dispersions of uniform silver nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 260: 75-81.
- Speed E. (1995) Milk and Dairy Product Technology. New York: Basel, ISBN 0-8247-0094-5.
- Tilaki R., Zad A., Mahdavi S. (2006) Stability, size and optical properties of silver nanoparticles prepared by laser ablation in different carrier media. *Applied Physics a-Materials Science & Processing*, 84: 215-219.

Tolaymat T. M., Badawy A. M., Genaidy A., Scheckel K. G., Luxton T. P., Suidan M. (2010) An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Science of the Total Environment*, 408: 999-1006.

Winchester M. R. (2010) Chemical characterization of engineered nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical chemistry. Springer Science and business media B. V.*, (396), 951-952.

Zheng L. X., O'Connell M. J., Doorn S. K., Liao X. Z., Zhao Y. H., Akhadov E. A. (2004) Ultralong single-wall carbon nanotubes, *Nature materials*, 3: 673-676.

Zwietering M. H., Wit J. C., Notermans S. (1996) Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the point of consumption. *International Journal of Food Microbiology*, (30), 55-70.

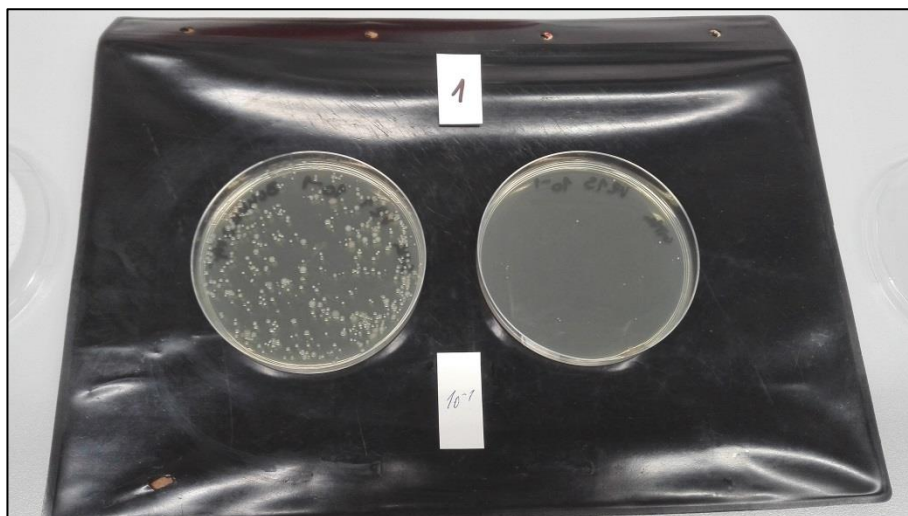
PŘÍLOHY

- PŘÍLOHA č. 1:** CPM u mléka v plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag⁺ 20 mg/m²
- PŘÍLOHA č. 2:** CPM na GTK – den druhý, VZ1 x VZ1-Ag (ředění 10⁻¹)
- PŘÍLOHA č. 3:** CPM u mléka v plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag⁺ 10 mg/m²
- PŘÍLOHA č. 4:** Narůžovělý proužek u lahve s modifikací Ag⁺ 20 mg/m²
- PŘÍLOHA č. 5:** CPM u mléka ve skleněných lahvích bez modifikace/s modifikací Ag⁺ 20 mg/m²
- PŘÍLOHA č. 6:** CPM u mléka ve skleněných lahvích bez modifikace/s modifikací Ag⁺ 10 mg/m²
- PŘÍLOHA č. 7:** Srovnávací pokus - CPM u mléka ve skleněných a plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag⁺ 10 mg/m²
- PŘÍLOHA č. 8:** Přežívání *S. aureus* v mléce uchovávaném v plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag⁺ 10 mg/m²
- PŘÍLOHA č. 9:** *Staphylococcus aureus*, ředění 10⁻² – lahev bez modifikace
- PŘÍLOHA č. 10:** *Staphylococcus aureus*, ředění 10⁻² – lahev s modifikací
- PŘÍLOHA č. 11:** Přežívání *L. ivanovii* v mléce uchovaném v plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag⁺ 10 mg/m²
- PŘÍLOHA č. 12:** *Listeria ivanovii*, ředění 10⁻⁷ – lahev bez modifikace
- PŘÍLOHA č. 13:** *Listeria ivanovii*, ředění 10⁻⁷ – lahev s modifikací

PŘÍLOHA č. 1: CPM u mléka v plastových lahví bez modifikace/s modifikací Ag⁺ 20 mg/m²

Den / ředění	Označení vzorku	Počet kolonií (experiment 1)	Počet kolonií (experiment 2)	CPM v cfu / ml
1 / 10⁰	VZ1	1120	1440	1,4×10⁴
	VZ2	1524	1584	
	VZ1-Ag	904	864	0,9×10⁴
	VZ2-Ag	1056	956	
2 / 10⁻²	VZ1	204	206	2,4×10⁵
	VZ2	275	287	
	VZ1-Ag	153	141	1,6×10⁵
	VZ2-Ag	180	167	
3 / 10⁻³	VZ1	77	86	1,1×10⁶
	VZ2	139	143	
	VZ1-Ag	100	118	9,2×10⁵
	VZ2-Ag	70	78	
4 / 10⁻⁴	VZ1	38	60	5,7×10⁶
	VZ2	66	61	
	VZ1-Ag	54	29	4,3×10⁶
	VZ2-Ag	47	39	
7 / 10⁻⁶	VZ1	15	29	1,3×10⁹
	VZ2	253	215	
	VZ1-Ag	142	142	8,3×10⁸
	VZ2-Ag	24	22	
8 / 10⁻⁶	VZ1	361	367	2,6×10⁹
	VZ2	160	155	
	VZ1-Ag	445	573	4,3×10⁹
	VZ2-Ag	315	330	

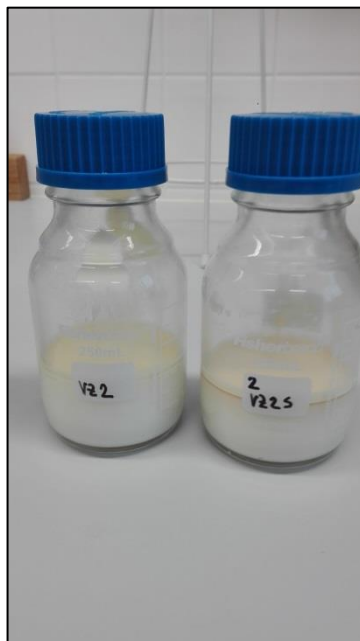
PŘÍLOHA č. 2: CPM na GTK – den druhý, VZ1 x VZ1-Ag (ředění 10^{-1})



PŘÍLOHA č. 3: CPM u mléka v plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag⁺
 10 mg/m²

Den / ředění	Vzorek	Počet kolonií (experiment 1)	Počet kolonií (experiment 2)	CPM v cfu/ml
1 / 10⁰	VZ1	536	508	0,5×10⁴
	VZ2	484	476	
	VZ1-Ag	85	84	0,1×10⁴
	VZ2-Ag	108	108	
2 / 10⁻¹	VZ1	412	392	4,2×10⁴
	VZ2	432	448	
	VZ1-Ag	14	5	0,1×10⁴
	VZ2-Ag	7	8	
3 / 10⁻²	VZ1	480	532	7,3×10⁵
	VZ2	444	512	
	VZ1-Ag	23	21	1,3×10⁴
	VZ2-Ag	7	1	
4 / 10⁻³	VZ1	484	500	5,5×10⁶
	VZ2	612	620	
	VZ1-Ag	10	16	8×10⁴
	VZ2-Ag	3	0	
5 / 10⁻⁴	VZ1	536	640	6,3×10⁷
	VZ2	600	772	
	VZ1-Ag	46	55	4,5×10⁶
	VZ2-Ag	35	41	
8 / 10⁻⁷	VZ1	928	772	1,2×10¹¹
	VZ2	1456	1673	
	VZ1-Ag	236	308	2,6×10¹⁰
	VZ2-Ag	228	252	

PŘÍLOHA č. 4 : Narůžovělý proužek u lahve s modifikací Ag^+ 20 mg/m^2



**PŘÍLOHA č. 5 : CPM u mléka ve skleněných lahvích bez modifikace/s modifikací Ag⁺
20 mg/m²**

Den / ředění	Vzorek	Počet kolonií (experiment 1)	Počet kolonií (experiment 2)	CPM v cfu / ml
1 / 10⁰	VZ1	N*	N*	3×10⁴
	VZ2	N*	N*	
	VZ1-Ag	2104	1544	1,7×10⁴
	VZ2-Ag	1472	1824	
2 / 10⁻²	VZ1	N*	N*	3×10⁶
	VZ2	N*	N*	
	VZ1-Ag	393	332	3,2×10⁵
	VZ2-Ag	256	304	
3 / 10⁻⁴	VZ1	692	640	9,8×10⁷
	VZ2	1240	1360	
	VZ1-Ag	75	81	6,1×10⁶
	VZ2-Ag	42	43	
4 / 10⁻⁵	VZ1	728	1016	9,2×10⁸
	VZ2	920	1032	
	VZ1-Ag	176	172	1,5×10⁸
	VZ2-Ag	116	124	
7 / 10⁻⁷	VZ1	728	712	1,1×10¹¹
	VZ2	1560	1552	
	VZ1-Ag	356	420	6,2×10¹⁰
	VZ2-Ag	920	800	

**PŘÍLOHA č. 6 : CPM u mléka ve skleněných lahvích bez modifikace/s modifikací Ag⁺
10 mg/m²**

Den / ředění	Vzorek	Počet kolonií (experiment 1)	Počet kolonií (experiment 2)	CPM v cfu/ml
1 / 10⁰	VZ1	164	232	0,2×10⁴
	VZ2	244	252	
	VZ1-Ag	108	152	0,2×10⁴
	VZ2-Ag	156	180	
2 / 10⁻¹	VZ1	108	84	0,9×10⁴
	VZ2	70	112	
	VZ1-Ag	55	49	0,7×10⁴
	VZ2-Ag	92	72	
3 / 10⁻¹	VZ1	856	712	5,5×10⁴
	VZ2	312	304	
	VZ1-Ag	216	208	4,5×10⁴
	VZ2-Ag	544	848	
4 / 10⁻²	VZ1	976	1792	1×10⁶
	VZ2	912	512	
	VZ1-Ag	1184	1040	1,1×10⁶
	VZ2-Ag	1296	960	
5 / 10⁻⁴	VZ1	800	832	6×10⁷
	VZ2	376	400	
	VZ1-Ag	352	408	5,3×10⁷
	VZ2-Ag	648	713	
8 / 10⁻⁷	VZ1	960	1088	9,3×10¹¹
	VZ2	800	864	
	VZ1-Ag	736	656	9,6×10¹⁰
	VZ2-Ag	1360	1104	

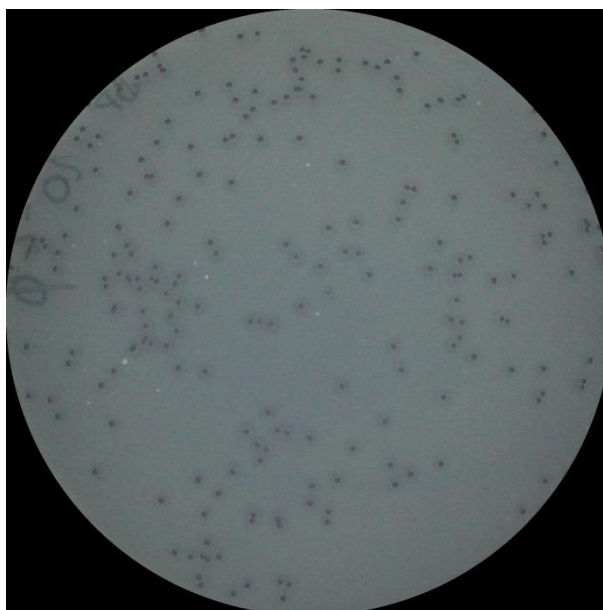
PŘÍLOHA č. 7: Srovnávací pokus - CPM u mléka ve skleněných a plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag⁺ 10 mg/m²

Den / ředění	Vzorek	Počet kolonií (experiment 1)		Počet kolonií (experiment 2)		CPM v cfu/ml	
		Plast	Sklo	Plast	Sklo	Plast	sklo
1 / 10⁰	VZ1	81	121	83	67	0,1×10⁴	0,1×10⁴
	VZ1-Ag	85	104	85	108	0,1 ×10⁴	0,1×10⁴
2 / 10⁻¹	VZ1	120	55	97	41	1,1×10⁴	0,5×10⁴
	VZ1-Ag	45	12	43	17	0,4×10⁴	0,2×10⁴
3 / 10⁻¹	VZ1	320	280	592	280	4,6×10⁴	2,8×10⁴
	VZ1-Ag	184	136	224	104	2×10⁴	1,2×10⁴
4 / 10⁻²	VZ1	768	640	496	704	6,3×10⁵	6,7×10⁵
	VZ1-Ag	168	336	96	368	1,3×10⁵	3,5×10⁵
5 / 10⁻³	VZ1	264	608	264	496	2,6×10⁶	5,5×10⁶
	VZ1-Ag	100	62	86	132	9,3×10⁵	9,7×10⁵
8 / 10⁻⁶	VZ1	880	1184	752	1248	8,2×10⁹	1,2×10¹⁰
	VZ1-Ag	208	896	160	902	1,8×10⁹	8,9×10⁹
9 / 10⁻⁷	VZ1	560	1280	640	1200	6×10¹⁰	1,2×10¹¹
	VZ1-Ag	576	1440	448	1344	5,1×10¹⁰	1,4×10¹¹

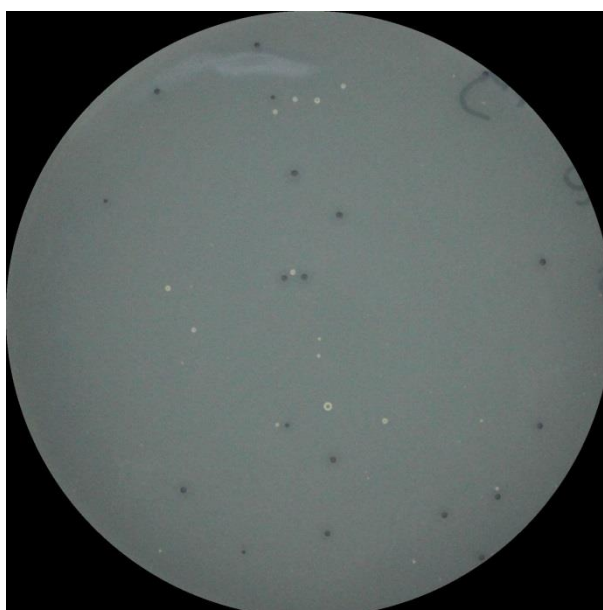
PŘÍLOHA č. 8: Přežívání *S. aureus* v mléce uchovávaném v plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag⁺ 10 mg/m²

Den / ředění	Vzorek	Počet kolonií (experiment 1)	Počet kolonií (experiment 2)	Počty v cfu / ml
1 / 10⁻²	VZ1	25	26	2,6×10⁴
	VZ1-Ag	22	19	2,1×10⁴
2 / 10⁻²	VZ1	28	41	3,5×10⁴
	VZ1-Ag	34	30	3,2×10⁴
3 / 10⁻²	VZ1	52	34	4,3×10⁴
	VZ1-Ag	26	25	2,5×10⁴
4 / 10⁻²	VZ1	89	98	9,4×10⁴
	VZ1-Ag	37	22	3×10⁴
7 / 10⁻²	VZ1	168	282	22,5×10⁴
	VZ1-Ag	28	20	2,4×10⁴
8 / 10⁻²	VZ1	224	248	23,6×10⁴
	VZ1-Ag	25	27	2,6×10⁴
9 / 10⁻²	VZ1	416	376	39,6×10⁴
	VZ1-Ag	14	28	2,1×10⁴

PŘÍLOHA č. 9: *Staphylococcus aureus*, ředění 10^{-2} – lahev bez modifikace



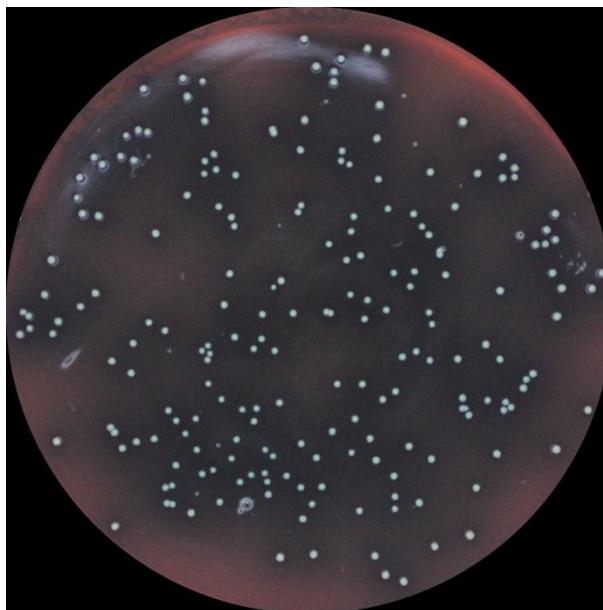
PŘÍLOHA č. 10: *Staphylococcus aureus*, ředění 10^{-2} – lahev s modifikací



PŘÍLOHA č. 11: Přežívání *L. ivanovii* v mléce uchovaném v plastových lahvích bez modifikace/s modifikací Ag⁺ 10 mg/m²

Den / ředění	Vzorek	Počet kolonií (miska 1)	Počet kolonií (miska 2)	Počty v cfu / ml
1 / 10⁻⁴	VZ1	12	11	1,2×10⁶
	VZ1s	9	8	9×10⁵
2 / 10⁻³	VZ1	176	172	1,7×10⁶
	VZ1s	104	72	8,8×10⁵
3 / 10⁻³	VZ1	456	488	4,7×10⁶
	VZ1s	208	304	2,6×10⁶
4 / 10⁻⁴	VZ1	448	376	4,1×10⁷
	VZ1s	328	318	3,2×10⁷
7 / 10⁻⁷	VZ1	304	352	3,28×10¹⁰
	VZ1s	76	128	1,02×10¹⁰
8 / 10⁻⁸	VZ1	512	264	3,8×10¹¹
	VZ1s	232	296	2,6×10¹¹
9 / 10⁻⁹	VZ1	408	376	3,9×10¹²
	VZ1s	120	128	1,2×10¹²

PŘÍLOHA č. 12: *Listeria ivanovii*, ředění 10^{-7} – lahev bez modifikace



PŘÍLOHA č. 13: *Listeria ivanovii*, ředění 10^{-7} – lahev s modifikací

