

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Matej BORNŠEK

**VPLIV SNAŽNOSTI POLNILNIH LINIJ ZA BREZALKOHOLNE
PIJAČE NA KAKOVOST KONČNIH PROIZVODOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF HYGIENIC CONDITIONS OF FILLING
LINES ON QUALITY OF ALCOHOL FREE BEVERAGES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v živilsko tehnološkem obratu in na Katedri za živilsko mikrobiologijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijske komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Barbaro Jeršek in za recenzenta doc. dr. Andreja Plestenjaka.

Mentorica: doc. dr. Barbara Jeršek

Recenzent: doc. dr. Andrej Plestenjak

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Matej Bornšek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 663.85:579.67:579.24 (043) = 863
KG brezalkoholne pijače / mikrobiološka kakovost brezalkoholnih pijač / izvirska voda / polnilne linije / higiena obrata / kontaminacija zraka / mikroorganizmi / kontaminacija pijač / kvar brezalkoholnih pijač
AV BORNŠEK, Matej
SA JERŠEK, Barbara (mentorica) / PLESTENJAK, Andrej (recenzent)
KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2006
IN VPLIV SNAŽNOSTI POLNILNIH LINIJ ZA BREZALKOHOLNE PIJAČE NA KAKOVOST KONČNIH PROIZVODOV
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 71 str., 24 pregl., 29 sl., 49 vir.
IJ sl
JI sl / en

AI Kakovost brezalkoholnih pijač je odvisna od mnogih dejavnikov, med katerimi so tudi snažnost opreme in prostora, v katerem poteka tehnološki proces. Ugotoviti smo želeli, ali snažnost proizvodnega okolja aseptične (polnilna linija 1) in septične polnilne linije (polnilna linija 2) za polnjenje brezalkoholnih pijač vpliva na kakovost in mikrobiološko ustreznost končnih proizvodov. Kvalitativno in kvantitativno smo določali mikroorganizme v prostoru polnilnih linij, na opremi, v zraku, v surovinah in v končnih proizvodih. Higieno stanje polnilnih linij smo ugotavljali z vzorčenjem površin z brisi, z vzorčenjem zraka z vzorčevalnikom zraka in s sedimentacijsko metodo. V vzorcih smo s klasičnimi mikrobiološkimi preiskavami določili plesni, kvasovke in bakterije. Število mikroorganizmov smo pri vzorcih površin izrazili kot število mikroorganizmov v brisu (CFU / 5 mL) in pri vzorcih zraka kot koncentracijo mikroorganizmov v volumski enoti (CFU / m³). Mikrobiološko preiskavo surovin in končnih produktov smo izvajali z membransko filtracijo ustreznega pripravljenega vzorca in določili v brezalkoholnih pijačah in deaerirani vodi kot surovini plesni, kvasovke in bakterije; v izvirski vodi pa koliformne bakterije, enterokoke in bakterije vrste *Pseudomonas aeruginosa*. Rezultate mikrobioloških preiskav smo vrednotili glede na, v okviru notranje kontrole obrata, predpisane zgornje mejne koncentracije mikroorganizmov. V prostorih polnilne linije 1 je bil delež neustreznih rezultatov mikrobioloških preiskav površin (21 %) in zraka (17 %) primerljiv z deležem neustreznih rezultatov mikrobioloških preiskav končnih proizvodov (22 %). V prostoru polnilne linije 2 smo med polnjenjem izvirske vode določili 5 % mikrobiološko neustreznih vzorcev zraka in 17 % vzorcev vpihanega zraka, medtem ko so bili vsi končni proizvodi (izvirska voda) ustrezni. Med polnjenjem brezalkoholne pijače z dodanim CO₂ smo ugotovili, da je bilo neustreznih 25 % vzorcev zraka, 25 % vzorcev vpihovanega CO₂ in 10 % vzorcev končnih proizvodov. Izbrane izolate mikroorganizmov smo identificirali in z njimi umetno kontaminirali končne proizvode. Mikroorganizmi so po umetni kontaminaciji povzročili kvar brezalkoholnih pijač. Rezultati nakazujejo relativno majhno, vendar ne izključujočo možnost kontaminacije končnih izdelkov z mikroorganizmi iz okolja polnilnih linij.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
DC UDC 663.85: 579.67 :579.24 (043) = 863
CX alcohol free beverages/ microbiological quality of alcohol free beverages / spring water / filling lines / hygiene in filling lines / airborne contamination / microorganisms / microbial contamination of alcohol free beverages / spoilage alcohol free beverages
AU BORNŠEK, Matej
AA JERŠEK, Barbara (supervisor) / PLESTENJAK, Andrej (reviewer)
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2006
TI INFLUENCE OF HYGIENIC CONDITIONS OF FILLING LINES ON QUALITY OF ALCOHOL FREE BEVERAGES
DT Graduation thesis (University studies)
NO XI, 71 p., 24 tab., 29 fig., 49 ref.
LA sl
AL sl / en
- AB The quality of alcohol free beverages depends on many factors and among them hygiene conditions of equipment and environment is also important. The aim of our work was to investigate if the survival and growth of microorganism in a food processing environment (aseptic filling line 1 and septic filling line 2) may lead to the contamination of finished products. Microorganisms on food processing equipment and from air in places of filling lines and microorganisms from raw material and final products were determined. Surfaces were sampled with swabs and air samples were collected with air sampler and with sedimentation method. Moulds, yeasts and bacteria in samples were detected and enumerated with cultural microbiological methods. The number of microorganisms from the surface was expressed as a number of microorganisms in the swab (CFU / 5 mL). The concentration of microorganisms in air was expressed as the number of microorganisms per volume of air (CFU / m³). Membrane filtration of a suitable prepared sample was used to analyze finished products and raw materials. Moulds, yeasts and bacteria were determined in non-alcoholic beverages and deaerated water used as raw material. Coliform bacteria, enterococci and *Pseudomonas aeruginosa* were determined in samples of spring water. Quantitative and qualitative microbiological guidelines that relate numbers and types of microorganisms per sample to critical levels of product contamination were established previously within internal control. Results of the microbiological analysis were evaluated to these microbiological guidelines. In places of filling line 1 the percentage of microbiologically unsuitable results were for surface samples 21 % and for air samples 17 %. These results are comparable to the percentage of unsuitable results of final products (22 %). In the place of the filling line 25 % of microbiologically unsuitable samples of air and 17 % of samples of blowing air were determined but all finished products (spring water) were suitable. During filling carbonated beverages we found out that 25 % of samples of air, 25 % of samples of blowing CO₂ and 10 % of samples of final products were unsuitable. Some of selected microbial isolates were identified and used for artificial contamination of finished products. Alcohol free beverages were spoiled within few days. Results showed relatively small but not excluded possibility of contamination of final products by microorganisms from the environment of filling lines.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	IX
SEZNAM OKRAJŠAV	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJ NALOGE	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 BREZALKOHOLNE PIJAČE	2
2.2 PROIZVODNJA BREZALKOHOLNIH PIJAČ	2
2.2.1 Tehnologija brezalkoholnih pijač	2
2.2.2 Zgodovina aseptičnega polnjenja	5
2.2.3 Aseptično polnjenje	5
2.2.4 Čiščenje in razkuževanje v proizvodnji brezalkoholnih pijač	6
2.2.4.1 Osnovna čistila in razkužila primerna za sistem CIP postopek ter njihova vloga	7
2.3 PITNA VODA	8
2.3.1 Izvirna voda	8
2.3.1.1 Koliformne bakterije in bakterije vrste <i>Escherichia coli</i>	10
2.3.1.2 Enterokoki	10
2.3.1.3 Sulfitreducirajoči klostridiji	10
2.3.1.4 Bakterije vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
2.4 SPREMLJANJE HIGIENE ŽIVILSKO PREDLOVALNIH PROSTOROV	11
2.4.1 Mikrobiološka preiskava površin	11
2.4.2 Mikrobiološka preiskava tekočih vzorcev	11
2.4.3 Mikrobiološka preiskava zraka	12
2.4.3.1 Aerosol v proizvodnji živil	12
2.4.3.2 Viri kontaminacije zraka	12
2.4.3.3 Filtracija zraka	13
2.4.3.4 Mikrobiološka kontrola zraka	13
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 MATERIALI	15
3.1.1 Mikrobiološka gojišča	15
3.1.2 Raztopine in kemikalije	16
3.1.3 Surovine	16
3.1.4 Končni proizvodi	16
3.1.5 Laboratorijska oprema in aparature	16
3.2 METODE DELA	17
3.2.1 Opis tehnoloških prostorov vzorčenja	17
3.2.1.1 Polnilna linija 1	18
3.2.1.2 Polnilna linija 2	24
3.2.1.3 Linija za pripravo brezalkoholnih pijač (OBP)	26

3.2.2 Vzorčenje.....	27
3.2.2.1 Vzorčenje površin v septičnem prostoru polnilne linije 1	27
3.2.2.2 Vzorčenje zraka v septičnem prostoru polnilne linije 1	29
3.2.2.3 Vzorčenje površin v aseptičnem prostoru polnilne linije 1	31
3.2.2.4 Vzorčenje zraka v aseptičnem prostoru polnilne linije 1	34
3.2.2.5 Vzorčenje zraka v prostorih polnilne linije 2	34
3.2.2.6 Vzorčenje deaerirane vode	37
3.2.2.7 Vzorčenje končnih proizvodov.....	38
3.2.3 Mikrobiološke preiskave.....	38
3.2.3.1 Mikrobiološka preiskava brisov	38
3.2.3.2 Mikrobiološka preiskava zraka.....	38
3.2.3.3 Mikrobiološka preiskava surovin in končnih proizvodov	38
3.2.4 Identifikacija mikroorganizmov	39
3.2.5 Rast izbranih mikroorganizmov v brezalkoholnih pijačah.....	39
4 REZULTATI.....	40
4.1 POLNILNA LINIJA 1	40
4.1.1 Koncentracije mikroorganizmov na površinah v septičnem prostoru polnilne linije 1.....	40
4.1.2 Koncentracije mikroorganizmov v zraku v septičnem prostoru polnilne linije 1	42
4.1.3 Koncentracije mikroorganizmov na površinah in v zraku v aseptičnem prostoru polnilne linije 1	43
4.1.4 Koncentracije mikroorganizmov v končnih proizvodih	44
4.2 POLNILNA LINIJA 2.....	45
4.2.1 Koncentracije mikroorganizmov v zraku v prostoru polnilne linije 2.....	45
4.2.2 Koncentracije mikroorganizmov, izoliranih iz zraka in CO ₂ preko polnilnih igel in zračnega filtra v prostoru polnilne linije 2.....	48
4.2.3 Koncentracije mikroorganizmov v končnih proizvodih	51
4.3 LINIJA OBP	52
4.3.1 Rezultati mikrobioloških preiskav deaerirane vode	52
4.4 IDENTIFICIRANI MIKROORGANIZMI	52
4.4.1 Mikroorganizmi v septičnem prostoru polnilne linije 1.....	52
4.4.2 Mikroorganizmi v aseptičnem prostoru polnilne linije 1.....	54
4.4.3 Mikroorganizmi v surovini in končnem proizvodu.....	54
4.5 RAST MIKROORGANIZMOV PO NACEPITVI V KONČNE PRODUKTE	54
4.5.1 Opis rasti mikroorganizmov v vzorcih pijač.....	55
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	59
5.1 Razprava	59
5.1.1 Polnilna linija 1	59
5.1.2 Polnilna linija 2	61
5.1.3 Rast mikroorganizmov v končnih proizvodih (brezalkoholnih pijačah)	64
5.2 SKLEPI.....	65
6 POVZETEK	66
7 VIRI.....	68

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Operacije in namen CIP sistema (Tomašič, 1996)	7
Preglednica 2: Končni proizvodi v katerih smo določali rast izoliranih mikroorganizmov	16
Preglednica 3: Vzorčna mesta površin v septičnem prostoru polnilne linije 1	28
Preglednica 4: Vzorčna mesta zraka v septičnem prostoru polnilne linije 1	29
Preglednica 5: Vzorčna mesta površin v aseptičnem prostoru polnilne linije 1	31
Preglednica 6: Vzorčna mesta zraka v prostoru polnilne linije 2	35
Preglednica 7: Raznolikost in pogostost mikroorganizmov na površinah v septičnem delu polnilne linije 1	41
Preglednica 8: Koncentracije mikroorganizmov (CFU/m ³) v septičnem prostoru linije 1	42
Preglednica 9: Raznolikost in pogostost mikroorganizmov na površinah v aseptičnem prostoru polnilne linije 1	43
Preglednica 10: Raznolikost in pogostost mikroorganizmov v zraku v aseptičnem prostoru polnilne linije 1	44
Preglednica 11: Raznolikost in pogostost mikroorganizmov v končnih proizvodih polnjenih v aseptičnem prostoru polnilne linije 1	45
Preglednica 12: Koncentracije plesni v prostoru polnilne linije 2 med polnjenjem pijače z dodanim CO ₂	46
Preglednica 13: Koncentracije mikroorganizmov v prostoru polnilne linije 2 med polnjenjem izvirske vode	47
Preglednica 14: Raznolikost in pogostost izoliranih mikroorganizmov v prostoru polnilne linije 2 med polnjenjem izvirske vode in pijače z dodanim CO ₂	49
Preglednica 15: Koncentracije mikroorganizmov v vpihovanem zraku polnilnih igel in zračnega filtra v prostoru polnilne linije 2 med polnjenjem izvirske vode	50
Preglednica 16: Rezultati mikrobioloških preiskav izvirske vode	51
Preglednica 17: Raznolikost in pogostost mikroorganizmov, izoliranih v končnem proizvodu A	51

Preglednica 18: Raznolikost in pogostost mikroorganizmov, izoliranih v vzorcih deaerirane vode	52
Preglednica 19: Mikroorganizmi, ki so bili identificirani na polnilni liniji 1 in liniji OBP	53
Preglednica 20: Rast mikroorganizmov v umetno kontaminiranih pijačah	55
Preglednica 21: Pogostost mikrobiološko neustreznih vzorcev površin, zraka in končnih proizvodov polnilne linije 1	59
Preglednica 22: Pogostost mikrobiološko neustreznih rezultatov preiskave deaerirane vode	61
Preglednica 23: Pogostost mikrobiološko neustreznih rezultatov vzorcev zraka, vpihovanega zraka in izvirske vode na polnilni liniji 2 med polnjenjem izvirske vode	62
Preglednica 24: Pogostost mikrobiološko neustreznih rezultatov vzorcev zraka, vpihovanega CO ₂ in pijače z dodanim CO ₂ na polnilni liniji 2	63

KAZALO SLIK

Slika 1: Plastenke v fazi izplakovanja v izplakovalniku plastenk (Gemmell in sod., 2002) ..	3
Slika 2: Shema polnilne igle za polnjenje plastenke z produktom (Vickers, 1998).....	4
Slika 3: Polnilni stroj s polnilnimi iglami (Vickers, 1998)	4
Slika 4: Zapiralne glave, ki so sestavni del zapiralca plastenk.....	5
Slika 5: Filter HEPA	13
Slika 6: Notranjost filtra HEPA.....	13
Slika 7: Tloris polnilne linije 1	19
Slika 8: Tloris septičnega prostora polnilne linije 1	21
Slika 9:Tloris aseptičnega prostora polnilne linije 1	23
Slika 10: Tloris polnilne linije 2	25
Slika 11: Tloris linije OBP	27
Slika 12: Vzorčna mesta v septičnem delu polnilne linije 1	30
Slika 13: Vzorčenje površine vhodnega tekočega traku v aseptičnem prostoru (vzorčno mesto 1)	31
Slika 14: Vzorčna mesta v aseptičnem delu polnilne linije 1	32
Slika 15: Vzorčenje površine vertikalnega tekočega traku po katerem pokrovčki v aseptičnem prostoru potujejo do zapiralca plastenk (vzorčno mesto 3).....	33
Slika 16: Vzorčenje notranje površine ene izmed polnilnih igel v aseptičnem prostoru (vzorčno mesto 10)	33
Slika 17: Vzorčenje površine tal pri vhodu v aseptični prostor (vzorčno mesto 12).....	34
Slika 18: Vzorčna mesta v prostoru polnilne linije 2	36
Slika 19: Vzorčno mesto deaerirane vode v prostoru polnilne linije OBP.....	37
Slika 20: Plesni rodu <i>Cladosporium</i> na gojišču OA2x.....	57
Slika 21:Plesni rodu <i>Cladosporium</i> (povečava: 600x).....	57

Slika 22: Umetno kontaminirana pijača z plesnimi rodu <i>Cladosporium</i> (desno), in kontrolni vzorec (levo)	57
Slika 23: Kvasovke vrste <i>Candida guilliermondii</i> na OA 2x	58
Slika 24: Kvasovke vrste <i>Candida guilliermondii</i> (povečava: 600x).....	58
Slika 25: Umetno kontaminirana pijača z kvasovkami vrste <i>Candida guilliermondii</i> (desno), in kontrolni vzorec (levo)	58
Slika 26: Pogostost plesni, kvasovk in bakterij izoliranih iz vzorcev površin, zraka in končnih izdelkov kot vzrokov za neustrezne rezultate na polnilni liniji 1	60
Slika 27: Pogostost plesni, kvasovk in bakterij izoliranih iz surovine deaerirana voda.....	61
Slika 28: Pogostost bakterij izoliranih iz zraka, vpihanega zraka in izvirske vode.....	62
Slika 29: Pogostost plesni, kvasovk in bakterij izoliranih iz zraka, vpihovanega CO ₂ in v pijači z dodanim CO ₂	63

SEZNAM OKRAJŠAV

a_w: termodinamska aktivnost vode

BRIX: sladkorna stopnja

CFU:število mikroorganizmov na kolonijsko enoto

CIP: čiščenje v zaprtem krogotoku

CO₂: ogljikov dioksid

HACCP: analiza tveganja kritičnih kontrolnih točk

OBP: linija za pripravo brezalkoholnih pijač

Ib.INCH: enota zapiralnega momenta pokrovčka na plastenki

Miteco: linija za pripravo brezalkoholnih pijač

MO: mikroorganizmi

N: pogostost pojavljanja mikroorganizmov v neustreznih vzorcih

n: število neustreznih rezultatov

NA: gojišče hranljivi agar

NaCl: natrijev klorid

PA: gojišče *Pseudomonas aeruginosa* agar

PET: polietilen tereftalat

LT7: gojišče laktozni agar s tergitolom

OA1x: gojišče enkratni oranžni agar

OA2x: gojišče dvakratni oranžni agar

SB: gojišče Slanetz & Bartley medium

SIP: sterilizacija v zaprtem krogotoku

1 UVOD

Kakovost brezalkoholnih pijač je odvisna od mnogih dejavnikov, med katerimi so pomembni: ustreznost surovin, snažnost opreme in snažnost okolja, v katerem tehnološki proces poteka. Tako kot za vse živilske proizvode velja tudi za brezalkoholne pijače, da iz slabe surovine ni mogoče narediti dobrega izdelka. Povečana mikrobiološka kontaminacija enega izmed naštetih dejavnikov lahko pomeni na koncu tehnološkega procesa zdravstveno neustrezno živilo. Živila so po zakonu o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živilom (2000, 2002) zdravstveno ustrezna oziroma varna, če izpolnjujejo 11 zahtev, od katerih sta dve neposredno povezani z mikrobiološkimi preiskavami živil. Ti dve zahtevi sta:

- Živila ne smejo vsebovati mikroorganizmov ali parazitov oziroma njihovih razvojnih oblik ali izločkov, ki bi lahko škodljivo vplivale na zdravje ljudi;
- Sestava živil ali njihove organoleptične lastnosti (okus, vonj, videz) zaradi fizikalnih, kemičnih, mikrobioloških ali drugih procesov ne smejo biti tako spremenjene, da so namensko neuporabna.

Varnost živil pomeni zagotovilo, da živilo ni škodljivo za zdravje potrošnika, če je pripravljeno oziroma zaužito za predviden namen.

Za doseg tega cilja je potrebno dobro poznavanje njihovega izvora, biokemičnih lastnosti, predvsem pa njihove ekologije. Zmanjšanje kakovosti, hranilne vrednosti in organoleptičnih lastnosti so posledice delovanja tehnoloških kvarljivcev, ki s svojo biokemično aktivnostjo (proteolitičnim in lipolitičnim delovanjem, z razgradnjo ogljikovih hidratov, prevrevanjem sladkorjev, tvorbo kislin) lahko bistveno spremenijo sestavo živila in njihove organoleptične lastnosti. Zaradi izgube kakovosti in neobstoja končnih proizvodov, lahko proizvajalci utrpijo tako gospodarsko škodo, kot tudi izgubo ugleda, ki jo je težko popraviti.

1.1 CILJ NALOGE

V praktično delo smo vključili dve polnilni liniji za proizvodnjo brezalkoholnih pijač (aseptična in septična). Ugotoviti smo želeli povezavo med snažnostjo proizvodnega okolja (posamezen prostor in linija, embalaža, oprema, zrak v prostoru) in kakovostjo oz. mikrobiološko ustreznostjo končnih proizvodov. Kvantitativno smo hoteli določiti prisotnost mikroorganizmov v prostoru polnilnih linij, na embalaži, na opremi, v proizvodih in jih glede na pogostost pojavljanja identificirati.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predvidevamo, da povečano število mikroorganizmov v proizvodnem okolju (prostor polnilnih linij, embalaža, oprema, zrak) negativno vpliva na kakovost oz. mikrobiološko ustreznost končnih proizvodov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BREZALKOHOLNE PIJAČE

Brezalkoholne pijače so pijače, ki so narejene iz baze, rastlinskih ekstraktov, žit in aromatizirane osvežilne brezalkoholne pijače. Proizvajajo jih iz pitne vode, mineralne vode in so gazirane ali negazirane (Suwa Stanojević, 1999).

pH brezalkoholnih pijač je od 2,5 - 4,0. Okus in aromo jim lahko izboljšajo z različnimi dodatki, kot so sladkor, kisline, naravne in umetne arome, penasti in emulgirajoči preparati. Kljub visoki koncentraciji kisline, kar nakazuje tudi nizek pH v teh pijačah, lahko v njih rastejo kvasovke, plesni in acidofilne bakterije (DiGiacomo in Gallangher, 2001).

Surovine, ki jih uporabljajo v proizvodnji brezalkoholnih pijač, kot so sladkorni sirup, barvni koncentri, voda so le redko vir mikroorganizmov. Barvne komponente največkrat vsebujejo visoke koncentracije alkohola (glicerola) ali kislin (benzojska in sorbinska). Sirupi so prav tako redek vir mikroorganizmov, saj prav tako vsebujejo visoke koncentracije kislin (>1000 ppm). Surovine, ki se uporabljajo za proizvodnjo brezalkoholnih pijač, običajno niso sterilne. Končni proizvod je pred polnjenjem zato pasteriziran (Wershofen, 2003).

Najpogostejši vir okužbe z mikroorganizmi v proizvodnji brezalkoholnih pijač je okolje polnilne linije in oprema, kjer tehnološki postopek poteka (DiGiacomo in Gallangher, 2001).

2.2 PROIZVODNJA BREZALKOHOLNIH PIJAČ

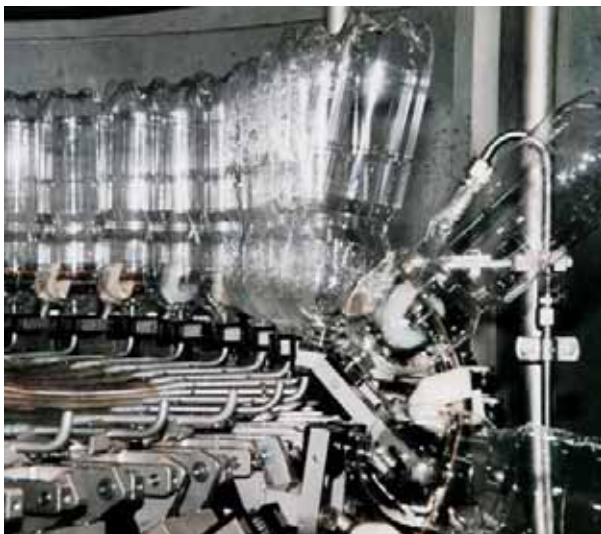
Tehnološki postopek proizvodnje brezalkoholnih pijač vključuje pripravo sestavin brezalkoholne pijače, mešanje sestavin, toplotno obdelavo oziroma konzerviranje pijače ter polnjenje v embalažne enote (Koren, 2002).

2.2.1 Tehnologija brezalkoholnih pijač

V tehnologiji brezalkoholnih pijač, kjer se v 40 % uporablja embalaža iz polietilen tereftalata (PET), predformo plastenke pihalni stroj najprej oblikuje z sterilnim zrakom v obliko plastenke (Sandeep in Simunovic, 2006).

V embalažo PET polnijo mineralno vodo, pivo in brezalkoholne pijače (sokovi, osvežilne pijače,...). Plastenke potujejo po tekočem traku do aseptičnega prostora, kjer vstopijo vanj. V aseptičnem prostoru se izvajajo trije procesi: izplakovanje plastenke, polnjenje in zapiranje. Sistem zagotavlja kapacitete polnjenja od 9.000 - 60.000 plastenke/uro, različnih prostornin od 0,25 L – 3,0 L. Plastenke po tekočem traku potujejo do izplakovalnika plastenke in se vanj vključijo po krožnem mehanizmu. Izplakovalnik je stroj okrogle oblike,

v katerem so razporejene šobe in držala. Ko plastenka pride do izplakovalnika, jo držalo prime za vrat, obrne in vključi v sistem izpiranja (slika 1).

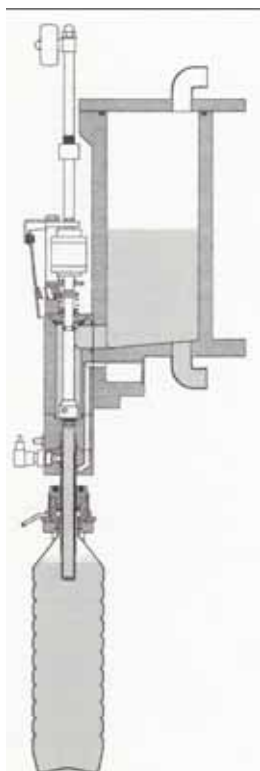


Slika 1: Plastenke v fazi izplakovanja v izplakovalniku plastenk (Gemmel in sod., 2002)

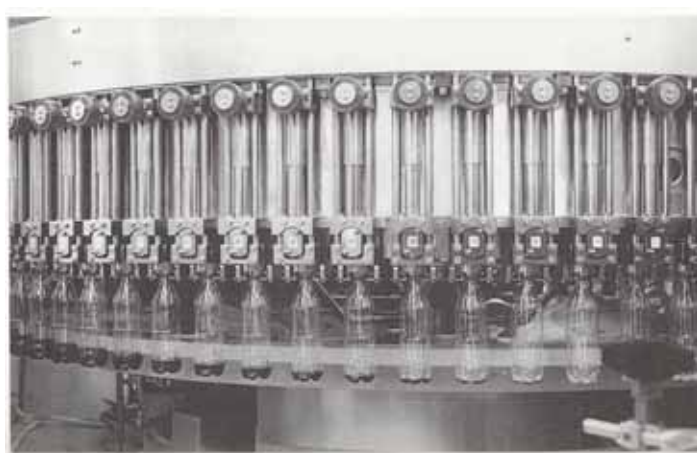
Izpiranje poteka skozi šobo z kislim razkužilnim sredstvom na osnovi peroksiocetne kisline, vodikovega peroksida in sterilne vode, s čimer je zagotovljeno razkuževanje plastenk. Razkuževanje v živilski industriji pomeni, da se zagotovi najmanjšo možnost kontaminacije s predvsem patogenimi mikroorganizmi in zmanjša možnost za razmnoževanje mikroorganizmov kvarljivcev. Obdelava notranjosti plastenke predstavlja glavnino obdelave in jo je moč doseči s škropljenjem ali spiranjem z izplakovalnikom plastenk. Takšno ravnanje ni nič manj pomembno, kajti okužba notranje vsebine se lahko razvije preko kontaminirane zunanje površine. Poleg tega obstaja mikrobiološko tveganje, če spore prehajajo v pijačo preko navoja oz. območja tesnjenja. Plastenke nato pot nadaljujejo po tekočem traku do polnilnega stroja. Polnilni stroj je prav tako v obliki kolesa, v katerem so razporejene polnilne igle in držala za plastenke (slika 3). Po krožnem mehanizmu se plastenke vključijo v polnilni stroj, kjer poteka polnjenje plastenk z pijačo kontinuirno pod pritiskom. Končni proizvod (pijača) se pred polnjenjem pasterizira v pasterizatorju (Wershofen, 2003).

Pasterizacija je postopek konzerviranja s toploto, pri katerem živila segrevamo do 100 °C. Cilj pasterizacije je uničiti vegetativne oblike bakterij, plesni in kvasovk; preprečiti delovanje encimov, ki bi povzročili nezaželene spremembe v živilih; ohraniti hranilno vrednost; ohraniti in izboljšati senzorične lastnosti živila (Suwa Stanojević, 1999).

Slika 2 prikazuje shemo polnilne igle, skozi kateri poteka polnjenje plastenke z produktom. Sistem je namenjen polnjenju tekočin, ki ne vsebujejo CO₂. Hitrost polnjenja je odvisna od premera igle in gibanja tekočine v posodi iz katere pijača priteka. Polnilne igle so sestavni del polnilnega stroja, ki se tekom procesa polnjenja vrti (rotira). Med polnjenjem plastenka in polnilna igla nista v kontaktu, zrak iz plastenke pa prehaja v atmosferski (zunanji) zrak in ne nazaj v polnilni stroj (Vickers, 1998).



Slika 2: Shema polnilne igle za polnjenje plastenke z produktom (Vickers, 1998)



Slika 3: Polnilni stroj s polnilnimi iglami (Vickers, 1998)

Polnjenju sledi zapiranje plastenk v zapiralnem stroju. Zapiralni stroj je sestavljen iz zapiranih glav (slika 4), ki privijejo pokrovček na grlo plastenke.



Slika 4: Zapiralne glave, ki so sestavni del zapiralca plastenk (Filling..., 2006)

Ko je plastenka napolnjena in hermetično zaprta, le-ta potuje po tekočem traku izven aseptičnega prostora na etiketirni stroj in nazadnje še v ovijalni stroj.

2.2.2 Zgodovina aseptičnega polnjenja

Sandeep in Simunovic (2006) navajata, da prvo aseptično polnjenje sega v leto 1913, ko je Nielsen iz Danske polnil mleko v kovinske posode. Leta 1917 je Dunley iz ZDA obdeal kovinske posode z paro in jih napolnil z steriliziranim produktom. Leta 1923 je aseptično pakirano mleko iz Južne Afrike doseglo sejem v Londonu, ne da bi se pokvarilo. Sistem HCF (segrevanje, ohlajanje, polnjenje) je osnovni proces aseptične proizvodnje in so ga razvili v podjetju Olin Ball v Ameriki leta 1927. Postopek Avoset je leta 1942 že vključeval vbrizg pare v produkt in uporabo vročega zraka za sterilizacijo kovinskih posod ali steklenic. Aseptični postopek Dole-Martin (1948) je vključeval sterilizacijo proizvoda, ki je potekala s pomočjo cevnega izmenjevalca toplote in kovinskega rezervoarja z uporabo suhe pare pri 232 °C, ohlajevanje in polnjenje v aseptičnih razmerah. Glavno prelomnico v zgodovini polnjenja v aseptičnih razmerah predstavlja uporaba vodikovega peroksida, za sterilizacijo embalažnih materialov leta 1981.

2.2.3 Aseptično polnjenje

Aseptično stanje je stanje, v katerem ni prisotnih mikroorganizmov in njihovih spor (Stevenson, 1992).

Aseptični sistem zagotavlja sterilno proizvodnjo produkta v zaprtem prostoru, aseptično polnjenje pa se nanaša na vsak del opreme, ki polni sterilni produkt v sterilno embalažo v aseptičnih razmerah. Zahteva, da je mogoče polnjenje pijač v malodane poljubnem vrstnem redu ni v skladu s higienskimi zahtevami. Že same izraze: aseptično, semi-aseptično, komercialno sterilno ali pitno sterilno si vsak proizvajalec razlaga po svoje. Kljub različnim pogledom je osnovni cilj vsakega proizvajalca mikrobiološko neoporečna polnitev, ki bi vse mikrobiološko občutljive pijače polnila v takih razmerah, da pijača v procesu polnitve ne bi prišla v stik z mikroorganizmi. S kratico AFH (ang. Aseptic Filling Hygiene) je opisana ena od rešitev problema higiene, ki zagotavlja polnitev brez mikroorganizmov. Pri uporabi primerne čistilnega sredstva in programa čiščenja igra pomembno vlogo tudi sestava pijač, ki jih bomo polnili (Wershofen, 2003).

Aseptični sistem vključuje črpanje, deaeracijo, segrevanje, hlajenje in pakiranje produkta v aseptičnih razmerah (Sandeep in Simunovic, 2006).

Pred začetkom procesa je potrebno zagotoviti, da je sistem ustrezno očiščen in steriliziran. Sanitacija v živilski industriji je postopek, s katerim se doseže, da so površine, oprema in prostori v takšnih higienskih razmerah, da preprečujejo kontaminacijo, ki bi lahko privedla do zdravstvene neustreznosti živil (Ponikvar in Jeršek, 2002).

Največkrat se za sterilizacijo opreme in celotnega procesa uporablja nasičena vodna para ali pa vroča voda, ki kroži po sistemu toliko časa, dokler ni doseženo sterilno stanje (Stevenson, 1992).

Črpanje produkta s konstantno hitrostjo je pomemben parameter, saj je le tako produkt po vsej prostornini enakomerno obdelan s toploto. Za črpanje se uporabljajo batne črpalke, ki zagotavljajo konstanten pretok, kljub padcu tlakov, do katerih pride lahko tekom procesa (Sandeep in Simunovic, 2006).

Z postopkom deaeracije odstranijo produktu odvečni zrak in pline s pomočjo vakuumске črpalke. Deaerator se nahaja neposredno pred grelcem. Segrevanje poteka v grelnem sistemu in je lahko direktno ali indirektno. Direktni način segrevanja vključuje direktni kontakt med grelnim medijem (paro) in produktom. Postopek lahko poteka z vbrizganjem ali dolivanjem vodne pare na proizvod. Dobre lastnosti tega načina so hitro segrevanje proizvoda in s tem povezane minimalne spremembe organoleptičnih lastnosti. Slabe lastnosti pa so povezane z uvajanjem pare v proizvod, s čimer se poveča volumen proizvoda. Pri indirektnem načinu segrevanja, kjer se uporabljajo ploščni, cevni in toplotni izmenjevalci z ravno površino, ni direktnega kontakta med grelnim medijem in proizvodom. Za katerega izmed naštetih načinov se bo proizvajalec odločil, je odvisno od reoloških lastnosti produkta (vsebnosti kislin, viskoznosti, agregatnega stanja, občutljivosti na visoke temperature), cene toplotnega izmenjevalca in možnosti čiščenja. Zadrževalna cev je pomemben člen aseptičnega sistema, v kateri je produkt izpostavljen segrevanju pri določeni temperaturi za določen čas, v tej cevi produkt doseže stanje sterilnosti. Produkt nato potuje v posebni rezervoar (ang. surge tanks), kjer se zadržuje pred pakiranjem. Prostornina rezervoarja je več tisoč litrov, problem lahko predstavlja kontaminacija zraka v rezervoarju, saj bi to pomenilo izgubo produkta. Zadnja faza aseptičnega sistema je pakiranje. Pakirni stroj omogoča aseptično polnjenje sterilnega produkta v sterilno embalažo in hermetično zaprto embalažo (Stevenson, 1992).

2.2.4 Čiščenje in razkuževanje v proizvodnji brezalkoholnih pijač

Sanitacija v živilstvu je pomemben parameter za zagotavljanje zdravstvene ustreznosti končnih proizvodov. Razkuževanje, ki je del sanitacije pomeni, uničenje mikroorganizmov, ne nujno njihovih spor in s tem njihovo zmanjšanje na število, ki ne predstavlja več tveganje za zdravje ljudi (Orth, 1998).

V tehnologiji brezalkoholnih pijač se za dosego omenjenega cilja uporablja postopek čiščenja zaprtega cevne sistema - CIP (ang. Cleaning in place). Sistem CIP predstavlja tehniko čiščenja cevi in opreme na mestu delovanja brez predhodnega razstavljanja v

posamezne elemente z učinkovitim prečrpavanjem čistil in razkužil ter začetnim in končnim izplakovanjem z vodo (Raspor, 2002).

Potek čiščenja s sistemom CIP in namen prikazuje preglednica 1.

Preglednica 1: Operacije in namen CIP sistema (Tomašič, 1996)

OPERACIJA	NAMEN
Predspiranje	Odstranitev velikih delcev nečistoč
Čiščenje z raztopino čistilnega sredstva	Odstranitev ostankov nečistoč
Spiranje	Odstranitev raztopine čistilnega sredstva
Razkuževanje	Uničenje mikroorganizmov
Končno spiranje	Odstranitev ostankov čistila in razkužila

Raztopine čistil in razkužil pripravljamo na nekem osrednjem mestu v zbirnih posodah. Iz zbiralnih posod jih črpamo, če je le mogoče po ceveh, ki so sicer namenjene za živila, do mesta, ki ga želimo čistiti, od tu pa v večini primerov spet v zbirne posode. Vsi večji votli deli takšnega zaključnega krožnega sistema so opremljeni z brizgalnimi glavami, ki morajo biti vgrajene tako, da zagotovijo dotok raztopin vse do površin, ki lahko pridejo v stik z živilom. Najprej je treba poudariti velik pomen učinkovitega uvodnega spiranja. Z uvodnim spiranjem s površin odstranimo vse nesprijete in lažje odstranljive delce, ki na ta način ne bremenijo čistilne raztopine. Tako so čistilni učinki boljši in poraba čistilnih sredstev manjša. Vodo po uvodnem spiranju zavržemo. Drugače je pri vmesnih spiranjih in pri zadnjem spiranju. Njihova naloga je odstranitev ostankov čistilnih in razkuževalnih raztopin. Smotno je na primer vodo po alkalnem čiščenju vračati v poseben zbirni rezervoar in jo pri naslednjem čiščenju uporabiti za uvodno spiranje (Kokol, 1979).

2.2.4.1 Osnovna čistila in razkužila primerna za sistem CIP postopek ter njihova vloga

Na učinek čistil in razkužil pri uporabi ustreznega sredstva vplivajo štirje dejavniki: koncentracija, temperatura, čas delovanja sredstva ter pri tem uporabljene mehanske sile. Te dejavnike je treba v praksi uskladiti glede na naravo nečistoče in drugih pogojev tako, da dosežemo optimalne učinke. Čim višja je koncentracija razkužila (v območju predpisanih koncentracij) tem boljše rezultate lahko dosegamo (Tomašič, 1996).

V veliki meri na učinek čiščenja vpliva temperatura. Kot orientacija naj služi podatek, da so tople raztopine (30 – 40 °C) 2- do 4-krat učinkovitejše kakor hladne. Odločilna ni začetna temperatura čistilne raztopine v zbirni posodi, ampak povprečna temperatura med kroženjem. Za temperaturo veljajo tudi nekatere razmejitve. Pri čiščenju zaprtih posod visoka temperatura ni priporočljiva, ker pri hladnem izpiranju lahko pride do nevarnega podtlaka (Kokol, 1979).

Najpogosteje uporabljena razkuževalna sredstva, ki se uporabljajo v proizvodnji brezalkoholnih pijač, so kombinacije peroksiocetne kisline in vodikovega peroksida, uporabljajo se tudi halogenirane karboksilne kisline (npr. monobromska očetna kislina) (Orth, 1998).

Osnova močno alkalnih čistil je navadno natrijev hidroksid (NaOH) v trdni ali tekoči obliki. Osnovna naloga močno alkalnih čistil je učinkovito odstranjevanje oprijetih organskih nečistoč, ki se jih z uvodnim spiranjem ne uspe odstraniti (Kokol, 1979).

Kisla sredstva primerna za postopek CIP so lahko na osnovi anorganskih kislin (predvsem dušikove ali fosforne) ali na osnovi organskih kislin. Njihova vloga je raztapljanje vseh anorganskih zaostankov, ki jih z alkalnimi sredstvi ni mogoče odstraniti. Praviloma alkalnemu čiščenju sledi kislo čiščenje, seveda po vmesnem spiranju. Pomembnost kislega čiščenja ne smemo podcenjevati, saj že majhni ostanki anorganskih oblog lahko zelo dobro ščitijo mikroorganizme, ki jih zato ni mogoče uničiti niti z močno alkalnimi sredstvi, niti s sicer zelo učinkoviti razkužili (Kokol, 1979).

2.3 PITNA VODA

Voda je najvažnejša spojina v naravi, brez katere ne bi bilo življenja na zemeljski obli. Je ena najvažnejših surovin v mnogih industrijah. Skrb za neoporečno vodo je zelo velika in obenem zahteva veliko sredstev ter znanja pri njenem polnjenju v različne oblike embalaže, kakor tudi pri oskrbi po vodovodnem omrežju. Izkoriščanje podzemnih voda mora biti v skladu s predpisano zakonodajo in odobreno od pristojnih oblasti (Kozic, 2002).

Živilo je vse, kar ljudje uporabljajo za prehranske namene v nepredelani, polpredelani ali predelani obliki, vključno s pitno vodo. Pitna voda je voda iz javnih sistemov za oskrbo s pitno vodo, voda za pakiranje ter predpakirana pitna voda, namenjena javni porabi (Zakon o zdravstveni ustreznosti živil..., 2000, 2002).

Pravilnik o pitni vodi (2004) določa, da je pitna voda: voda v njenem prvotnem stanju ali po pripravi, namenjena pitju, kuhanju, pripravi hrane ali za druge gospodinjske namene, ne glede na njeno poreklo in ne glede na to, ali se dobavlja iz vodovodnega omrežja sistema za oskrbo s pitno vodo, cistern ali kot predpakirana voda in vsa voda, ki se uporablja za proizvodnjo in promet živil.

2.3.1 Izvirna voda

Izvirna voda je po Pravilniku o naravni mineralni, izvirski vodi in namizni vodi (2004) in Pravilniku o spremembah in dopolnitvah Pravilnika o naravni mineralni vodi, izvirski vodi in namizni vodi (2005): voda, ki ima enako čistost kot na izvoru, ne vsebuje onesnaževalcev ter se polni na izviru. Embalaža, ki se uporablja za polnjenje izvirne vode, mora omogočiti takšno zapiranje, da preprečuje vsako možnost ponaredbe in kontaminacije. Izvirna voda, ki je v prometu ne sme vsebovati:

- parazitov in njihovih razvojnih oblik ter patogenih mikroorganizmov;
- bakterij vrste *Esheria coli*, drugih koliformnih bakterij, ter enterokokov ter bakterij vrste *Pseudomonas aeruginosa* v 250 ml vzorca;
- sporogenih sulfitreducirajočih anaerobnih bacilov v 50 ml vzorca.

V izvirski vodi, ki je v prometu, skupno število kolonij mikroorganizmov, sposobnih za razmnoževanje, ne sme presegati naslednjih vrednosti:

- 20 v 1 ml (pri temperaturi 37° C in 24-urni inkubaciji na hranljivem agarju);

- 100 v 1 ml (pri temperaturi 22° C in 72-urni inkubaciji na hranljivem agarju).

Skupno število kolonij mikroorganizmov, sposobnih za razmnoževanje, se mora ugotavljati najpozneje v 12 urah po polnjenju naravne mineralne vode, katera mora biti v tem času na temperaturi 4 ° C + / -1 °C.

Oprema za izkoriščanje izvira izvirske vode mora biti takšna, da se prepreči kakršnakoli možnost kontaminacije in da se ohranijo enake lastnosti, kot jih ima izvirna voda na izviru, zato:

- mora biti izvir izvirske vode ali njegov iztok zaščiten pred možnostjo kontaminacije;
- mora biti tehnična oprema (npr. zajetja, cevovodi, rezervoarji) izdelana iz materialov, primernih za pitno vodo, ter takšna, da se prepreči vsaka kemijska, fizikalno-kemijska in mikrobiološka sprememba vode;
- morajo pogoji izkoriščanja, še posebej prostor in naprave za pranje in polnjenje, ustrezati higienskim zahtevam, kar velja tudi za embalažo, ki mora biti obdelana ali izdelana tako, da ne vpliva na mikrobiološke in kemijske lastnosti izvirske vode (Pravilnik o naravni mineralni vodi, izvirski vodi in namizni vodi, 2004; Pravilnik o spremembah in dopolnitvah Pravilnika o naravni mineralni vodi, izvirski vodi in namizni vodi, 2005).

Vodozbirno območje mora biti ustrezno registrirano ter zavarovano z varnostnimi pasovi. Na vodozbirnem območju ter v njihovi bližini ne sme biti potencialnih onesnaževalcev. Preučene morajo biti geološke razmere na zajetju in napajalnem zaledju. Vodni vir mora biti mikrobiološko neoporečen, kakovost vode na izviru in v plastenki namenjeni potrošniku mora biti enaka ter konstantna (brez odstopanj v različnih časovnih obdobjih).

Priporočljivo je, da sta obrat (polnilnica) in oprema namenjena polnjenju vode, torej da v polnilni liniji poteka samo polnjenje vode. Ostanke sladkorjev, celic rastlin in arome, ki ostajajo v polnilnih linijah, kjer poteka polnjenje brezalkoholnih pijač (sokov,...), lahko vplivajo negativno iz organoleptičnega in mikrobiološkega vidika na vodo. Cevovodi med zajetjem in polnilnico, morajo biti iz primerne materiala in ne smejo dopuščati dotoka zraka. Vodo po cevovodu potiska gravitacija, kar onemogoča fizikalne spremembe vode zaradi negativnih pritiskov, ki jih povzročajo črpalke. Polnilne linije so običajno zasnovane tako, da se pred vstopom vode v polnilni stroj le-ta mehansko očisti. Filter iz aktivnega oglja poskrbi, da se odstranijo vsi trdni delci, ki bi po cevovodu lahko prišli do polnilne linije.

Zaradi možnih akutnih posledic, je obvladovanje mikroorganizmov v pitni vodi na prvem mestu po pomenu za zdravje. Mikrobiološki parametri nam pokažejo obseg in stopnjo fekalne ali druge onesnaženosti pitne vode z mikroorganizmi. V pitni vodi rutinsko določamo fekalne bakterije (*Escherichia coli*, enterokoki), ki imajo izvor v človeških in/ali živalskih iztrebkih in indikatorske bakterije (*Clostridium perfringens* s sporami, koliformne bakterije, število kolonij pri 22 °C in pri 37 °C), v embalirani pitni vodi pa še bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Rezultate ocenjujemo v povezavi z vrednostmi ostalih parametrov.

2.3.1.1 Koliformne bakterije in bakterije vrste *Escherichia coli*

Izvirna voda ne sme vsebovati bakterij vrste *Escherichia coli* in drugih koliformnih bakterij. Prisotnost bakterij vrste *E. coli* in drugih enterobakterij v živilu je lahko indikator za prisotnost črevesnih bakterij, medtem ko odsotnost enterobakterij še ne pomeni, da živilo ne vsebuje črevesnih patogenih bakterij. Bakterije vrste *E. coli* spadajo v družino Enterobacteriaceae. So gramnegativne, fakultativno anaerobne palčke. Glukozo in druge ogljikove hidrate običajno razgrajujejo do kisline in plina, dobro rastejo ob prisotnosti žolčnih soli. Optimalna temperatura za rast je 37 °C, nekateri patogeni sevi lahko rastejo tudi pod 7 °C in nad 45 °C. Običajno rastejo pri vrednosti pH med 4.4 in 9. Prisotne so v prebavnem traktu ljudi in toplokrvnih živali, pa tudi v zemlji, vodi in drugje. Prisotnost bakterij vrste *E. coli* nakazuje možnost, da je živilo kontaminirano s fekalijami. S tem kaže na možnost prisotnosti ostalih patogenih mikroorganizmov ter na nizek higienski nivo proizvodnje živil. Koliformne bakterije so aerobne in fakultativno anaerobne, po gramu negativne, nesporogene, paličaste bakterije, ki rastejo v prisotnosti žolčnih soli ali drugih ekvivalentnih selektivnih dodatkov, tvorijo kislino in plin iz laktoze pri inkubaciji na 35 °C ali 37 °C (Jeršek, 2005).

2.3.1.2 Enterokoki

Enterokoki so grampozitivne kroglaste bakterije v parih ali kratkih verižicah, ki so prisotne v črevesju oz. v blatu ljudi in živali. Upoštevamo jih kot zanesljive fekalne indikatorje. V vodi se ohranijo dlje časa kot bakterije vrste *E. coli*, zato njihovo prisotnost v pitni vodi ocenjujemo kot starejše fekalno onesnaženje. Po Pravilniku o pitni vodi (2004) so enterokoki uvrščeni v Prilogo I, del A, med mikrobiološke parametre. Mejna vrednost za enterokoke v pitni vodi je: 0/100 ml.

2.3.1.3 Sulfitreducirajoči klostridiji

Sulfitreducirajoči klostridiji so grampozitivne, sporogene, anaerobne palčke. Njihova prisotnost v zemlji in vodi, nakazuje na fekalno onesnaženje (Poček, 1990).

Celice sulfitreducirajočih klostridijev se pojavljajo posamezno, v parih ali kratkih verižicah. V vodi se najpogosteje pojavljajo bakterije vrste *Clostridium perfringens*, ki so v naravi zelo razširjene. Prisotne so v prsti, prahu, prebavnem traktu ljudi in živali in v vodi. So mezofilne bakterije, optimalna temperatura za rast je med 37 °C in 45 °C, minimalna okoli 20 °C in maksimalna okoli 50 °C. Rastejo v območju pH 5,0 in 8,5. Ob prisotnosti več kot 5% NaCl je rast inhibirana (Jeršek, 2005).

Spore prežive v vodi dolgo časa in so odporne na razkuževalna sredstva. Če jih najdemo skupaj z bakterijami vrste *E. coli* ocenjujemo to kot svežo kontaminacijo, če so sami ali z enterokoki brez bakterij vrst *E. coli*, je onesnaženje staro. V filtrirani vodi kažejo na napake v postopku filtracije. Iščemo jih v pitnih vodah, ki imajo stik s površinsko vodo. Po Pravilniku o pitni vodi (2004) so bakterije vrste *Clostridium perfringens* (vključno s sporami) uvrščene v Prilogo I, del C, med indikatorske parametre. Določena mejna vrednost za bakterije vrste *Clostridium perfringens* (vključno s sporami), v pitni vodi je: 0/100 ml.

2.3.1.4 Bakterije vrste *Pseudomonas aeruginosa*

Med mikrobiološke preiskave vode spada tudi določanje bakterij vrste *Pseudomonas aeruginosa*. Prisotnost omenjenih bakterij v vodi je tudi indikator fekalnega onesnaženja. Bakterije vrste *Pseudomonas aeruginosa* so gramnegativni, aerobni sporogeni bacili, ki lahko izkoriščajo molekularni kisik. Vsi so kemoorganotrofni, nekateri pa fakultativni hemolitotrofi, ki izkoriščajo vodik kot vir energije. Bakterije rastejo pri temperaturi 42 °C (Poček in sod., 1990).

Te bakterije so na splošno prisotne v okolju. V vlažnem okolju lahko tvorijo biofilme in so zelo odporne na dodana razkuževalna sredstva. Njihovo ugotavljanje je smiselno za ocenitev splošnega higienskega stanja vodovodnega sistema oz. možnosti preživetja in razmnoževanja bakterij. Rutinsko jih iščemo v vodi namenjeni za pakiranje. Po Pravilniku o pitni vodi (2004), so bakterije *Pseudomonas aeruginosa* uvrščene v Prilogo I, del A, med mikrobiološke parametre za vodo namenjeno za pakiranje. Mejna vrednost za *Pseudomonas aeruginosa* v vodi namenjeni za pakiranje je: 0/250 ml.

2.4 SPREMLJANJE HIGIENE ŽIVILSKO PREDELOVALNIH PROSTOROV

Preživetje in rast mikroorganizmov v živilsko predelovalnem okolju lahko pomeni tveganje za kontaminacijo in kvar živil. Viri mikroorganizmov v prostoru, kjer poteka tehnološki proces priprave in predelave živil so: surovine, aerosol, oprema v prostoru, osebje, odpadki, insekti in drugi kontaminanti. Z mikrobiološkimi preiskavami proizvodnih površin, opreme in zraka lahko določimo učinkovitost čiščenja in razkuževanja opreme, mikrobiološko ustreznost zraka, vire in pogostost pojavljanja mikroorganizmov in v povezavi z mikrobiološkimi preiskavami surovin, vmesnih in končnih izdelkov tudi možnosti za mikrobiološko neustreznost končnih proizvodov (Evancho in sod., 2001).

2.4.1 Mikrobiološka preiskava površin

Namen mikrobiološke preiskave vzorca iz proizvodnega okolja živil je čim hitreje ugotoviti mikrobiološko ustreznost in kakovost vzorca. Površine lahko vzorčimo z brisi, izpirki ali kontaktnimi ploščami. Za vzorčenje z brisi uporabljamo sterilne epruvete z določenim volumnom sterilne fiziološke raztopine (5 mL ali 10 mL). Na notranji strani pokrovčka epruvete je pritrjena palčka, ki je na koncu ovita z vato. Pri vzorčenju površin z brisom pobrišemo površino določene velikosti (20 cm²) tako, da bris med vzorčenjem obračamo in da smer brisanja površine vsaj dvakrat zamenjamo. Nato damo bris v epruveto s fiziološko raztopino in vsebino dobro premešamo. Vzorčenju sledi klasična mikrobiološka preiskava vzorca (Jeršek, 2003).

2.4.2 Mikrobiološka preiskava tekočih vzorcev

Membranska filtracija je metoda, ki se uporablja za mikrobiološke preiskave tekočih vzorcev kot so vode, sirupi, koncentracije in brezalkoholne in druge pijače. Bolj viskozne vzorce je potrebno pred analizo razredčiti (DiGiacomo in Gallagher, 2001).

Je način kvalitativnega in kvantitativnega določanja števila mikroorganizmov – kvasovk, bakterij in plesni v določeni količini vzorca. Mikrobne celice se pri filtraciji ujamejo v mrežo filtra, ki nato preprečuje preraščanje kolonij (Smole Možina, 2003).

Naprava za filtriranje je iz nerjavečega jekla, z gumijasto cevjo preko steklenice za odsesavanje in nato preko Woulffove steklenice povezana direktno na vakuumsko črpalko. Woulffova steklenica je potrebna zato, da preprečuje vstop tekočine iz steklenice za odsesavanje v električno vakuumsko črpalko. V spodnjem delu filtracijske enote je vstavljena sinter ploščica na katero položimo hidrofobni membranski filter (HGMF, angl. Hydrophonic grid membrane filter). Hidrofobni membranski filtri z graduirano mrežo so bili najprej razviti za povečanje števnega območja običajnih membranskih filtrov pri analizi vod, z uvedbo pred filtra, ki zadrži delce živila pa se je uporaba razširila tudi na druge vzorce živil. Lijak za filtracijo se s pomočjo mehanizma za pritrdjevanje pritrdi na spodnji del aparata. V ta lijak nalijemo določen volumen vzorca, ki ga želimo filtrirati in lijak pokrijemo. Sledi filtracija vzorca preko membranskega filtra, položitev filtra na trdno gojišče in inkubacija. Po končani inkubaciji kot rezultat mikrobiološke preiskave izrazimo število mikroorganizmov (CFU/ v določenem volumnu vzorca) v prefiltriranem vzorcu.

2.4.3 Mikrobiološka preiskava zraka

2.4.3.1 Aerosol v proizvodnji živil

Aerosol je mešanica plina (lahko zmesi plinov, kot je npr. zrak) in fino porazdeljenih trdnih ali kapljevinskih delcev s premerom od 0,01 μm do 10 μm . Aerosol s kapljevinskimi delci je megla, aerosol s trdnimi delci pa dim; tudi zrak, v katerem lebdi prah, je v tem smislu aerosol (Kemija, 2004).

Aerosol je eden od dejavnikov higiene prostorov v katerih poteka proizvodnja živil, zato mora biti v določenih razmerah pod nadzorom saj je lahko vir ali vektor prenosa patogenih mikroorganizmov, prašnih delcev, vodnih kapljic in delcev kože, ki lahko povzročijo kontaminacijo končnega proizvoda (Brown in sod., 2003).

Delci aerosola v premeru merijo od 0,3 μm do 100 μm , vendar se tisti delci, ki so večji od 5 μm posedajo na površine, manjši pa ostajajo suspendirani v zraku (Stetzenbach in sod., 2004).

Mikroorganizmi se v zraku lahko nahajajo v obliki spor (bakterije, plesni), lahko so suspendirani v vodnih kapljicah ali pa pritrjeni na prašne delce ali delce kože (Brown in sod., 2003).

2.4.3.2 Viri kontaminacije zraka

Mikroorganizmi in ostali kontaminanti lahko v okolje polnilne linije pridejo iz zunanjega okolja preko zračnikov ventilacijskih sistemov, preko embalaže, preko kontaminiranih površin, vir okužbe zraka pa je lahko tudi človek. Človek se v aseptičnem prostoru lahko nahaja le če ima na sebi sterilno obleko, pokrivalo z zaščitno masko, obutev in je ustrezno usposobljen za delo v takšnem prostoru. Kljub posebni opremljenosti, človek še vedno spada med najpogostejše vire kontaminacij ne samo zraka, pač pa tudi površin (Brown in sod., 2003).

Vdor zraka iz zunanjega okolja v aseptični prostor preprečuje nadtlak, ki je v zraku aseptičnega prostora. V takšnem prostoru veljajo tudi posebne klimatske razmere, ki lahko pripomorejo k zmanjšanju števila nekaterih mikroorganizmov. Na tvorbo aerosola vplivajo

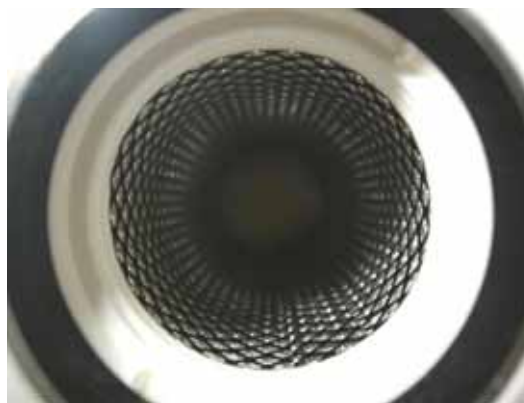
temperatura, relativna vlaga in pretok zraka, ki morajo biti v takšnih prostorih nenehno kontrolirani. Dvig temperature v zraku, lahko posledično pomeni večjo vsebnost vlage v zraku. V kolikor zrak pride v kontakt z ohlajeno površino lahko pride do kondenzacije, ki lahko povzroči rast mikroorganizmov ali pa korozijo materialov (Brown, 2005).

2.4.3.3 Filtracija zraka

Zrak je ob vstopu v aseptični prostor filtriran preko posebnih filtrov HEPA (ang. High Efficiency Particulate Air) (slika 5). Zračni filtri zadržujejo delce prahu in mikroorganizme na posebnih membranah, ki jih lahko vidimo na sliki 6, katerih velikost por je $0,3\ \mu\text{m}$, kar pomeni, da membrana zadrži delce, ki so $\geq 0,3\ \mu\text{m}$ (Brown, 2005).



Slika 5: Filter HEPA



Slika 6: Notranjost filtra HEPA

2.4.3.4 Mikrobiološka kontrola zraka

Vzorčenje zraka lahko izvedemo s sedimentacijsko metodo ali z različnimi vzorčevalniki zraka. Vzorčenju lahko sledi klasična mikrobiološka preiskava vzorca ali katera od alternativnih metod določanja mikroorganizmov (Stetzenbach in sod., 2004).

Pri sedimentacijski metodi vzorčenja zraka se odprte plošče z izbranim mikrobiološkim gojiščem za določen čas postavijo horizontalno v prostor. Po končani izpostavitvi sledi inkubacija in identifikacija mikroorganizmov v laboratoriju. Sedimentacijska metoda vključuje gravitacijsko silo in zračne tokove v okolju. Ker tok zraka ni nikoli konstanten, ima gravitacijska sila manjšo vlogo pri vzorčenju zraka. Sedimentacijska metoda vzorčenja ima več pomanjkljivosti: metoda ni volumetrična in daje le kvalitativne in ne tudi kvantitativnih rezultatov. Na rezultate vzorčenja imata pogosto vpliv hitrost zračnega toka oziroma tokov in turbulenca (Morris in sod., 2000).

Drug princip vzorčenja zraka je vzorčenje z vzorčevalnikom. Večina mikrobioloških vzorčevalnikov zraka deluje po načelu prestrezanja mikroorganizmov neposredno na plošče z gojiščem. V to skupino vzorčevalnikov sodijo vzorčevalniki Andersen Six – Stage sampler (Andersen Instrument Inc., Atlanta, Georgia), Cassella Slit Sampler (Casella Ltd, Bedford, England), Surface Air Systems (SAS) Sampler (Cherwell Laboratories, Bicester, Oxon). Nekateri vzorčevalniki za osamitev organizmov iz zraka uporabljajo elektrostatično percipitacijo. Primer takega vzorčevalnika je vzorčevalnik Litton – type (Sci-Med, Inc, Eden Prairie, Madison), ki se pogosto uporablja za vzorčenje zraka notranjih prostorov. Pri

vzorčenju zraka se lahko uporablja tudi metoda filtracije, kjer črpalke z velikim ali majhnim volumnom posesajo zrak skozi filtre in tako ujamejo organizme iz zraka na filter.

Vzorčevalniki, ki delujejo na principu lovljenja delcev iz zraka na gojišče ali druge površine, se pogosto uporabljajo pri vzorčenju zraka notranjih prostorov. Vzorčevalniki prečrpavajo zrak s pomočjo črpalk, ventilatorjev ali sesalcev, kar omogoča kalibracijo vzorčevalnika in prostorninsko določljivost volumna vzorca. Ločimo enostopenjske in večstopenjske vzorčevalnike. Pri enostopenjskih je tok zraka usmerjen neposredno proti površini plošče z agarjem. Zrak lahko vstopa v vzorčevalnik skozi ozko razpoko (npr. Casella Slit Sampler), ali pa skozi s številnimi luknjicami preluknjan pokrov vzorčevalnika (npr. vzorčevalnik SAS). Hitra in nenadna sprememba smeri zračnega toka, ki jo povzroči struktura vzorčevalnika, vodi do zajemanja delcev iz zraka na površino gojišča z učinkovitostjo, ki je odvisna od hitrosti zračnega toka in velikosti delcev. Večstopenjski vzorčevalniki omogočajo selektivno vzorčenje delcev velikosti 0,3 do 15 μm . Primer takšnega vzorčevalnika je vzorčevalnik Andersen Six – Stage, ki ima vstavljenih šest plošč z gojišči. Na vsako od njih se ujamejo delci različnih velikosti. Po končanem vzorčenju zraka se gojišča inkubira. Kolonije na gojiščih zrastejo neposredno iz za rast sposobnih mikrobnih celic. Ko pridejo celice mikroorganizmov preko vzorčevalnika z določeno hitrostjo do gojišča, nekatere niso več zmožne tvoriti kolonij. Zato se število kolonij, ki zrastejo na gojišču glede na statistično določen faktor, poveča in izrazi kot število mikroorganizmov (CFU) v določenem volumnu zraka. Zrasle kolonije lahko kvantificiramo in identificiramo. Pred začetkom meritev je potrebno določiti najustreznejši volumen s predposkusom. Če pa so volumni vzorčenja preveliki, lahko pride do konfluentne rasti mikroorganizmov, kar onemogoča določitev števila kolonij. Zato plošče postanejo neuporabne za nadaljnjo delo (Morris in sod., 2000).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Mikrobiološka gojišča

Tekom diplomskega dela smo uporabljali naslednje vrste mikrobioloških gojišč:

- gojišče hranljivi agar (NA, Nutrient agar, 1.05450.0500, Merck, Nemčija),
- gojišče laktozni agar s tergitolom 7 (LT7, Lactose agar with tergitol 7, 1.07680.0500, Merck, Nemčija),
- raztopina TTC 0,05 vol.%; (421510, Biolife, Italija)
- gojišče *Pseudomonas* agar (PA, PCM0559, Oxoid, Italija),
- dodatek *Pseudomonas* supplement (SR102E, Oxoid, Italija)
- gojišče Slanetz & Bartley (SB, CM0377, Oxoid, Italija),
- gojišče tehnični agar (agar technical, 411025, Biolife, Italija),
- gojišče oranžni agar (OA, 1.10673.05000, Merck, Nemčija),
- gojišče pivinski agar.

Gojišče laktozni agar s tergitolom 7

V 1000 mL sterilno erlenmajerico smo natehtali 27 g gojišča v prahu in ga raztopili v 500 mL 2x dest. H₂O. Sledil je postopek 20 minutne sterilizacije v avtoklavu pri 121 °C 20 minut. Ko se je gojišče ohladilo na 50 °C smo aseptično dolili 25 mL 0,05 % vodne raztopine TTC, premešali in gojišča aseptično razlili v sterilne petrijevke premera 70 mm.

Gojišče *Pseudomonas* agar

V 1000 mL sterilno erlenmajerico smo natehtali 24,2 g gojišča PA, dodali 500 mL 2xdest. H₂O in 5 mL glicerola. Po segrevanju v Kochovem loncu pri 100°C je sledila in 20 minutna sterilizacija pri 121 °C. V na 50 °C ohlajeno gojišče smo aseptično dolili vsebino dodatka, v katero smo predhodno dodali 2 mL mešanice 96 % etanola in sterilne dest. H₂O v razmerju 1:1. Gojišče smo aseptično razlili v sterilne petrijevke premera 70 mm.

Gojišče Slanetz & Bartley

V 1000 mL sterilno erlenmajerico smo natehtali 21,0 gojišča SB in ga raztopili v 500 mL 2 x dest. H₂O. Sledilo je raztapljanje gojišča v Kochovem loncu pri temperaturi 100 °C 60 minut. Še vročo vsebino smo premešali in aseptično razlili v petrijevke premera 70 mm.

Pivinski agar

Za 1000 mL gojišča smo zmešali 600 mL sladice 12 % piva in 300 mL pitne vode. V 1000 mL sterilno erlenmajerico smo natehtali 20 g tehničnega agarja in dolili 800 mL razredčene sladice. Sledila je 20 minutna sterilizacija gojišča v avtoklavu pri 121 °C in aseptično razlivanje v sterilne petrijevke premera 70 mm.

Oranžni agar 1-kratni in 2- kratni

V 1000 mL sterilno erlenmajerico smo natehtali dvojno količino gojišča OA, to je 84 g za OA2x in 42 g za OA1x, ter dolili 1000 mL 2 x dest. H₂O. Gojišče smo nato premešali, ga raztopili v Kochovem loncu pri 100 °C in prelili v 500 mL steklenice do polovice. Steklenice smo nato 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri 121°C.

Fiziološka raztopina

V 1000 mL sterilno erlenmajerico smo natehtali 8,5 g NaCl (1.06404.1000, Merck, Nemčija) in dolili 1000 mL dest. H₂O. Raztopino smo premešali in prelili v sterilne 500 mL steklenice. Steklenice smo nato 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C.

3.1.2 Raztopine in kemikalije

Uporabili smo naslednje raztopine in kemikalije:

- etanol (96%, 1.00971.6025 Merck, Nemčija)
- metilensko modrilo (Merck, Nemčija)
- glicerol 5 mL

3.1.3 Surovine

Vzorčili in mikrobiološko preiskali smo deaerirano vodo, ki jo uporabljajo za pripravo brezalkoholnih pijač. Vzorčno mesto omenjene surovine je bilo na liniji OBP, kjer poteka tudi priprava gotovih brezalkoholnih pijač z mešanjem surovin v mešalnih baterijah.

3.1.4 Končni proizvodi

Uporabili smo tudi končne proizvode, ki so zapisani v preglednici 2. V končne proizvode smo nacepili izbrane kolonije mikroorganizmov (plesni, kvasovk in bakterij), ki smo jih izolirali iz brisov s katerimi smo vzorčili površine z brisi in iz zraka v prostorih polnilnih linij 1 in OBP.

Preglednica 2: Končni proizvodi v katerih smo določali rast izoliranih mikroorganizmov

Pijača A	osvežilna pijača z dodanim CO ₂ , izdelana iz rastlinskih izvlečkov z izvirnim ameriškim okusom
Pijača B	nizkoenergijska brezalkoholna pijača z mešanim sadnim sokom z okusom limone, brez dodanega CO ₂
Pijače C, D in G	brezalkoholne pijače iz rastlinskih izvlečkov, brez dodanega CO ₂
Pijača E	nizkoenergijska brezalkoholna pijača z jabolčnim sokom obogatena z magnezijem in vitamini, brez dodanega CO ₂
Pijača F	nizkoenergijska brezalkoholna pijača z breskovim sokom in aloe vero brez dodanega CO ₂
Pijača H	nizkoenergijska brezalkoholna pijača s sadnim sokom iz citrusov obogatena z vitamini
Pijača I	multivitaminska negazirana brezalkoholna pijača z mešanim sadnim sokom

3.1.5 Laboratorijska oprema in aparature

Aparature:

- avtoklav (Persues Pbi International, Italija) za toplotno sterilizacijo steklovine in gojišč,
- analitska tehnica (Sartorius AG CP2202 S, Nemčija),
- inkubatorji (Persues Pbi international, Italija),
- Kochov lonec,
- vzorčevalnik zraka (MAS-100, Merck, Nemčija),

- termoblok (Kambič, Slovenija),
- plinski gorilnik (Bochem Laborbedarf, Nemčija),
- svetlobni mikroskop (Eclipse 50i Nikon, Japonska),
- digitalni fotoaparati (Coolpix 4500 Nikon, Japonska),
- aparat za membransko filtracijo (Sartorius, Nemčija),
- podajalnik filter papirjev (Sartorius, Nemčija)

Steklovina:

- petrijeve plošče 70 mm, 90 mm (Golias, Slovenija),
- erlenmajerice 500 mL – 1000 mL,
- objektna in krovna stekelca,
- steklenice 330 – 500 mL

Druga oprema

- sterilne plastične epruvete z brisi (Golias-SLO),
- sterilni robčki (Ecolab Henkel-Nemčija),
- termometri (Hg, TLOS, Hrvaška),
- membranski filtri 0,45µm (Sartorius, Nemčija),
- membranski filtri-črni 0,45µm (Schleicher&Schuell, Nemčija)

3.2 METODE DELA

Mikrobiološke preiskave posameznega vzorca (bris, živilo, zrak) so vključevale naslednje stopnje: vzorčenje in transport vzorca v mikrobiološki laboratorij, priprava vzorca za mikrobiološko preiskavo, izvedba ustrezne mikrobiološke metode, in odčitavanje in vrednotenje rezultatov.

Pri mikrobioloških preiskavah vzorcev smo uporabljali klasične mikrobiološke gojitvene metode. Preiskave so bile kvalitativne – to so metode, pri katerih smo ugotavljali prisotnost oziroma odsotnost določenih mikroorganizmov v določeni količini vzorca, in kvantitativne.

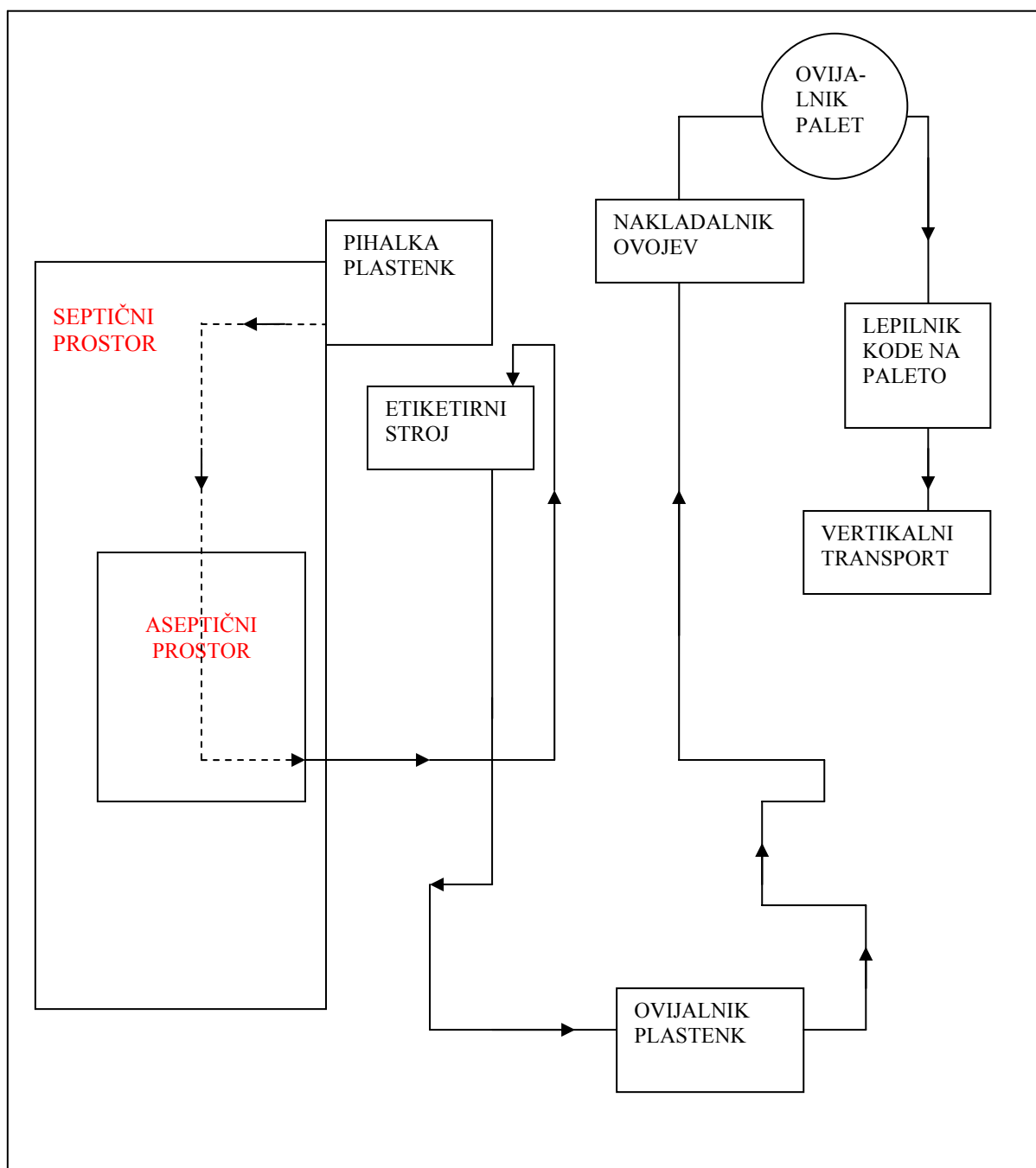
3.2.1 Opis tehnoloških prostorov vzorčenja

Vzorčili smo v prostorih dveh polnilnih linij in liniji za pripravo brezalkoholnih pijač (OBP); polnilna linija 1, na kateri aseptično polnijo osvežilne brezalkoholne pijače brez CO₂, polnilna linija 2, kjer polnijo izvirsko vodo in brezalkoholno pijačo z dodanim CO₂ in linija OBP za pripravo brezalkoholnih pijač.

3.2.1.1 Polnilna linija 1

Polnilna linija 1 se nahaja v treh ločenih prostorih (slika 7): aseptični prostor, septični prostor in prostor, kjer poteka vpihovanje, etiketiranje in pakiranje plastenk.

V aseptičnem prostoru potekajo operacije izpiranje plastenk z oksonijo, polnjenje plastenk z pijačo v polnilnem stroju in zapiranje plastenk v zapiralcu plastenk. V septičnem prostoru se nahaja transport plastenk od pihalke plastenk do aseptičnega prostora, pot produkta po ceveh preko pretočnega pasterizatorja, pufer tanka, hladilca pijače vse do aseptičnega prostora, kjer pijača vstopi v polnilni stroj. V tretjem prostoru poteka etiketiranje plastenk, ovijanje, zlaganje plastenk na palete in transport palet v skladišče.



Slika 7: Tloris polnilne linije 1

Legenda:

- > : transport plastenk v septičnem in aseptičnem prostoru
- > : transport hermetično zaprtih plastenk v prostoru 3

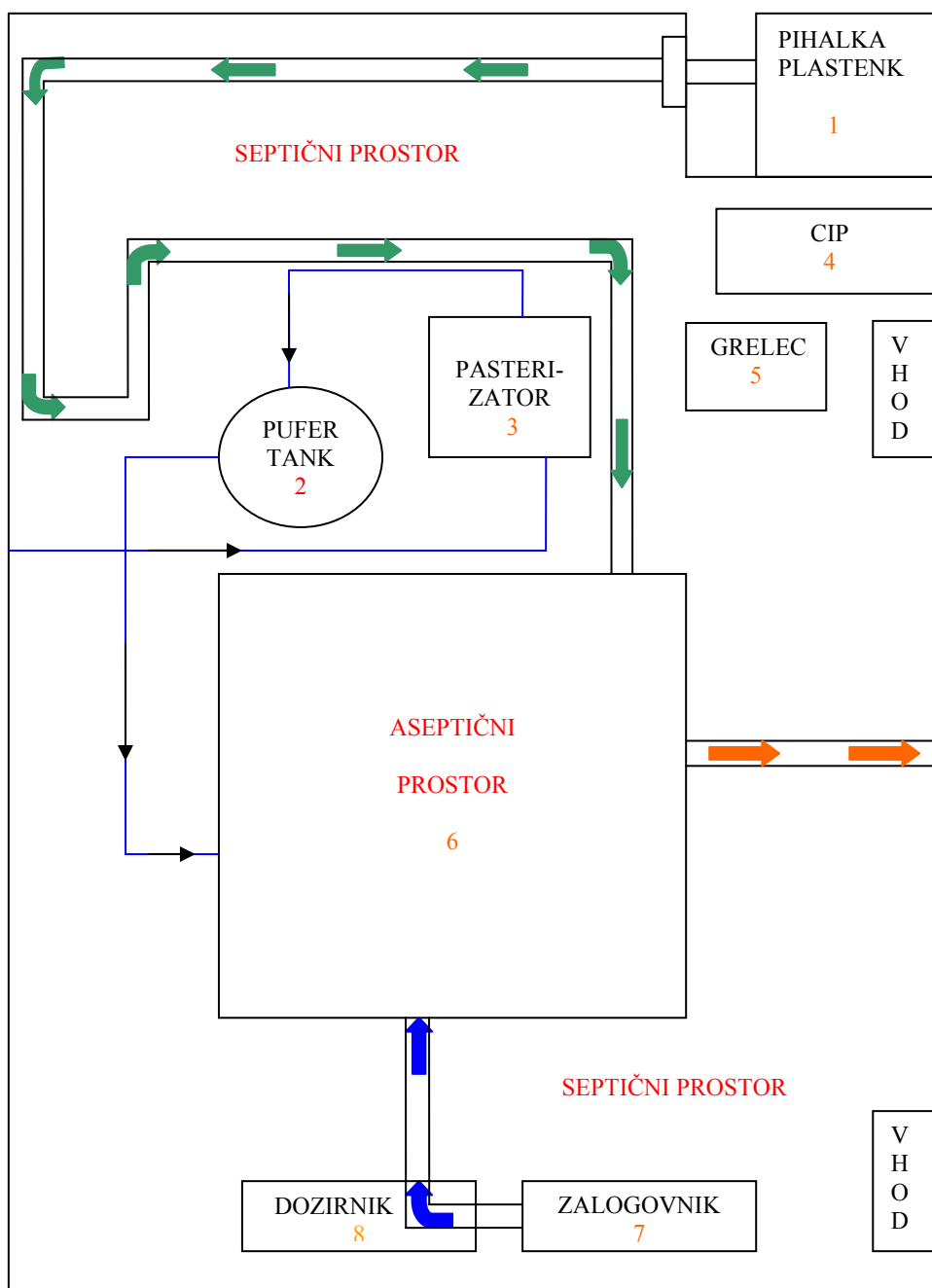
Na sliki 8 je shema tlorisa septičnega dela polnilne linije 1. Predforme plastenk se v pihalki plastenk pri temperaturi 100 - 120 °C oblikujejo v platenko volumna 0,5 L ali 1,5 L. Plastenske s zračnim transportom potujejo v zaprtem traku do aseptičnega prostora.

Pijača po cevovodih priteče iz linije OBP na polnilno linijo 1 in preko pasterizatorja in pufer tanka potuje do polnilnega stroja. V pretočnem pasterizatorju (št. 3, slika 8) poteka pasterizacija pijače pri 95 °C, 20-30 sekund. Pijača potuje najprej v predgrelec, nato v pasterizacijsko cono in na koncu skozi hladilec, kjer se pijača ohladi na temperaturo 10 – 15 °C. Po eni strani poteka segrevanje pijače, po drugi strani pa ohlajevanje pijače. Pasteriziran produkt nato potuje do pufer tanka (št. 2, slika 8), kjer se pijača zadržuje pred vstopom v polnilni stroj, ki pa se nahaja že v aseptičnem prostoru.

V septičnem prostoru se nahajata tudi zalogovnik (št. 7, slika 8) in dozirnik pokrovčkov (št. 8, slika 8), ki sta med seboj povezana. Pokrovčki prispejo v obrat v zapakirani vreči, ki se nahaja v kartonski embalaži. Zaposleni nato pokrovčke stresejo iz vreče v zalogovnik, iz katerega s pomočjo dozirnika potujejo iz zalogovnika z horizontalnim in nato še z vertikalnim transportom do zapiralnega stroja, ki se nahaja v aseptičnem prostoru.

Sterilizacija cevovodov omenjenega prostora poteka s sistemoma CIP (ang. cleaning in place) in SIP (ang. sterilization in place). Vsakih 48 ur poteka čiščenje cevovodov s sistemom CIP, z lužino in kislino segreto na 80 °C in nato sterilizacija z vodo pri 120 °C. Postopek traja 6 – 8 ur in sicer od linije OPB iz katere pripravljen produkt potuje po ceveh, do polnilne linije 1 skozi pasterizator (št. 3, slika 8) in pufer tank vse do polnilnega stroja. Sistem SIP, ki traja 10 minut, je namenjen sterilizaciji zunanjih površin in opreme v aseptičnem prostoru. V tem primeru se z mešanico peroksiocetne kisline in sterilne vode, na koncu pa samo z sterilno vodo spirajo zunanje površine aseptičnega prostora: izplakovalnik plastenk, polnilni stroj in zapiralec plastenk. Postopek izvajajo vsaki 2 uri.

Snaznost tega septičnega dela polnilne linije 1 smo določali z vzorčenjem z brisi površin in filtracijo zraka na mestih, ki so zapisana v preglednici 3 in 4.



Slika 8: Tloris septičnega prostora polnilne linije 1

Legenda:

- ➡ : Potovanje plastenk z zračnim transportom od pihalke plastenk do aseptičnega prostora
- ➡ : Pot pokrovčkov od zalogovnika do zapiralca plastenk
- ➡ : Pot zaprtih plastenk napolnjenih z pijačo iz aseptičnega prostora na etiketiranje in ovijanja palet
- ➡ : Pot produkta

V aseptičnem prostoru, katerega shema je prikazana na sliki 9 potekajo tekom tehnološkega procesa tri operacije: izplakovanje plastenkov v izplakovalniku (št.1, slika 9), polnjenje pijače v plastenke v polnilnem stroju (št. 2, slika 9) in zapiranje plastenkov v zapiralnem stroju (št. 3, slika 9).

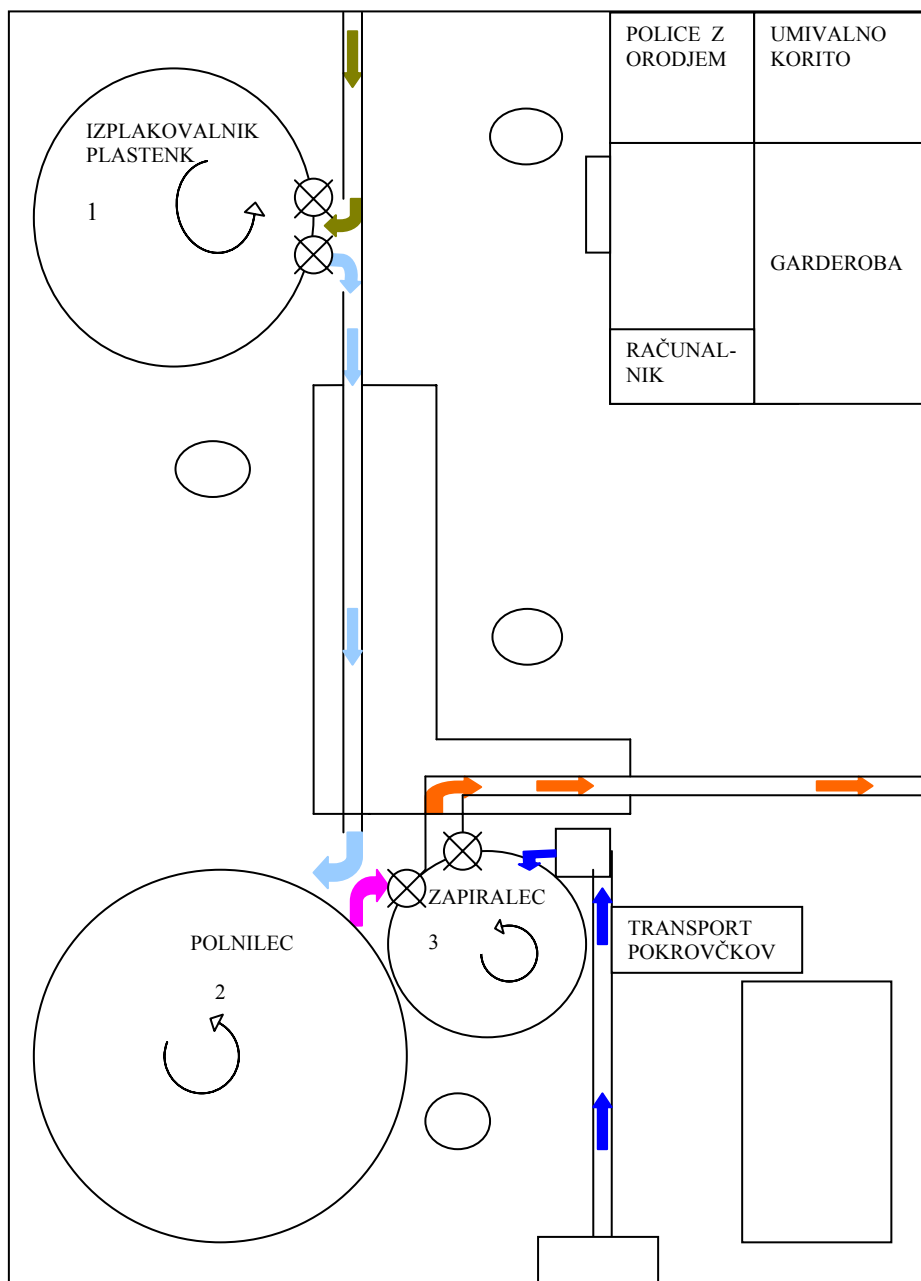
Plastenke po tekočem traku potujejo do izplakovalnika plastenkov. Dvostopenjski izplakovalnik je sestavljen iz 80 izplakovalnih igel skozi katere poteka spiranje notranjih površin plastenkov. V prvem delu izplakovalnika skozi izplakovalne igle v plastenke vbrizgajo oksonijo. Oksonija je kislno razkuževalno sredstvo na osnovi peroksiocetne kisline in vodikovega peroksida. Je učinkovito razkuževalno sredstvo proti vsem vrstam mikroorganizmov v industriji brezalkoholnih pijač. V drugem delu izplakovalnika poteka še spiranje notranjih površin plastenke z sterilno vodo. Plastenke se tako razkužijo in nadaljujejo pot po tekočem traku do polnilnega stroja. Polnilni stroj je sestavljen iz 96 polnilnih igel skozi katere v plastenko priteče pijača. Pijača do polnilca priteče po zaprtem cevnem transportu iz linije OBP, kjer poteka priprava pijače in skozi septični prostor, kjer poteka pasterizacija pijače.

Z pijačo napolnjene plastenke nato nadaljujejo pot po tekočem traku do zapiralca plastenkov, kjer s pomočjo 12 zapiralnih glav poteka privijanje pokrovčkov na vratove plastenkov. Zapiralni moment posamezne glave nastavi na vrednost, pri kateri se izmerjene vrednosti momentov na določeni glavi nahajajo med 15 in 18 lb.inch. Vrtilna frekvenca zapiralnih glav se nastavi v območju od 9 do 12 (delitev na variatorju motorja) glede na velikost izmerjenih vrednosti momentov na plastenkah. Vrtilno frekvenco znižajo, ko so vrednosti zapiralnih momentov visoke in obratno (npr. če so frekvence polnilnega stroja 3000 - 3500 plastenkov/uro, so vrtilne frekvence zapiralnih glav – nastavitev variatorja 9,5). Pokrovčki do zapiralca plastenkov potujejo z vertikalnim transportom iz zalogovnika, ki je del septičnega prostora. Med transportom pokrovčkov do zapiralca plastenkov poteka tudi brizganje peroksiocetne kisline po pokrovčkih, ki se tako razkužijo preden vstopijo v zapiralec plastenkov.

Izplakovalnik plastenkov, polnilec in zapiralec se tekom tehnološkega procesa vrtijo v obratni smeri urinega kazalca kot lahko vidimo tudi na sliki 9.

Hermetično zaprte plastenke iz zapiralca plastenkov nadaljujejo pot po tekočem traku iz aseptičnega prostora v prostor, kjer poteka etiketiranje in na koncu ovijanje palet.

Snaznost aseptičnega prostora se izvaja v okviru notranje kontrole podjetja z vzorčenjem površin z brisi in vzorčenjem zraka s filtracijo. Notranja kontrola je vzpostavljena z veljavnimi predpisi na osnovah sistema HACCP, ki omogoča prepoznavanje in obvladovanje, mikrobioloških, kemijskih in fizikalnih agensov, ki bi lahko predstavljali tveganje za zdravje potrošnika. V času diplomskega dela smo tudi sami vzorčili na enak način na točno določenih mestih polnilne linije 1. Mesta vzorčenja so prikazana v preglednici 5.



Slika 9: Tloris aseptičnega prostora polnilne linije 1

Legenda:

- ➡: Pot plastenk po tekočem traku v aseptičnem prostoru do izplakovalnika plastenk,
- ➡: Platenke po razkuževanju,
- ➡: Vstop plastenke napolnjene z produktom v zapiralec plastenk,
- ➡: Pot napolnjenih z produktom in hermetično zaprtih plastenk iz aseptičnega prostora na etiketiranje in ovijanje palet,
- ➡: Pot pokrovčkov od zalogovnika do zapiralca plastenk.

3.2.1.2 Polnilna linija 2

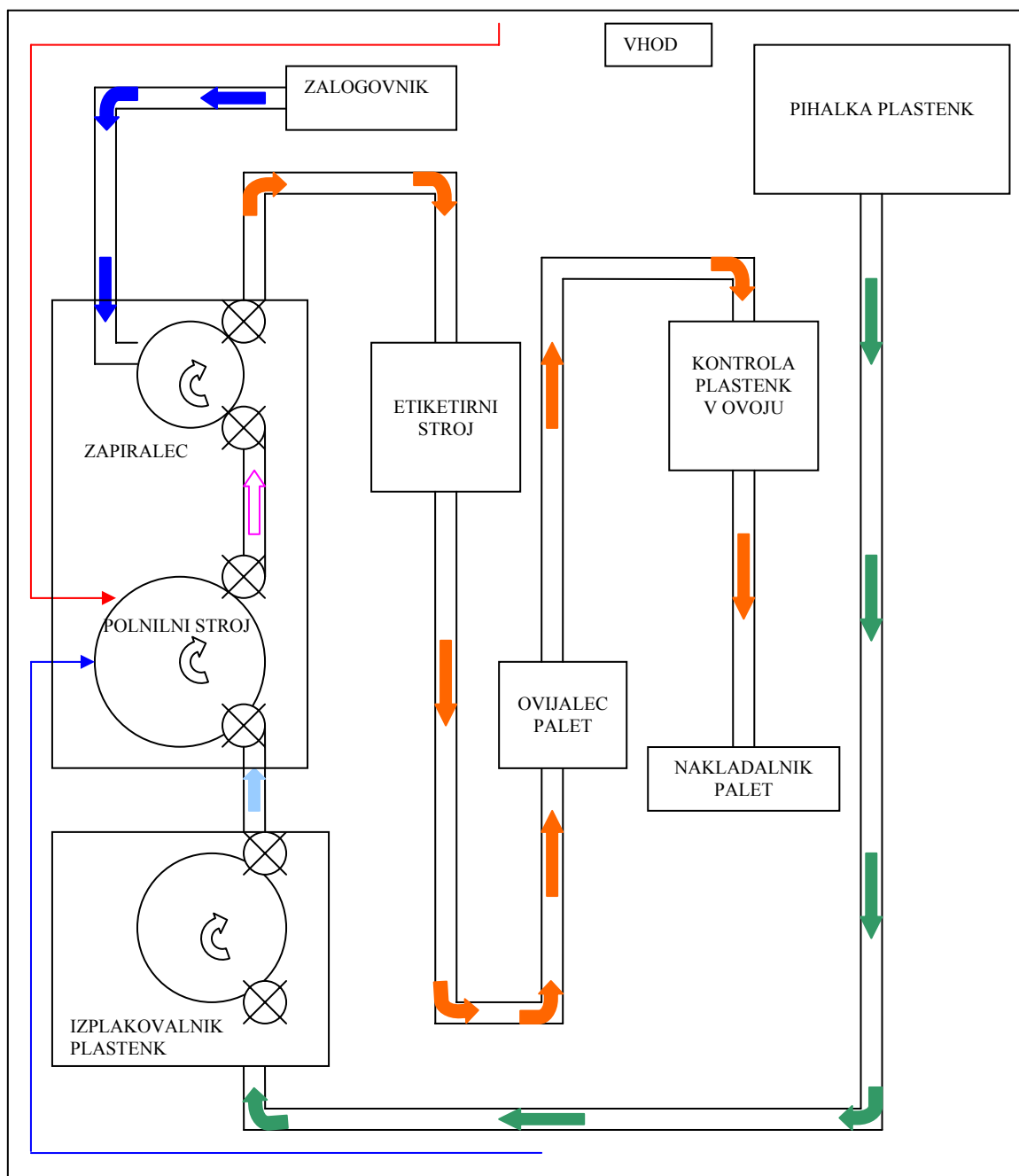
Za razliko od polnilne linije 1, se linija 2 nahaja v enem prostoru, kjer polnjenje izvirske vode in pijače z dodanim CO₂ ne poteka v aseptičnih razmerah.

Postopek polnjenja se na liniji 2 (slika 10) prične z vpihovanjem predforme plastenke v vpihovalnem stroju do željnega volumna plastenke (0,5 L ali 1,5 L). Plastenke tekom tehnološkega procesa potujejo z zračnim transportom do komore, kjer je izplakovalnik plastenk, v katerem se očistijo, bodisi razkužijo z peroksiocetno kislino, ko polnijo pijačo z dodanim CO₂ ali s sterilno vodo, ko polnijo izvirsko vodo.

Sledi postopek polnjenja plastenk z pijačo, ki v polnilni stroj priteče po ceveh iz linije Miteco, kjer pripravljajo pijačo. Kapaciteta polnjenja je 9000 plastenk/uro. Proizvodnja pijače z dodanim CO₂ poteka po ustreznem receptu na liniji za pripravo brezalkoholnih pijač 2 (Miteco), kjer proizvajajo sirup. Najprej pripravijo sladkorno raztopino, nato pa v mešalni bateriji v končnem razmerju zmešajo zahtevane sestavine (sladkorna raztopina, baza, voda, citronska kislina, konzervans, askorbinska kislina). Kadar polnijo izvirsko vodo, le-to črpajo iz lastnih vodnjakov preko pufer tanka in filtrirajo skozi dva membranska filtra. Predfilter ima filtrne sveče premera 1 µm, filter pa filtrne sveče premera 0,2 µm. Vode in pijače z dodanim CO₂ pred polnjenjem ne pasterizirajo.

Ko so plastenke napolnjene z pijačo potujejo na zapiralec plastenk, ki se nahaja v isti komori kot polnilni stroj. Zapiralec s pomočjo zapiralnih glav privije pokrovček na vrat plastenke, ki tako postane hermetično zaprta. Pokrovčki do zapiralnega stroja pridejo po tekočem traku iz zalogovnika pokrovčkov. Sledi postopek etiketiranja, označevanje roka uporabe, foliranje, lepljenje ročajev (na ovoje 6 x 1,5 L), nakladanje na paleto, ovijanje palete s folijo in na koncu transport v skladišče.

Snaznost omenjene polnilne linije kontrolirajo v podjetju v okviru notranje kontrole. V času diplomskega dela pa smo tudi sami vzorčili zrak s pomočjo vzorčevalnika zraka, Nemčija) in z sedimentacijsko metodo na točno določenih mestih polnilne linije, ki so prikazana v preglednici 6 in sliki 18.



Slika 10: Tloris polnilne linije 2

Legenda:

- ➡ : Pot plastenk po tekočem traku od pihalke plastenk do vstopa v izplakovalnik plastenk
- ➡ : Pot plastenk po razkuževanju
- ➡ : Pot plastenk napolnjenih s produktom v zapiralec plastenk
- ➡ : Pot napolnjenih in hermetično zaprtih plastenk po tekočem traku do etiketirnega stroja
- ➡ : Pot pokrovčkov od zalogovnika do zapiralca plastenk,
- ➡ : Pot produkta 1 (pijača z dodanim CO₂),
- ➡ : Pot produkta 2 (voda)

3.2.1.3 Linija za pripravo brezalkoholnih pijač (OBP)

V prostoru linije OBP poteka priprava surovin za brezalkoholne pijače brez vmesne faze proizvodnje sirupa. Najprej pripravijo sladkorno raztopino in nato na mešalnih baterijah zmešajo komponente v ustreznem razmerju, da dobijo gotovo pijačo. Gotovo pijačo nato polnijo na polnilni liniji 1 za aseptično polnjenje. Pijačo, ki jo polnijo v plastenke pred polnjenjem pasterizirajo v pretočenem pasterizatorju. Pijači, ki jo polnijo na liniji 2 ne pasterizirajo.

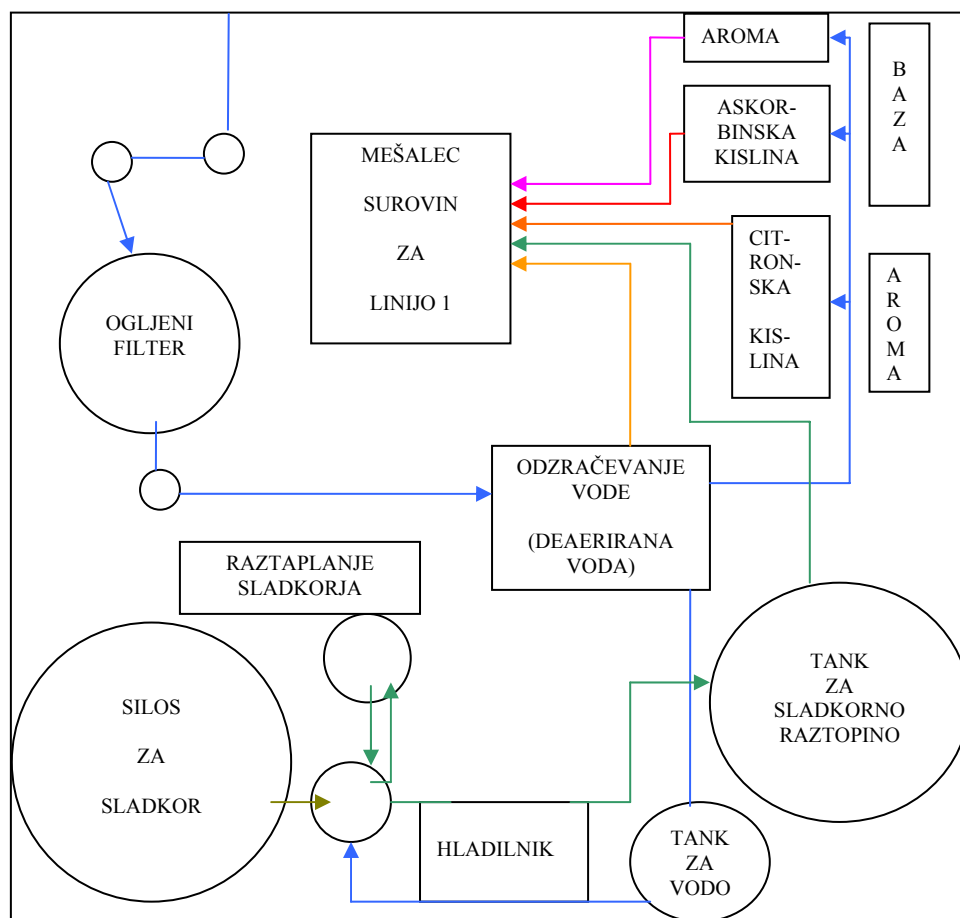
Na sliki 11 lahko vidimo postopek priprave in mešanja ustreznih surovin na liniji OBP. Osnovne surovine so voda, raztopina citronske kisline, raztopina sladkorja, raztopina L-askorbinske kisline in baza, lahko dodajajo tudi aromo, konzervansov ne uporabljajo. Voda mora mikrobiološko ustrezati zahtevam pravilnika za pitno vodo.

Vodo črpajo iz lastnih vodnjakov in se izteka v vodni stolp. Vodni stolp opravlja funkcijo rezervoarja in blaži nihanja v porabi vode. Pred prihodom v vodni stolp se voda razkuži z klordioksidom. Razkuženo vodo iz vodnega stolpa nato mehčajo s tehnologijo reverzne osmoze. Tako pripravljena voda teče iz vodnega stolpa preko ogljenega filtra na postopek deaeracije.

Načelo reverzne osmoze pojasnimo takole. Če sta dve raztopini različne koncentracije ali pa topilo in raztopine, ločeni s polprepustno membrano, opazimo prehod topila skozi membrano. Če je na obeh straneh enak pritisk, gre tok topila v taki smeri, da se razlika v koncentraciji zmanjšuje; govorimo o pojavu, ki je znan pod imenom osmoza. Pritisk, ki je potreben, da se vzpostavi statično ravnotežje imenujemo osmotski pritisk in je enak višku hidrostatskega pritiska na strani raztopine. Če pritisk na strani raztopine povečamo, se proces osmoze zavira in se pri pritisku, ki je enak osmotskemu, popolnoma ustavi. Pri še nadaljni povečavi pritiska se smer toka topila obrne in iz raztopine izteka čisto topilo. Reverzna osmoza je torej prisiljen proces, ki ga lahko sprožimo, če na strani raztopine deluje pritisk, ki je večji od osmotskega (Kržan, 1977).

Pred reverzno osmozo sledi postopek filtriranja preko ogljenega filtra, s pomočjo katerega iz vode odstranijo klordioksid. Voda nato potuje skozi filter z velikostjo por 5 μ m na katerem se ujamejo delci nečistoč in delci aktivnega oglja iz ogljenega filtra. Tako obdelana voda priteče na sistem reverzne osmoze, kjer poteka mehčanje vode. Na koncu dobijo vodo z točno določeno sestavo, prevodnostjo in trdoto. Tako obdelana voda se uporablja tudi za pripravo sterilne vode, ki jo uporabljajo v postopkih: CIP, SIP, spiranje plastenk in pokrovčkov. Pred dodajanjem vode v mešalec surovin vodo tudi odzračijo - deaeracija v odzračevalcu in tako dobijo vodo brez prisotnega zraka - deaerirano vodo.

Citronsko kislino uporabljajo v obliki monohidrata, raztopino L-askorbinske kisline pa pripravijo tako, da zahtevani količini L-askorbinske kisline postopno dodajajo toliko hladne vode, da ima končna raztopina 16,8 °Brix (sladkorna stopnja). Bazo pred uporabo tudi homogenizirajo, ki traja najmanj 15 minut. Ko zmešajo omenjene surovine, dobijo gotovo pijačo, ki potuje iz omenjene linije po cevnem transportu do linije 1 za aseptično polnjenje.



Slika 11: Tloris linije OBP

—> :	pitna voda
—> :	deaerirana voda
—> :	sladkorna raztopina
—> :	citronska kislina
—> :	askorbinska kislina
—> :	aroma

3.2.2 Vzorčenje

3.2.2.1 Vzorčenje površin v septičnem prostoru polnilne linije 1

Brise smo uporabljali za ugotavljanje higienskega stanja na polnilni liniji 1, tako v aseptičnem kot septičnem prostoru. Vzorčili smo delovno površino traku, tal, stene, polnilnih igel, opreme in embalaže, vzorčna mesta so zapisana v preglednici 3 in označena na sliki 12. Za vzorčenje smo uporabili sterilne plastične epruvete v katerih je bilo 5 mL sterilne fiziološke raztopine. Pri vzorčenju površin z brisom smo z brisom vzorčili površino 20 cm², tako da smo bris med vzorčenjem obračali in smer površine vsaj dvakrat zamenjali. Bris smo nato dali v epruveto s fiziološko raztopino in vsebino ročno premešali.

V okviru notranjega nadzora v aseptičnem prostoru polnilne linije 1 tudi 2-krat dnevno zaposleni vzorčijo z brisi na vzorčnih mestih: vhodni trak, polnilne igle in zapiralec

plastenk, vključno z zapiralnimi glavami. Na vzorčnih mestih z oznakami 1-3 smo z brisi. vzorčili površino znotraj (A) in zunaj (B) traku polnilne linije. Na vzorčnem mestu 4 smo vzorčili površino pleksi stekla, ki pokriva zalogovnik pokrovčkov. Tekoči trak, po katerem potujejo pokrovčki predstavlja vzorčno mesto 5.A, kjer smo vzorčili površino traku, med potovanjem pokrovčkov, torej med obratovanjem linije. Vzorčili smo tudi površino tal (vzorčno mesto 6), okoli odtočnega jaška, ki se nahaja ob zalogovniku pokrovčkov. Dozirnik pokrovčkov omogoča potovanje pokrovčkov iz zalogovnika po horizontalnem in vertikalnem traku v aseptični prostor. Pokrovčki se razporejajo drug za drugim, po traku s pomočjo majhnih koles, ki se vrtijo. Na vzorčnem mestu 7 smo vzorčili površino koles.

Preglednica 3: Vzorčna mesta površin v septičnem prostoru polnilne linije 1

OZNAKA VZORČNEGA MESTA	OPIS VZORČNEGA MESTA
1.A	Začetek transporta plastenk – znotraj traku
1.B	Začetek transporta plastenk – zunaj traku
2.A	Sredina transporta plastenk – znotraj traku
2.B	Sredina transporta plastenk – zunaj traku
3.A	Konec transporta plastenk – znotraj traku
3.B	Konec transporta plastenk – zunaj traku
4.	Pleksi steklo, ki pokriva komoro s pokrovčki- nad pleksi steklom- Zalogovnik pokrovčkov
5.A	Vertikalni transport pokrovčkov – površina traku
6.	Tla ob dozirniku pokrovčkov - površina tal
7.	Dozirnik pokrovčkov – kolesa dozirnika

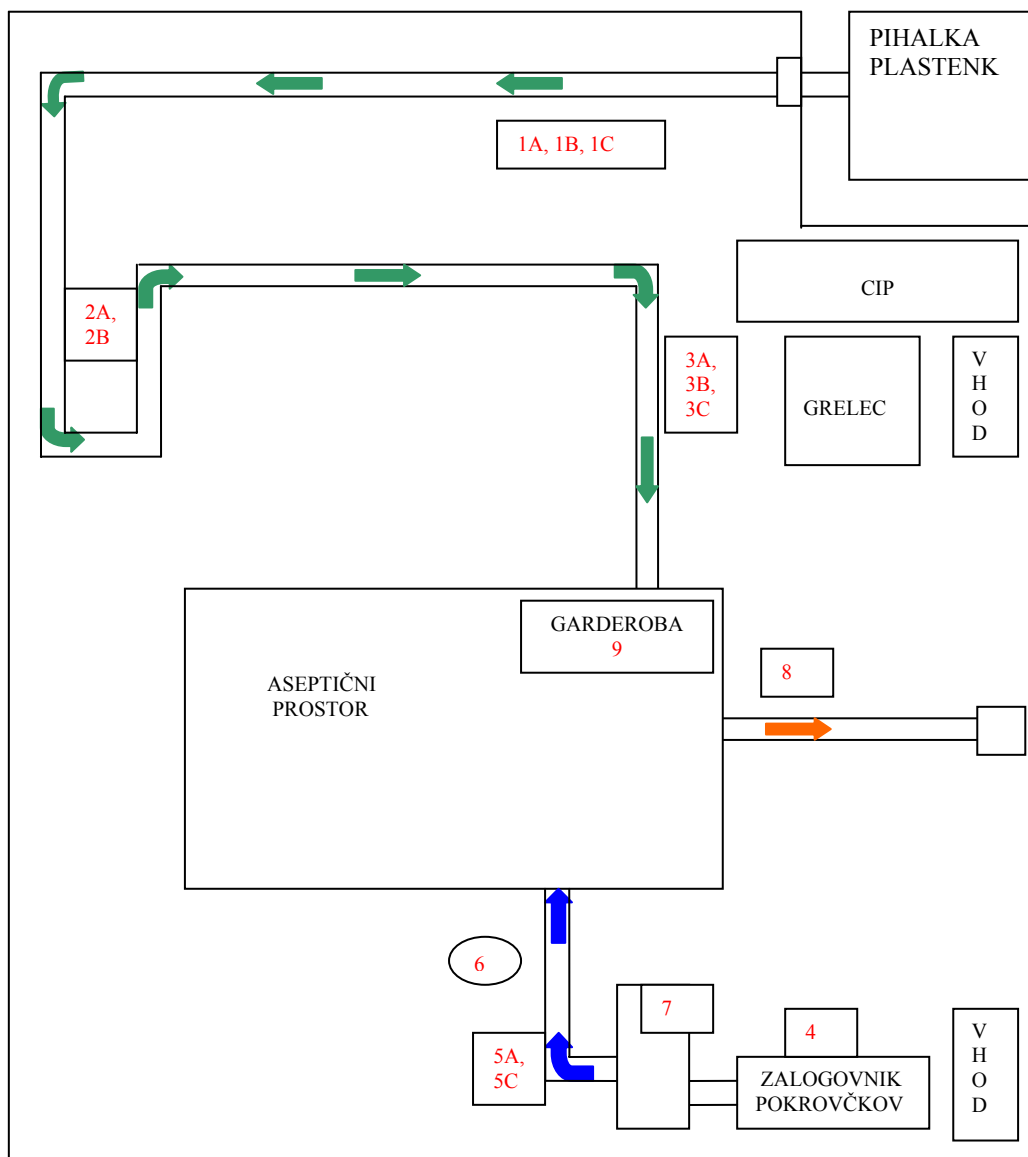
3.2.2.2 Vzorčenje zraka v septičnem prostoru polnilne linije 1

Od začetka julija 2005 do konca avgusta 2005 smo v presledkih približno enega tedna z vzorčevalnikom zraka vzorčili zrak v septičnem delu polnilne linije 1. Zrak, smo vzorčili na točno določenih mestih, ki so opisana v preglednici 4 in označena na sliki 12.

Preglednica 4: Vzorčna mesta zraka v septičnem prostoru polnilne linije 1

Oznaka vzorčnega mesta	Opis vzorčnega mesta
1.C	Zrak ob začetku transporta plasten
3.C	Zrak ob koncu transporta plasten
5.C	Zrak ob transportu pokrovčkov
8. Izhodni trak	Zrak ob tekočem traku
9.Garderoba	Zrak v prostoru za preoblačenje

Vzorčni mesti 1.C in 3.C se nahajata ob začetku oziroma ob koncu tekočega traku po katerem poteka transport praznih plasten. Na vzorčnem mestu 5.C smo vzorčili zrak ob traku po katerem pokrovčki potujejo v aseptični prostor. Vzorčno mesto 8 se nahaja ob izhodnem traku polnilne linije 1, vzorčno mesto 9 je prostor v katerem poteka preoblačenje v sterilno obleko, v kateri lahko vstopimo v aseptični prostor. Vzorčenje zraka na omenjenih vzorčnih mestih je potekalo med proizvodnjo. Z vzorčevalnikom zraka smo vzorčili 250 L volumen zraka v septičnem prostoru polnilne linije 1 in na liniji 2.



Slika 12: Vzorčna mesta v septičnem delu polnilne linije 1

Legenda:

-  : Pot plastenkov z zračnim transportom od pihalke plastenkov do aseptičnega prostora
-  : Pot pokrovcov od zalagovnika do zapiralca plastenkov
-  : Pot plastenkov napolnjenih s pijačo in zaprtih plastenkov iz aseptičnega prostora na etiketiranje

- 1A, 2A, 3A: vzorčna mesta površin zunaj transportnega traku
1B, 2B, 3B: vzorčna mesta površin znotraj transportnega traku
5A: vzorčno mesto površine vertikalni transport pokrovčkov
4: vzorčno mesto površine pleksi stekla zalogovnika
6: vzorčno mesto površine tal okoli odtočnega jaška pri dozirniku pokrovčkov
7: vzorčno mesto površine koles dozirnika pokrovčkov
1C, 3C, 5C: vzorčna mesta zraka ob transportnem traku
8: vzorčno mesto zraka ob izhodnem tekočem traku
9: vzorčno mesto zraka v prostoru za preoblačenje

3.2.2.3 Vzorčenje površin v aseptičnem prostoru polnilne linije 1

Vzorčna mesta v aseptičnem delu polnilne linije 1 so prikazana na sliki 14 in opisana v preglednici 5. Vzorčili smo vedno v času, ko ni potekalo polnjenje brezalkoholnih pijač, po čiščenju cevnih sistemov. Vzorčenje je potekalo enako kot v septičnem delu polnilne linije 1 (točka 3.2.2.1).

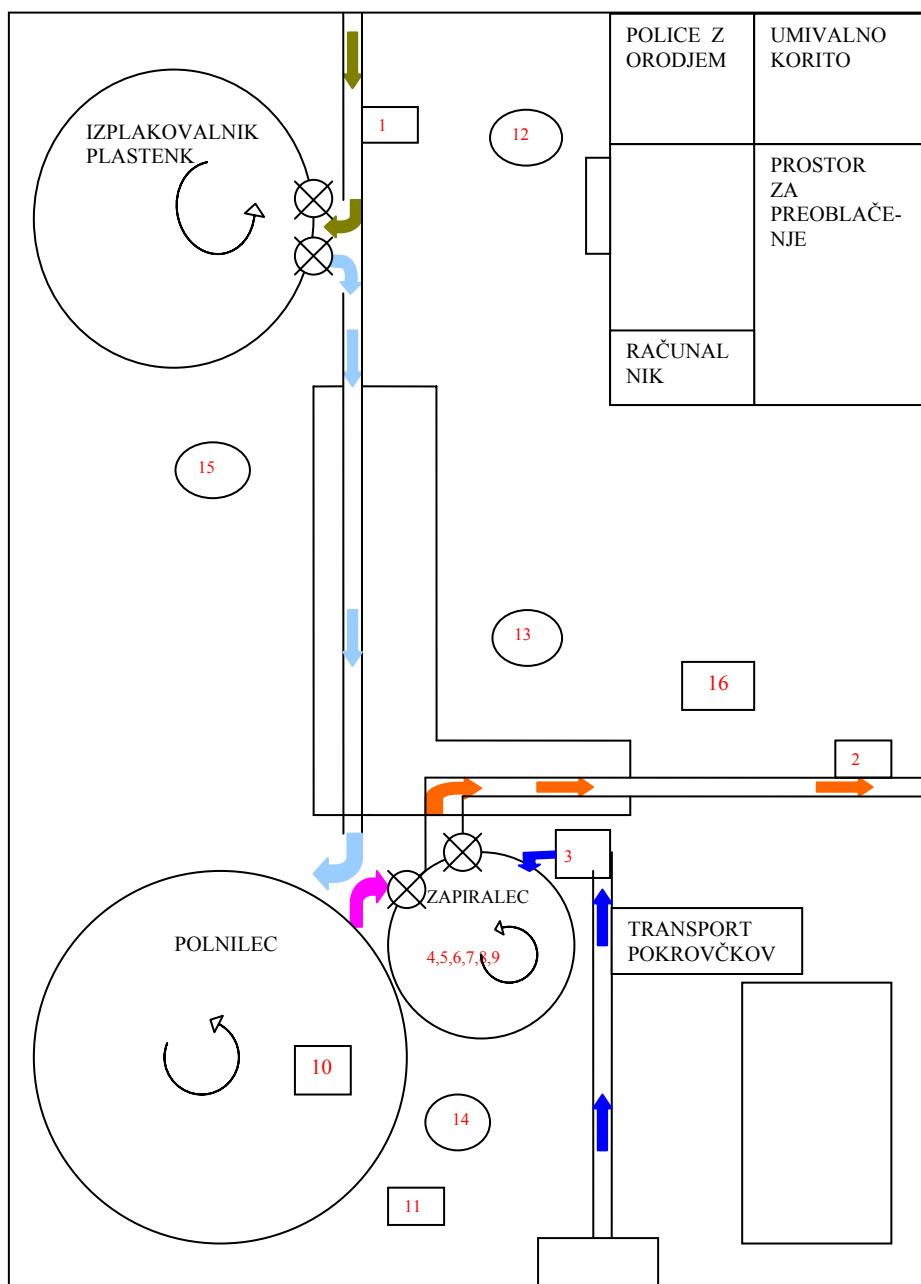
Preglednica 5: Vzorčna mesta površin v aseptičnem prostoru polnilne linije 1

Oznaka vzorčnega mesta	Opis vzorčnega mesta
1.	Vhodni tekoči trak
2.	Izhodni tekoči trak
3.	Transport pokrovčkov
4.	Zapiralec pokrov zgoraj
5.	Zapiralec pokrov spodaj
6.	Zapiralec pokrov – vodilna krivulja
7.	Zapiralec steber
8.	Zapiralec steber znotraj
9.	Dve zapiralni glavi
10.	Štiri polnilne igle
11.	Stena pri polnilcu
12.	Tla pri vhodu
13.	Tla pri zapiralcu
14.	Tla pri polnilcu
15.	Tla pri izplakovalniku plasten

Na vzorčnih mestih 1 in 2 smo vzorčili površino tekočega traku po katerem potujejo platenke tekom tehnološkega procesa (slika 13).



Slika 13: Vzorčenje površine vhodnega tekočega traku v aseptičnem prostoru (vzorčno mesto 1)



Slika 14: Vzorčna mesta v aseptičnem delu polnilne linije 1

Legenda:

- ➔ : Pot plastenk po tekočem traku v aseptičnem prostoru do izplakovalnika plastenk
- ➔ : Plastenske po razkuževanju
- ➔ : Vstop plastenke napolnjene z produktom v zapiralec plastenk
- ➔ : Pot polnih in hermetično zaprtih plastenk iz aseptičnega prostora na etiketiranje
- ➔ : Pot pokrovčkov od zalogovnika do zapiralca plastenk
- 1 – 15 : Vzorčna mesta površin v aseptičnem prostoru (preglednica 5)
- 16 : Vzorčno mesto za zrak

Na vzorčnem mestu 3 (slika 15) smo vzorčili površino tekočega traku po katerem potujejo pokrovčki do zapiralca plastenk.



Slika 15: Vzorčenje površine vertikalnega tekočega traku po katerem pokrovčki v aseptičnem prostoru potujejo do zapiralca plastenk (vzorčno mesto 3)

Zapiralec plastenk smo razdelili na 5 vzorčnih mest in sicer: vzorčni mesti 4 in 5 predstavljata ohišje zapiralca, vzorčno mesto 6 potovanje pokrovčkov v zapiralcu, vzorčni mesti 7 in 8 oporni sistem zapiralca, na vzorčnem mestu 9 pa smo z dvema brisoma vzorčili zunanjo in notranjo površino dveh zapiralnih glav, ki tekom tehnološkega procesa privijeta pokrovček na plastenko. Vzorčno mesto 10 predstavljajo štiri polnile igle, katerih zunanjo in notranjo površino smo vzorčili z štirimi brisi (slika 16).



Slika 16: Vzorčenje notranje površine ene izmed polnilnih igel v aseptičnem prostoru (vzorčno mesto 10)

Vzorčno mesto 11, je površina stene pri polnilnem stroju. Vzorčna mesta 12 do 15 so površine tal okoli odtočnih jaškov v aseptičnem prostoru pri vhodu (slika 17), v območju izplakovalnika, polnilca in zapiralca plastenk. Vzorčili smo v času, ko proizvodnja polnjenja brezalkoholnih pijač ni potekala, po CIP (ang. cleaning in place) sistemu.



Slika 17: Vzorčenje površine tal pri vhodu v aseptični prostor (vzorčno mesto 12)

3.2.2.4 Vzorčenje zraka v aseptičnem prostoru polnilne linije 1

V aseptičnem prostoru polnilne linije 1 tudi v okviru notranjega nadzora obrata vzorčijo zrak (vzorčno mesto 16, slika 14) dvakrat dnevno, z vzorčevalnikom zraka na trdno gojišče OA2x v petrijevki. V aseptičnem prostoru smo vzorčili z vzorčevalnikom zraka 1000 L volumen zraka na gojišče OA2x. Hitrost pretoka zraka je bila 100L/minuto.

3.2.2.5 Vzorčenje zraka v prostorih polnilne linije 2

Zrak v prostoru polnilne linije 2 smo vzorčili na gojišče OA1x (za kvasovke, plesni in acidotolerantne bakterije), ko so polnili pijačo z dodanim CO₂. Ko so polnili izvirske vodo smo vzorčili na gojišča PA (za bakterije vrste *Pseudomonas aeruginosa*), pivinski agar (za kvasovke, plesni in bakterije), SB (za enterokoke), LT7 (za koliformne bakterije in bakterije vrste *Escherichia coli*) in NA (za aerobne mezofilne bakterije).

Na vzorčnih mestih 1 in 2 (slika 18) smo v prostoru polnilne linije 2 z vzorčevalnikom vzorčili volumen 250 L zraka.

Na vzorčnem mestu 3 smo ploščo z gojiščem (PA, LT7, SB, NA in pivinski agar, ko so polnili vodo in OA1x, ko so polnili pijačo z dodanim CO₂) postavili za 30 sekund (čas, ki je določen v okviru notranje kontrole) pod ventil, ga odprli in vpihovali zrak na gojišče v petrijevki. Petrijevko smo držali oddaljeno od izhoda zraka, v razdalji 10 do 20 cm in jo

počasi obračali tako, da je bila cela površina gojišča izpostavljena toku zraka. Na vzorčnem mestu 4 smo petrijevke z trdnim gojiščem postavili pod polnilne igle in skozi njih vzorčili zrak (med polnjenjem izvirske vode), ali pa CO₂ (med polnjenjem pijače z dodanim CO₂) z vpihovanjem na ustrezna trdna gojišče, ki so zapisana v preglednici 6. Vzorčenje na omenjenih vzorčnih mestih je potekalo med tehnološkim postopkom, torej med proizvodnjo.

Preglednica 6: Vzorčna mesta zraka v prostoru polnilne linije 2

Oznaka vzorčnega mesta	Opis vzorčnega mesto	Način vzorčenja	Pijača	Gojišče
1.	Prostor okoli izplakovalnika plastenk	Filtracija 250 L zraka	Voda	PA, LT7, SB, NA
1.	Prostor okoli izplakovalnika plastenk	Filtracija 250 L zraka	Pijača z dodatkom CO ₂	OA1x
2.	Zapiralec plastenk	Filtracija 250 L zraka	Voda	PA, LT7, SB, NA
2.	Zapiralec plastenk	Filtracija 250 L zraka	Pijača z dodatkom CO ₂	OA1x
3.	Zračni filter	Vpihovanje zraka v gojišče	Voda	PA, LT7, SB, NA, pivinski agar
3.	Zračni filter	Vpihovanje CO ₂ v gojišče	Pijača z dodatkom CO ₂	OA1x
4.	Tri polnilne igle	Vpihovanje zraka v gojišče	Voda	PA, LT7, SB, NA, pivinski agar
4.	Tri polnilne igle	Vpihovanje CO ₂ v gojišče	Pijača z dodatkom CO ₂	OA1x

Legenda:

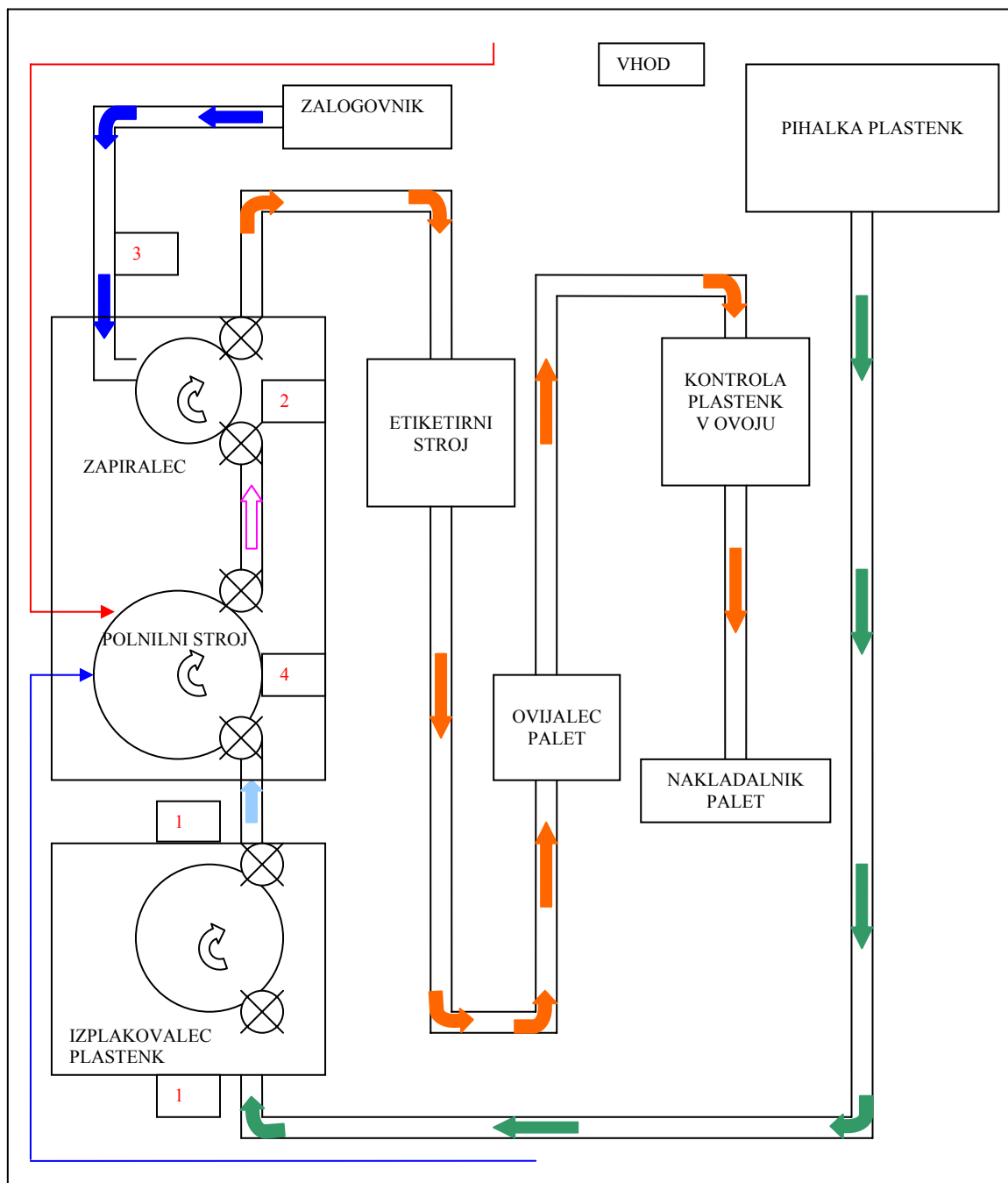
PA: gojišče *Pseudomonas* agar

LT7: gojišče Laktozni agar s tergitolom

NA: gojišče Hranljivi agar

SB: gojišče Slanetz & Bartley medium

OA1x: gojišče 1-kratni Oranžni agar



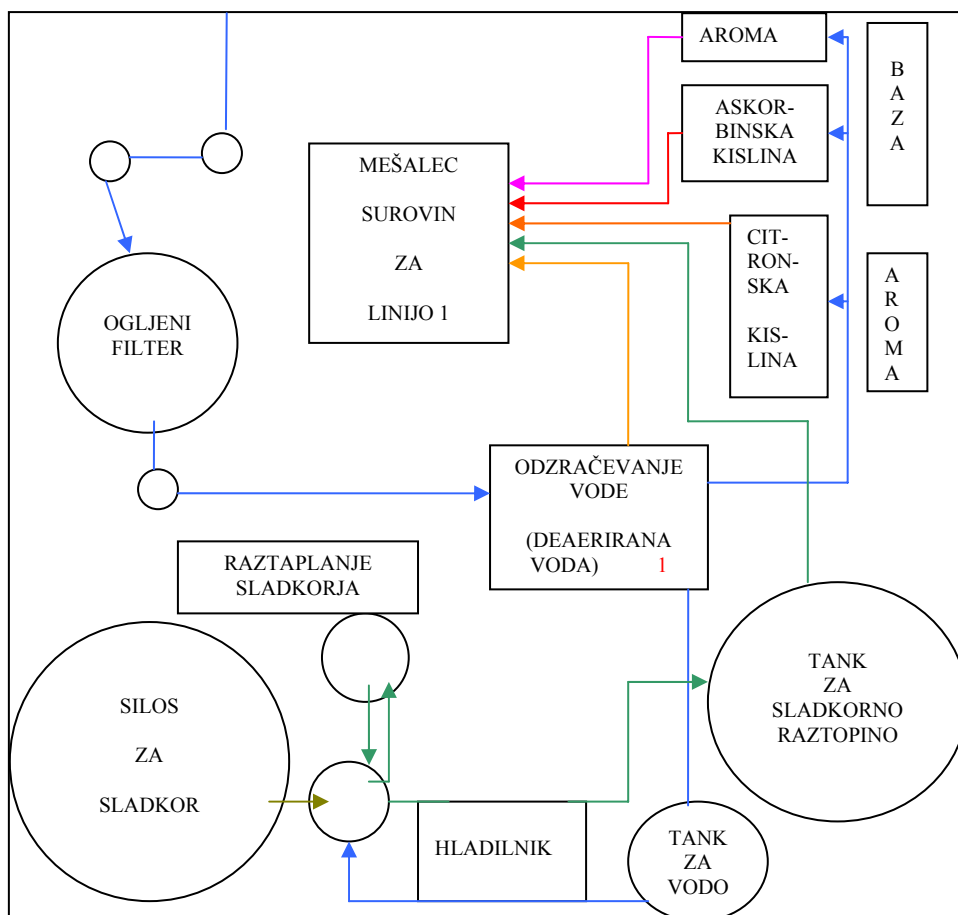
Slika 18: Vzorčna mesta v prostoru polnilne linije 2

Legenda:

- ➡ : Pot plastenk po tekočem traku od pihalke plastenk do vstopa v izplakovalnik plastenk
- ➡ : Pot plastenk po razkuževanju
- ➡ : Vstop plastenk napolnjene z produktom v zapiralec plastenk,
- ➡ : Pot polnih in hermetično zaprtih plastenk po tekočem traku do etiketirnega stroja
- ➡ : Pot pokrovcov od zalogovnika do zapiralca plastenk
- 1 – 4: Vzorčna mesta zraka (preglednica 6)
- : pot vode
- : pot pijače z dodanim CO₂

3.2.2.6 Vzorčenje deaerirane vode

Deaerirano vodo smo vzorčili na vzorčnem mestu 1 (slika 19), ki se nahaja na liniji za pripravo brezalkoholnih pijač OBP. Za sterilizacijo odvzemnih mest pred samim vzorčenjem, smo uporabljali plinski gorilnik. Odvzemno mesto je bila pipa, skozi katero je, če smo pipo odprli pritekel vzorec. Za vzorčenje smo uporabljali sterilne steklenice volumna 0,33 L. Vzorčenje smo opravljali enkrat dnevno.



Slika 19: Vzorčno mesto deaerirane vode v prostoru polnilne linije OBP

Legenda:

1. vzorčno mesto deaerirana voda

—▶	: pitna voda
—▶	: deaerirana voda
—▶	: sladkorna raztopina
—▶	: citronska kislina
—▶	: askorbinska kislina
—▶	: aroma

3.2.2.7 Vzorčenje končnih proizvodov

V okviru notranjega nadzora vzorčijo končne proizvode napolnjene v plastenke vsako uro iz tekočega traku polnilnih linij 1 in 2. Končne proizvode nato transportirajo do laboratorija, kjer poteka mikrobiološka preiskava končnih proizvodov.

3.2.3 Mikrobiološke preiskave

3.2.3.1 Mikrobiološka preiskava brisov

Po končanem vzorčenju površin z brisi v prostorih polnilne linije 1 smo vzorce transportirali do laboratorija. Vsebrisa smo v laboratoriju ročno premešali, aseptično zlili v sterilno petrijevko, dodali stopljeno in na 50 °C ohlajeno gojišče OA2x in inkubirali 48 ur pri temperaturi 30 °C. Gojišča smo dnevno pregledovali s pomočjo mikroskopa in šteli zrasle kolonije. Število mikroorganizmov smo izrazili kot število mikroorganizmov v 5 mL brisa (CFU / 5 mL).

3.2.3.2 Mikrobiološka preiskava zraka

Po končanem vzorčenju z vzorčevalnikom zraka na liniji 1 in 2 smo plošče z gojišči zaprli s pokrovom petrijevke in jih transportirali v laboratorij. Inkubacija plošč z gojiščem OA 1x in OA 2x je trajala 48 ur v termostatu pri temperaturi 30 °C. Inkubacija plošč z gojišči LT7, SB, NA, PA je trajala 48 ur v termostatu pri temperaturi 37 °C. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije in to število pretvorili v korigirano število kolonij z uporabo tabele za pretvorbo (angl., positive hole conversion table) (Morris in sod.. 2000).

Število mikroorganizmov smo izrazili kot koncentracijo mikroorganizmov na volumsko enoto zraka (CFU/m³), ki smo jo določili s pomočjo enačbe:

Število mikroorganizmov (CFU/m³) = število korigiranih kolonij na plošči x 1000 / volumen vzorčenega zraka (Morris in sod.. 2000).

Zrak in CO₂ smo preko polnilnih igel in zračnega filtra vpihovali na gojišča približno 30 sekund, kar smo ocenili glede na pretok, da ustreza volumnu 200 L zraka.

3.2.3.3 Mikrobiološka preiskava surovin in končnih proizvodov

Plastenko z vzorcem končnega proizvoda (pijača B, C, D, E, F, G in izvirska voda), steklenico z vzorcem surovine (deaerirana voda) smo dobro premešali. Vrat plastenke ali steklenice smo nato obžgali, prelili 500 mL (končni proizvod) oz. 330 mL (surovina) vzorca v sterilni lijak, in ga s pomočjo vakuumske črpalke prefiltrirali preko membranskega filtra z velikostjo por 0,45 µm. V primeru filtracije končnih proizvodov, ki jih polnijo na polnilni liniji 1, smo filter papir položili na sterilno gojišče OA 1x. V primeru filtracije izvirske vode, smo filtre položili na sterilna gojišča LT7, PS in SB. Plošče z gojiščem OA 1x smo inkubirali 48 ur pri 30 °C. Plošče z gojišči LT7, PS in SB smo inkubirali 48 ur pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo prešteli kolonije mikroorganizmov in jih izrazili kot število mikroorganizmov v prefiltriranem volumnu

vzorca, in sicer: CFU / 330 mL za deaerirano vodo, v primeru filtracije izvirske vode: CFU / 250 mL izvirske vode za koliformne bakterije, CFU / 250 mL izvirske vode za enterobakterije, CFU / 500 mL izvirske vode za bakterije vrste *Pseudomonas aeruginosa*. V primeru filtracije končnih proizvodov B, C, D, E, F, G smo izrazili število mikroorganizmov v CFU / 500 mL pijače. Plastenko z vzorcem končnega proizvoda (pijači H in I) nismo prefiltrirali, saj je gostota pijače večja kot pri ostalih omenjenih vzorcih, zato smo odpipetirali 5 ml vzorca v prazno petrijevko, prelili pijačo z gojiščem OA2x ohlajenim na 45 °C in inkubirali 3 dni pri temperaturi 35 °C. Po inkubaciji smo prešteli kolonije mikroorganizmov in jih izrazili kot število mikroorganizmov v CFU / 5 mL vzorca. Za določanje skupnega števila aerobnih mezofilnih bakterij v izvirski vodi, smo odpipetirali 1 mL vode v dve prazni petrijevki, prelili vodo z gojiščem NA ohlajenim na 45 °C in eno petrijevko inkubirali 24 ur pri 37 °C, drugo pa 72 ur pri 22 °C. Po inkubaciji smo prešteli kolonije mikroorganizmov in jih izrazili kot število v CFU / 1 mL vzorca.

3.2.4 Identifikacija mikroorganizmov

Tekom opravljanja diplomskega dela smo izbrane kolonije plesni, kvasovk in bakterij poslali na identifikacijo na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo medicinske fakultete v Ljubljani.

3.2.5 Rast izbranih mikroorganizmov v brezalkoholnih pijačah

Po zaključku preiskave določenega vzorca (bris, zrak, živilo), smo izbrane, identificirane kolonije kvasovk, plesni in bakterij z cepilno zanko aseptično nacepili v končne proizvode (pijače A-I). Pijače kontaminirane z mikroorganizmi smo v plastenkah postavili v prostor na temperaturo 30°C in vsak jih dan vizualno opazovali ter beležili vrsto in čas sprememb v pijačah.

4 REZULTATI

4.1 POLNILNA LINIJA 1

4.1.1 Koncentracije mikroorganizmov na površinah v septičnem prostoru polnilne linije 1

V času od 28.06.2005 do 21.09.2005 smo opravili 120 vzorčenj površin v septičnem delu polnilne linije 1. V okviru notranje kontrole so določene naslednje mejne koncentracije mikroorganizmov:

- za bakterije do 4 CFU / 5 mL,
- za kvasovke do 1 CFU / 5 mL
- in za plesni do 2 CFU / 5 mL pri tem, da je vzorčena površina 20 cm².

Rezultati, ki so enaki ali večji od mejnih koncentracij se označijo kot odstopanje od predpisane koncentracije in so v preglednici 7 označeni kot neustrezni rezultati.

Od 120 vzorcev 34 vzorcev (28 %) ni ustrezalo. Iz rezultatov v preglednici 7 vidimo, da so bili na vseh vzorčnih mestih, razen vzorčnega mesta 7. Dozirnik pokrovčkov, rezultati občasno neustrezni. Na vzorčnem mestu 1.A Začetek transporta plastenkov znotraj traku je bilo od skupno 12 vzorcev 33 % neustreznih (4 vzorci), in sicer na površini omenjenega vzorčnega mesta so bile prisotne kolonije plesni. Na vzorčnem mestu 2.A Sredina transporta plastenkov znotraj traku je bilo 8 % vzorcev neustreznih (od skupno 12 vzorcev, 1 vzorec neustrezen). Na vzorčnem mestu 2.B Sredina transporta plastenkov zunaj traku je bilo 17 % vzorcev neustreznih (od skupno 12 vzorcev 2 vzorca neustrezna) in sicer so bile prisotne kolonije plesni. Na vzorčnem mestu 3.A Konec transporta plastenkov znotraj traku je bilo 17 % vzorcev neustreznih (od skupno 12 vzorcev 2 vzorca neustrezna) in sicer so bile prisotne kolonije plesni in kvasovk hkrati. Na vzorčnem mestu 3.B Konec transporta plastenkov zunaj traku je bilo 42 % vzorcev neustreznih (od skupno 12 vzorcev 5 vzorcev neustreznih), prisotne so bile hkrati kolonije kvasovk in plesni. Na vzorčnem mestu 4. Zalogovnik pokrovčkov je bilo 33 % vzorcev neustreznih (4 vzorci) in sicer so bile v vseh primerih prisotne kolonije plesni.

Največ neustreznih rezultatov je bilo na vzorčnih mestih 1.B in 6. Na vzorčnem mestu 1.B Začetek transporta plastenkov zunaj je bilo od skupno 12 vzorcev 58 % neustreznih (7 vzorcev) in od teh sedmih vzorcev so bile enkrat prisotne kolonije bakterij in šestkrat kolonij plesni. Na vzorčnem mestu 6. Tla ob sortirniku pokrovčkov je bilo 67 % vzorcev neustreznih (8 vzorcev) in sicer trikrat so bile prisotne na površini vzorčnega mesta kolonije kvasovk in petkrat kolonije plesni.

Najmanj neustreznih rezultatov je bilo na vzorčnem mestu 5. Vertikalni transport pokrovčkov in sicer je bilo 8 % vzorcev neustreznih (1 vzorec).

Preglednica 7: Raznolikost in pogostost mikroorganizmov na površinah v septičnem delu polnilne linije 1

Vzorčno mesto	Število brisov	Neustrezni rezultati		Mikroorganizmi v neustreznih vzorcih							
		n	% ¹	B		K		P		K+P	
				N	% ²	N	% ²	N	% ²	N	% ²
1.A Začetek transporta plastenik - znotraj traku	12	4	33	0	0	0	0	4	100	0	0
1.B Začetek transporta plastenik - zunaj traku	12	7	58	1	14	0	0	6	86	0	0
2.A Sredina transporta plastenik - znotraj traku	12	1	8	0	0	0	0	1	100	0	0
2.B Sredina transporta plastenik - zunaj traku	12	2	17	0	0	0	0	2	100	0	0
3.A Konec transporta plastenik - znotraj	12	2	17	0	0	0	0	0	0	2	100
3.B Konec transporta plastenik - zunaj	12	5	42	0	0	0	0	0	0	5	100
4. Zalogovnik pokrovčkov	12	4	33	0	0	0	0	4	100	0	0
5. A Vertikalni transport pokrovčkov	12	1	8	0	0	0	0	1	100	0	0
6. Tla ob sortirniku pokrovčkov	12	8	67	0	0	3	38	5	62	0	0
7. Dozirnik pokrovčkov	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SKUPAJ	120	34	28	1	3	3	9	23	67	7	21

Legenda:

B: bakterije

K: kvasovke

P: plesni

n: število neustreznih vzorcev

N: pogostost pojavljanja mikroorganizmov v neustreznih vzorcih

%¹: odstotek neustreznih vzorcev izmed vseh vzorcev na določenem vzorčnem mestu

%²: odstotek neustreznih vzorcev glede na delež posameznih mikroorganizmov v posameznem vzorcu

4.1.2 Koncentracije mikroorganizmov v zraku v septičnem prostoru polnilne linije 1

Z vzorčevalnikom zraka smo vzorčili zrak septičnega delu polnilne linije 1 na vzorčnih mestih opisanih v preglednici 4, uporabljali smo gojišče oranžni agar (OA1x). Za zrak v septičnem delu polnilne linije 1 veljajo v okviru notranjega nadzora predpisane najvišje koncentracije mikroorganizmov:

- bakterije: 5 CFU / m³ zraka
- plesni: 2 CFU / m³ zraka
- kvasovke: 2 CFU / m³.

V Garderobi je predpisana koncentracija mikroorganizmov 0 CFU / m³.

V preglednici 8 so prikazane koncentracije mikroorganizmov v zraku septičnega prostora polnilne linije 1. Od skupno 60 vzorčenj zraka je bila koncentracija plesni presežena 17-krat, in 2 krat koncentracija kvasovk.

Preglednica 8: Koncentracije mikroorganizmov (CFU/m³) v septičnem prostoru linije 1

Datum vzorčenja	Koncentracije mikroorganizmov (CFU/m ³) na vzorčnih mestih				
	1.C Začetek transporta plastenk	3.C Konec transporta plastenk	5.C Transport pokrovčkov	8. Izhodni tekoči trak	9.Garderoba
28.06.05	4 (plesen)	0*	4 (plesen)	0*	0*
06.07.05	0*	0*	0*	0*	0*
12.07.05	0*	0*	0*	0*	0*
19.07.05	0*	12 (plesen)	0*	4 (plesen)	4 (plesen)
					24 (kvasovke)
27.07.05	0*	0*	0*	4 (plesen)	0*
03.08.05	0*	0*	4 (plesen)	0*	0*
10.08.05	4 (plesen)	0*	0*	0*	0*
18.08.05	0*	0*	4 (plesen)	0*	0*
24.08.05	0*	0*	4 (plesen)	16 (plesen)	8 (plesen)
08.09.05	0*	0*	0*	0*	4 (plesen)
14.09.05	0*	0*	4 (plesen)	0*	0*
21.09.05	4 (plesen)	4 (plesen)	0*	4 (plesen)	0*
		4 (kvasovke)			
SKUPAJ (neustrezno)	12 (3)	12 (3)	12 (5)	12 (4)	12 (4)

Legenda:

* CFU / 250 l

4.1.3 Koncentracije mikroorganizmov na površinah in v zraku v aseptičnem prostoru polnilne linije 1

V času od 01.06.2005 do 30.09.2005 smo v aseptičnem prostoru polnilne linije 1 opravili 797 vzorčenj površin z brisi in 108 vzorčenj zraka. Za aseptični prostor je predpisana koncentracija mikroorganizmov:

- površine 0 CFU / 5 mL
- in za zrak 0 CFU / m³.

Rezultati, ki ne ustrezajo zahtevam so v preglednicah 9 in 10 označeni kot neustrezni.

Preglednica 9: Raznolikost in pogostost mikroorganizmov na površinah v aseptičnem prostoru polnilne linije 1

Vzorčno mesto	Število brisov	Neustrezni rezultati		Mikroorganizmi v neustreznih vzorcih						
		n	%	B	K	P	B+K	B+P	K+P	B+P+K
				N	N	N	N	N	N	N
1. Vhodni trak	120	90	75	2	47	6	5	1	25	4
2. Izhodni trak	106	18	17	1	10	4	0	0	2	1
3. Transport pokrovčkov	21	3	14	0	1	2	0	0	0	0
4. Zapiralec pokrov zgoraj	30	7	21	0	5	1	0	0	1	0
5. Zapiralec pokrov spodaj	20	1	5	0	0	1	0	0	0	0
6. Zapiralec pokrov-vodilna krivulja	27	3	11	0	2	1	0	0	0	0
7. Zapiralec steber	23	5	22	0	0	4	0	1	0	0
8. Zapiralec steber znotraj	16	1	6	0	1	0	0	0	0	0
9. Zapiralna glava	149	5	3	1	0	4	0	0	0	0
10. Polnilna igla	186	6	3	0	1	4	1	0	0	0
11. Stena pri polnilcu	34	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12. Tla pri vhodu	17	4	23	0	4	0	0	0	0	0
13. Tla pri zapiralcu	19	13	63	0	13	0	0	0	0	0
14. Tla pri polnilcu	18	7	39	1	3	0	1	0	2	0
15. Tla pri splakovalniku plastenk	12	2	16	0	1	1	0	0	0	0
Skupaj	798	165	21	5	88	28	7	2	30	5

Legenda:

n: število neustreznih vzorcev glede na število vseh vzorcev na vzorčnem mestu

N: pogostost pojavljanja mikroorganizmov v neustreznih vzorcih

% odstotek neustreznih vzorcev izmed vseh vzorcev na vzorčnem mestu

B: bakterije

K: kvasovke

P: plesni

Od 797 vzorcev površin, 165 vzorcev (21 %) ni ustrezalo. V preglednici 9 vidimo, da so bili rezultati na vseh vzorčnih mestih, razen vzorčnega mesta 11, občasno neustrezní. Največ neustreznih rezultatov je bilo na vzorčnih mestih 1., 13. in 14. Na vzorčnem mestu 1. Vhodni tekoči trak je bilo od skupno 120 vzorcev, kar 75 % rezultatov neustreznih (90 vzorcev), na vzorčnem mestu 13. Tla pri zapiralcu je bilo 63 % rezultatov neustreznih (13 vzorcev) in na vzorčnem mestu 14. Tla pri polnilcu je bilo 39 % rezultatov neustreznih (7 vzorcev).

V preglednici 10 so podani rezultati določanja mikroorganizmov v zraku aseptičnega dela polnilne linije 1. Od 108 vzorcev, jih 11 (10,2 %) ni ustrezalo. V zraku smo največkrat določili plesni.

Preglednica 10: Raznolikost in pogostost mikroorganizmov v zraku v aseptičnem prostoru polnilne linije 1

Vzorčno mesto	Število vzorčenj	Neustrezní rezultati		Mikroorganizmi v neustreznih vzorcih					
		n	% ¹	Plesni		Kvasovke		B + K	
				N	% ²	N	% ²	N	% ²
16. Zrak v aseptičnem prostoru	108	11	10,2	8	72,72	2	18,18	1	9,0

Legenda:

n: število neustreznih vzorcev

N: pogostost pojavljanja mikroorganizmov v neustreznih vzorcih

%¹: odstotek neustreznih vzorcev izmed vseh vzorcev na določenem vzorčnem mestu

%²: odstotek neustreznih vzorcev glede na delež posameznih mikroorganizmov v posameznem vzorcu

4.1.4 Koncentracije mikroorganizmov v končnih proizvodih

V času od 01.06.2005 do 30.09.2005 smo opravili 1135 mikrobioloških preiskav končnih proizvodov, ki so jih polnili v aseptičnem prostoru polnilne linije 1. Za končne proizvode B, C, D, E, F, G je v okviru notranje kontrole predpisana koncentracija 0 CFU / 500 mL, za končna proizvoda H in I pa je predpisana koncentracija 0 CFU / 5 mL. Rezultati, ki niso izpolnjevali zahtev, so v preglednici 11 označeni neustrezní.

Iz rezultatov v preglednici 11 lahko vidimo, da od 1135 vzorcev, 248 vzorcev (22 %) ni ustrezalo. V pijači D je bilo število mikroorganizmov negativno v 500 mL pijače, v pijači H pa v 5 mL pijače. V pijači B je bilo od 76 vzorcev 15 vzorcev neustreznih, v pijači C pa je bilo od 144 vzorcev 37 vzorcev neustreznih. V pijači E, kjer je bilo število vzorcev najvišje je bilo od 415 vzorcev 106 vzorcev (25 %) neustreznih. Največ neustreznih rezultatov je bilo v pijači F in sicer od 187 vzorcev je bilo 60 vzorcev (32 %).

Preglednica 11: Raznolikost in pogostost mikroorganizmov v končnih proizvodih polnjenih v aseptičnem prostoru polnilne linije 1

Vzorec	Število vzorcev	Neustrezni rezultati		Mikroorganizmi v neustreznih rezultatih					
		n	%	B	K	P	B+K	B+P	K+P
				N	N	N	N	N	N
Pijača B	76	15	20	7	1	7	0	0	0
Pijača C	144	37	26	18	10	7	2	0	0
Pijača D	15	0	0	0	0	0	0	0	0
Pijača E	415	106	25	81	0	13	9	3	0
Pijača F	187	60	32	54	0	2	4	0	0
Pijača G	59	8	14	6	1	0	0	1	0
Pijača H	25	0	0	0	0	0	0	0	0
Pijača I	214	22	10	0	4	12	0	0	0
Skupaj	1135	248	22	136	16	41	15	4	0

Legenda:

n: število neustreznih rezultatov

N: pogostost pojavljanja mikroorganizmov v neustreznih vzorcih

‰: odstotek neustreznih vzorcev izmed vseh vzorcev na določenem vzorčnem mestu

B: bakterije

K: kvasovke

P: plesni

4.2 POLNILNA LINIJA 2

4.2.1 Koncentracije mikroorganizmov v zraku v prostoru polnilne linije 2

Za polnilno linijo 2, veljajo v okviru notranjega nadzora manj stroge zgornje dopustne meje mikroorganizmov kot za polnilno linijo 1, saj polnjenje na polnilni liniji 2 ne poteka v aseptičnih razmerah. Zgornje mejne koncentracije mikroorganizmov v zraku v prostoru polnilne linije 2 so:

- med polnjenjem pijače z dodanim CO₂:
 - o bakterije: do 10 CFU / m³ zraka
 - o kvasovke: do 5 CFU / m³ zraka
 - o plesni: do 5 CFU / m³ zraka
- med polnjenjem vode oziroma pijač brez dodanega CO₂:
 - o koliformne bakterije: 0 CFU/ m³ zraka
 - o enterokoki: 0 CFU/ m³ zraka
 - o skupno število aerobnih mezofilnih bakterij: 20 CFU/ m³ zraka

Rezultati, ki niso izpolnjevali zahtev, so v preglednici 12 označeni neustrezni.

Z vzorčevalnikom zraka smo vzorčili zrak na vzorčnih mestih opisanih v preglednici 6. Uporabljali smo gojišče oranžni agar (OA1x). V preglednici 12 vidimo, da je bila koncentracija plesni v zraku od skupno 6 vzorčenj na vzorčnem mestu 1. Izplakovalnik plastenk presežena dvakrat in enkrat na vzorčnem mestu 2. Zapiralec plasten. Bakterij in kvasovk v zraku ni bilo prisotnih.

Preglednica 12: Koncentracije plesni v prostoru polnilne linije 2 med polnjenjem pijače z dodanim CO₂

Datum vzorčenja	Koncentracije plesni (CFU/m ³) na vzorčnih mestih	
	1. Izplakovalec plastenk	2. Zapiralec plastenk
26.07.05	4	0
28.07.05	8	0
23.08.05	16	20
28.08.05	0	4
06.09.05	0	4
08.09.05	0	0
SKUPAJ (neustrezno)	20 (2)	28 (1)

Preglednica 13, prikazuje rezultate 12 vzorčenj zraka v prostoru polnilne linije 2 med polnjenjem izvirske vode. Vzorčili smo z vzorčevalnikom zraka na tri vrste gojišč in sicer na gojišče LT7, na gojišče SB in na gojišče NA. Med polnjenjem izvirske vode je v okviru notranje kontrole določeno, da v m³ zraka ne sme biti prisotnih koliformnih bakterij, enterokokov, skupno število aerobnih mezofilnih bakterij pa ne sme presegati 20 CFU/ m³ zraka. Zrak v prostoru polnilne linije 2 med polnjenjem vode ni bil kontaminiran z koliformnimi bakterijami ali enterokoki, število aerobnih mezofilnih bakterij pa je bilo neustrezno le enkrat in sicer dne 04.08.05.

Preglednica 13: Koncentracije mikroorganizmov v prostoru polnilne linije 2 med polnjenjem izvirske vode

Datum vzorčenja	Gojišče	Koncentracije mikroorganizmov (CFU/m ³) na vzorčnih mestih	
		1.Izplakovalec plastenik	2.Zapiralec plastenik
05.07.05	LT7	0*	0*
	SB	0*	0*
	NA	4	0*
07.07.05	LT7	0*	0*
	SB	0*	0*
	NA	4	8
14.07.05	LT7	0*	0*
	SB	0*	0*
	NA	0*	0*
20.07.05	LT7	0*	0*
	SB	0*	0*
	NA	0*	16
21.07.05	LT7	0*	0*
	SB	0*	0*
	NA	8	12
02.08.05	LT7	0*	0*
	SB	0*	0*
	NA	0*	0*
04.08.05	LT7	0*	0*
	SB	0*	0*
	NA	8	48
09.08.05	LT7	0*	0*
	SB	0*	0*
	NA	0*	0*
11.08.05	LT7	0*	0*
	SB	0*	0*
	NA	4	8
17.08.05	LT7	0*	0*
	SB	0*	0*
	NA	4	0*
19.08.05	LT7	0*	0*
	SB	0*	0*
	NA	8	4
21.09.05	LT7	0*	0*
	SB	0*	0*
	NA	4	4

Legenda:

LT7: gojišče Laktozni agar s tergitolom

NA: gojišče Hranljivi agar

SB: gojišče Slanetz & Bartley medium

* 0 CFU/ 250 L

4.2.2 Koncentracije mikroorganizmov, izoliranih iz zraka in CO₂ preko polnilnih igel in zračnega filtra v prostoru polnilne linije 2

Zgornje mejne koncentracije mikroorganizmov v CO₂, ki se uporablja pri polnjenju brezalkoholnih pijač z dodanim CO₂ na polnilni liniji 2, so:

- bakterije: do 2 CFU / m³ CO₂
- kvasovke: do 2 CFU / m³ CO₂
- plesni: do 2 CFU / m³ CO₂

Zgornje mejne koncentracije mikroorganizmov v zraku polnilnih igel, ki se uporabljajo za polnjenje izvirske vode na polnilni liniji 2, so:

- skupno število aerobnih mezofilnih bakterij: do 20 CFU / m³ zraka
- koliformne bakterije: do 0 CFU / m³ zraka
- bakterije rodu *Pseudomonas*: do 0 CFU / m³ zraka
- enterokoki: do 0 CFU / m³ zraka
- kvasovke: do 2 CFU / m³ zraka
- plesni: do 2 CFU / m³ zraka

Če je bila določena koncentracija mikroorganizmov višja od predpisane zgornje koncentracije, so v preglednici 14 in 15 rezultati označeni kot neustrezni.

Pri vzorčenju smo uporabljali gojišče oranžni agar (OA1x) med polnjenjem pijače z dodanim CO₂. Gojišča: pivinski agar, laktozni agar s tergitolom (LT7), hranljivi agar (NA), *Pseudomonas* agar (PA) in Slanetz & Bartley medium (SB) smo uporabljali za vzorčenje zraka in vpihanega zraka med polnjenjem izvirske vode.

V času od 01.06.2005 do 30.09.2005 smo opravili 19 vzorčenj CO₂ preko zračnega filtra z vpihovanjem CO₂ na gojišče OA1x (Vzorčno mesto 3, preglednica 14) in 23 vzorčenj CO₂ iz treh naključno izbranih polnilnih igel (Vzorčno mesto 4). Trikrat (13 %) je bila presežena koncentracija mikroorganizmov v CO₂ polnilnih igel in petkrat (56 %) v CO₂, ki potuje skozi zračni filter. Med polnjenjem izvirske vode je bilo opravljeno 19 vzorčenj zraka preko zračnega filtra in 59 vzorčenj zraka iz treh naključno izbranih polnilnih igel, z vpihovanjem zraka na gojišče pivinski agar. V 34 vzorcih zraka (58 %) iz polnilnih igel in v 8 vzorcih zraka (42 %), ki se filtrira preko zračnega filtra je bila ugotovljena presežena dovoljena koncentracija mikroorganizmov.

Preglednica 14: Raznolikost in pogostost izoliranih mikroorganizmov v prostoru polnilne linije 2 med polnjenjem izvirske vode in pijače z dodanim CO₂

Vzorčno mesto	Število vzorčenj	Neustrezni rezultati		Mikroorganizmi					
		n	% ¹	Bakterije		Plesni		B + P	
				N	% ²	N	% ²	N	% ²
3. Zračni filter (CO₂)	9	5	56	3	60	1	20	1	20
4. Polnilne igle (CO₂)	23	3	13	2	66,6	1	33,3	0	0
3. Zračni filter (zrak)	19	8	42	1	12,5	6	75	1	12,5
4. Polnilne igle (zrak)	59	34	58	6	18	28	82	0	0

Legenda:

n: število neustreznih rezultatov

N: pogostost pojavljanja mikroorganizmov v neustreznih vzorcih

B + P: bakterije in plesni

%¹: odstotek neustreznih vzorcev izmed vseh vzorcev na določenem vzorčnem mestu

%²: odstotek neustreznih vzorcev glede na delež posameznih mikroorganizmov v posameznem vzorcu

V preglednici 15 so prikazani, rezultati vzorčenj zraka z vpihovanjem zraka skozi polnilne igle in preko zračnega filtra.

Preglednica 15: Koncentracije mikroorganizmov v vpihovanem zraku polnilnih igel in zračnega filtra v prostoru polnilne linije 2 med polnjenjem izvirske vode

Datum vzorčenja	Koncentracija mikroorganizmov v zraku CFU/ m ³					
	Gojišče	Polnilna igla 1	Polnilna igla 2	Polnilna igla 3	Gojišče	Zračni filter
05.07.2005	LT7	0*	0*	0*	LT7	0*
	SB	0*	0*	0*	SB	0*
	PA	0*	0*	0*	NA	5
07.07.2005	LT7	0*	0*	0*	LT7	0*
	SB	0*	0*	0*	SB	0*
	PA	0*	0*	0*	NA	5
14.07.2005	LT7	0*	0*	0*	LT7	0*
	SB	0*	0*	0*	SB	0*
	PA	0*	0*	0*	NA	0*
20.07.2005	LT7	0*	0*	0*	LT7	0*
	SB	0*	0*	0*	SB	0*
	PA	0*	0*	0*	NA	0*
21.07.2005	LT7	0*	0*	0*	LT7	0*
	SB	0*	0*	0*	SB	0*
	PA	0*	0*	0*	NA	10
02.08.2005	LT7	0*	0*	0*	LT7	0*
	SB	0*	0*	0*	SB	0*
	PA	0*	0*	0*	NA	0*
04.08.2005	LT7	0*	0*	0*	LT7	0*
	SB	0*	0*	0*	SB	0*
	NA	40	45	40	NA	60
09.08.2005	LT7	0*	0*	0*	LT7	0*
	SB	0*	0*	0*	SB	0*
	NA	25	10	10	NA	0*
11.08.2005	LT7	0*	0*	0*	LT7	0*
	SB	0*	0*	0*	SB	0*
	NA	0*	0*	27	NA	5
17.08.2005	LT7	0*	0*	0*	LT7	0*
	SB	0*	0*	0*	SB	0*
	NA	0*	0*	0*	NA	5
19.08.2005	LT7	0*	0*	0*	LT7	0*
	SB	0*	0*	0*	SB	0*
	NA	5	20	40	NA	10
21.09.2005	LT7	0*	0*	0*	LT7	0*
	SB	0*	0*	0*	SB	0*
	NA	0*	15	55	NA	5

Legenda:

LT7: gojišče Laktozni agar s tergitolom

NA: gojišče Hranljivi agar

SB: gojišče Slanetz & Bartley medium

PA: gojišče *Pseudomonas* agar

* 0 CFU/ 200 L

V zraku ni bilo prisotnih bakterij rodu *Pseudomonas*, enterokokov in koliformnih bakterij. Skupno število aerobnih mezofilnih bakterij je bilo preseženo 7x v zraku polnilnih igel in 1x v zraku iz zračnega filtra.

4.2.3 Koncentracije mikroorganizmov v končnih proizvodih

Preglednica 16 prikazuje rezultate 301 mikrobiološke preiskave izvirske vode, ki jo polnijo na polnilni liniji 2. V izvirski vodi ni bilo ugotovljenih neustreznih rezultatov.

Preglednica 16: Rezultati mikrobioloških preiskav izvirske vode

Vzorec	Število vzorcev	Neustrezni rezultati	B ₁ (CFU/ 250 ml)	B ₂ (CFU/ 250 ml)	B ₃ (CFU/ 500 ml)	B ₄ (CFU / 1ml)	B ₅ (CFU/ 1 ml)
		n	N	N	N	N	N
Izvirna voda	301	0	0	0	0	0	0

Legenda:

n: število neustreznih rezultatov

N: pogostost pojavljanja mikroorganizmov v neustreznih vzorcih

B₁: koliformne bakterije

B₂: enterokoki

B₃: bakterije rodu *Pseudomonas*

B₄: aerobne mezofilne bakterije v 1ml (24 -urna inkubacija pri 22 °C)

B₅: aerobne mezofilne bakterije v 1ml (24 -urna inkubacija pri 37 °C)

Opravili smo 117 mikrobioloških preiskav končnega proizvoda A na polnilni liniji 2. Za končne proizvode je v okviru notranje kontrole predpisana koncentracija mikroorganizmov 0 CFU / 5 mL. V preglednici 17 lahko vidimo, da je bilo od skupno 117 vzorcev, 10 % rezultatov neustreznih (12 vzorcev).

Preglednica 17: Raznolikost in pogostost mikroorganizmov, izoliranih v končnem proizvodu A

Vzorec	Število vzorcev	Neustrezni rezultati		Mikroorganizmi v neustreznih rezultatih					
		n	%	B	K	P	B+K	B+P	K+P
				N	N	N	N	N	N
Pijača A	117	12	10	4	0	8	0	0	0

Legenda:

n: število neustreznih rezultatov

N: pogostost pojavljanja mikroorganizmov v neustreznih vzorcih

B: bakterije

K: kvasovke

P: plesni

4.3 LINIJA OBP

4.3.1 Rezultati mikrobioloških preiskav deaerirane vode

V času od 01.06.2005 do 30.09.2005 smo opravili 68 vzorčenj surovine deaerirana voda v prostoru linije OBP. Rezultati mikrobioloških preiskav vzorcev deaerirane vode, ki se uporablja kot surovina za pripravo brezalkoholnih pijač, ki se polnijo na liniji 1 so prikazani v preglednici 18. Za deaerirano vodo je predpisana koncentracija mikroorganizmov 0 CFU/330 mL.

Preglednica 18: Raznolikost in pogostost mikroorganizmov, izoliranih v vzorcih deaerirane vode

Vzorčno mesto	Število vzorčenj	Neustrezni rezultati		Mikroorganizmi v neustreznih vzorcih					
		n	%	K	B	P	K+B	B+P	P+K
Deaerirana voda	68	40	59	6	28	0	3	2	1

Legenda:

n: število neustreznih rezultatov

K: kvasovke

B: bakterije

P: plesni

Od 68 vzorcev, 40 vzorcev (59 %) ni ustrezalo. Iz rezultatov, ki so zapisani v preglednici 18 vidimo, da so bile bakterije najbolj pogosto vzrok za neustreznost vzorca.

4.4 IDENTIFICIRANI MIKROORGANIZMI

V preglednici 19 so rezultati izbranih mikroorganizmov, ki so jih identificirali na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani. Izbrali smo naslednje mikroorganizme: kolonije kvasovk in plesni, ki smo jih izolirali iz dveh končnih proizvodov, ki jih polnijo na liniji 1. Kolonije bakterij, ki smo jih izolirali iz surovine deaerirana voda, za pripravo končnih proizvodov na liniji OBP, kolonije plesni, ki smo jih izolirali iz zraka v aseptičnem prostoru in v septičnem prostoru in kolonije kvasovk, ki smo jih izolirali iz površin ali zraka septičnega in aseptičnega prostora polnilne linije 1. Kolonije mikroorganizmov, ki so zrasle na gojišču smo trikrat precepili iz gojišč OA1x ali OA2x na sveže pripravljeno isto gojišče tako, da smo kolonije čimbolj osamili.

4.4.1 Mikroorganizmi v septičnem prostoru polnilne linije 1

Na vzorčem mestu 1.A Začetek transporta plastenk so bile identificirane plesni rodu *Trichoderma* sp., na vzorčem mestu 2.A Sredina transporta plastenk znotraj, plesni vrste *Alternaria alternata*, na vzorčem mestu 3.A Konec transporta plastenk, plesni vrste *Fusarium oxysporum* in na vzorčem mestu 3.B Konec transporta plastenk zunaj, kvasovke vrste *Candida intermedia*. Omenjena mesta, razen mesta 3.B, predstavljajo zaprti prostor traku, po katerem platenke s pomočjo zračnega transporta potujejo do aseptičnega prostora. Zrak ob izhodnem traku, vzorčno mesto 8, je bil kontaminiran s plesnimi rodu *Cladosporium*, v prostoru za preoblačenje, vzorčno mesto 9, so bile plesni vrste *Aurebasidium pullulans*. Tla ob dozirniku pokrovčkov, vzorčno mesto 6 so bila kontaminirana s plesnimi rodu *Trichoderma*. Na vzorčem mestu 4. Površina pleksi stekla, ki pokriva komoro, v kateri se nahajajo pokrovčki in ki je del zalogovnika pokrovčkov, je bila kontaminirana s plesnimi rodu *Penicillium*.

Preglednica 19: Mikroorganizmi, ki so bili identificirani na polnilni liniji 1 in liniji OBP

Linija	Vzorčno mesto	Vzorec	Identificirani mikroorganizmi
Linija OBP	Vzorčno mesto 1.	Surovina	<i>Enterobacter sakazakii</i>
Septični prostor polnilne linije 1	Vzorčno mesto 1.A Začetek transporta plastenk – znotraj traku	Bris	<i>Trichoderma</i> sp.
	Vzorčno mesto 2.A Sredina transporta plastenk – znotraj traku	Bris	<i>Alternaria alternata</i>
	Vzorčno mesto 3.A. Konec transporta plastenk – znotraj traku	Bris	<i>Fusarium oxysporum</i>
	Vzorčno mesto 3.B Konec transporta plastenk – zunaj traku	Bris	<i>Candida itermedia</i>
	Vzorčno mesto 4. Pleksi steklo na zalogovniku pokrovčkov	Bris	<i>Penicillium</i> sp.
	Vzorčno mesto 6. Tla ob dozirniku pokrovčkov	Bris	<i>Trichoderma</i> sp.
	Vzorčno mesto 8. Zrak ob izhodnem tekočem traku	Zrak	<i>Cladosporium</i> sp.
	Vzorčno mesto 9. Zrak v prostoru za preoblačenje	Zrak	<i>Aurebasidium pullulans</i>
Aseptični prostor polnilne linije 1	Vzorčno mesto 1. Vhodni tekoči trak	Bris	<i>Candida guilliermondii</i>
	Vzorčno mesto 2. Izhodni tekoči trak	Bris	<i>Cladosporium</i>
	Vzorčno mesto 3. Transport pokrovčkov	Bris	<i>Paecilomyces marquandii</i>
	Vzorčno mesto 4. Zapiralec pokrov zgoraj	Bris	<i>Fusarium oxysporum</i>
	Vzorčno mesto 9. Zapiralni glavi	Bris	<i>Paecilomyces marquandii</i>
	Vzorčno mesto 10. Štiri polnilne igle	Bris	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>
	Vzorčno mesto 12. Tla pri vhodu	Bris	<i>Acremonium strictum</i>
	Vzorčno mesto 15. Tla pri izplakovalniku plastenk	Bris	<i>Cladosporium</i> sp.
	Vzorčno mesto 16. Zrak v aseptičnem prostor	Zrak	<i>Geotrichum</i> sp.
	Plastenka za izplakovalnikom plastenk	Bris	<i>Aspergillus flavus</i>
Polnilna linija 1	Končni proizvod E	Končni proizvod	<i>Paecilomyces marquandii</i>
	Končni proizvod E	Končni proizvod	<i>Candida pelliculosa</i>

4.4.2 Mikroorganizmi v aseptičnem prostoru polnilne linije 1

Na vzorčnem mestu 1. Vhodni tekoči trak smo izolirali kvasovke vrste *Candida guilliermondii*. Plesni vrste *Paecilomyces marquandii* so bile določene na vzorčnem mestu 3. Transport pokrovčkov in na vzorčnem mestu 9. Zapiralna glava, ki je del zapiralca plastenkov v aseptičnem prostoru polnilne linije 1. Na pokrovu zapiralca plastenkov - zgoraj vzorčno mesto 4., so bile identificirane plesni vrste *Fusarium oxysporum*. Plesni rodu *Cladosporium*, so bile določene na površini tekočega traku pri izhodu iz aseptičnega prostora polnilne linije 1 (vzorčno mesto 2. Izhodni tekoči trak) in na površini tal pri izplakovalniku plastenkov (vzorčno mesto 15. Izplakovalnik plastenkov). V polnilni igli, (vzorčno mesto 10. Štiri polnilne igle) so bile identificirane plesni vrste *Sporobolomyces salmonicolor* in v zraku aseptičnega prostora (vzorčno mesto 16.) plesni rodu *Geotrichum*. Na tleh okoli odtočnega jaška pri vhodu v aseptični prostor (vzorčno mesto 12. Tla pri vhodu) so bile identificirane plesni vrste *Acremonium strictum*. Iz površine ene izmed plastenkov na vhodnem tekočem traku po izstopu iz izplakovalnika plastenkov smo izolirali plesni rodu *Aspergillus flavus*.

4.4.3 Mikroorganizmi v surovini in končnem proizvodu

Surovina (deaerirana voda) je bila kontaminirana s bakterijami vrste *Enterobacter sakazakii*. Končni proizvod E je bil kontaminiran s plesnimi vrste *Paecilomyces marquandii* in s kvasovkami vrste *Candida pelliculosa*.

4.5 RAST MIKROORGANIZMOV PO NACEPITVI V KONČNE PRODUKTE

Izbrane kolonije identificiranih mikroorganizmov smo aseptično nacepili v končne proizvode - brezalkoholne pijače. Plastenke z kontaminirano pijačo smo nato postavili v prostor pri 30 °C in dnevno opazovali posledice kvara v pijačah. Zanimal nas je čas v katerem pride do opaznih sprememb v pijačah kot tudi posledice kvara (sprememba barve, motnost, razslojevanje,...).

Od 9 vrst brezalkoholnih pijač, ki smo jih umetno kontaminirali s kvasovkami, bakterijami in plesnimi, ki so zapisani v preglednici 20, se je pokvarilo 8 vrst pijač (B, C, D, E, F, G, H in I), pijača A se tekom spremljanja (30 dni) ni pokvarila.

Kvar v pijačah nacepljenih z plesnimi vrste *Paecilomyces marquandi*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus*, *Acremonium strictum*, *Alternaria alternata*, *Aurebasidium pullulans* in rodovi *Cladosporium* sp., *Geotrichum* sp., *Trichoderma* sp. in *Penicillium* sp. se je kazal v obliki kosmičaste rasti plesni v pijačah B – G in v obliki razslojenosti pri pijači H in I. Kvar v pijačah nacepljenih z kvasovkami vrst *Candida pelliculosa*, *Candida guilliermondii*, *Sporobolomyces salmonicolor* in *Candida intermedia* se je kazal v obliki motnosti pijač (B, C, D, E, F, G in H). Vrsti *Sporobolomyces salmonicolor* in *Candida intermedia* sta pri pijačah B, C, D, E, F, G, H in I povzročali kvar v obliki bombaže plastenkov, kot posledica fermentacije. Pijača, ki je bila umetno kontaminirana z bakterijami vrste *Enterobacter sakazakii* je bila motna.

Preglednica 20: Rast mikroorganizmov v umetno kontaminiranih pijačah

Mikroorganizmi	Pijača A	Pijača B	Pijača C	Pijača D	Pijača E	Pijača F	Pijača G	Pijača H	Pijača I
<i>Paecilomyces marquandii</i>	-	+3	+4	+5	+3	+3	+3	-	-
<i>Candida pelliculosa</i>	-	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-
<i>Enterobacter sakazakii</i>	-	+5	-	-	+3	+3	+3	-	-
<i>Candida guilliermondii</i>	-	+1	+2	+3	+1	+1	+2	-	-
<i>Cladosporium sp.</i>	-	+5	-	-	+3	+3	+3	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	+1	+5	+5	+1	+1	+1	+14	+7
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	-	+1	+3	+3	+1	+1	+1	-	+1
<i>Geotrichum sp.</i>	-	+2	+4	+4	+1	+1	+2	+11	+11
<i>Aspergillus flavus</i>	-	+1	+1	+3	+1	+1	+1	-	+11
<i>Acremonium strictum</i>	-	+3	+3	+3	+1	+1	+1	-	+6
<i>Trichoderma sp.</i>	-	+11	+2	+2	+1	+1	+1	-	+11
<i>Alternaria alternata</i>	-	+4	-	-	+2	+2	+2	-	-
<i>Aurebasidium pullulans</i>	-	+3	-	-	+1	+1	+2	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	-	+1	+2	+2	+1	+1	+1	+12	+6
<i>Candida intermedia</i>	-	+1	+1	+3	+1	+1	+1	+3	+5

Legenda 1:

+/- rast MO v pijači in čas v dnevih v katerem je do opaznih sprememb prišlo

- ni rasti MO v pijači po preteku 30 dni

4.5.1 Opis rasti mikroorganizmov v vzorcih pijač

Prve opazne spremembe nacepljenih vzorcev s plesnimi vrste *Paecilomyces marquandii* smo opazili po 72 urah in sicer pri pijači B v obliki rahle rasti na dnu plastenke, pri pijačah E, F in G, kjer se je plesen močno rasla v spodnjem delu plastenke 15 cm nad dnom proti vrhu, v obliki posameznih kosmičev. Po 4 dnevih smo opazili tudi rahlo rast plesni na dnu plastenke pri pijači C, in po 5 dnevih rahlo rast plesni na dnu plastenke pri pijači D. Pri ostalih vzorcih ni bilo vizualnih sprememb.

Pri vzorcih nacepljenih s plesnimi vrste *Aspergillus flavus* smo opazili začetek rasti po 24 urah pri pijači B, vendar je bila rast manj intenzivna kot pri pijačah C, E, F in G. Rast je

bila bolj izrazitejša na dnu plastenke v premeru 5 cm, proti vrhu pa se je plesen razrasla v obliki posameznih kosmičev. Po 36 urah smo opazili rast pri pijači D. Po 11 dnevih smo opazili rast plesni pri pijači I, v kateri se je 13. dan začel proces razslojevanja.

Pri vzorcih nacepljenih s plesnimi vrste *Fusarium oxysporum* smo opazili, da so se plesni razrasle v pijačah: B, E, F in G v manj kot 24 urah, in sicer po celotnem volumnu pri zadnjih treh pijačah in v spodnjem delu plastenke pri prvi pijači. Po 5 dnevih smo opazili rast plesni tudi pri pijači C in D, kjer se je plesen razrasla na dnu plastenke. Po 7 dnevih smo opazili rast pri pijači I v obliki razslojevanja in po 14 dnevih pri pijači H.

Pri vzorcih nacepljenih s plesnimi rodu *Geotrichum* sp. smo opazili spremembe v pijači E in F po 24 urah v spodnjem delu plastenke. Po 48 so se pojavile prve opazne spremembe tudi pri pijači B in G, vendar rast ni bila tako intenzivna kot pri pijači E in F. Po 4 dneh smo opazili rast tudi pri pijači C in D v obliki posameznih kosmičev na dnu plastenke. Po 11 dnevih smo opazili proces razslojevanja v pijači H in I.

Pri vzorcih nacepljenih s plesnimi vrste *Alternaria alternata* smo opazili rast po 48 urah pri pijačah: E, F in G v obliki kosmičaste rasti. Plesen se je tudi pritrjevala na stene plastenke. Po 4 dneh smo opazili rast pri pijači B, vendar rast ni bila tako intenzivna kot pri ostalih pijačah v katerih se je plesen razrasla.

Pri vzorcih nacepljenih s plesnimi rodu *Penicillium* smo opazili rast po 24 urah pri pijačah: B, E, F in G. Plesen se je razrasla v obliki posameznih kosmičev po celotnem volumnu pijače, vendar pa pri pijači B v manjšem obsegu kot pri ostalih treh pijačah. Po 48 urah smo opazili rast pri pijači C in D, kjer je plesen plavala na površju pijače. Pijača I se je pričela razslojevati po 6 dneh, pijača H pa po 12 dneh. Razslojevanje pri pijači I se je pričelo od zgoraj navzdol, pri pijači H pa ravno obratno

Pri vzorcih nacepljenih s plesnimi rodu *Trichoderma* sp. smo opazili rast po 24 urah in sicer kot rahlo rast na dnu plastenke pri pijačah: E, F in G. Po 48 urah smo opazili močnejšo rast v spodnjem delu plastenke s pijačo. Rast smo opazili tudi pri pijači C in D po 48 urah in po 11 dneh pri pijači B. Pijača I se je pričela razslojevati po 11 dneh.

Pri vzorcih nacepljenih s plesnimi vrste *Acremonium stricticum* smo opazili rast plesni po 24 urah v pijačah E, F in G. Vse omenjene pijače so bile motne v spodnjem delu plastenke. Po preteku 72 ur so postale motne tudi pijače B, C in D, vendar je bila od vseh omenjenih, pijača B najmanj motna. Po 6 dnevih se je začela razslojevati tudi pijača I.

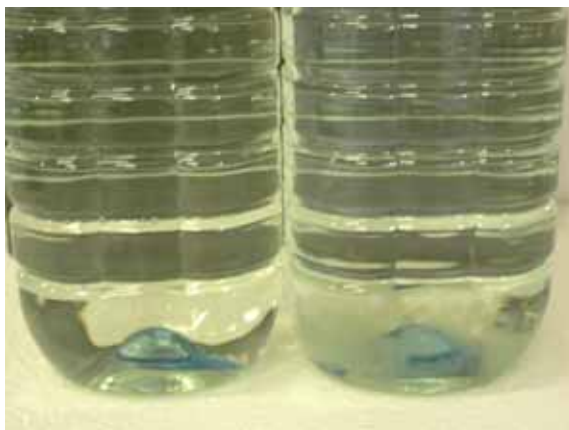
Pri vzorcih nacepljenih s plesnimi rodu *Cladosporium* sp. smo opazili rast po 72 urah pri pijačah: E, F in G in sicer kot močna rast v spodnjem delu plastenke. Po 5 dnevih se je pojavila opazna rast tudi pri pijači B v obliki drobnih kosmičev. Primer rasti plesni na gojišču OA2x prikazuje slika 20. Kolonije plesni pod mikroskopom pri 600x povečavi lahko vidimo na sliki 21, slika 22 pa prikazuje rast plesni v končnem proizvodu.



Slika 20: Plesni rodu *Cladosporium* na gojišču OA2x



Slika 21: Plesni rodu *Cladosporium*
(povečava: 600x)



Slika 22: Umetno kontaminirana pijača z plesnimi rodu *Cladosporium* (desno), in kontrolni vzorec (levo)

Pri vzorcih nacepljenih s plesnimi vrste *Auerobasidium pullulans* smo opazili rast po 24 urah pri pijači E in F. Po 48 urah se je pojavila rast tudi pri pijači G, vendar v manjšem obsegu. Po 72 urah se je plesen pričela pritrjevati tudi na stene plastenke, razrasla pa se je tudi v pijači B.

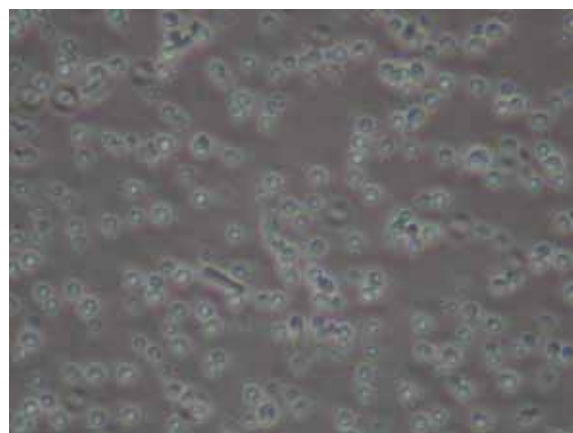
Pri vzorcih nacepljenih s kvasovkami vrste *Sporobolomyces salmonicolor* smo opazili rast po 24 urah pri pijači B, ki je bila motna, vendar manj kot pijače E, F in G, v katerih smo rast prav tako opazili v omenjenem času. Po 48 urah so postale plastenke v katerih so bile omenjene pijače napihnjene, kar je bila posledica fermentacije. Po 72 urah postane pijača C motna in plastenka napihnjena. Po preteku 72 ur postane pijača D motna in plastenka I napihnjena.

Pri vzorcih nacepljenih s kvasovkami vrste *Candida pelliculosa* smo po 24 urah opazili, da so vse pijače razen A in H postale motne. Po 72 urah se postale plastenke tudi napihnjene, kar je bila posledica tvorbe plina CO₂ tekom fermentacije, ki je potekala v pijači.

Pri vzorcih nacepljenih s kvasovkami vrste *Candida guilliermondii* smo po 24 urah opazili, da so bile pijače B, E in F motne, vendar pijača B v manjšem obsegu kot pijači E in F. Po 48 urah sta postali motni tudi pijači C in G, po preteku 72 ur pa še pijača D. Primer rasti omenjene vrste kvasovk na gojišču OA2x prikazuje slika 23. Celice kvasovk pod mikroskopom pri 600x povečavi lahko vidimo na sliki 24, slika 25 pa prikazuje rast kvasovk v končnem proizvodu.



Slika 23: Kvasovke vrste *Candida guilliermondii* na OA 2x



Slika 24: Kvasovke vrste *Candida guilliermondii* (povečava: 600x)



Slika 25: Umetno kontaminirana pijača z kvasovkami vrste *Candida guilliermondii* (desno), in kontrolni vzorec (levo)

Pri vzorcih nacepljenih s kvasovkami vrste *Candida intermedia* smo opazili rast po preteku 24 ur pri pijačah B, C, E, F in G. Pijači B in C sta bili motni v spodnjem delu plastenke, ostale po celi prostornini. Po preteku 72 ur smo opazili napihnjeni plastenki pijače E in H, kar je bila posledica fermentacije, pijača D je postala motna. Po 5 dnevih je postala napihnjena tudi plastenka z pijačo I.

Pri vzorcih nacepljenih s bakterijami vrste *Enterobacter sakazakii* smo opazili rast po 72 urah, pri pijači E in F, ki sta bile motne v spodnjem delu plastenke. Po 5 dnevih je postala motna tudi pijača B v spodnjem delu plastenke.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Polnilna linija 1

Pred začetkom diplomskega dela, smo postavili hipotezo, da povečano število mikroorganizmov v proizvodnem okolju (prostori polnilnih linij, embalaža, oprema, zrak) negativno vpliva na mikrobiološko ustreznost končnih proizvodov.

Pri proizvodnji živil je potrebno zagotoviti ustrezno oviro med živilom in možnim virom kontaminacije živila (Ponikvar in Jeršek, 2002). Oprema je v proizvodnji živil poleg ljudi ključnega pomena. Med opremo tako sodi na primer zaprti trak po katerem plastenke z zračnim transportom potujejo do aseptičnega prostora. V kolikor so zrak in površine znotraj traku kontaminirane, lahko to pomeni vir kontaminacije za plastenke, ki po tekočem traku potujejo do aseptičnega prostora. V septičnem prostoru polnilne linije smo ugotovili, da 28 % vzorcev površin in 32 % vzorcev zraka ni ustrezalo predpisom, ki jih v okviru notranje kontrole določajo zgornje mejne koncentracije mikroorganizmov (preglednica 21).

Preglednica 21: Pogostost mikrobiološko neustreznih vzorcev površin, zraka in končnih proizvodov polnilne linije 1

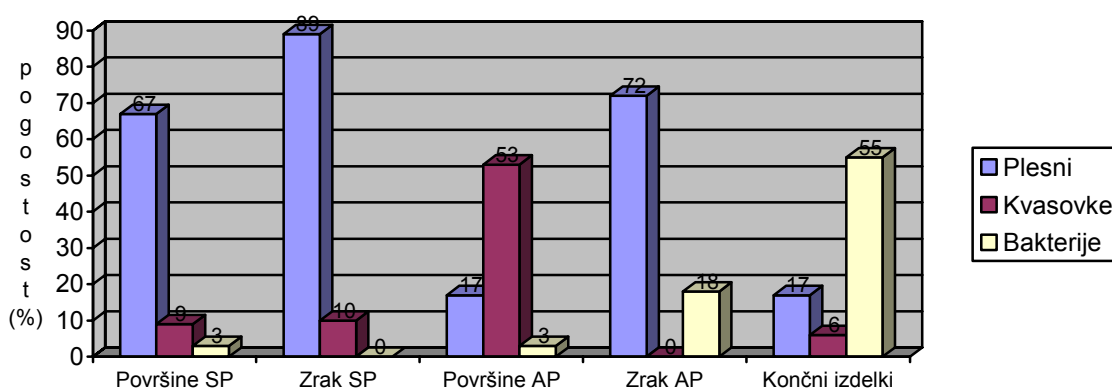
Prostor	Vzorci	Število vzorčenj	Neustrezni vzorci	
			Število	%
Septični prostor	Površina	120	34	28 %
	Zrak	60	19	32 %
Aseptični prostor	Površina	798	165	21 %
	Zrak	108	11	10 %
Končni proizvodi (B do I)		1135	248	22 %

Wershofen (2003) navaja, da ima poleg površin in opreme, vpliv na kakovost končnih izdelkov tudi zrak v aseptičnem prostoru polnilne linije. Zrak je običajno v takšnih prostorih filtriran, vendar pa to ne pomeni, da se v prostoru ne morejo vendarle pojaviti mikroorganizmi ali prašni delci. Naši rezultati kažejo, da je bilo v aseptičnem prostoru poleg 21 % vzorcev površin neustreznih tudi 10 % vzorcev zraka. Rezultati nakazujejo relativno majhno, vendar ne izključujočo možnost kontaminacije izdelkov z mikroorganizmi preko zraka. V aseptičnem prostoru je nadtlak filtriranega zraka, ki preprečuje vdor zunanjega zraka. To ne pomeni, da se mikroorganizmi v aseptičnem prostoru ne morejo pojaviti. Kot je bilo že omenjeno v točki 3.2.1.1, plastenke v aseptični prostor in iz njega potujejo po tekočem traku. Ta trak pri vhodu v aseptični prostor sega približno 0,5 metra v septični prostor, kjer je možnost kontaminacije večja. Iz septičnega prostora trak lahko prinese mikroorganizme v aseptični prostor, kar lahko vidimo tudi v rezultatih, saj je delež neustreznih rezultatov največji na površini vhodnega tekočega traku (75 % neustreznih rezultatov, preglednica 9).

V končnih proizvodih smo določili 22 % neustreznih vzorcev (preglednica 21) in ta rezultat kaže na podobne odstotke neustreznih vzorcev kot smo jih določili v samem

proizvodnem okolju tako kot navaja Wershofen (2003). Tudi DiGiacomo in Gallangher (2001) navajata, da so najpogostejši viri kontaminacije z mikroorganizmi v proizvodnji brezalkoholnih pijač, okolje polnilne linije in oprema, kjer poteka tehnološki postopek.

Podrobnejši pregled rezultatov, v katerem smo določali pogostost posameznih skupin mikroorganizmov, ki so bili največkrat vzrok za neustrezne rezultate, je pokazal (slika 26), da so bile v septičnem prostoru polnilne linije 1 najpogostejše vzrok plesni. V aseptičnem prostoru so bile najpogostejše v zraku plesni in na površinah kvasovke, medtem ko smo v končnih izdelkih ugotovili, da so bile bakterije največkrat vzrok neustreznosti. Kljub temu, da je bilo vzorčenje in mikrobiološke preiskave izvedene v enakem časovnem obdobju, se postavljajo nova vprašanja o vzrokih za neustreznost končnih izdelkov.



Slika 26: Pogostost plesni, kvasovk in bakterij izoliranih iz vzorcev površin, zraka in končnih izdelkov kot vzrokov za neustrezne rezultate na polnilni liniji 1

Legenda:

SP septični prostor
AP aseptični prostor

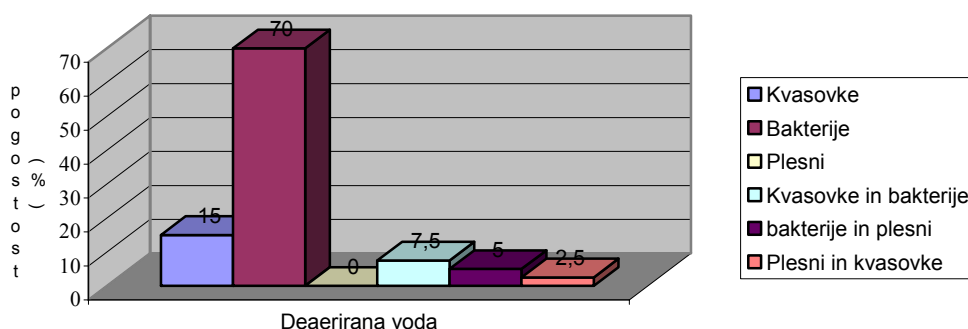
Po identifikaciji izoliranih mikroorganizmov smo lahko ugotovili, da smo plesni vrste *Paecilomyces marquandii* izolirali iz površine vertikalnega traku po katerem potujejo pokrovčki do zapiralnih glav zapiralnega stroja, kjer jih privijejo na grlo plastenke. Omenjeno vrsto plesni smo našli znotraj zapiralne glave, torej na mestu, kjer je pokrovček pred privitjem na plastenko in v končnem proizvodu. Možna pot plesni bi bila: pokrovčki (vertikalni trak) - zapiralna glava - končni proizvod. Wershofen (2003) navaja, da do kontaminacije izdelka lahko pride preko kontaminirane zunanje površine. Nevarnost prenosa mikroorganizmov preko embalaže obstaja zaradi nezadostne zunanje obdelave embalaže in zaradi ciljnega zračnega toka. Hermetično zapiranje plastenk s pokrovčki je zadnja faza tehnološkega procesa, ki poteka znotraj aseptičnega prostora. Kontaminacija sestavnih delov zapiralca plastenk, še posebej zapiralnih glav s strani embalaže (pokrovčkov) ali iz zraka pomeni možnost kontaminacije končnega proizvoda. Embalaža je lahko zelo nevaren vir ali prenašalec kontaminacije živil z mikroorganizmi (Cegnar, 1979).

Na kakovost brezalkoholnih pijač ima velik vpliv tudi mikrobiološka ustreznost surovin, ki se uporabljajo pri pripravi končnih proizvodov. Izmed surovin smo opravili mikrobiološko preiskavo deaerirane vode, rezultati pa so prikazani v preglednici 22.

Preglednica 22: Pogostost mikrobiološko neustreznih rezultatov preiskave deaerirane vode

Vzorec	Št. vzorcev	Neustrezni rezultati	
		Število	%
Deaerirana voda	68	40	59

V deaerirani vodi smo določili 40 % neustreznih vzorcev. Podrobnejši pregled rezultatov, v katerem smo določali pogostost posameznih skupin mikroorganizmov, ki so bili največkrat vzrok za neustrezne rezultate, je pokazal (slika 27), da so bile v deaerirani vodi najpogostejše vzrok bakterije (70 %). Poleg bakterij smo v deaerirani izolirali tudi kvasovke (15 %). Plesni smo v deaerirani vodi izolirali skupaj z bakterijami (5 %) in z kvasovkami (2,5 %). Kvasovke in bakterije so bile prisotne v 7,5 % neustreznih rezultatov. Glede na to, da smo iz končnih proizvodov, ki jih polnijo na polnilni liniji 1 izolirali kvasovke, bakterije in plesni (slika 26), je lahko za kontaminacijo le-teh kriva tudi neustrezna mikrobiološka kakovost omenjene surovine, kljub pasterizaciji končnega proizvoda.



Slika 27: Pogostost plesni, kvasovk in bakterij izoliranih iz surovine deaerirana voda

Da bi lahko bolj podrobno ugotovili možne povezave med kontaminacijo okolja, kontaminacijo surovin in kontaminacijo končnih proizvodov, bi morali spremljati pogostost pojavljanja posameznih izolatov v okolju, surovinah in v končnem proizvodu ter uporabiti bolj natančno karakterizacijo izolatov za njihovo sledenje (Jeršek, 2005).

5.1.2 Polnilna linija 2

Tudi za polnilno linijo 2 smo postavili hipotezo, da povečano število mikroorganizmov v proizvodnem okolju (prostor polnilne linije, oprema, zrak) negativno vpliva na mikrobiološko ustreznost končnih proizvodov.

Kim in Feng (2001) navajata, da dominantno mikrofloro v ustekleničeni vodi tvorijo Gram negativne bakterije, ki lahko rastejo v vodi brez CO₂, kot tudi v mineralnih vodah ali vodah z dodanim CO₂. To so bakterije rodu *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Moraxella* in *Acinetobacter*. Koliformne bakterije so le redko prisotne v ustekleničenih vodah, kljub temu pa je njihova prisotnost v vodah lahko indikator kontaminacije.

Mikrobiološki pregled vode mora vedno odgovoriti na naslednja vprašanja:

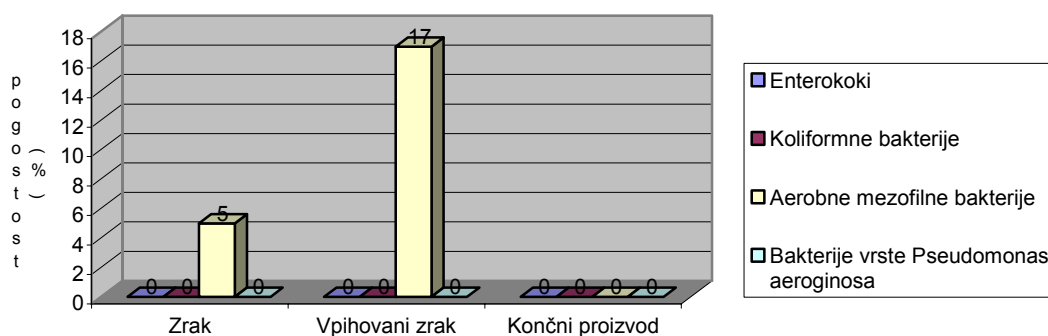
- ali je voda okužena s fekalijami oziroma bakterijami črevesnega izvora, med katerimi so lahko tudi patogene?
- kakšno je higiensko stanje polnilne linije na kateri polnjenje vode v plastenke poteka?
- kakšen je efekt tehnološkega prečiščevanja vode?

Naši rezultati kažejo (preglednica 23, slika 28), da je bilo v prostoru polnilne linije 2 neustreznih 5 % vzorcev zraka in 17 % vzorcev vpihanega zraka, ki smo ga vpihovali na trdno gojišče preko polnilnih igel in zračnega filtra. Rezultati nakazujejo relativno majhno, vendar ne izključujočo možnost kontaminacije izdelkov z mikroorganizmi preko zraka. Kljub temu, v vzorcih končnih proizvodov (izvirna voda) mikroorganizmov nismo odkrili.

Preglednica 23: Pogostost mikrobiološko neustreznih rezultatov vzorcev zraka, vpihovanega zraka in izvirske vode na polnilni liniji 2 med polnjenjem izvirske vode

Vzorec	Št. vzorcev	Neustreznih rezultatov	
		Število	%
Zrak v prostoru	24	1	5
Vpihani zrak	48	8	17
Izvirna voda	301	0	0

Edberg (1998) navaja, da ustekleničena voda ni sterilni produkt, ne sme pa vsebovati patogenih mikroorganizmov. Podrobnejši pregled rezultatov je pokazal (slika 28), da je bilo število bakterij rodu *Pseudomonas*, enterokokov in koliformnih bakterij v izvirske vodi, zraku in vpihanem zraku negativno, skupno število aerobnih mezofilnih bakterij pa v izvirske vodi ni preseglo vrednosti, ki jih dovoljuje Pravilnik o naravni mineralni vodi, izvirske vodi in namizni vodi (2004), kar dokazuje, da je bila voda zdravstveno ustrezna. V kolikor bi v izvirske vodi odkrili prisotnost koliformnih bakterij, bi lahko to pomenilo slabo higiensko stanje polnilne linije, tveganje za kontaminacijo končnega proizvoda in s tem tveganje za zdravje potrošnika (Kim in Feng, 2001). V zraku in vpihovanem zraku smo, glede na, v okviru notranje kontrole predpisane koncentracije mikroorganizmov, odkrili povečano vsebnost aerobnih mezofilnih bakterij (slika 28), vendar ti neustrezni rezultati niso imeli vpliva na kakovost končnega proizvoda.



Slika 28: Pogostost bakterij izoliranih iz zraka, vpihanega zraka in izvirske vode

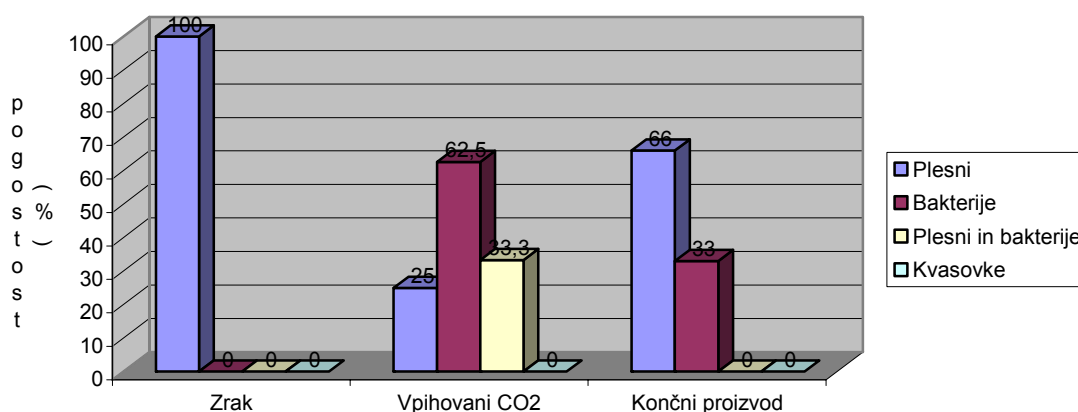
Med polnjenjem pijače z dodanim CO₂ smo vpihovali tudi CO₂ iz polnilnih igel in zračnega filtra na gojišče OA 1x. S tem smo želeli ugotoviti, ali so v vpihanem CO₂ in zraku prisotni mikroorganizmi, ki bi lahko pomenili tveganje za kontaminacijo brezalkoholne pijače z dodanim CO₂. Ugotovili smo, da je bilo neustreznih 25 % vzorcev zraka, 25 % vzorcev vpihovanega CO₂ in 10 % vzorcev končnih proizvodov (preglednica 24). Večje število neustreznih rezultatov smo določili v vpihanem CO₂ kot pa v vpihanem zraku iz polnilnih igel med polnjenjem izvirske vode.

Preglednica 24: Pogostost mikrobiološko neustreznih rezultatov vzorcev zraka, vpihovanega CO₂ in pijače z dodanim CO₂ na polnilni liniji 2

Vzorec	Št. vzorcev	Neustrezni rezultati	
		Število	%
Zrak v prostoru	12	3	25
Vpihani CO₂	32	8	25
Končni proizvod	117	12	10

Podrobnejši pregled rezultatov, v katerem smo določali pogostost posameznih skupin mikroorganizmov, ki so bili največkrat vzrok za neustrezne rezultate, je pokazal (slika 29), da so bile v zraku vzrok plesni, v vpihanem CO₂ in v končnem proizvodu pa je bil delež bakterij 62,5%, delež plesni pa 25%. Kvasovk v nobenem izmed vzorcev ni bilo prisotnih.

Vzorci zraka v prostoru so bili neustrezni zaradi plesni, v CO₂ pa smo poleg plesni izolirali še bakterije (slika 29). Tudi v končnem proizvodu smo izolirali bakterije in plesni, kar nakazuje na možnost kontaminacije izdelkov preko zraka in CO₂ v polnilnih iglah.



Slika 29: Pogostost plesni, kvasovk in bakterij izoliranih iz zraka, vpihovanega CO₂ in v pijači z dodanim CO₂

Polnjenje izvirske vode in brezalkoholne pijače z dodanim CO₂ poteka v septičnih razmerah. Kozic (2002) navaja, da mora v polnilnem delu procesa vedno prevladovati pozitivni zračni tlak. Ventilacije morajo biti urejene s filtrirnimi napravami in ta mora biti

nastavljena tako, da v vsakem primeru preprečuje kondenzacijo vlage v prostoru. Polnilna oprema mora biti brez oblog (karbonatnih ali drugih) in ne sme spuščati sredstev za mazanje. Vse naprave za proces polnjenja morajo biti iz nerjavečega materiala in tako obdelane, da se dajo čistiti z industrijskimi postopki čiščenja. Omenjeni parametri v polnilni liniji 2 tudi veljajo.

5.1.3 Rast mikroorganizmov v končnih proizvodih (brezalkoholnih pijačah)

Prisotnost mikroorganizmov ali njihovih spor v zraku ali na površinah pomeni mikrobiološko tveganje za kontaminacijo končnega proizvoda. Z mikroorganizmi, ki smo jih izolirali iz zraka in površin polnilne linije 1, smo umetno kontaminirali končne proizvode, ki jih polnijo na aseptični in septični polnilni liniji. Tako smo želeli preveriti možnosti, da lahko mikroorganizmi, ki smo jih izolirali iz zraka ali površin, lahko povzročijo kvar končnih proizvodov, ki jih polnijo na obeh linijah.

Brezalkoholne pijače imajo visok a_w (vodna aktivnost), ki omogoča rast mikroorganizmom. Poleg vodne aktivnosti imajo pomemben vpliv tudi vrednost pH in vsebnost sladkorja, ki omogočajo rast mikroorganizmom v takih pijačah (Battey in sod., 2001).

Za pijače, ki jih polnijo na omenjeni liniji velja, da je pH v območju med 3,0 – 3,5. Vsi mikroorganizmi imajo svoj pH, pri katerem lahko rastejo in optimalni pH, pri katerem rastejo najhitreje. Kvasovke in plesni običajno niso tako občutljive na pH, kot bakterije in lahko rastejo pri nizkih pH vrednosti. Na primer plesni rodu *Fusarium* lahko rastejo v območju pH od 1,8 – 11. Praviloma imajo plesni optimalni pH med 3,0 in 3,5, bakterije med 6,8 in 7,2 in kvasovke med 4,0 in 4,5 (Garbutt, 1997).

Edino v pijači A, ki jo polnijo na polnilni liniji 2 nismo opazili nobenih vizualnih sprememb, ki bi bile posledice kvara. Pijača A ima izmed vseh naštetih pijačah najnižji pH, edina vsebuje CO₂, vsebuje pa tudi fosforno in citronsko kislino, ki služita kot sredstvi za uravnavo kislosti pijače. CO₂ je plin, ki deluje kot konzervans. Lazar Hari (1979) navaja, da so mikroorganizmi večinoma aerobi, kar pomeni, da potrebujejo za svojo rast in razmnoževanje kisik. V brezalkoholnih pijačah z dodanim CO₂ bi torej lahko živeli, le fakultativni anaerobi, medtem ko striktni aerobi odmrejo že neposredno po polnjenju.

5.2 SKLEPI

Na podlagi zbranih podatkov in rezultatov naše naloge lahko podamo naslednje ugotovitve:

- Povečano število mikroorganizmov v proizvodnem okolju polnilne linije 1 (površine in zrak v septičnem in aseptičnem prostoru) je negativno vplivalo na kakovost oz. mikrobiološko ustreznost končnih proizvodov.
- Povečano število mikroorganizmov v proizvodnem okolju polnilne linije 2 (zrak v prostoru, CO₂) je negativno vplivalo na mikrobiološko ustreznost brezalkoholnih pijač z dodanim CO₂, medtem ko tega vpliva pri polnjenju izvirske vode nismo določili.
- Mikroorganizmi, ki smo jih izolirali in identificirali iz zraka, površin in embalaže polnilne linije 1 so po umetni kontaminaciji brezalkoholnih pijač, ki se polnijo na polnilni liniji 1, povzročili kvar teh pijač, kar pomeni, da njihova prisotnost v okolju polnilne linije pomeni možno mikrobiološko tveganje za končni proizvod.
- Za zagotavljanje mikrobiološke ustreznosti končnih proizvodov je potrebno izvajati mikrobiološki nadzor surovin, končnih proizvodov in tehnološkega procesa vključno s postopki sanitacije ter higienskih razmer okolja, v katerem tehnološki proces poteka.

6 POVZETEK

Namen diplomskega dela je bil, ugotoviti v kakšni meri higiensko stanje polnilnih linij in proizvodnega okolja za brezalkoholne pijače vpliva na kakovost in mikrobiološko obstojnost končnih proizvodov. V praktično delo smo vključili dve polnilni liniji, od katerih na eni polnilni liniji poteka polnjenje brezalkoholnih pijač brez dodanega CO₂ v aseptičnih razmerah, na drugi polnilni liniji pa poteka polnjenje izvirske vode in brezalkoholne pijače z dodanim CO₂ v septičnih razmerah.

Higiensko stanje linije, kjer polnjenje poteka v aseptičnih razmerah smo po vzorčenju površin z brisi in volumetričnim vzorčenjem zraka mikrobiološko ovrednotili. Brise smo uporabljali za ugotavljanje higienskega stanja v proizvodnem obratu na polnilni liniji tako v aseptičnem kot septičnem prostoru polnilne linije, kjer polnjenje poteka v aseptičnih razmerah. Vzorčili smo delovno površino sestavnih delov polnilne linije (tekoči trak, polnilni stroj, zapiralni stroj), površino tal, stene in embalaže. Za vzorčenje smo uporabili sterilne plastične epruvete v katerih je bilo 5 mL sterilne fiziološke raztopine. Število mikroorganizmov smo glede na izvedeno mikrobiološko preiskavo izrazili kot število mikroorganizmov v 5 mL brisa (CFU/5mL).

Na snažnost okolja obeh polnilnih linij vpliva tudi aerosol, ki je eden od dejavnikov higiene prostorov, v katerih poteka proizvodnja živil. Ker je aerosol lahko vir ali vektor prenosa patogenih mikroorganizmov, prašnih delcev, vodnih kapljic in delcev kože, ki lahko povzročijo kontaminacijo končnih proizvodov, smo z vzorčevalnikom zraka v prostorih obeh polnilnih linij vzorčili tudi zrak. Po končanem vzorčenju smo plošče z gojiščem v laboratoriju inkubirali. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije in to število pretvorili v korigirano število kolonij in število mikroorganizmov izrazili kot koncentracijo mikroorganizmov na volumsko enoto zraka (CFU/m³).

Poleg mikrobioloških preiskav brisov in zraka, smo z metodo membranske filtracije ugotavljali tudi mikrobiološko ustreznost končnih proizvodov (pijače B-H), ki jih polnijo v prostoru aseptične polnilne linije in ene izmed surovin, ki jo uporabljajo za pripravo brezalkoholnih pijač, ki jih polnijo v aseptičnih razmerah. Z metodo membranske filtracije smo ugotavljali tudi mikrobiološko ustreznost izvirske vode, ki jo polnijo v septični polnilni liniji. Plošče z strjenim gojiščem OA1x, na katero smo položili membranski filter papir preko katerega smo filtrirali vzorec brezalkoholne pijače ali deaerirane vode, smo nato inkubirali v termostatu 48 ur pri 30 °C. V primeru filtracije izvirske vode smo filter položili na sterilna gojišča laktozni agar s tergitilom, *Pseudomonas agar* in Slanetz & Bartley medium ter inkubirali 48 ur pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo prešteli kolonije mikroorganizmov in jih izrazili kot število mikroorganizmov v volumnu prefiltriranega vzorca in sicer za brezalkoholne pijače (CFU/ 500 mL vzorca), za izvirsko vodo (CFU/ 250 mL vzorca) in za deaerirano vodo (CFU / 330 mL vzorca).

Po zaključku mikrobiološke preiskave določenega vzorca (bris, zrak, živilo), smo izbrane kolonije kvasovk, plesni in bakterij, aseptično z cepilno zanko, nacepili v končne proizvode.

S tem smo želeli ugotoviti, ali lahko mikroorganizmi, ki smo jih izolirali iz zraka, površin in embalaže polnilnih linij povzročijo kvar v teh pijačah, kar pomeni, da njihova prisotnost v okolju polnilne linije pomeni mikrobiološko tveganje za končni proizvod.

Ugotovili smo, da je večina mikroorganizmov, ki smo jih izolirali iz površin in zraka, ter nato nacepili v brezalkoholne pijače, ki jih polnijo na obeh polnilnih linijah (aseptična in septična), povzročala kvar v večini pijač, ki jih polnijo v aseptičnih razmerah.

Možno povezavo med kontaminacijo okolja in kontaminacijo končnega izdelka smo ugotovili z identifikacijo plesni vrste *Paecilomyces marquandii*. Izolirali smo jih v pijači, ki jo polnijo v aseptičnih razmerah, na površini tekočega traku, po katerem potujejo pokrovčki in znotraj zapiralne glave, ki pokrovček privije na vrat plastenke. Kljub temu, da je pijača pred polnjenjem pasterizirana, da je plastenka pred polnjenjem razkužena, je do kontaminacije pijače najverjetnje prišlo v fazi zapiranja plastenk, torej v zaključni fazi, ki poteka v aseptičnem prostoru.

Polnjenje izvirske vode v septični polnilni liniji je iz mikrobiološkega vidika neproblematično, saj v zraku, ki je v prostoru polnilne linije in v vpihanem zraku iz polnilnih igel in zračnega filtra, nismo odkrili koliformnih bakterij, enterokokov in bakterij vrste *Pseudomonas*, poleg tega pa so bili vsi rezultati mikrobioloških preiskav izvirske vode ustrezni. Ker se linija nahaja v septičnih razmerah, pomeni da so na površinah in v zraku prisotni mikroorganizmi, vendar le-ti ne vplivajo negativno na mikrobiološko ustreznost izvirske vode. Poleg izvirske vode na omenjeni polnilni liniji polnijo tudi pijačo z dodanim CO₂, ki pa zaradi svoje sestave (vsebnost CO₂, fosforna kislina, ki deluje kot konzervans) ni tako občutljiva kot recimo pijače, ki ne vsebujejo konzervansov.

Na kakovost brezalkoholnih pijač nedvomno vplivajo mikrobiološka ustreznost surovin, embalaže, zraka, higiensko stanje polnilne linije v prostorih katere poteka tehnološki postopek polnjenja in učinkovitost čiščenja ter razkuževanja opreme v polnilni liniji. Nenehen nadzor zgoraj omenjenih parametrov je pogoj za mikrobiološko ustreznost končnih proizvodov.

7 VIRI

- Adamič J., Smole-Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole-Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-45
- Battey A.S., Duffy S., Schaffner D.W. 2001. Modeling mould spoilage in cold-filled ready-to drink beverages by *Aspergillus niger* and *Penicillium spinulosum*. Food Microbiology, 5, 18: 521-529
- Brown K.L. 2005. Guidelines on air quality standards for the food industry. 2nd ed. Gloucestershire, Campden & Chorleywood Food Research Association Group: 142 str.
- Brown K.L. 2003. Control of airborne contamination. V: Hygiene in food processing. Lelieveld M., Mostert A., Holah J., White B. (eds.). Cambridge, Woodhead: 106-121
- Filling and packaging. 2006. Dortmund, KHS Maschinen and Anlagenbau Aktiengesellschaft (januar 2006)
http://www.khs.com/img/pool/1070_Capping%20Technology.pdf (februar 2006): 12 str.
- Cegnar F. 1979. Mikrobiologija embalaže za živila. V: Živilska mikrobiologija. 5. Bitenčevi živilski dnevi '79, Ljubljana, 14-15 dec. 1979. Adamič J., Bučar F. (ur.) Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 71-93
- DiGiacomo R., Gallagher P. 2001. Soft drinks. V: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Downes F., Ito K. (eds.). Washington, American Public Health Association: 569 -571
- Edberg S.C. 1998. Microbiology of treated bottled water. V: Technology of bottled water. Senior D., Ashurst P. (eds.). Sheffield, Sheffield Academic Press: 274-288
- Evancho M.G, Sveum H.W., Moberg J.L., Frank F.J. Microbiological monitoring of the food processing environment. V: Microbiological examination of foods. 3rd ed. Downes P.F., Ito. K (eds.). Washington, American Public Health Association: 25-35
- Garbutt J. 1997. Essentials of food microbiology. 1st ed. London, Arnold: 250 str.
- Gammel M., Keller M. 2001. From prince charming to PET. KHS Journal, 1:23-26
- Jeršek B. 2005. Praktikum mikrobiološke analize živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 44 str.
- Jeršek B. 2003. Higiena živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 60str.

- Jeršek B. 2004. Metodologija odkrivanja mikrobiološke kontaminacije živil. V: Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 99-109
- Jeršek B. 2005. Sledenje mikroorganizmov. V: Sledljivost živil. 23. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 31. marec in 1. april 2005. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 199-209
- Kemija: (leksikon). 2004. Tržič, Učila International: 442 str.
- Kim H., Feng P. 2001. Bottled water. V: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Downes F., Ito K. (eds.). Washington, American Public Health Association: 573 -576
- Klofutar C. 1997. Termodinamska aktivnost vode. V: Moderne tehnologije predelave in kakovost živil. 18. Bitenčevi živilski dnevi '97. Ljubljana, 12-13 jun. 1997. Žlender B., Gašperlin L. (ur.) Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 21-33
- Kokol P. 1979. Osnove CIP postopka za čiščenje, njegova uporabnost in obratna kontrola. V: Živilska mikrobiologija. Bitenčevi živilski dnevi '79, Ljubljana, 14-15 dec. 1979. Adamič J., Bučar F. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 169-181
- Koren I. 2002. HACCP v proizvodnji brezalkoholnih pijač. V: Priročnik za postavljanje in vodenje sistema HACCP. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Slovenski inštitut za kakovost in meroslovje; Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 459-470
- Kozic V. 2002. HACCP v proizvodnji mineralne vode. V: Priročnik za postavljanje in vodenje sistema HACCP. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Slovenski inštitut za kakovost in meroslovje; Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 490-501
- Kržan J. 1977. Tehnologija priprave bakteriološko čiste vode. V: Voda. 3. živilski dnevi, Ljubljana, 1977. Bučar F. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 133-137
- Lazar Hari M. 1979. Stopenjski mikrobiološki nadzor pri pridobivanju brezalkoholnih gaziranih pijač. V: Živilska mikrobiologija. Bitenčevi živilski dnevi '79, Ljubljana, 14-15 dec. 1979. Adamič J., Bučar F. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 117-124
- Lelieveld H., Mostert M., Holah J., White B. 2003. Hygiene in food processing. Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 106-121
- Madigan M., Martinko J., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th ed. London, Pearson Education: 137-167

- Morris G., Kokki M.H., Anderson K., Richardson M.D. 2000. Sampling of *Aspergillus* spores in air. *Journal of Hospital Infection*, 44: 81-92
- Ocvirk R. 2005. Spore *Aspergillus* spp. v zraku Kliničnega oddelka za hematologijo Kliničnega centra v Ljubljani. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek medodelčnega študija mikrobiologije: 8-12
- Orth R. 1998. The importance of disinfection for the hygiene in the dairy and beverage production. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41: 201-208
- Poček B. 1990. Voda za piče. Beograd, Savezni zavod za zdravstveno zaščito: 843 str.
- Pokorn J. 1990. Mikrobiologija v živilskih procesih. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Živilska tehnologija: 120 str.
- Ponikvar M., Jeršek B. 2002. Tehnično higienski pogoji v procesu. V: Priročnik za postavljanje in vodenje sistema HACCP. Raspor P. s sodelavci (ur.). Ljubljana, Slovenski inštitut za kakovost in meroslovje; Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 51-70
- Portnoy J.M., Barnes C. S., Kennedy K. 2004. Sampling for indoor fungi. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113, 2: 189-198
- Pravilnik o naravni mineralni vodi, izvirski vodi in namizni vodi. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 50: 6761-6768
- Pravilnik o spremembah in dopolnitvah Pravilnika o naravni mineralni vodi, izvirski vodi in namizni vodi. 2005. Uradni list Republike Slovenije, 15, 75: 8039-8040
- Pravilnik o pitni vodi. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 19: 2155-2166
- Raspor P. 2002. Definicija sistema HACCP in načel HACCP. V: Priročnik za postavljanje in vodenje sistema HACCP. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Slovenski inštitut za kakovost in meroslovje; Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 113-126
- Samson A. R., van Reenen-Hoekstra S. E. 1988. Introduction to food-borne fungi. 3rd ed. Baarn, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 299 str.
- Samson A. R., Hoekstra E. S., Frisvad J. C., Filtenborg O. 2000. Introduction to food-and airborne fungi. 6th ed. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 387 str.
- Sandeep K.P., Simunovic J. 2006. Aseptic procesing: basic principles and advantages. V: Handbook of food science, technology, and engineering. Hui Y.H. (ed.). Vol. 3. Boca Raton, CRC Press Taylor & Francis Group: 123-1 – 123-11

- Smole Možina S. 2003. Metode mikrobiološke preiskave živil. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 87-113
- Stetzenbach L., Buttner M., Cruz P. 2004. Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Current Opinion in Biotechnology*, 15: 170-174
- Stevenson K. 1992. Aseptic processing and packaging. V: *Encyclopedia of food science and technology*. Vol.1 Hui Y.H. (ed.). New York, Wiley – Interscience Publication:128-136
- Suwa Stanojević M. 1999. Tehnologija osvežilnih pijač in sadnih sokov. Tehnologija sadja, vrtnin in pijač. Prvi natis. Ljubljana, Zavod Republike Slovenije za šolstvo: 218-224
- Tomašič A. 1996. Sanitacija v obratih živilske industrije. V: Milohnoja M., Tomašič A. Higiena v proizvodnji in prometu z živili. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 102-137
- Vickers F.G. 1998. Filling equipment. V: *Technology of bottled water*. Senior D., Ashurst P. (eds.). Sheffield, Sheffield Academic Press: 139-170
- Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili. 2000. Uradni list Republike Slovenije, 10, 52: 6949-6955
- Zakon o spremembah in dopolnitvah o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili. 2002. Uradni list Republike Slovenije, 12, 42: 4072-4075
- Wershofen T. 2003. Practical experience with cold aseptic filling lines from the viewpoint of manufacturer of cleaning agents and disinfectants. *Brauwelt*, 143, 44: 1434-1440
- Mikrobiološki parametri. 2006. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije (januar 2005)
http://www.ivz.si/javne_datoteke/datoteke/851-Parametri_mikrobioloski.doc (september 2006): 4str.

ZAHVALA

Mentorici doc. dr. Barbari Jeršek se iskreno zahvaljujem za pomoč in izkazano potrpljenje pri nastajanju diplomske naloge, koristne napotke, strokovne popravke in preglede diplomskega dela.

Doc. dr. Andreju Plestenjaku se zahvaljujem za izredno strokoven in natančen pregled diplomske naloge, ki ga je opravil v vlogi recenzenta. Hvala za vse nasvete in strokovne popravke, ki so dali moji diplomski nalogi še dodatno težo.

Posebna zahvala je namenjena g. Janezu Kešnarju - direktorju službe kakovosti v Pivovarni Union, delovni mentorici ge. Barbari Pellis - vodji mikrobiološkega laboratorija, gdč. Špeli Sušnik - vodji HACCP sistema in g. Gregorju Pernetu - samostojnemu mikrobiologu. Vsem se iskreno zahvaljujem za ponujeno priložnost, za odlično strokovno vodenje, za poglobljene razprave ob dobljenih rezultatih, za čas ko ste mi znali prisluhniti predvsem pa za moralno podporo v dneh, ko je šlo vse narobe. Prav tako se zahvaljujem tudi vsem zaposlenim v podjetju.

Zahvaljujem se tudi uni. dipl.bibl. Barbari Slemenik, za prijaznost in pomoč pri iskanju literature. Najlepša hvala tudi univ. dipl. inž. Ivici Hočevar za svetovanje pri oblikovanju diplomskega dela ter dokumentacijski opremi naloge.

Posebna zahvala je namenjena tudi mojim staršem in najbližjim. Hvala za vso podporo tekom študija, za vzpodbudne besede med nastajanjem diplomskega dela, predvsem pa, da ste vseskozi verjeli vame.