

Komplexní udržitelné systémy v zemědělství 2012-2018 „KUS“

Návrhu projektu do 2. stupně veřejné soutěže

Evidenční číslo projektu	QJ1210300
Podací označení projektu	QJ1210300
Název projektu	Systémy jištění kvality a bezpečnosti mlékárenských výrobků vhodnými metodami aplikovatelnými v praxi
PROGRAM	Komplexní udržitelné systémy v zemědělství 2012-2018 „KUS“
PODPROGRAM	Udržitelné zemědělské systémy
Doba řešení	04/2012 - 12/2016
Příjemce koordinátor	Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.
Příjemce	Státní zdravotní ústav
Příjemce	Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Příjemce	Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Další účastník projektu	BOHEMILK, a.s.
Další účastník projektu	Českomoravský svaz mlékárenský
Další účastník projektu	EUROFINS CZ, s.r.o.
Další účastník projektu	Mlékárna Olešnice, rolnické mlékařské družstvo

1. Identifikační údaje projektu

1.1. Evidenční číslo projektu

QJ1210300

1.2. Název projektu

Systémy jištění kvality a bezpečnosti mlékárenských výrobků vhodnými metodami aplikovatelnými v praxi

1.3. Veřejná soutěž

Dvoustupňová veřejná soutěž ve výzkumu, vývoji a inovacích v rámci programu Komplexní udržitelné systémy v zemědělství 2012-2018 "KUS" s počátkem řešení projektů v roce 2012

1.4. Program

Komplexní udržitelné systémy v zemědělství 2012-2018 „KUS“

1.5. Podprogram

PP1 - Udržitelné zemědělské systémy

1.5.1. Zvláštní pravidla pro zemědělství a rybolov

Využití zvláštních pravidel

ZP03 - Projekt bude využívat zvláštnosti pro zemědělství a rybolov podle článku 9. Rámce Společenství

Produkty dle kapitol přílohy I Smlouvy o ES

Produkty Kapitola 4 - Mléko a mléčné výrobky ptačí vejce přírodní med

1.6. Cíl podprogramu

C109 - Inovovat technologické postupy, složení potravin a metody kontroly kvality, s důrazem na zdravou výživu obyvatel, zvýšit podíl nových primárních produktů v potravinách se zlepšenými nutričními a dietetickými vlastnostmi.

1.7. Obory řešení dle CEP

1.7.1. Klasifikace hlavního oboru řešení

Potravinářství

1.7.2. Klasifikace vedlejšího oboru řešení

Mikrobiologie, virologie

1.7.3. Klasifikace dalšího vedlejšího oboru řešení

(Zvolte vedlejší obor)

1.8. Obory řešení dle Infobanky

Obory K2 - K2. Potravinářská výroba

K21 - K2.1 Potravinářství

K214 - K2.1.4 Kvalita potravin

1.9. Převažující typ činnosti

Aplikovaný výzkum

2. Představení projektu

2.1. Představení projektu a jeho vlastního řešení

Mléko a mléčné výrobky tvoří významnou součást zdravé výživy obyvatelstva, a to díky své vysoké nutriční hodnotě, obsahu všech důležitých živin v optimálním poměru a jejich výborné biologické využitelnosti. Jedná se především o bílkoviny s ideálním poměrem esenciálních aminokyselin, o tuky v dobře stravitelné formě obsahující jak nasycené, tak nenasycené mastné kyseliny, včetně esenciálních, o sacharidy, a to jak stravitelné (laktosa), tak nestravitelné, s prebiotickým účinkem (např. laktulosa), o všechny vitaminy rozpustné vodě i rozpustné v tucích, o minerální látky v biologicky dostupné formě (např. vápník, fosfor, hořčík, železo, zinek) a další biologicky aktivní látky (např. enzymy, bioaktivní peptidy, organické kyseliny).

Tato nutriční vyváženost a komplexnost však v sobě skrývá zároveň i riziko, neboť mléko a mléčné výrobky představují vhodná růstová média pro řadu mikroorganismů, včetně těch, které mohou způsobit kažení výrobků a/nebo vznik alimentárních onemocnění. Pokud se mikrobiologicky rizikové výrobky dostanou do oběhu, může to mít dalekosáhlé výsledky jak pro vlastního výrobce, tak pro ostatní výrobce daného typu výrobků, neboť trvá řadu měsíců až let, než se podaří obnovit důvěru spotřebitelů v bezpečnost daných výrobků. Příkladem může být relativně nedávná nákaza *Listeria monocytogenes* pocházející ze sýrů zrajících pod mazem od jednoho výrobce, která měla za následek statisticky významný pokles poptávky především po sýrech zrajících pod mazem a sýrech plísňových v celé ČR.

Poněkud příznivější varianta nastane, pokud je mikrobiologicky nevyhovující šarže výrobků zjištěna přímo u výrobce a není uvedena na trh. Nicméně, i tak to ale znamená významnou ztrátu pro konkrétního výrobce, která vyplývá z výrobních nákladů a nákladů na likvidaci nevyhovující šarže.

V ideálním případě u výrobců fungují takové systémy, které umožní pro daný výrobek vybrat surovinu optimální kvality, zhodnotit ji a dle potřeby upravit podmínky a průběh jednotlivých etap technologického procesu, odhalit a eliminovat zdroje kontaminace v prostředí mlékárny a na/ve strojním zařízení a posoudit kvalitu a bezpečnost výrobků dříve, než tyto opustí mlékárnu. K tomu všemu je nezbytné vědět, jaké parametry a jakým způsobem stanovovat.

Platná legislativa a normy (např. Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005, ve znění Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007 o mikrobiologických kritériích pro potraviny, norma ČSN 56 9609 (2008)) sice poskytují určité vodítko, ale zdaleka nepokrývají celou problematiku mléka a mléčných výrobků. Hlavní míra odpovědnosti a rozhodování, co, kdy, kde, jak stanovit a jaké hodnoty povolit leží proto na jednotlivých výrobcích potravin. V tomto směru není dostatečný ani systém HACCP, který sice pokrývá problematiku zajištění zdravotní bezpečnosti, ale který se nezabývá mikroorganismy způsobujícími kažení výrobků, ani případnými bezpečnostními riziky, která mohou tyto mikroorganismy pro citlivé jedince představovat.

Významnou překážkou dostatečného a účinného používání kritérií pro zajištění kvality, bezpečnosti a trvanlivosti mléčných výrobků je nedostatek vhodných metod, kterými by se tato kritéria stanovila. Vhodné metody jsou rychlé, cenově a přístrojově dostupné, robustní, dostatečně citlivé a přesné.

Výše zmíněné požadavky na metody využitelné v praxi se jeví jako nezbytné a samozřejmé, přesto je však většina metod publikovaných v literatuře nesplňuje, protože tyto metody nebyly navrženy a ověřeny na reálných vzorcích. Tento problém byl popsán např. v práci Němečkové a kol. (2009).

Dalším problémem je fakt, že nejsou přesně známy parametry, které by měly být stanoveny, přestože je pro určitou skupinu mikroorganismů charakteristická jistá nežádoucí aktivita. Jednotlivé mikrobiální druhy nebo kmeny v rámci této skupiny se

mírou své aktivity liší, včetně mechanismu účinku této aktivity, který může vést jak k významnému riziku (kažení nebo vzniku zdravotně rizikových metabolitů), tak k nevýznamným změnám. Proto je potřeba nelézt vhodné markery, které umožní dát do souvislosti hodnotu konkrétního parametru a míru rizika. Tento problém popsali např. Chen a kol. (2003, 2004), Silla Santos (1996).

V souvislosti s řešením tohoto projektu se spojily výzkumné organizace (Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Státní zdravotní ústav a Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně) a zástupci uživatelů výsledků. Mlékárny BOHEMILK, a.s. (Opočno) a Mlékárna Olešnice, RMD jsou konkrétní představitelé mlékáren, které mají zájem o navržení a zavedení metod využitelných ve svých provozech a aplikovatelných na své výrobky. Českomoravský svaz mlékárenský (zájmové sdružení mlékáren a dalších subjektů, jejichž činnost s mlékárenským průmyslem jakkoliv souvisí, které má celkem 62 členů a sdružuje – měřeno objemem nakupovaného mléka – více než 90% mlékárenského sektoru v ČR) v projektu zajistí zprostředkování přenosu požadavků na řešení z mlékáren výzkumným organizacím a zpět, a to i u těch mlékáren, které se na řešení tohoto projektu nebudou přímo podílet. EUROFINS CZ, s.r.o. nabízí a provádí chemické a mikrobiologické analýzy se širokým zaměřením na kontroly konané v oblasti bezpečnostních a kvalitativních parametrů potravin, kosmetických a farmaceutických výrobků. V projektu reprezentuje laboratoř, která rozšíří své služby o analýzy metodami navrženými v tomto projektu, a to zejména těmi, které mlékárny nebudou mít možnost nebo nebudou chtít provádět rutinně ve svých laboratořích, ale o které budou mít zájem formou pravidelných zakázek. Předpokládá se, že minimálně 50 % mikrobiologických a analytických metod doporučených na základě vyřešení tohoto projektu bude používáno přímo v provozních laboratořích mlékáren, že 25 % bude používáno v laboratořích, které se zabývají rutinní analýzou formou zakázek, a to jak soukromých, tak státních, a že 25 % zůstane pro potřeby praxe v laboratořích řešitelů (jde o metody, pro které je potřeba speciální přístrojové vybavení, které není dostupné v laboratořích uživatelů výsledků, a které nelze nahradit odpovídajícími lépe dostupnými metodami). Zároveň se předpokládá, že v projektu bude použito přibližně 60 mikrobiologických, chemických nebo fyzikálně-chemických metod, z nichž okolo 30 bude doporučeno pro využití v praxi. Tyto metody budou zahrnovat jak metody nově navržené, tak převzaté z literatury a optimalizované pro daný typ vzorků, tak referenční metody prováděné podle příslušných norem.

Jedinečnost a originalita navrhovaného projektu vyplývá z principu jeho řešení. Mlékárny si samy určí, ke kterým typům výrobků nebo technologických operací potřebují mít k dispozici vhodnější systémy jištění jakosti a bezpečnosti, než doposud stávající. Konkrétně budou odebírány vzorky a z nich izolovány mikroorganismy, které budou následně identifikovány a charakterizovány ve vazbě na existující mikrobiologická rizika. Pro tyto mikroorganismy budou navrženy vhodné kontrolní metody, a to jak metody jejich kvalitativní a kvantitativní detekce, tak metody pro potlačení jejich výskytu nebo nežádoucích aktivit prostřednictvím modifikací technologických parametrů nebo postupů. Navržené kontrolní metody budou předány mlékárnám, které je aplikují a v provozních podmínkách tím ověří jejich účinnost. Tento postup představuje zásadní rozdíl od běžné experimentální praxe, kdy jsou výzkumníky vytipovány rizikové mikroorganismy s výraznou rizikovou aktivitou, a pro které existují vhodné detekční metody, nicméně kdy podmínky experimentů mnohdy nemodelují reálný systém mlékárenských výrobků.

Literatura:

Chen, L., Daniel, R. M., Coolbear, T. (2003): Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *Int. Dairy J.* 13: 255 – 275.

Chen, L., Coolbear, T., Daniel, R. M. (2004): Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines. *Int. Dairy J.* 14: 495 – 504.

ČSN 56 9609 Pravidla správné hygienické a výrobní praxe – Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace. ČNI, Praha 2008.

Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005, ve znění Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007, o mikrobiologických kritériích pro potraviny.

Němečková, I., Pechačová, M., Roubal, P. (2009): Problems with detection of proteolytic micro-organisms and their undesirable activities in milk. *Czech J. Food Sci.* 27: S2-82 – S2-8

Silla Santos, M. H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 213 – 231.

3. Rámcový projekt

3.1. Účel projektu

3.1.2. Potřeba a aktuálnost projektu

Řešení projektu přispěje ke zvýšení kvality a bezpečnosti mlékařenských výrobků, a tím i ke zvýšení důvěry a zájmu spotřebitelů o tyto výrobky. Mléko a mléčné výrobky hrají ve výživě člověka svou nezasupitelnou roli. Jsou nutričně vyvážené a jejich pravidelná konzumace pomáhá snižovat riziko řady závažných civilizačních onemocnění - osteoporóza, kardiovaskulární onemocnění, některé typy nádorových onemocnění, obezita, diabetes mellitus, aj. Lze očekávat, že význam prevence proti těmto onemocněním poroste se zvyšujícím se průměrným věkem obyvatelstva a prodloužením délky života. Ve veřejném zájmu je podpořit prevenci proti těmto onemocněním, která představuje mnohem nižší náklady, než jsou náklady vynaložené na léčbu a následnou péči o pacienty.

Kromě zmíněného zdravotního aspektu spočívá aktuálnost projektu také v podpoře konkurenceschopnosti českých mlékařů. Prosperita mlékařů v ČR vyvolá větší zájem o syrové mléko jako o surovinu, a tím dojde i k podpoře prvovýrobců mléka a k rozvoji zemědělského sektoru.

Řešení projektu přinese vyšší míru bezpečnosti potravin v ČR a zvýšení kvality mléka a mlékařenských výrobků, což vyplývá z nově definovaných požadavků na bezpečnou a specifickou kvalitu mlékařenské produkce a z navržených systémů jejího jistění.

Zajištění dostatečného množství výroby kvalitních a bezpečných potravin tuzemského původu pro zdravou výživu obyvatelstva je jedním z hlavních bodů Programu KUS.

3.1.3. Vazba projektu na mezinárodní projekty v rámci společného plánování (JPI) v zemědělském výzkumu a na projekty ERA

Není vazba na mezinárodní projekty.

3.1.4. Vazba projektu na strategii ČR a EU dané problematiky a význam pro rozvoj oboru

Dostupnost, kvalita a bezpečnost potravin a ovlivnění zdraví obyvatel výživou je jedním z hlavních témat aplikovaného výzkumu a vývoje v agrárním sektoru, a to podle usnesení vlády č. 113 ze dne 26. 1. 2009 "Koncepce zemědělského aplikovaného výzkumu a vývoje do roku 2015". Navrhovaný projekt je plně v souladu s touto prioritou.

Kromě toho projekt naplňuje vizi České technologické platformy pro potraviny Potravinářské komory ČR. Vizí platformy je účinná integrace strategicky zaměřeného národního a koordinovaného výzkumu v oblasti výživy, potravin a spotřebitele a řízení potravinového řetězce, což přinese inovované, nové a zdokonalené potravinářské výrobky pro regionální, národní a globální trhy. Tyto nové produkty budou lépe odpovídat potřebám a očekáváním spotřebitelů a budou mít společně s doporučenými změnami ve stravovacích návycích a životním stylu pozitivní dopad na veřejné zdraví a kvalitu života. Takto cílené aktivity budou podporovat úspěšný a konkurenceschopný celoevropský agro-potravinářský průmysl, jehož podnikatelské řízení bude založené na ekonomickém růstu, transferu technologií, ekologické udržitelnosti produkce a důvěře spotřebitelů.

3.2. Cíl projektu

3.2.1. Cíl projektu

Na základě požadavků ze strany mlékáren vytipovat rizikové mikrobiologické a další parametry, pro které navrhnout, optimalizovat a zavést vhodné metody aplikovatelné v praxi jako součást systémů jištění kvality a bezpečnosti pro vybrané mlékářenské výrobky a technologické operace

3.2.2. Termíny řešení projektu

3.2.2.1 Zahájení řešení projektu (Od):

04/2012

3.2.2.2 Ukončení řešení projektu (Do):

12/2016

3.3. Výsledky projektu

Identifikační číslo výsledku	Název výsledku	Termín dosažení výsledku (rok)	Termín realizace výsledku (rok)
V001	Vytipovat rizikové parametry pro výrobu vybraných nefermentovaných mléčných výrobků, pro které navrhnout, optimalizovat a	2016	2017

Identifikační číslo výsledku	Název výsledku	Termín dosažení výsledku (rok)	Termín realizace výsledku (rok)
	zavést vhodné metody		
V002	Vytipovat rizikové parametry pro výrobu vybraných fermentovaných mléčných výrobků, pro které navrhnout, optimalizovat a zavést vhodné metody	2016	2017
V003	Vytvořit systém jištění kvality a bezpečnosti vybraných mlékárenských výrobků	2016	2017

3.3.1. Výsledek projektu

3.3.1. Identifikační číslo výsledku

V001

3.3.2. Název výsledku

Vytipovat rizikové parametry pro výrobu vybraných nefermentovaných mléčných výrobků, pro které navrhnout, optimalizovat a zavést vhodné metody

3.3.3. Popis výsledku

Na základě požadavků ze strany spolupracujících mlékáren budou vybrány typy nefermentovaných výrobků nebo technologické operace, které budou studovány v rámci tohoto projektu. Pro ně budou vytipovány mikrobiologické, chemické nebo fyzikálně-chemické parametry, které umožní posoudit riziko kažení nebo bezpečnostní riziko. Pro tyto parametry budou navrženy, optimalizovány a zavedeny vhodné kontrolní metody, které budou implementovány do stávajících nebo nových systémů jištění kvality a bezpečnosti.

V době podání tohoto návrhu projektu se jako aktuální tématické okruhy k řešení jeví: psychrotrofní a termorezistentní mikroflóra a kažení UHT výrobků, osmoфильní mikroflóra a kažení zahuštěných slazených výrobků, termostabilita a kažení zahuštěných neslazených výrobků. Tyto okruhy mohou být v průběhu řešení projektu modifikovány na základě aktuálních potřeb mlékáren.

3.3.4. Formy výsledku podle struktury databáze RIV

Druh výsledku RIV	Předpokládaný počet
P - patent	0
Z – Poloprovoz, ověřená technologie, odrůda, plemeno	0
F – Výsledky s právní ochranou - užitný vzor, průmyslový vzor	0
G - technicky realizované výsledky – prototyp, funkční vzorek	0
N - certifikované metodiky a postupy, specializovaná mapa	3
R – software	0

Druh výsledku RIV	Předpokládaný počet
H – výsledky promítnuté do právních předpisů a norem	0
J – článek v impaktovaném nebo neimpaktovaném časopise	0
J – článek v recenzovaném časopise	2
B – odborná kniha	0
D – článek ve sborníku	0

3.3.5. Termín dosažení výsledku (rok)

2016

3.3.6. Potenciální odběratel

Potenciální uživatelé tohoto výsledku jsou mlékárny v ČR a zkušební laboratoře. Zájem o výsledek V001 projevila mlékárna BOHEMILK, a.s. a laboratoř EUROFINS CZ, s.r.o. Dosažení výsledku V001 je podporováno také Českomoravským svazem mlékárenským, který potvrdil jeho přínosnost i pro další mlékárny a bude, spolu s výzkumnými organizacemi účastníky se tohoto projektu, jedním ze zprostředkovatelů výsledku mlékárnám.

3.3.7. Způsob komercializace nebo jiného uplatnění

Formy výsledků podle struktury RIV:

2014 - 2 články v recenzovaném časopise

2015 - 2 certifikované metodiky

2016 - 1 certifikovaná metodika

Výsledek V001 bude uživatelům předán takto:

- prostřednictvím Českomoravského svazu mlékárenského, který je ve stálém kontaktu s mlékárnami v ČR a s problémy, které musejí mlékárny řešit
- prostřednictvím akcí (semináře, workshopy, konference, ale ne typ D podle stávající metodiky hodnocení), kterých se účastní mj. technologové, manažeři jakosti a další pracovníci mlékáren a vysokoškolští pracovníci, kteří vychovávají budoucí generaci mlékařů, např. DEN VÚM (v období 2014 - 2016 každoročně), Kroměřížské mlékařské dny (2014, 2016), seminář Mléko a sýry (2014, 2016), apod.
- prostřednictvím článku v recenzovaném časopise Mlékařské listy - Zpravodaj, který odebírají zejména mlékárny v ČR (tato forma bude použita i v případě, že v databázi RIV nebude možné uplatnit výsledek typu Jrec, protože jiné, zejména mezinárodní, časopisy se do rukou uživatelů výsledků pravidelně nedostávají)
- zahrnut bude do náplně vzdělávacích workshopů pro laborantky a pro vedoucí laboratoří, které Výzkumný ústav mlékárenský pravidelně pořádá
- zkušební laboratoře budou stimulovány k zavedení nových metod prostřednictvím poptávky ze strany mlékáren. Poptávka bude doplněna o odkaz na příslušnou metodiku
- samozřejmě bude zveřejněn na internetu za podmínek splňujících článek 34 Nařízení Komise

3.3.8. Termín realizace výsledku (rok)

2017

3.3.2. Výsledek projektu

3.3.1. Identifikační číslo výsledku

V002

3.3.2. Název výsledku

Vytipovat rizikové parametry pro výrobu vybraných fermentovaných mléčných výrobků, pro které navrhnout, optimalizovat a zavést vhodné metody

3.3.3. Popis výsledku

Na základě požadavků ze strany spolupracujících mlékáren budou vybrány typy fermentovaných výrobků nebo technologické operace, které budou studovány v rámci tohoto projektu. Pro ně budou vytipovány mikrobiologické, chemické nebo fyzikálně-chemické parametry, které umožní posoudit riziko kažení nebo bezpečnostní riziko. Pro tyto parametry budou navrženy, optimalizovány a zavedeny vhodné kontrolní metody, které budou implementovány do stávajících nebo nových systémů jištění kvality a bezpečnosti.

V době podání tohoto návrhu projektu se jako aktuální tématické okruhy k řešení jeví: ošetřování solných lázní, zrání sýrů, biofilmy, nezákysové bakterie mléčného kvašení, biogení aminy, enterotoxiny Staphylococcus aureus. Tyto okruhy mohou být v průběhu řešení projektu modifikovány na základě aktuálních potřeb mlékáren.

3.3.4. Formy výsledku podle struktury databáze RIV

Druh výsledku RIV	Předpokládaný počet
P - patent	0
Z – Poloprovoz, ověřená technologie, odrůda, plemeno	0
F – Výsledky s právní ochranou - užitný vzor, průmyslový vzor	1
G - technicky realizované výsledky – prototyp, funkční vzorek	0
N - certifikované metodiky a postupy, specializovaná mapa	2
R – software	0
H – výsledky promítnuté do právních předpisů a norem	0
J – článek v impaktovaném nebo neimpaktovaném časopise	7
J – článek v recenzovaném časopise	6
B – odborná kniha	0
D – článek ve sborníku	0

3.3.5. Termín dosažení výsledku (rok)

2016

3.3.6. Potenciální odběratel

Potenciální uživatelé tohoto výsledku jsou mlékárny v ČR a zkušební laboratoře. Zájem o výsledek V002 projevila Mlékárna Olešnice, RMD a laboratoř EUROFINs CZ, s.r.o. Dosažení výsledku V002 je podporováno také Českomoravským svazem mlékárenským, který potvrdil jeho přínosnost i pro další mlékárny a bude, spolu s výzkumnými organizacemi účastníky se tohoto projektu, jedním ze zprostředkovatelů výsledku mlékárnám. Dalším potenciálním odběratelem výsledků je výrobce imunochemických kitů.

3.3.7. Způsob komercializace nebo jiného uplatnění

Formy výsledků podle struktury RIV:

2013 - 1 článek v recenzovaném časopise, 1 článek v impaktovaném časopise

2014 - 2 články v recenzovaném časopise, 2 články v neimpaktovaném časopise, 1 článek v impaktovaném časopise

2015 - 1 certifikovaná metodika, 2 články v impaktovaném časopise, 2 články v recenzovaném časopise

2016 - 1 užitečný vzor, 1 certifikovaná metodika, 1 článek v recenzovaném časopise, 1 článek v impaktovaném časopise

Výsledek V002 bude uživatelům předán takto:

- prostřednictvím Českomoravského svazu mlékárenského, který je ve stálém kontaktu s mlékárnami v ČR a s problémy, které musejí mlékárny řešit
- prostřednictvím akcí (semináře, workshopy, konference, ale ne typ D podle stávající metodiky hodnocení), kterých se účastní mj. technologové, manažeři jakosti a další pracovníci mlékáren a vysokoškolští pracovníci, kteří vychovávají budoucí generaci mlékařů, např. DEN VŮM (v období 2014 - 2016 každoročně), Kroměřížské mlékařské dny (2014, 2016), seminář Mléko a sýry (2014, 2016), apod.
- prostřednictvím článku v recenzovaném časopise Mlékařské listy - Zpravodaj, který odebírají zejména mlékárny v ČR (tato forma bude použita i v případě, že v databázi RIV nebude možné uplatnit výsledek typu Jrec, protože jiné, zejména mezinárodní, časopisy se do rukou uživatelů výsledků pravidelně nedostávají)
- zahrnut bude do náplně vzdělávacích workshopů pro laborantky, pro vedoucí laboratoří a pro sýraře, které Výzkumný ústav mlékárenský pravidelně pořádá
- zkušební laboratoře budou stimulovány k zavedení nových metod prostřednictvím poptávky ze strany mlékáren. Poptávka bude doplněna o odkaz na příslušnou metodiku
- odborná veřejnost v ČR i ve světě bude s poznatky vyplývajícími z projektu seznámena prostřednictvím článků v impaktovaných časopisech
- navržený imunochemický kit bude v roce 2016 ochráněn užitečným vzorem a nabídnut potenciálním výrobcům imunochemických kitů
- samozřejmě bude zveřejněn na internetu za podmínek splňujících článek 34 Nařízení Komise

3.3.8. Termín realizace výsledku (rok)

2017

3.3.3. Výsledek projektu

3.3.1. Identifikační číslo výsledku

V003

3.3.2. Název výsledku

Vytvořit systém jištění kvality a bezpečnosti vybraných mlékárenských výrobků

3.3.3. Popis výsledku

V průběhu řešení projektu budou sbírána data o kvalitě syrového mléka, popř. i vybraných meziproduktů, a o kvalitě finálních výrobků. Data budou zahrnovat jak experimentální hodnoty získané při řešení tohoto projektu pomocí nově zavedených metod, tak data získaná při rutinních analýzách v provozních laboratořích mlékáren. Z dat bude vytvořen software, který umožní posoudit vhodnost dané suroviny pro daný výrobek nebo odhadnout riziko kažení finálního výrobku.

3.3.4. Formy výsledku podle struktury databáze RIV

Druh výsledku RIV	Předpokládaný počet
P - patent	0
Z – Poloprovoz, ověřená technologie, odrůda, plemeno	0
F – Výsledky s právní ochranou - užitný vzor, průmyslový vzor	0
G - technicky realizované výsledky – prototyp, funkční vzorek	0
N - certifikované metodiky a postupy, specializovaná mapa	0
R – software	1
H – výsledky promítnuté do právních předpisů a norem	0
J – článek v impaktovaném nebo neimpaktovaném časopise	0
J – článek v recenzovaném časopise	0
B – odborná kniha	0
D – článek ve sborníku	0

3.3.5. Termín dosažení výsledku (rok)

2016

3.3.6. Potenciální odběratel

Potenciální uživatelé tohoto výsledku jsou mlékárny v ČR. Zájem o výsledek V003 projeví BOHEMILK, a.s. a Mlékárna Olešnice, RMD. Dosažení výsledku V003 je podporováno také Českomoravským svazem mlékárenským, který potvrdil jeho přínosnost i pro další mlékárny a bude, spolu s výzkumnými organizacemi účastnicími se tohoto projektu, jedním ze zprostředkovatelů výsledku mlékárnám.

3.3.7. Způsob komercializace nebo jiného uplatnění

**Formy výsledků podle struktury RIV:
2016 - 1 software**

Výsledek V003 bude uživatelům předán takto:

- prostřednictvím Českomoravského svazu mlékárenského, který je ve stálém kontaktu s mlékárnami v ČR a s problémy, které musejí mlékárny řešit
- informace o sestavovaném softwaru bude prezentována na akcích jako je DEN VÚM, Kroměřížské mlékařské dny, seminář Mléko a sýry, apod.
- samozřejmě bude zveřejněn na internetu za podmínek splňujících článek 34 Nařízení Komise

Vytvořený software bude zdarma k dispozici všem mlékárnám v ČR

3.3.8. Termín realizace výsledku (rok)

2017

3.4. Dílčí cíle řešení

Přehled dílčích cílů řešení

Ident. číslo	Název (cíl) dílčího cíle	Datum zahájení řešení dílčího cíle	Datum ukončení řešení dílčího cíle
C001	Vytipovat mikrobiální původce vad nefermentovaných mléčných výrobků, navrhnout, optimalizovat a zavést mikrobiologické metody jejich detekce či stanovení a navrhnout preventivní opatření proti jejich nežádoucím aktivitám.	2012	2015
C002	Vytipovat chemické parametry významné pro jištění kvality nefermentovaných mléčných výrobků a navrhnout, optimalizovat a zavést vhodné metody jejich posuzování.	2012	2016
C003	Vytipovat mikrobiální původce vad fermentovaných mléčných výrobků.	2012	2014
C004	Navrhnout, optimalizovat a zavést mikrobiologické metody detekce, stanovení a charakterizace mikrobiálních původců vad fermentovaných mléčných výrobků a navrhnout preventivní opatření proti jejich nežádoucím aktivitám.	2012	2016
C005	Navrhnout, vytvořit a ověřit systémy jištění kvality a bezpečnosti vybraných mlékárenských výrobků.	2012	2016

3.4.X. Dílčí cíl řešení projektu

3.4.1. Definice dílčího cíle

3.4.1.1. Identifikační číslo dílčího cíle

C001

3.4.1.2. Název (cíl) dílčího cíle

Vytipovat mikrobiální původce vad nefermentovaných mléčných výrobků, navrhnout, optimalizovat a zavést mikrobiologické metody jejich detekce či stanovení a navrhnout preventivní opatření proti jejich nežádoucím aktivitám.

3.4.1.3. Datum zahájení řešení dílčího cíle (měsíc/rok)

04/2012

3.4.1.4. Datum ukončení řešení dílčího cíle (měsíc/rok)

12/2015

3.4.2. Výsledky dílčího cíle

Dílčí cíl C001 se vztahuje k výsledku V001 "Vytipovat rizikové parametry pro výrobu vybraných nefermentovaných mléčných výrobků, pro které navrhnout, optimalizovat a zavést vhodné metody".

Plánovány jsou tyto výsledky dílčího cíle:

- soubor izolovaných a identifikovaných mikroorganismů, u kterých je posouzen jejich potenciál způsobovat kažení nefermentovaných mléčných výrobků, zejména UHT mléka a zahuštěných mlék slazených a neslazených**
- metodika mikrobiologického hodnocení vyrobených šarží nefermentovaných mléčných výrobků z hlediska posouzení rizika kažení v průběhu doby minimální trvanlivosti**
- navržená preventivní opatření k minimalizaci nežádoucích aktivit mikroorganismů nebo jejich enzymů v nefermentovaných mléčných výrobcích**

3.4.3. Forma zpracování a předání výsledků dílčího cíle

2014 - 1 článek v recenzovaném časopise

2015 - 2 certifikované metodiky

3.4.4. Kritické předpoklady dosažení dílčího cíle

Pro úspěšné vyřešení tohoto dílčího cíle je žádoucí, aby byly zejména během prvních dvou let řešení zachyceny nefermentované výrobky, ve kterých došlo ke kažení. To značně usnadní řešení a přispěje jak k nalezení rizikových mikroorganismů, tak k navržení vhodných metod a preventivních postupů ve vztahu právě k těmto mikroorganismům.

3.4.X. Dílčí cíl řešení projektu

3.4.1. Definice dílčího cíle

3.4.1.1. Identifikační číslo dílčího cíle

C002

3.4.1.2. Název (cíl) dílčího cíle

Vytipovat chemické parametry významné pro jištění kvality nefermentovaných mléčných výrobků a navrhnout, optimalizovat a zavést vhodné metody jejich posuzování.

3.4.1.3. Datum zahájení řešení dílčího cíle (měsíc/rok)

04/2012

3.4.1.4. Datum ukončení řešení dílčího cíle (měsíc/rok)

12/2016

3.4.2. Výsledky dílčího cíle

Dílčí cíl C002 se vztahuje k výsledku V001 "Vytipovat rizikové parametry pro výrobu vybraných nefermentovaných mléčných výrobků, pro které navrhnout, optimalizovat a zavést vhodné metody".

Plánovány jsou tyto výsledky dílčího cíle:

- nalezené chemické parametry syrového mléka nebo finálních nefermentovaných mléčných výrobků (zejména UHT mléka a zahuštěného mléka neslazeného), které jsou významné pro dosažení a udržení kvality finálních výrobků po celou dobu minimální trvanlivosti**
- zavedené metodiky pro posuzování těchto chemických parametrů**

Poznámka: Přestože během výroby UHT a zahuštěných mléčných výrobků dochází k usmrcení nebo potlačení růstu většiny mikroorganismů, během skladování těchto

výrobků může docházet k nežádoucím enzymatickým nebo fyzikálně-chemickým změnám, a proto byla chemickým metodám hodnocení těchto výrobků - na rozdíl od metod hodnocení fermentovaných mléčných výrobků - vyhrazen samostatný dílčí cíl.

3.4.3. Forma zpracování a předání výsledků dílčího cíle

2014 - 1 článek v recenzovaném časopise

2016 - 1 certifikovaná metodika

3.4.4. Kritické předpoklady dosažení dílčího cíle

Existence a nalezení vhodných chemických parametrů, jejichž změny v závislosti na riziku kažení jsou významnější než přirozená variabilita těchto parametrů v mléce.

3.4.X. Dílčí cíl řešení projektu

3.4.1. Definice dílčího cíle

3.4.1.1. Identifikační číslo dílčího cíle

C003

3.4.1.2. Název (cíl) dílčího cíle

Vytipovat mikrobiální původce vad fermentovaných mléčných výrobků.

3.4.1.3. Datum zahájení řešení dílčího cíle (měsíc/rok)

04/2012

3.4.1.4. Datum ukončení řešení dílčího cíle (měsíc/rok)

12/2014

3.4.2. Výsledky dílčího cíle

Dílčí cíl C003 se vztahuje k výsledku V002 "Vytipovat rizikové parametry pro výrobu vybraných fermentovaných mléčných výrobků, pro které navrhnout, optimalizovat a zavést vhodné metody".

Plánovány jsou tyto výsledky dílčího cíle:

- soubor izolovaných a identifikovaných mikroorganismů, u kterých byl posouzen jejich potenciál způsobovat kažení fermentovaných mléčných výrobků, zejména sýrů

Poznámka: Protože mikroorganismy, které mohou způsobovat kažení fermentovaných mléčných výrobků, představují značně rozsáhlou a heterogenní skupinu, byl jejich izolaci, identifikaci a charakterizaci - na rozdíl od mikrobiálních původců kažení nefermentovaných mléčných výrobků - vyhrazen samostatný dílčí cíl.

3.4.3. Forma zpracování a předání výsledků dílčího cíle

2013 - 1 článek v recenzovaném časopise

2014 - 1 článek v impaktovaném časopise, 1 článek v neimpaktovaném časopise

3.4.4. Kritické předpoklady dosažení dílčího cíle

Pro úspěšné vyřešení tohoto dílčího cíle je žádoucí, aby byly zejména během prvních dvou let řešení zachyceny fermentované mléčné výrobky, ve kterých došlo ke kažení. To značně usnadní řešení a přispěje k nalezení rizikových mikroorganismů.

3.4.X. Dílčí cíl řešení projektu

3.4.1. Definice dílčího cíle

3.4.1.1. Identifikační číslo dílčího cíle

C004

3.4.1.2. Název (cíle) dílčího cíle

Navrhnout, optimalizovat a zavést mikrobiologické metody detekce, stanovení a charakterizace mikrobiálních původců vad fermentovaných mléčných výrobků a navrhnout preventivní opatření proti jejich nežádoucím aktivitám.

3.4.1.3. Datum zahájení řešení dílčího cíle (měsíc/rok)

04/2012

3.4.1.4. Datum ukončení řešení dílčího cíle (měsíc/rok)

12/2016

3.4.2. Výsledky dílčího cíle

Dílčí cíl C004 se vztahuje k výsledku V002 "Vytipovat rizikové parametry pro výrobu vybraných fermentovaných mléčných výrobků, pro které navrhnout, optimalizovat a zavést vhodné metody".

Plánovány jsou tyto výsledky dílčího cíle:

- u vybraných mikroorganismů z dílčího cíle C003 jsou v rámci dílčího cíle V004 určeny doplňující charakteristiky, jejichž přítomnost může vést k opakovaným problémům s výskytem těchto mikroorganismů, popř. ke vzniku metabolitů nežádoucích z hlediska zdravotní bezpečnosti
- zavedené metodiky pro posouzení těchto charakteristik u izolovaných mikroorganismů
- zavedené metodiky pro posuzování rizika kažení nebo bezpečnostních rizik kyselých mléčných výrobků
- navržené preventivní postupy a technologická doporučení pro minimalizaci rizik spojených s dotčenými mikroorganismy

3.4.3. Forma zpracování a předání výsledků dílčího cíle

2013 - 1 článek v impaktovaném časopise

2014 - 2 články v recenzovaném časopise, 1 článek v neimpaktovaném časopise

2015 - 1 certifikovaná metodika, 2 články v impaktovaném časopise, 2 články v recenzovaném časopise

2016 - 1 užitný vzor, 1 certifikovaná metodika, 1 článek v recenzovaném časopise, 1 článek v impaktovaném časopise

3.4.4. Kritické předpoklady dosažení dílčího cíle

Úspěšné řešení a dosažení dílčího cíle C003.

3.4.X. Dílčí cíl řešení projektu

3.4.1. Definice dílčího cíle

3.4.1.1. Identifikační číslo dílčího cíle

C005

3.4.1.2. Název (cíle) dílčího cíle

Navrhnout, vytvořit a ověřit systémy jistění kvality a bezpečnosti vybraných mlékárenských výrobků.

3.4.1.3. Datum zahájení řešení dílčího cíle (měsíc/rok)

04/2012

3.4.1.4. Datum ukončení řešení dílčího cíle (měsíc/rok)

12/2016

3.4.2. Výsledky dílčího cíle

Dílčí cíl C005 se vztahuje k výsledku V003 "Vytvořit systém jištění kvality a bezpečnosti vybraných mlékárenských výrobků".

Plánovány jsou tyto výsledky dílčího cíle:

- nalezené parametry, které lze rutinně stanovovat přímo na mlékárnách a které jsou v přímé souvislosti s kvalitou finálních výrobků
- navržené systémy jištění kvality pro vybrané mlékárenské technologie, a to v podobě softwaru

3.4.3. Forma zpracování a předání výsledků dílčího cíle

2016 - 1 software

3.4.4. Kritické předpoklady dosažení dílčího cíle

Existence a nalezení statisticky významných závislostí mezi parametry, které lze rutinně stanovovat na mlékárnách, a kvalitou finálních mléčných výrobků.

4. Plán projektu

4.1. Metodika řešení

Metodika vlastního řešení

Dílčí cíl C001 "Vytipovat mikrobiální původce vad nefermentovaných mléčných výrobků, navrhnout, optimalizovat a zavést mikrobiologické metody jejich detekce či stanovení a navrhnout preventivní opatření proti jejich nežádoucím aktivitám."
(1. 4. 2012 - 31. 12. 2015)

Dílčí výzkumná hypotéza 1:

Existuje omezený počet skupin nebo druhů mikroorganismů, které jsou příčinou vzniku většiny vad vybraných nefermentovaných mléčných výrobků (UHT mléko, zahuštěná mléka slazená a neslazená, apod. trvanlivé mléčné výrobky), přičemž je možné tyto

mikroorganismy, popř. jejich enzymy detekovat či stanovit vhodnými metodami aplikovatelnými v praxi. Výsledky získané těmito metodami umožní mlékárnám činit včasné a správné rozhodnutí, a to jak ve vztahu k jednotlivým zpracovávaným šaržím, tak při hledání a potlačování zdrojů mikrobiální kontaminace.

Vstupní informace:

Běžně se jako nejčastější původci vad trvanlivých nefermentovaných mléčných výrobků uvádějí tyto druhy nebo skupiny mikroorganismů: pro UHT a sterilované mléčné výrobky rody *Bacillus* sp. (*B. cereus*) a *Pseudomonas* sp., a zejména jejich termostabilní proteolytické a lipolytické enzymy, pro zahuštěná mléka slazená osmotolerantní kvasinky a plísně, pro sušené mléčné výrobky sporotvorné bakterie a mikrokoky. Přestože proces UHT nebo sterilace vede k usmrcení většiny přítomných mikroorganismů, enzymy zůstávají přítomny a mohou být příčinou kažení. Významná je také sekundární kontaminace, k níž může docházet až po tepelném ošetření. Protože současné metody umožňují spolehlivější identifikaci mikroorganismů, je žádoucí tento seznam potenciálně rizikových mikroorganismů aktualizovat. Zároveň však stále chybí celá řada spolehlivých, rychlých, robustních a dostupných metod, které by umožnily posoudit a minimalizovat riziko kažení finálních trvanlivých mléčných výrobků.

Materiál, metody, postupy:

Klasickými kultivačními postupy budou analyzovány reálné vzorky z výroby nefermentovaných mléčných výrobků (syrové mléko, fázové vzorky, meziprodukty, finální výrobky, vzorky z prostředí). Vybrané mikroorganismy budou izolovány, identifikovány pomocí sekvenace 16S rRNA, popř. rodově a druhově specifických PCR metod, a posouzen bude jejich potenciál způsobovat kažení cílových mléčných výrobků (proteolytická a lipolytická enzymová aktivita, růst při nízké teplotě, odolnost vůči záhřevu, apod.). Nalezeny budou významné zdroje kontaminace těmito mikroorganismy. S využitím izolovaných mikroorganismů budou navrženy a ověřeny metody hodnocení vstupní suroviny, etap technologického procesu či finálních výrobků, a to včetně různých variant zátěžových testů, systémů vzorkování či real-time PCR metod kvantifikace technologicky rizikových mikroorganismů. Navržena budou též opatření či postupy pro minimalizaci těchto mikrobiálních rizik.

Na řešení se bude podílet: VÚM s.r.o., VŠCHT v Praze, BOHEMILK, ČMSM, EUROFINS CZ

Časový plán:

2012 - izolace a charakterizace mikroorganismů, posouzení jejich potenciálu způsobovat kažení nefermentovaných mléčných výrobků, návrh designu PCR metod

2013 - izolace a charakterizace mikroorganismů, posouzení jejich potenciálu způsobovat kažení nefermentovaných mléčných výrobků, určení hlavních zdrojů kontaminace, odzkoušení a optimalizace PCR metod

2014 - na základě výsledků z předcházejících let návrh metod pro klasické mikrobiologické hodnocení vhodnosti vstupní suroviny a kvality finálních mléčných výrobků a návrh postupů pro minimalizaci rizika kažení nefermentovaných mléčných výrobků, optimalizace a posouzení parametrů navržených PCR metod

2015 - zavedení a ověření navržených metod a postupů v praxi

Výsledky pro RIV:

2014 - 1 článek v recenzovaném časopise
2015 - 2 certifikované metodiky

Dílčí cíl C002 "Vytipovat chemické parametry významné pro jištění kvality nefermentovaných mléčných výrobků a navrhnout, optimalizovat a zavést vhodné metody jejich posuzování."

(1. 4. 2012 - 31. 12. 2016)

Dílčí výzkumná hypotéza 2:

Existují chemické nebo fyzikálně-chemické parametry syrového mléka a vybraných nefermentovaných mléčných výrobků (UHT mléko a zahuštěná mléka neslazená), které jsou spolehlivými indikátory rizika kažení těchto finálních výrobků, popř. technologických problémů při jejich výrobě, přičemž je možné tyto parametry detekovat či stanovit vhodnými metodami aplikovatelnými v praxi.

Vstupní informace:

Pro výrobu kvalitních stabilních produktů typu UHT mléko a zahuštěné neslazené mléko je klíčovým parametrem termostabilita vstupní suroviny. Metoda, kterou v současné době používá pro hodnocení termostability průmyslového partner, neposkytuje výsledky s dostatečně vypovídající schopností. Pro kvalitu slazených i neslazených výrobků je důležité sledování obsahu sacharidů a reakčních produktů vznikajících při tepelném ošetření. Kvalitu výrobků mohou dále ovlivňovat sporulující mikroorganismy a jejich metabolity.

Materiál, metody, postupy:

Budou navrženy postupy charakterizace vstupní suroviny a meziproductů (u zahuštěného mléka) z hlediska termostability. Výchozí metodou bude stanovení doby koagulace v olejové lázni za zvýšené teploty. U vzorků vykazujících zhoršenou termostabilitu budou dále analyzovány další parametry, které charakterizují rovnováhu solí (pomocí kapilární elektroforézy), kyselost a stav bílkovin (úroveň proteolýzy). Bude možné získat informace o vlivu ročního období na termostabilitu, posoudit vliv a minimální koncentraci stabilizačních solí a vliv skladování mléka. Pro stanovení sacharidů je zavedena metoda kapalinové chromatografie s ELS detekcí, budou testovány možnosti využití nové robustní kolony Hypercarb. Kapalinovou chromatografií a kapilární elektroforézou budou sledovány metabolity klostridií, především organické kyseliny.

Na řešení se bude podílet: VŠCHT v Praze, VÚM s.r.o., BOHEMILK, ČMSM

Časový plán:

2012 - vytipování chemických, popř. fyzikálně-chemických parametrů, a výběr metod, které budou testovány z hlediska vhodnosti pro posuzování těchto parametrů

2013 - ideový návrh a prvotní posouzení vytipovaných metod

2014 - optimalizace vybraných metod

2015 - optimalizace vybraných metod

2016 - zavedení a ověření navržených metod v praxi

Výsledky pro RIV:

2014 - 1 článek v recenzovaném časopise
2016 - 1 certifikovaná metodika

**Dílčí cíl C003 "Vytipovat mikrobiální původce vad fermentovaných mléčných výrobků."
(1. 4. 2012 - 31. 12. 2014)**

Dílčí výzkumná hypotéza 3:

Existuje omezený počet skupin nebo druhů mikroorganismů, které jsou příčinou vzniku většiny vad či bezpečnostních rizik vybraných fermentovaných mléčných výrobků (zejména přírodních sýrů), přičemž je možné vybrat takové mikrobiologické parametry, které lze v průběhu výroby a zrání sýrů detekovat či stanovit vhodnými metodami aplikovatelnými v praxi.

Vstupní informace:

Běžně se jako nejčastější původci vad či bezpečnostních rizik přírodních sýrů uvádějí tyto druhy nebo skupiny mikroorganismů: zástupci čeledi Enterobacteriaceae, kvasinky, plyn-produkující klostridia, nezákysové bakterie mléčného kvašení, enterokoky, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*. Každý sýr obsahuje unikátní mikroflóru a přírodní sýry obecně obsahují pestré směs vzájemně se ovlivňujících mikrobiálních druhů a kmenů. Proto je studium mikroflóry sýrů stále otevřenou a aktuální otázkou.

Materiál, metody, postupy:

Klasickými kultivačními postupy budou analyzovány reálné vzorky z výroby přírodních sýrů (syrové mléko, fázové vzorky, solné lázně, finální výrobky, vzorky z prostředí). Vybrané mikroorganismy budou izolovány, identifikovány pomocí sekvenace 16S rRNA, popř. i pomocí rodově a druhově specifických PCR metod či MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie, a posouzen bude jejich potenciál způsobovat kažení sýrů (tvorba plynu, biochemické vlastnosti, růst při nízké teplotě, odolnost vůči NaCl, odolnost vůči nízkému pH, apod.). U bakterií čeledi Enterobacteriaceae budou dohledávány zdroje kontaminace (surovina, prostředí výroby, personál a pod.). K tomuto účelu budou použity typizační metody na principu makrorestrikčního štěpení, charakteristiky izolátů budou vzájemně porovnány a vyhodnoceny. Nalezeny budou zdroje kontaminace těmito mikroorganismy. Dále bude studována diverzita mikroorganismů v závislosti na ročním období. Doporučeny budou mikroorganismy či jejich skupiny (a k nim vhodné metody), které by bylo žádoucí stanovovat ve výrobě sýrů pravidelně.

Na řešení se bude podílet: VÚM s.r.o., VŠCHT v Praze, SZÚ, Mlékárna Olešnice, rolnické mlékařské družstvo, ČMSM, EUROFINS CZ

Časový plán:

2012 – izolace, identifikace a charakterizace mikroorganismů z výroby sýrů, návrh designu PCR metod

2013 – izolace, identifikace a charakterizace mikroorganismů z výroby sýrů, odzkoušení a optimalizace PCR metod

2014 – určení zdrojů kontaminace, určení hlavních rizikových mikroorganismů a skupin

mikroorganismů ve výrobě sýrů, publikace výsledků, optimalizace a posouzení parametrů navržených PCR metod, informace pro výrobce o možnosti identifikace mikrobiologických vad mlékárenských výrobků molekulárně-genetickými metodami (v případě zájmu servisní analýzy)

Výsledky pro RIV:

2013 - 1 článek v recenzovaném časopise

2014 - 1 článek v impaktovaném časopise, 1 článek v neimpaktovaném časopise

**Dílčí cíl C004 "Navrhnout, optimalizovat a zavést mikrobiologické metody detekce, stanovení a charakterizace mikrobiálních původců vad fermentovaných mléčných výrobků a navrhnout preventivní opatření proti jejich nežádoucím aktivitám."
(1. 4. 2012 - 31. 12. 2016)**

Dílčí výzkumná hypotéza 4:

Mezi mikroorganismy, které se vyskytují v sýrech, jsou i takové druhy či kmeny, které představují riziko perzistence ve výrobě a/nebo riziko tvorby zdravotně nežádoucích metabolitů. Pro detekci či stanovení těchto mikroorganismů nebo jejich nežádoucích aktivit lze využít metody aplikovatelné v praxi. Nežádoucí výskyt a aktivity těchto mikroorganismů mohou být minimalizovány s využitím vhodných preventivních opatření nebo modifikací technologických podmínek či postupů.

Vstupní informace:

Biofilm označuje přisedlá mikrobiální společenství na pevném povrchu, která se skládají z jednotlivých buněk spojených mezi sebou a povrchem extracelulárními polymerními látkami, převážně polysacharidy. Pevnost a struktura biofilmu znemožňuje odstranění biofilmu pouhým oplachem a zvyšuje odolnost buněk biofilmu před vlivy vnějšího prostředí (nutriční stresy, průnik antimikrobiálních látek). Tvorba biofilmu může být tedy významným faktorem přežití a šíření mikroorganismů v potravinářských provozech, kde takto mohou za vhodných podmínek (uspořádání provozu, způsobu a úroveň sanitace) přežít a být zdrojem opakované kontaminace výrobků. Biofilm musí být tedy brán v úvahu při řešení mikrobiologických problémů v potravinářských provozech a jeho eliminaci musí být věnována náležitá pozornost.

Staphylococcus aureus je relativně odolný vůči NaCl a je schopen růst i při nízkých teplotách, kdy produkuje celou řadu toxických látek, které vyvolávají různá onemocnění. V současné době je známo 21 typů stafylokokových enterotoxinů (typ A-E, tzv. klasické enterotoxiny a typ G-V, tzv. nové enterotoxiny) a očekává se, že v brzké době budou objeveny další. Všechny klasické enterotoxiny a z nových toxinů typ H mají několik společných vlastností, jako je vysoká termostabilita (snesou i půlhodinový var), odolnost k trávicím enzymům nebo schopnost vyvolat zvracení a průjem.

Dalšími zdravotně rizikovými metabolity, které se mohou vyskytovat v sýrech, jsou biogenní aminy, které vznikají dekarboxylací aminokyselin, zejména během zrání sýrů. Biogenní aminy mohou být jedním z faktorů vedoucích k bolestem hlavy, hypertenzi nebo naopak hypotenzi, onemocněním trávicího traktu, poruchám srdeční činnosti nebo vzniku kancerogenních látek.

Materiál, metody, postupy:

Mikroorganismy izolované v rámci dílčího cíle C003 budou testovány na schopnost

tvorby biofilmu v závislosti na vnějších podmínkách prostředí (teplota, chemické složení prostředí, materiál, vliv ostatních mikroorganismů) s cílem zjistit tvorbu biofilmu v optimálních a reálných podmínkách provozu. Biofilm tvořený izoláty na jednotlivých površích (mikrotitrační destičky, kupóny vložené do mikrobiální suspenze) za sledovaných podmínek bude detekován do něj se vážícími barvivy (krystalová violet, rhodamin atd.) v závislosti na míře jejich absorpance. U biofilm tvořících izolátů bude zjištěna jeho odolnost vůči používaným desinfekčním látkám, příp. dalším antimikrobiálním látkám, a jiným dekontaminačním procesům komerčními systémy pro odlišení živých a mrtvých buněk, příp. s využitím fluorescenční mikroskopie. Na základě získaných poznatků bude navržena nejvhodnější strategie pro odstranění a prevenci tvorby biofilmu v provozu, jejíž praktický dopad bude ověřen v praxi.

Pokud jde o tvorbu toxinů *S. aureus*, v práci se zaměříme na nejrozšířenější enterotoxiny. Při jejich identifikaci budou využity jak imuno-, tak i PCR metody, a to jak již existující, tak nově navržené. V průběhu řešení projektu budou sestaveny imunometody proti vybraným enterotoxinům a bude zavedena metoda určení přítomnosti genů zodpovědných za tvorbu enterotoxinů. U vybraných izolátů *S. aureus* bude zjištěn vliv podmínek na tvorbu enterotoxinů a na míru exprese genů za tuto tvorbu odpovědných. Bude navržena a ověřena Real-Time metoda kvantifikace *S. aureus* v jednotlivých fázích provozu.

Biogenní aminy (histamin, tyramin, fenylethylamin, putrescin, kadaverin, tryptamin, spermin, spermidin) budou stanovovány ve vzorcích mléčných výrobků. Dále budou vyšetřovány i jednotlivé mikroorganismy s cílem zjistit potenciální produkci výše jmenovaných biogenních aminů. U vybraných izolátů budou rovněž studovány faktory ovlivňující produkci biogenních aminů s cílem minimalizace produkce v reálných mléčných výrobcích.

Produkce biogenních aminů u jednotlivých izolátů bude testována ve speciálních dekarboxylačních médiích, které podporují dekarboxylaci volných aminokyselin. Extrakce z výrobků bude prováděna kyselinou chloristou. Biogenní aminy budou derivatizovány s použitím dansylchloridu. Vlastní chromatografická separace bude provedena na koloně C18, k detekci bude využit UV/VIS a fluorometrický detektor. Kromě výše popsanych metod a postupů budou pro potřeby praxe navrženy také postupy a technologické kroky vedoucí k eliminaci planktonních buněk nežádoucích mikroorganismů v průběhu výroby sýrů, např. v solných lázních.

Na řešení se bude podílet: VŠCHT v Praze, SZÚ, UTB ve Zlíně, VÚM s.r.o., Mlékárna Olešnice, rolnické mlékařské družstvo, ČMSM, Eurofins CZ

Časový plán:

2012 – testování tvorby biofilmu, biogenních aminů či toxinů u vybraných izolátů, sestavení nové imunochemické metody pro vybraný stafylokokový enterotoxin

2013 – testování tvorby biofilmu, biogenních aminů či toxinů u vybraných izolátů, sestavení nové imunochemické metody pro vybraný stafylokokový enterotoxin a její testování

2014 – stanovení podmínek, které ovlivňují tvorbu biofilmu, biogenních aminů či toxinů, zhodnocení účinnosti desinfekčních prostředků, modelové laboratorní experimenty, sestavení imunochemické metody pro další vybraný stafylokokový enterotoxin a její testování

2015 – výběr vhodných desinfekčních prostředků, posouzení vlivu použitých dekontaminačních schémat na tvorbu biofilmu a jejich úprava, navržení postupů a modifikací technologického procesu, které minimalizují tvorbu biogenních aminů nebo

toxinů, technologické experimenty, testování nové imunometody pro detekci stafylokokových toxinů, sestavení imunochemické metody pro další vybraný stafylokokový enterotoxin a její testování
2016 – ověření účinnosti navržených změn, zavedení navržených metod a postupů do praxe

Výsledky pro RIV:

2013 - 1 článek v impaktovaném časopise

2014 - 2 články v recenzovaném časopise, 1 článek v neimpaktovaném časopise

2015 - 2 články v impaktovaném časopise, 1 certifikovaná metodika, 2 články v recenzovaném časopise

2016 - 1 užitný vzor, 1 certifikovaná metodika, 1 článek v recenzovaném časopise, 1 článek v impaktovaném časopise

**Dílčí cíl C005 "Navrhnout, vytvořit a ověřit systémy jištění kvality a bezpečnosti vybraných mlékárenských výrobků."
(1. 4. 2012 - 31. 12. 2016)**

Dílčí výzkumná hypotéza 5:

Mlékárny provádí na vstupní surovině (mléku) řadu měření. Některá z těchto dat je možné využít k predikci vlastností finálního mléčného výrobku, resp. mohou posloužit jako indikátor pro zavedení preventivních/nápravných opatření ve výrobě.

Vstupní informace:

Kvalifikovaný odhad vlastností výrobků si vyžaduje existenci matematicko-statistického modelu, který je schopen v reálném čase poukázat na trendy vývoje jakosti za daných podmínek. Takový model ani metodický přístup k jeho tvorbě však nejsou v současné době k dispozici.

Materiál, metody, postupy:

Data z mlékáren o hodnotách vstupních měření, parametrech mezioperační kontroly a následných parametrech finálních výrobků (pro jednotlivé výrobky) za několik uplynulých let budou zpracována pokročilými metodami vícerozměrné statistické analýzy (shluková analýza, metoda hlavních komponent, diskriminační analýza, popř. metoda analýzy rozptylu a zobecněných lineárních regresních modelů). Využívány budou softwarová prostředí Statistica a Matlab.

Cílem je nalézt závislosti mezi jednotlivými proměnnými. Na základě nalezených závislostí bude konstruován model predikce a určeny limitní hodnoty (kritické hodnoty) klíčových parametrů ovlivňující jakost finálního výrobku. Znalost modelu a kritických hodnot klíčových parametrů podmíní tvorbu softwaru, jehož cílem je ukázat pracovníkům mlékáren na potenciálně hrozící problém ohrožující zdravotní nezávadnost produktu anebo jeho horší kvalitativní parametry.

Po konstrukci modelu budou experimentálně vyrobeny výrobky, na nichž budou simulovány různé vady s cílem ověřit funkčnost navrženého modelu.

Vlastní tvorba softwaru (obsahujícího navržený model pro dané výrobky) bude zadána externímu dodavateli.

Na řešení se bude podílet: UTB ve Zlíně, VÚM s.r.o., BOHEMILK, Mlékárna Olešnice,

rolnické mlékařské družstvo, Eurofins CZ, ČMSM

Časový plán:

2012 - sběr dat pro definované výrobky

2013 - sběr dat pro definované výrobky, hledání závislostí

2014 - sběr dat pro definované výrobky, konstrukce modelů predikce

2015 - konstrukce modelů predikce, ověření modelů v pilotních podmínkách, tvorba beta-verze softwaru

2016 - ověření softwaru a jeho úprava pro potřeby praxe

Výsledky pro RIV:

2016 - 1 software

4.2. Projektový a řešitelský tým

4.2.1. Představení týmu

Příjemcem - koordinátorem projektu je Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. (IČ 26722861). Příjemci jsou Státní zdravotní ústav (IČ 75010330), Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně (IČ 70883521) a Vysoká škola chemicko-technologická v Praze (IČ 60461373). Příjemce - koordinátor a příjemci budou signatáři smlouvy uzavřené s Ministerstvem zemědělství o řešení tohoto projektu. Příjemci - koordinátorovi a příjemcům budou uvolněny finanční prostředky na řešení projektu přímo z Ministerstva zemědělství. Řešitelský tým příjemce-koordinátora a příjemců je tvořen zejména vědeckými a výzkumnými pracovníky, kteří budou provádět výzkumné aktivity vztahující se k projektu a výsledky těchto aktivit předají uživatelům výsledků. Odborná úroveň řešitelů a vybavení výzkumných pracovišť jsou popsány v bodech 4.2.3. Řešitelský tým a 4.3. Technické a materiální vybavení.

Uživatelé výsledků projektu jsou v projektu zastoupeni dalšími účastníky projektu: BOHEMILK, a.s. (IČ 26470535), Českomoravský svaz mlékárenský (IČ 15886026), EUROFINS CZ, s.r.o. (IČ 27449408) a Mlékárna Olešnice, RMD (IČ 48911020). Další účastníci projektu uzavřou s příjemcem - koordinátorem (Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.) doplňkovou smlouvu o spolupráci, kterou bude mj. řešeno financování řešení projektu převodem finančních prostředků z účtu příjemce - koordinátora na účty dalších účastníků projektu.

Další účastníci projektu mají zájem jako uživatelé výsledků projektu na jejich dosažení, protože:

- Českomoravský svaz mlékárenský zastupuje většinu mlékárenských subjektů v ČR a zajistí přenos výsledků projektu i těm uživatelům, kteří se přímo neúčastní řešení
- BOHEMILK, a.s. a Mlékárna Olešnice, RMD jsou konkrétní mlékárny, které mají zájem o využití výsledků řešení projektu ve svých provozech. K řešení projektu přispějí zejména poskytováním reálných vzorků a ověřováním dosažených výsledků v praxi.
- EUROFINS CZ, s.r.o. je akreditovaná laboratoř, která má zájem rozšířit své služby o nové analytické a mikrobiologické metody. Služby této laboratoře využívají nejen mlékárny a další potravinářské podniky, ale i další zájemci z jiných oborů.