

Mikrobiologická analýza lyofilizovaných potravin

Sandra Labudová

Bakalářská práce
2023



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Sandra Labudová**
Osobní číslo: **T20345**
Studijní program: **B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin**
Specializace: **Potravinářské biotechnologie a aplikovaná mikrobiologie**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Mikrobiologická analýza lyofilizovaných potravin**

Zásady pro vypracování

Teoretická část

Lyofilizované potraviny a výskyt mikroorganismů v těchto potravinách

Možnosti detekce mikroorganismů v lyofilizovaných potravinách

Praktická část

Mikrobiologická analýza vybraných lyofilizovaných potravin

Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce

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

Seznam doporučené literatury:

CHITRAKAR, B., ZHANG, M., ADHIKARI, B. Dehydrated foods: Are they microbiologically safe? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59: 2734-2745. 2019.

ALP, D., BULANTEKIN, O. The microbial quality of various foods dried by applying different drying methods: a review. *European Food Research and Technology*, 247: 1333-1343. 2021.

MORASI, R.M., MORES RALL, V.L. et al. *Salmonella* spp. in low water activity food: Occurrence, survival mechanisms, and thermoresistance. 2022. doi: 10.1111/1750-3841.16152.

BEUCHAUT, L.R., KOMITOPOULOU, E. et al. Low-water activity foods: Increased concern as vehicles of foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 76: 150-172. 2013.

ICMSF – International Commission on Microbiological Specification for Foods. *Microorganisms in foods 6*. 2nd ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 2005.

Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně.

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

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

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

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2023

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce bylo stanovení počtu vybraných indikátorových mikroorganismů ve vzorcích lyofilizovaných potravin, konkrétně v ovoci. Práce obsahuje teoretickou část, která je zaměřena na popis a charakteristiku technologického procesu lyofilizace a využití lyofilizovaných potravin. Dále je zaměřena na mikroorganismy, které se v lyofilizovaných potravinách mohou vyskytovat a metody detekce těchto mikroorganismů. Experimentální část se zabývá mikrobiologickou analýzou lyofilizovaného a sušeného ovoce. Ze získaných výsledků bylo zjištěno, že u sušeného ovoce byla menší mikrobiologická kontaminace než u lyofilizovaného ovoce. Nejvyšší počet plísní a kvasinek byl stanoven u lyofilizovaných malin. Nejvyšší počet růstově náročných bakterií byl stanoven u lyofilizovaných višní, kiwi a jablečných plátků a sporující bakterie byly detekovány u lyofilizovaných banánových plátků.

Klíčová slova:

Lyofilizované potraviny, mikroorganismy, mikrobiologická analýza, lyofilizace

ABSTRACT

The aim of this bachelor's thesis was the microbiological determination of the number of microorganisms in selected samples of freeze-dried food, specifically in fruit. The work contains a theoretical part, which is focused on the description and characteristics of the technological process of lyophilization and the use of lyophilized foods. It is also focused on microorganisms that can occur in freeze-dried foods and methods of detecting these microorganisms. The experimental part deals with the microbiological analysis of freeze-dried and dried fruit and the preparation of cultivation soils. From the obtained results, it was found that the dried fruit had less microbiological contamination than the freeze-dried fruit. The highest number of molds and yeasts was determined in lyophilized raspberries. The highest number of fastidious bacteria was determined in freeze-dried cherries, kiwi and apple slices, and sporulating spores were detected in freeze-dried banana slices.

Keywords:

Freeze-dried food, microorganism, microbiological analysis, lyophilization

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé práce prof. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat také své rodině a svému příteli za velkou podporu po celou dobu mého studia.

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 LYOFILIZOVANÉ POTRAVINY	11
1.1 VÝROBA LYOFILIZOVANÝCH POTRAVIN	11
1.1.1 Předúprava.....	12
1.1.2 Zmrazení	12
1.1.3 Primární sušení (sublimace ledu)	13
1.1.4 Sekundární sušení.....	13
1.1.5 Průběh lyofilizace.....	14
1.1.6 Skladování lyofilizovaných potravin	14
1.2 LYOFILIZÁTOR.....	15
1.2.1 Produktová komora	15
1.2.2 Police.....	16
1.2.3 Kondenzátor	16
1.2.4 Kapalinový policový systém.....	16
1.2.5 Vakuový systém	16
1.2.6 Chladicí systém	16
1.2.7 Řídicí systém.....	17
1.3 VLASTNOSTI LYOFILIZOVANÝCH POTRAVIN	17
2 MIKROORGANISMY PŘÍTOMNÉ V LYOFILIZOVANÝCH POTRAVINÁCH.....	18
2.1 VYBRANÉ MIKROORGANISMY PŘÍTOMNÉ V LYOFILIZOVANÝCH POTRAVINÁCH	19
2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	19
2.1.2 <i>Cronobacter</i> spp.	20
2.1.3 <i>Salmonella</i> spp.	20
2.1.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.1.5 <i>Penicillium</i> spp.....	22
2.1.6 <i>Aspergillus</i> spp.	23
2.2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ RŮST MIKROORGANISMŮ V DEHYDRATOVANÝCH POTRAVINÁCH	23
2.2.1 Teplota.....	24
2.2.2 Ultrazvuk.....	25
2.2.3 Tlak	25
2.2.4 Záření	25
2.2.5 Osmotický tlak	26
2.2.6 Vodní aktivita a_w	26
2.2.7 Redoxní potenciál E_h	27
2.2.8 pH.....	27
2.2.9 Antibiotika.....	27
3 METODY DETEKCE MIKROORGANISMŮ.....	29
II PRAKTICKÁ ČÁST	32

4	CÍL PRÁCE	33
5	MATERIÁL A METODY	34
5.1	TESTOVANÉ VZORKY SUŠENÉHO OVOCE.....	34
5.2	ZJIŠŤOVANÉ MIKROORGANISMY	41
5.3	METODIKA	41
5.3.1	Kultivační média a jejich příprava	41
5.3.2	Příprava vzorků, inokulace a kultivace	43
5.3.3	Použité pomůcky a přístroje.....	44
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	45
6.1	MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA SUŠENÉHO A LYOFILIZOVANÉHO OVOCE	45
6.2	DISKUZE.....	54
	ZÁVĚR	58
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	59
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	64
	SEZNAM OBRÁZKŮ	65
	SEZNAM PŘÍLOH.....	67

ÚVOD

V posledních letech byl zaznamenán vyšší zájem o lyofilizované potraviny, což jsou potraviny, které byly vysušeny ve vakuu ve zmrazeném stavu, aby došlo ke snížení jejich hmotnosti a ke zvýšení jejich trvanlivosti. Tento proces výroby potravin je stále populárnější. Lyofilizace umožňuje zachování všech výživových hodnot, organoleptických vlastností včetně chuti a barvy, což vede k produkci kvalitních potravin. Lyofilizované potraviny jsou používány kromě potravinářského průmyslu i v jiných oblastech, jako je například vojenství či kosmologie. Díky své vysoké kvalitě, a hlavně dlouhé trvanlivosti, dosáhly tyto potraviny velké oblibě mezi spotřebiteli.

Nicméně i lyofilizované potraviny mohou nést určitou mikrobiální zátěž, což může mít vliv na bezpečnost potravin. Potraviny se tak mohou stát dobrým místem pro mikroorganismy, které mohou způsobovat alimentární nemoci. Proto je důležité dodržovat stanovené hygienické podmínky při technologickém zpracování a styku s potravinami, aby byla zajištěna bezpečnost spotřebitele.

Tato bakalářská práce je zaměřena převážně na lyofilizované ovoce. Teoretická část je zaměřena na proces lyofilizace a vlastnosti těchto potravin. Dále jsou zde popisovány mikroorganismy vyskytující se v lyofilizovaných potravinách a faktory, které ovlivňují jejich výskyt. Ještě jsou zde uvedené některé metody detekce mikroorganismů.

V praktické části je popsána provedená mikrobiologická analýza vybraných lyofilizovaných a sušených druhů ovoce, u kterých byly následně spočítány vyrostlé kolonie a vypočítáno CFU/g.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 LYOFILIZOVANÉ POTRAVINY

Po druhé světové válce lidé hledali možné způsoby, jak nejlépe uchovat a konzervovat potraviny, aniž by bylo nutno je neustále chladit. Rozhodli se využít procesu lyofilizace. Prvním potravinářským produktem, který byl lyofilizován, byla káva. Postupem času došlo k rozšíření o různé druhy ovoce, zeleniny, masa, bylinek a také mléčných výrobků. (Alp a Bulantekin, 2021)

Lyofilizace je též nazývána jako sublimační sušení. Patří mezi nejšetrnější metody využívané v potravinářském průmyslu. Proces spočívá v rychlém zamrazení potravin tak, aby nedošlo k porušení struktury potraviny krystalky ledu. (Kadlec, 2003)

Průběh lyofilizace je značně pomalý, což má za následek vysoké náklady na energie, které jsou pro tento proces nezbytné. Celkově se tedy jedná o značně ekonomicky nákladnou metodu, proto se zpravidla využívá jen pro drahé potraviny a suroviny, které mají jemnou strukturu či aroma, například káva, maso, zelenina a ovoce, plody moře a podobně, nebo u potravin, kde je nutné prodloužit jejich údržnost v nezměněném stavu a zároveň v malém skladovacím objemu. Ve výsledku nedojde ke změnám organoleptických vlastností ani nutričních hodnot. (Fellows, 2022)

Ovšem ne všechny potraviny jsou vhodné pro sušení mrazem. Před lyofilizací je vhodné ovoce a zeleninu nejprve nakrájet na menší kousky, to stejné se doporučuje i pro maso či mořské plody. U některých potravin je lyofilizace velmi nákladná a tudíž neefektivní. I když je sušení mrazem (lyofilizace) v současnosti hojně používanou technikou v potravinářském průmyslu, pořád je snaha modernizovat a zdokonalovat podmínky tohoto procesu. Úkolem je zlepšit vlastnosti potravin různými předúpravami, snížit celkovou dobu procesu a udělat tuto technologii finančně dostupnější. (Prosapio a Lopez-Quiroga, 2020)

1.1 Výroba lyofilizovaných potravin

Proces lyofilizace je složen ze čtyř hlavních kroků, mezi které se řadí předúprava, zmrazení, primární sušení a sekundární sušení (desorpce vlhkosti). (Kumar, 2019)

1.1.1 Předúprava

Aby bylo možné lyofilizovat daný produkt, nejprve je potřeba tento produkt, jakkoliv upravit. Existuje celá řada úprav, kterými je možno dosáhnout lepšího průběhu zmrazování. Je možno vybraný produkt nakrájet, čímž zmenšíme produkt na kousky nebo můžeme využít ředění a produkt naředit. Dalším způsobem úpravy je přidání různých složek, čímž dosáhneme stabilnějšího výsledného produktu. (The Freeze Drying Theory and Process, 2018)

1.1.2 Zmrazení

V tomto kroku je voda oddělena od ostatních složek produktu, následně dochází k jejímu zamrznutí, a to má za následek vznik ledových krystalů. Než bude možné přistoupit k dalšímu kroku, kterým je primární sušení, bude to trvat několik hodin. Proces zmrazení je nejdůležitějším postupem celého procesu lyofilizace. V průběhu zmrazení dochází k tvorbě pórů, které hrají důležitou roli při následném primárním i sekundárním sušení. Jejich tvar totiž může ovlivňovat rychlost, jakou se bude přenášet potřebné teplo při sušení. Tvorba ledových krystalů také ovlivňuje další fáze procesu lyofilizace. Vzniklé krystaly by měly splňovat určité parametry, aby nedocházelo k narušení průběhu sušení. Například jsou-li krystaly malé a nepravidelného tvaru, může dojít ke zpomalení sušení, čímž se celkový proces zbytečně zpomalí. (Varzakas, 2015)

Celý průběh zmrazení je uskutečňován v přístroji zvaném lyofilizátor. Teploty uvnitř tohoto zařízení se nejčastěji pohybují v rozsahu od -40 do -60 °C, někdy ale teploty mohou dosahovat až -80 °C. Dodržováním správných teplot je dosaženo kvalitnějšího výsledného produktu. Na konci každého zmrazení je nutné ověřit, zdali vše proběhlo správně. K tomu se používá tzv. tepelná analýza, mezi kterou můžeme zařadit metody, jako je např. kryomikroskopie nebo skenovací kalorimetrie a jiné. Nevýhodou tepelné analýzy je, že nepodává zcela stoprocentní výsledky a tím není možno se na ni stoprocentně spoléhat. Pokud by došlo během zmrazení k narušení struktury zmrazovaného produktu může výsledný produkt vykazovat nežádoucí vlastnosti, jako jsou např. nafouknutí, lepkavost, scvrknutí a mnoho jiných. Například u jablečného džusu při teplotě okolo -42 °C může docházet ke zhoršení organoleptických vlastností. U kávového extraktu se vlastnosti zhoršují už při -20 °C. (The Freeze Drying Theory and Process, 2018)

1.1.3 Primární sušení (sublimace ledu)

Ve fázi primárního sušení dochází k sublimaci ledu neboli jeho přeměně rovnou na páru. Proces je založen na tlakovém rozdílu, který je vytvořen mezi vznikající vodní párou ledové plochy a parciálním tlakem vodní páry proudící v sušárně. Aby bylo docíleno správného vysušení produktu, je potřeba si zvolit ideální teplotu na kterou daný produkt zahřejeme a tuto teplotu zachovat po celou dobu sušení. Největší úlohu v tomto procesu hraje parciální tlak. Pokud chceme, aby sublimace ledu byla rychlejší, bude třeba nastavit nízký parciální tlak v komoře. Nastane-li situace, že by byl tlak snížen až na velmi nízké hodnoty, mohlo by to vést k znehodnocení vysoušeného produktu. Proto se doporučuje pracovat s tlakem v hodnotách 50–200 mTorr. (Varzakas, 2015)

Jak už bylo uvedeno výše, je nutné sledovat a kontrolovat optimální teplotu chlazení. Teplota z velké části ovlivňuje i sublimační ochlazování. Dodáváním dostatečného množství tepla urychlujeme sušení, totéž platí na základě fyzikálních pravidel i opačně. Podmínkou je, že nesmí dojít k dodání velkého množství tepla. To by mohlo vést jednak k omezení rychlosti celého procesu a také by mohlo dojít k poškození ledových krystalů. Dodat potřebné teplo do produktu můžeme radiací, plynnou konvencí mezi produktem a molekulami zbytkového plynu v komoře přístroje, nebo přímým kontaktem mezi dnem nádoby a deskou přístroje. Projevy nesprávného provedení primárního sušení, to znamená nedodržením některých výše uvedených podmínek, mohou být deformace produktu, které se většinou projevují smršťováním, lepivostí, nafouknutím, nebo může dojít k roztavení, případně až k rozpadu produktu. (Introduction to Freeze Drying, 2020)

1.1.4 Sekundární sušení

Po primárním sušení následuje po minimální časové prodlevě další sušení, též nazývané desorpce vlhkosti nebo jen sekundární sušení. Toto sušení se od toho primárního liší právě nepřítomností ledu. V tomto kroku dochází k odstranění vody, která je vázaná v produktu, obsah vázané vody z celkového obsahu vody v produktu činí tedy okolo 10–35 %. Samotné odstranění vody vázané je mnohdy komplikovanější a časově náročnější než eliminování vody volné. K odstranění této přebytečné vody je využíváno vakuum. Ve vakuu dojde k ohřátí lyofilizovaného produktu a zároveň k odpaření vody. Podobně jako u primárního sušení, je i v této fázi nutné dodržet danou podmínku, aby nedošlo k poškození produktu. Zmiňovanou podmínkou je, že by nemělo být dodáváno nadbytečné množství tepla.

Jak už bylo dříve zmíněno, velké množství tepla může mít destruktivní účinky na námi sušený produkt. Protože je většina používaných surovin termolabilních, doporučuje se u výsledného produktu monitoring finálního obsahu vlhkosti. (Mujumdar, 2006)

Po ukončení procesu lyofilizace by mělo být s finálním produktem zacházeno dle doporučených podmínek a měl by být uchovávan při vhodných podmínkách. (Prosapio a Lopez-Quiroga, 2020)

1.1.5 Průběh lyofilizace

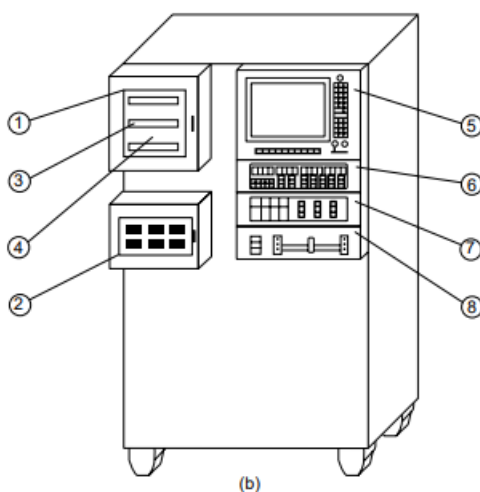
Lyofilizace se může jevit jako velmi jednoduchý a časově nenáročný technologický proces, čemuž tak ve skutečnosti není. Tato metoda, co se týče času, je hodně zdlouhavá. Nejdříve je nutné si daný vzorek připravit, což nám může zabrat několik minut, záleží však na množství. Je také vhodné dopředu nastavit přístroje. To může zabrat asi 30 minut až hodinu. Poté je nutné nechat produkt zmrazit. Doba zmrazení se může pohybovat mezi 10 až 30 hodinami. Po skončení mrazení následuje primární sušení, jehož doba je poměrně nestálá. Záleží totiž jaký produkt se suší a také v jaké podobě, zdali je to kapalina, pevná látka nebo jiná konzistence. Sekundární sušení obvykle trvá 1–10 hodin. Jak už bylo ale výše řečeno, doba lyofilizace se liší v závislosti na produktu, jeho množství a podobě. Jinak bude probíhat lyofilizace ovoce a zeleniny a jinak např. farmaceutických produktů. (Prosapio a Lopez-Quiroga, 2020)

1.1.6 Skladování lyofilizovaných potravin

Produkty, které prošly procesem lyofilizace je vhodné skladovat v suchém a temném prostředí, aby nedošlo k jejich znehodnocení či porušení. Doporučuje se skladování při teplotě asi 21 °C. Dále není vhodné výrobek vystavovat slunečnímu záření. Záleží ovšem také na způsobu balení. Pověštinou jsou k balení těchto produktů používány sáčky, ve kterých výrobek dokáže vydržet čerstvý několik měsíců, dokonce i let. Naopak u špatně uskladněných produktů hrozí velké riziko zvlhnutí, což může vést ke vzniku mikrobiální kontaminace. (Shukla, 2011)

1.2 Lyofilizátor

Při lyofilizaci je používán přístroj, který se nazývá lyofilizátor, který je znázorněný na obrázku 1. Tento přístroj je rozdělen na několik hlavních částí, které plní jednotlivé důležité úkoly. Těmi již zmiňovanými částmi jsou police, produktová komora, kapalinový policový systém, kondenzátor, chladicí systém, vakuový systém, řídicí systém a zátkač. (Mujumdar, 2006)



Obrázek 1: Složení lyofilizátoru (Mujumdar, 2006)

1. sušící komora, 2. kondenzátorová komora, 3. chladicí jednotka, 4. chladicí a topný systém, 5. počítačové zařízení, 6. indikátor a regulátor vakua, 7. panel na ovládání teploty, 8. tiskárna (Mujumdar, 2006)

1.2.1 Produktová komora

Je to pevná komora, do které je vkládán produkt určený k lyofilizaci. Tato komora je konstruována proti nepříznivým podmínkám, jako je přetlak, nedostatečný tlak a jiné, které mohou nastat při procesu lyofilizace. Materiál, ze kterého je tato část sestavena, je obvykle nerezová ocel, aby nedocházelo ke korozi a komora byla snadno čistitelná. Součástí produktové komory je vakuový senzor, police a systém usnadňující jejich pohyb. (Gaidhani, 2015)

1.2.2 Police

Jak už bylo řečeno u produktové komory, součástí lyofilizátoru jsou police, a to buď jedna či více. Obecně plní police při tomto procesu řadu úkonů. Jedním takovým je výměna tepla. Police mohou teplo odebírat z produktu, to se děje při zmrazování, anebo dodávat, a to většinou při fázi sušení. Police by měly být rovné a pevné, aby unesly váhu produktů. Spojení mezi policemi a systémem je umožněno soustavou hadic, ve kterých nejčastěji proudí olej, jelikož dobře vede teplo. (Deepak, 2013)

1.2.3 Kondenzátor

Kondenzátor dělíme na vnitřní, ten se vyskytuje uvnitř lyofilizátoru, a kondenzátor vnější, který se nachází obvykle zvenčí na zadní straně lyofilizátoru. Hlavním úkolem kondenzátoru je vázat rozpouštědlo, kterým je ve většině případů voda. Proto jsou pro jeho konstrukci voleny cívky a pláty, které jsou schopny vydržet ochlazování. (Deepak, 2013)

1.2.4 Kapalinový policový systém

Aby bylo možné, že police budou mít dostatečnou teplotu v průběhu procesu, je potřebné mít správně zavedený kapalinový policový systém. Právě zde dochází k cirkulaci kapaliny nejčastěji oleje, který je rozváděn celým systémem za pomoci čerpadla, a to vše za sníženého tlaku. Požadovanou teplota je nastavována vnějším systémem. (Gaidhani, 2015)

1.2.5 Vakuový systém

Součástí tohoto systému jsou vývěvy, které mění, zvyšují a snižují tlak v komorách. Tento tlak je potřebný především v obou fázích sušení. Vakuum je pečlivě kontrolováno jen při primárním sušení. (Deepak, 2013)

1.2.6 Chladicí systém

Chladicí systém je důležitý pro chlazení jednak polic a také kondenzátoru, aby nedošlo k jeho přehřátí. Tento systém je využíván především v raném procesu lyofilizace, kde je nutné produkt zmrazit. (Gaidhani, 2015)

1.2.7 Řídicí systém

Zdali je řídicí systém ovládán ručně nebo je plně automatizován to záleží na typu lyofilizátoru. Díky řídicímu systému je možné monitorovat a ohlídat hodnoty teploty a tlaku, které nesmí překročit limitní hranici. Další sledovanou veličinou je čas. Doba lyofilizace by měla být dodržena, aby se tak předešlo zbytečným komplikacím. (Deepak, 2013)

1.3 Vlastnosti lyofilizovaných potravin

Potraviny, které byly dehydratovány jinými metodami, mají oproti lyofilizovaným potravinám o něco nižší kvalitu. Potravin, které prošly procesem lyofilizace, mají značné výhody na rozdíl od jiných známých využívaných metod. Jednou z výhod je, že si potravina zachová svou autentičnost, a to ve smyslu barvy, chuti, aromatu, struktury a složení. Lyofilizace je zvláště šetrná pro suroviny citlivé na vysoké teploty. Lyofilizované potraviny pro svůj nízký obsah vlhkosti jsou vhodnou potravinou na dlouhé cestování, turistiku či jiné akce. Další kladnou věcí je i rychlá rehydratace těchto výrobků. Jelikož se jedná o šetrnou technologii, je možné výsledné produkty skladovat a přepravovat za pokojových teplot po delší dobu. (Liu, Zhang a Hu, 2022)

Mezi negativa lze uvést, že je považována za jednu z nejdražších metod sušení. Při této metodě je spotřebováno velké množství energie, další vysoké náklady se týkají provozu a údržby. Spotřeba energie u této technologie, je téměř dvojnásobná a náklady asi čtyřikrát až osmkrát vyšší ve srovnání s jinými metodami, například sušením vzduchem. Proto je tato metoda využívána jen pro velmi kvalitní a drahé potravinářské produkty. (Ratti, 2001)

Další nevýhodou lyofilizovaných potravin může být kontaminace mikroorganismy. U potravin, které již byly kontaminovány před samotnou lyofilizací, může dojít pouze k inhibici růstu mikroorganismů. Při pozdější rehydrataci tak dochází k obnovení jejich růstu a následnému množení. (Fellows, 2022)

Nevýhodou mohou být také složky obsaženy v ovoci, jako například cukry, polypeptidy aminokyseliny, organické kyseliny a jiné látky, které mohou sloužit pro mikroorganismy jako ochranná bariéra před procesem lyofilizace či jinými technologickými úpravami. Příkladem může být disacharid laktóza, jenž působí u kvasinek jako protekční látka před nepříznivými podmínkami. (Chitrakar, Zhang a Adhikari, 2019)

2 MIKROORGANISMY PŘÍTOMNÉ V LYOFILIZOVANÝCH POTRAVINÁCH

Člověk díky potravíně, ve které se mohou vyskytovat mikroorganismy, které přežily technologické zpracování, může být ohrožen nákazou či otravou. Tyto nákazy a otravy označujeme jako alimentární. Alimentární nákazy jsou úzce spjaty se surovinami, které jsou určeny ke konzumaci, a ve kterých se mohou vyskytovat mikroorganismy. Mikroorganismy, jejich spory nebo toxiny se tak do lidského těla dostávají právě po konzumaci mikrobiálně kontaminovaných potravin. Ve většině známých případů je napaden převážně gastrointestinální trakt člověka, což se projevuje hlavně průjmem, zvracením, bolestí břicha a hlavy, únavou, případně jinými projevy. Jak závažný průběh alimentární otrava nebo nákaza bude mít, se liší podle schopnosti imunitního systému každého jedince reagovat na nežádoucí agens. Za zmínku stojí také to, že existují hned dva způsoby, jak vzniká alimentární nákaza, a to primární a sekundární. Když se mikroorganismus už předtím vyskytoval v surovině, která je určena k přípravě pokrmů či k přímé spotřebě, jedná se o primární nákazu. Pokud se ale mikroorganismus dostal do potraviny během technologického zpracování nebo jakémkoliv technologickém procesu či skladování, pak mluvíme o sekundární nákaze. Proto se doporučuje oddělovat tepelně upravené potraviny a suroviny od syrových, zeleninu či ovoce umýt vodou a mnoho dalších preventivních opatření. (Rambousková a Hrnčířová, 2008)

Lyofilizované potraviny obvykle obsahují zbytkovou vlhkost a jejich hodnoty vodní aktivity pohybující se v rozmezí 0,03 – 0,70 mohou mít za následek výskyt hub, včetně plísní, či jiných patogenních mikroorganismů. Výsledky výzkumů potvrzují, že patogenní mikroorganismy, které jsou zodpovědné za alimentární nákazy, jsou schopné přežít v sušených produktech. Mezi tyto patogenní mikroorganismy patří *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, patogenní kmeny *Escherichia coli*, *Cronobacter* spp., *Bacillus cereus* nebo *Clostridium perfringens*. Jak bylo již dříve uvedeno, tyto mikroorganismy jsou schopné způsobit řadu zdravotních komplikací jako průjem, křeče, zvracení a v ojedinělých případech i smrt. (Chitrakar, Zhang a Adhikari, 2019)

Nežádoucími mikroorganismy, které se mohou vyskytovat třeba v lyofilizovaném ovoci nebo zelenině, jsou převážně kvasinky a mikroskopické vláknité houby neboli plísně rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. Tyto plísně jsou známé svou produkcí toxických látek zvaných

mykotoxiny, které mohou mít nepříznivý vliv na zdraví člověka. (Chitrakar, Zhang a Adhikari, 2019)

2.1 Vybrané mikroorganismy přítomné v lyofilizovaných potravinách

2.1.1 *Escherichia coli*

Tato bakterie patří mezi nejvíce a nejlépe prostudované bakterie. Je to gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinka, která disponuje fermentativním metabolismem a patří do čeledi Enterobacteriaceae. Běžně je součástí střevní mikrobioty jak člověka, tak i živočichů ale některé kmeny jsou považovány za patogeny produkující enterotoxiny. Růst *E. coli* na kultivační půdě je znázorněn na obrázku 2. (Němec a Matoulková, 2015)

Patogenní kmeny *Escherichia coli* napadají převážně gastrointestinální trakt, a to několika možnými způsoby. Právě podle těchto způsobů rozlišujeme EPEC, což je enteropatogenní *Escherichia coli*, vyvolávající vodnaté průjmy; EHEC neboli enterohemoragická *Escherichia coli*, která způsobuje krvavé průjmy, a mezi tyto řadíme i vysoce nebezpečnou *Escherichia coli* O157. Dále existuje ETEC – enterotoxigenní *Escherichia coli*, která způsobuje průjmy u dětí; EIEC – enteroinvazivní *Escherichia coli*, způsobující průjmy v místech se špatnými hygienickými návyky; EAEC – enteroagregativní a DAEC – difuzně agregativní *Escherichia coli*, projevující se průjmem u dětí v chudých oblastech. Přenos tohoto patogenního mikroorganismu je nejčastěji uskutečňován kontaminovanými potravinami. (Goering et al., Julák, 2016)

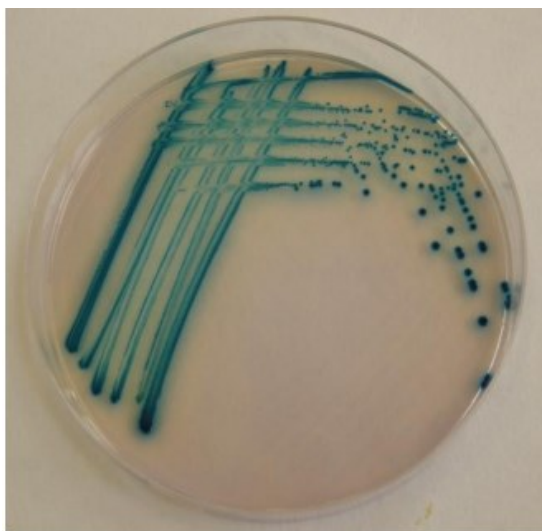


Obrázek 2: *Echerichia coli* na Endo agaru (Koukalová, 2013)

2.1.2 *Cronobacter* spp.

Cronobacter patří do čeledi Enterobacteriaceae a je to gramnegativní bakterie tvaru tyčinky, která netvoří spory. Optimální teplota růstu *Cronobacter* spp. je 37-39 °C, ale je schopen růst i při teplotách v rozmezí 5–47 °C. Tato bakterie se vyskytuje v sušených potravinách a je schopná zde přežít i několik let. Nejpravděpodobnějším místem výskytu tohoto mikroorganismu jsou kojenecké výživy, což může být nebezpečné hlavně pro novorozence a kojence. Ovšem *Cronobacter* spp. bývá citlivý na některé druhy antibiotik, což je pozitivum. Růst *Cronobacter* na kultivační půdě je znázorněn na obrázku 3. (Holý a Forsythe, 2014)

Nejznámějším druhem je *Cronobacter sakazakii*, který je patogenní. Tento patogen může u novorozenců, kojenců nebo lidí s oslabenou imunitou vyvolat bakteriémií. (Beuchat et al., 2009)

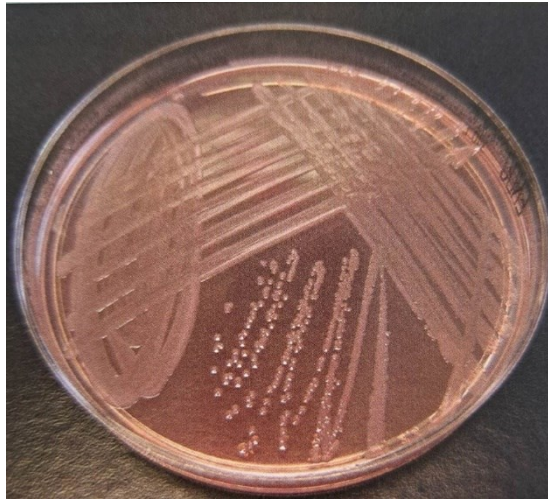


Obrázek 3: *Cronobacter* spp. na ESIA agaru (Tylšová a Bursová, 2015)

2.1.3 *Salmonella* spp.

Salmonella je gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinka z čeledi Enterobacteriaceae. Tato bakterie nevytváří spory a má fermentativní metabolismus. Roste v teplotním rozmezí 5-47 °C; optimum 37 °C, pH 3-9; optimum je při pH 7 a 2% koncentraci NaCl. Stejně jako *Escherichia coli* i *Salmonella* se vyskytuje v gastrointestinálním traktu jak živočichů, tak i lidí. Do prostředí je vylučována výkaly a je původcem mnoha onemocnění, jako např. salmonelózy, břišního tyfu a jiných. Růst *Salmonella* na kultivační půdě je znázorněn na obrázku 4. (Němec a Matoulková, 2015)

Salmonelóza je střevní onemocnění, jehož nejčastějším projevem je průjem. Ovšem u starších osob a dětí bývají projevy o něco závažnější. Většinou je toto onemocnění přenášeno právě kontaminovanou potravou (drůbeží maso, majonézy, vejce...), výjimečně vodou. Vzácný je také přenos z člověka na člověka. Po prodělané nemoci se ve většině případů stává člověk bezpříznakovým bacilonosičem. Proto se jako prevence doporučuje dodržování správných hygienických návyků. (Goering et al., Julák, 2016)



Obrázek 4: *Salmonella enterica* na Endo agaru (Koukalová, 2013)

2.1.4 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus se řadí mezi grampozitivní, fakultativně anaerobní koky, netvořící spory. Tato bakterie, na rozdíl od jiných, dokáže růst i v prostředí s vysokou koncentrací chloridu sodného, a to konkrétně při 10 %. Optimální teplota růstu se pohybuje v rozmezí 30-37°C. Růst *Staphylococcus aureus* na kultivační půdě je znázorněn na obrázku 5. (Němec a Matoulková, 2015)

Výskyt této bakterie byl zaznamenán ve vodě, půdě, potravinách a je součástí kožní mikrobioty člověka, ale považuje se také za patogena, který způsobuje abscesy, bakteriémie, plicní infekce a mnoho dalších onemocnění. Problémem je, že *Staphylococcus aureus* je rezistentní vůči některým antibiotikům. Mezi nejznámější lze jmenovat methcilin – rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) nebo vankomycin – rezistentní *Staphylococcus aureus* (VRSA). Především MRSA způsobuje velké problémy v nemocničních zařízeních. Nebezpečná je také tvorba toxinů, kam spadají exfoliativní toxiny (ETs), které způsobují Ritterovu chorobu. Mezi běžně se vyskytující exfoliativní toxiny řadíme ETA, ETB, ETC a ETD. (Ahmad-Mansour et al., 2021)

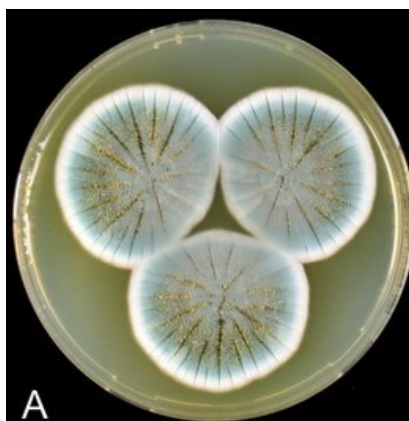


Obrázek 5: *Staphylococcus aureus* na krevním agaru (Koukalová, 2013)

2.1.5 *Penicillium* spp.

Penicillium je mikroskopická vláknitá houba z čeledi Trichocomaceae. Tato plíseň je charakteristická svým hojně větveným myceliem s bezbarvými hyfami. Je to nejčastější původce kažení potravin, převážně ovocných plodů. (Němec a Matoulková, 2015)

Převážná většina druhů této plísně se řadí mezi psychrotolerantní a nejsou téměř schopné růst při teplotě okolo 37 °C, některé mezofilní druhy rostou při pokojové teplotě okolo 25°C. Růst *Penicillium* na kultivační půdě je znázorněn na obrázku 6. Co se týče výskytu této plísně, je velice rozmanitý od vzduchu až po již zmíněné potravinářské produkty. Hraje důležitou roli při výrobě sýru s plísní, ale působí i negativně, a to tak, že způsobuje hnilobu a má schopnost produkce mykotoxinů. Nejznámějšími produkovanými mykotoxiny patří ochratoxin A (OTA), patulin, citreoviridin, citrinin, roquefortin C a cyklopiazonová kyselina. (Perrone a Susca, 2017)



Obrázek 6: *Penicillium rubens* (Houbraken, Frisvad a Samson, 2011)

2.1.6 *Aspergillus* spp.

Tato plíseň, stejně jako *Penicillium*, patří do čeledi Trichocomaceae. Po morfologické stránce má rod *Aspergillus* specializované hyalinní hyfy. Tyto hyfy slouží k tvorbě konidiofor, které mohou být užitečné při identifikaci, protože u každého druhu mají jinou morfologii, a dokonce i zabarvení. Růst *Aspergillus* na kultivační půdě je znázorněn na obrázku 7. *Aspergillus* se může vyskytovat ve vzduchu či půdě a dalo by se o něm říci, že je halotolerantní a osmotolerantní. Je také znám pro svou produkci některých člověku nebezpečných mykotoxinů. Tyto mykotoxiny, kterými jsou aflatoxiny, ochratoxin A, citrinin vyvolávají u člověka alergie, orgánové poškození a dokonce i smrt. (Němec a Matoulková, 2015)

V potravinářském průmyslu dokáže napáchat značné škody, jelikož je *Aspergillus* schopný růst v prostředí o docela nízké vodní aktivitě. Napadenými potravinami bývají nejčastěji různé druhy obilovin, ale mohou to být i marmelády, džemy, zelenina a ovoce. Některé druhy ovšem mohou být i užitečné, a to k výrobě saké, zpracování organických kyselin, výrobě enzymů či hydrolýze škrobu. (Ray, 2003)



Obrázek 7: *Aspergillus niger* (Wee et al., 2023)

2.2 Faktory ovlivňující růst mikroorganismů v dehydratovaných potravinách

Mikroorganismy pro svůj růst a rozmnožování potřebují příznivé podmínky. Příznivými podmínkami jsou myšlené biologické, chemické a fyzikální vlastnosti daného prostředí,

ve kterém se mikroorganismus vyskytuje. Avšak většina těchto mikroorganismů disponuje schopností se na dané prostředí poměrně rychle adaptovat. Přizpůsobení se daným podmínkám může být zajištěno například tvorbou a produkcí extracelulárních enzymů, změnou buňky a enzymatického aparátu nebo tvorbou spor. Stává se, že mikroorganismy do značné míry mohou díky svým činnostem měnit i vnější prostředí. (Němec a Matoulková, 2015)

Existuje mnoho způsobů a metod, jak efektivně odstranit nežádoucí mikroorganismy. Mezi nejznámější způsoby patří dezinfekce, sterilace, pasterace. Převážně jsou tyto metody hojně využívány v potravinářském průmyslu. Dezinfekce se provádí pomocí chemikálií nebo dezinfekčních prostředků a jejím cílem je inhibice převážně patogenních mikroorganismů, ovšem spory mohou tento zásah přežít. Pasterace je proces, kdy dochází k usmrcení vegetativních forem mikroorganismů za pomoci vyšších teplot. Při sterilaci jsou odstraněny jak vegetativní formy mikroorganismů, tak i jejich spory. Proto se sterilace považuje za nejúčinnější metodu odstranění mikroorganismů. (Šilhánková, 2002)

Faktory, které působí na mikroorganismy, můžeme rozdělit na fyzikální a chemické. Do fyzikálních faktorů spadá hlavně teplo, tlak, ultrazvuk a různé druhy záření. Mezi chemické faktory patří oxidoredukční potenciál, pH, dezinfekční a povrchově aktivní látky a antibiotika.

2.2.1 Teplota

Teplota patří mezi fyzikální faktory. A právě teplota hraje klíčovou roli při rozmnožování a růstu mikroorganismů. Některé mikroorganismy preferují vyšší teploty a některé naopak nižší. Malá část mikroorganismů dokáže přežít i ve velkém rozmezí teplot a existují i takové, co přežívají i extrémní teploty. Mikroorganismy dělíme do tří základních teplotních skupin: psychofilní (optimum 0-15 °C), mezofilní (optimum 25-40 °C) a termofilní (optimum 50-60 °C). Pro každý mikroorganismus lze vytyčit hranice, při nichž bude ještě probíhat růst, a při kterých už naopak bude růst inhibován. Těmito pomyslnými hranicemi jsou minimální a maximální teplota, kdy při minimální teplotě určitý mikroorganismus už roste a při maximální je ještě mikroorganismus schopen růstu. (Tortora, Funke a Case, 2018)

2.2.2 Ultrazvuk

Jak už název vypovídá, jedná se o zvukové vlny, jejichž frekvence přesahuje hodnotu 20 kHz. Ultrazvuk je schopný usmrtit všechny mikroorganismy. Hodně významný je tzv. kavitační ultrazvuk, který funguje tak, že působí na plazmatickou membránu, kterou narušuje a dochází tak k poškození buňky. Citlivými mikroorganismy bývají gramnegativní bakterie, odolné jsou mykobakterie. (Němec a Matoulková, 2015)

2.2.3 Tlak

Tlak může mít rovněž negativní vliv na růst a rozmnožování mikroorganismů. Převážná většina mikroorganismu roste za normálního atmosférického tlaku. Pokud ovšem nastane situace, že tlak navýšíme, růst mikroorganismu se postupně bude zpomalovat. Platí zde, že čím je tlak vyšší, tím pomalejší je růst mikroorganismů. Vyšší tlak narušuje a poškozuje buňky. Existují ale i mikroorganismy, kterým vyšší tlak nevadí a neškodí. Tato skupina se nazývá barofilní – preferují vyšší tlak a barotolerantní – dokáží přežít vyšší hodnoty tlaku. (Bursová et al., 2014)

2.2.4 Záření

Záření má jak pozitivní, tak negativní vliv na mikroorganismy. Pro fototrofní skupiny představuje zdroj energie, zabezpečuje tvorbu pigmentů a může být i smrtící. Záření vyvolává změny uvnitř buňky, čímž dochází k jejímu narušení a k usmrcení daného mikroorganismu. Ovšem záleží na typu záření, protože každý typ působí na buňky jiným mechanismem. Například ultrafialové záření, které má vlnovou délku 250–270 nm, působí na DNA uvnitř buněk a má mutagenní účinky. Citlivost k UV záření je závislá dle druhu mikroorganismu. Je známo, že gramnegativní bakterie jsou hodně citlivé oproti grampozitivním. UV záření může být použito sterilizaci povrchů či pracovních předmětů, například v laboratořích. Dalším typem záření je viditelné světlo, γ záření a ionizující záření. (Němec a Matoulková, 2015)

2.2.5 Osmotický tlak

Buňky jsou tvořeny z velké části vodou. Voda tvoří asi 80 % celkového složení buňky. Vlivem osmotického tlaku dochází k vyplavení potřebné vody z buňky do okolního prostředí. Podle osmotického tlaku dělíme prostředí na hypotonické – kde koncentrace látek uvnitř buňky je větší než koncentrace látek mimo buňku. Dalším prostředím je hypertonické prostředí, což je přesným opakem hypotonického prostředí. (Tortora, Funke a Case, 2018)

Většina mikroorganismů obývá prostředí s nízkou koncentrací solí, přičemž vyšší koncentrace solí mohou mít na většinu z nich negativní vliv. Nicméně některé mikroorganismy, zejména z domény *Archaea*, se v průběhu evoluce přizpůsobily vyšším koncentracím solí a projevují vysokou toleranci. Některé „běžné“ bakterie, jako *Staphylococcus*, mohou také růst v přítomnosti vysokých koncentrací soli. Halofilní organismy musí řešit změnu osmolarity prostředí, aby udržely svůj vnitřní tlak, což mohou dělat buď produkcí určitých látek nebo akumulací látek z okolí. V praxi se změna osmotického tlaku využívá pro konzervaci potravin pomocí soli nebo cukru. (Němec a Matoulková, 2015)

2.2.6 Vodní aktivita a_w

Voda je pro mikroorganismy velice důležitá, protože ovlivňuje jejich životní procesy. Účastní se transportu látek, při metabolismu a také má vliv na růst buněk. Pokud není přítomno dostatečné množství vody, tento problém může zcela zastavit růst, a nakonec dochází i k usmrcení daného mikroorganismu. Opět zde ale záleží na druhu mikroorganismu, protože každý druh se liší tím, při jakých hodnotách vodní aktivity je schopen růst. Podle Görnera a Valíka (2004) je pro většinu bakterií optimální hodnota vodní aktivity okolo 0,94-0,91, kdežto pro plísně se toto optimum pohybuje v rozmezí od 0,93 do 0,80. (Görner a Valík, 2004)

V posledních letech se stále častěji setkáváme s potravinami a složkami potravin s nízkou aktivitou vody, které mohou obsahovat patogeny způsobující nemoci. Tyto potravinové patogeny jsou schopné přežívat po dlouhou dobu, a to i několik měsíců a let v potravinách s nízkou hodnotou a_w a v suchých prostředích určených pro zpracování a přípravu potravin. Tyto patogeny obvykle vykazují zvýšenou toleranci vůči teplu a dalším úpravám, které by normálně zabily buňky v prostředí s vyšší hodnotou a_w . (Beuchat et al., 2013)

2.2.7 Redoxní potenciál E_h

Podle toho, jestli daná látka má oxidační nebo redukční schopnosti určujeme oxidačně – redukční potenciál. Obecně se mezi látky s redukčními vlastnostmi řadí například vodík a železnaté ionty. Mezi látky s oxidačními vlastnostmi řadíme kyslík, peroxidy a dusičnany. A právě kvůli redoxnímu potenciálu jsme schopni rozdělit mikroorganismy na aerobní a anaerobní. Aerobní mikroorganismy se vyznačují růstem v přítomnosti kyslíku, což představuje pozitivní redoxní potenciál. Oproti tomu anaerobním mikroorganismům se lépe daří v prostředí bez kyslíku, který působí na anaeroby toxicky. Pro prostředí pro anaerobní mikroorganismy lze vytvořit snížením redoxního potenciálu, například použitím kyseliny askorbové. Existují však i mikroorganismy, které jsou schopné žít jednak v anaerobním prostředí a také v aerobním prostředí. Tyto mikroorganismy se označují jako fakultativně anaerobní. (Šilhánková, 2002)

2.2.8 pH

K určení, zda je prostředí či roztok kyselý nebo zásaditý, nám slouží pH. Pro většinu mikroorganismů je ideální neutrální pH což jsou hodnoty v rozmezí 6,5 – 7. Naopak acidofilní bakterie jsou schopné růst i v hodně kyselém prostředí, jehož hodnoty se pohybují kolem 3. Obecně platí, že plísňe se mohou vyskytovat v širším rozmezí pH než bakterie. (Tortora, Funke a Case, 2018)

pH do značné míry ovlivňuje životní procesy všech mikroorganismů. Má značný vliv na růst, rozmnožování a celkový metabolismus a transport látek. pH do značné míry určuje, jak jsou mikroorganismy odolné vůči teplotám (termorezistenci). Znamená to tedy, že čím více je pH vzdáleno optimální hodnotě daného mikroorganismu, tím méně tento mikroorganismus snáší vyšší teploty. (Bursová, Necidová a Dušková, 2014)

2.2.9 Antibiotika

Antibiotika jsou látky, které vznikají při sekundárním metabolismu některých bakterií. Pro značnou část mikroorganismů jsou v malých dávkách inhibiční, ale ve větším množství mohou být toxické. Každý druh antibiotika působí na konkrétní části v buňce. Tedy podle místa účinku existují antibiotika, které narušují syntézu bílkovin, syntézu DNA a RNA, cytoplazmatickou membránu, buněčnou stěnu a fosforylaci. Hojně používanými antibiotiky

jsou polymyxin, vankomycin, methicillin, streptomycin, tetracyklin, chloramfenikol, novobiocin, rifampicin, erytromycin a spousta dalších. (Němec a Matoulková, 2015)

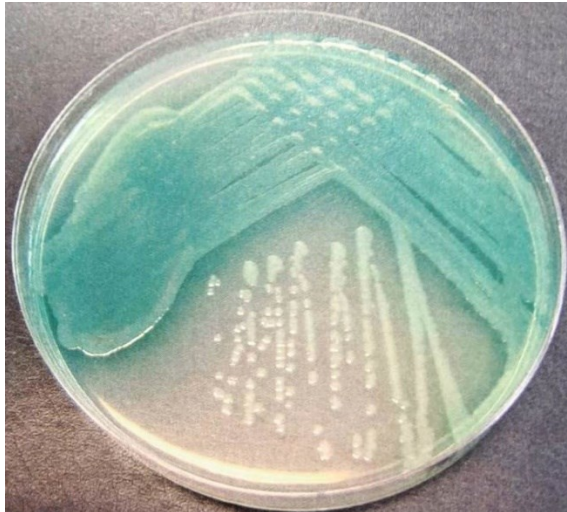
3 METODY DETEKCE MIKROORGANISMŮ

Ve mnohých odvětvích potravinářského průmyslu jsou mikroorganismy užitečnou součástí výroby různých potravinových produktů. V mlékárenství jsou využívány bakterie mléčného kvašení (BMK) k výrobě jogurtů, keřirových mlék a jiných mléčných výrobků. Sýrařský průmysl zase využívá plísně k výrobě sýrů s plísní uvnitř a na povrchu nebo takový masný průmysl se neobejde bez mikroorganismů potřebných při tvorbě fermentovaných masných výrobků. Přesto se ale vyskytují mikroorganismy, které jsou v potravinářství nežádoucí a nebezpečné. Nežádoucí mikroorganismy mohou, mimo jiné způsobovat kažení a hnilobu potravin, a tím je znehodnocovat tak, že budou nevhodné ke konzumaci. (Bursová, Necidová a Dušková, 2014)

V potravinářství je zapotřebí co nejrychleji, nejlevněji a nejefektivněji testovat potraviny na přítomnost patogenních mikroorganismů z důvodu ochrany zdraví spotřebitele. Jedna z nejstarších a nejvyužívanějších metod je kultivace na kultivačních médiích. Tato metoda, je sice levná, ale časově náročná. Kultivace daného mikroorganismu trvá i několik dní a k určení přesného patogenu jsou vyžadovány další biochemické, imunologické a jiné identifikační testy. (Foddai a Grant, 2020)

K dispozici máme jak kvalitativní, tak kvantitativní stanovení. Kvantitativní stanovení slouží k určení množství daných mikroorganismů, které jsou přítomny v testovaném vzorku. Toto stanovení lze provádět metodou přelití, kdy je inokulum v Petriho misce přelito určeným kultivačním médiem, nebo metodou roztěru, kdy je inokulum nanášeno na již připravenou kultivační půdu a sterilní hokejkou rozetřeno po celém povrchu média. Dále se sem řadí stanovení nejpravděpodobnějšího počtu mikroorganismů (MPN). Kvalitativní stanovení nám oproti kvantitativnímu určuje výskyt sledovaného mikroorganismu. Toto stanovení se skládá z několika důležitých kroků, kterými jsou primární a sekundární pomnožení, izolace a konfirmace. Pomnožení probíhá převážně v tekutých médiích a následná izolace je provedena na tuhé kultivační půdy. (Bursová et al., 2014)

Tekuté půdy jsou ke kultivaci využívány pro jednodušší růst mikroorganismů. Nejčastější tekutou půdou jsou různé druhy bujónů. Naopak pevné půdy jsou vyráběny z bujonového základu a agaru. Právě tento polysacharid získaný z mořských řas má gelotvorné vlastnosti, díky kterým dochází k tuhnutí kultivačního média. Takto připravené půdy jsou obvykle uchovávány v Petriho miskách, jež nesou své pojmenování po svém objeviteli, kterým byl Richard Petri. (Votava, 2000)



Obrázek 8: Nárůst *Pseudomonas aeruginosa* na Pseudomonas agaru P (Votava, 2000)

Gramovo barvení spadá pod mikroskopické metody. Svůj název si toto barvení získalo po svém objeviteli, dánském vědci a lékaři, Hansu Christianu Gramovi. Pomocí tohoto barvení dokážeme rozpoznat, zda se jedná o gramnegativní nebo grampozitivní bakterie. Tato metoda spočívá v rozdílném složení buněčné stěny bakterií. Grampozitivní bakterie mají buněčnou stěnu složenou ze silné vrstvy peptidoglykanu, kdežto u gramnegativních bakterií je buněčná stěna ze slabé vrstvy peptidoglykanu. (Tantray et al., 2023)

U Gramova barvení je vzorek nejprve vložen do krystalové violeti po dobu asi 60 sekund. Následně je vzorek opláchnut destilovanou vodou a namočen do Lugolova roztoku, ve kterém je ponechán asi 30 sekund. Poté se vzorek opláchně acetone, vodou a následně se ponechá asi 60 sekund v safraninu. Nakonec se opět opláchně destilovanou vodou. Výsledkem je u grampozitivních bakterií modrofialové zbarvení, naopak gramnegativní bakterie jsou zbarveny do růžovočervené. (Koukalová, 2013)

Další metody jsou založené na analýze nukleových kyselin. Nejznámější metodu je polymerázová řetězová reakce, známá pod zkratkou PCR. Tato metoda je založena na mnohonásobné amplifikaci vybraného úseku DNA prostřednictvím opakujících se cyklů. Pro PCR je zapotřebí cílová DNA, jenž bude amplifikována, komplementární primery (oligonukleotidy) k sekvencím DNA a termostabilní DNA polymerázu (např. Taq polymeráza, která pochází z bakterie *Thermus aquaticus*). Průběh PCR je takový, že při teplotě vyšší než 90 °C dochází k denaturaci cílové DNA, čímž dojde k rozpojení jednotlivých řetězců. Poté je teplota snížena na asi 50–65 °C a primery tak mohou začít nasedat na komplementární sekvence cílové DNA. Pomocí katalýzy Taq polymerázou jsou

vytvořena nová vlákna DNA, což probíhá při teplotě 65–75 °C. Tyto kroky jsou cyklicky opakovány zpravidla v 30-35 cyklech. (Oyarzabal a Backert, 2012)

Za přesnou a rychlou metodu je považována také hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice průletovým analyzátozem (MALDI – TOF MS). Díky této technologii jsme schopni identifikovat jednotlivé mikroorganismy na úrovni rodů a druhů. Touto metodou bylo možno identifikovat mnoho mikroorganismů od bakterií, přes houby, až po viry. (Croxatto, Prod'hom a Greub, 2012)

Při MALDI – TOF MS je vzorek smíchán s určitým množstvím roztoku (kyselina benzoová) a následně je vložen na destičku, kde se nechá vysušit. Destička obsahující vzorek je umístěna do přístroje, konkrétně do měřicí komory. Aby mohla být zahájena analýza vzorku, je zapotřebí vytvořit vakuum. Jakmile je vakuum vytvořeno, začne na vzorky působit laser. Působením laseru dochází k ionizaci proteinů. Kvůli vytvořenému elektromagnetickému poli je pohyb iontů urychlen a tyto ionty postupují dále do letové trubice, kde je přesně měřena doba letu. Právě na základě doby letu (TOF) se zaznamenává charakteristické spektrum, které tvoří specifické otisky jedinečné pro daný druh. Pomocí počítačového programu jsou výsledné hodnoty srovnávány a vyhodnoceny. (Wieser et al., 2012)

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této práce byla mikrobiologická analýza lyofilizovaného ovoce. Byla zvolena nepřímá kultivační metoda stanovení počtu buněk. Díky této metodě byly stanovovány indikátorové mikroorganismy, jejichž vyrostlé kolonie na kultivačních médiích byly následně počítány.

V teoretické části byly popsány:

- Principy a postupy lyofilizace.
- Vlastnosti lyofilizovaných potravin.
- Mikroorganismy přítomné v lyofilizovaných potravinách.
- Faktory ovlivňující růst mikroorganismů.
- Metody detekce mikroorganismů v potravinách.

Praktická část popisuje:

- Provedenou mikrobiologickou analýzu lyofilizovaného a sušeného ovoce.
- Vyhodnocení výsledků, diskuzi a závěr.

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Testované vzorky sušeného ovoce

V praktické části bakalářské práce byla provedena mikrobiologická analýza celkem 29 vzorků ovoce, přičemž 19 vzorků bylo ovoce lyofilizované a 10 vzorků bylo ovoce sušené horkým vzduchem. Část vzorků ovoce byla připravena v laboratorních podmínkách (lyofilizováno a/nebo sušeno horkým vzduchem), část vzorků ovoce v lyofilizované formě byla dodána firmou, která je prodává jako lyofilizované ovoce nebo přidává do müsli směsí. Seznam analyzovaných vzorků a jejich základní charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 1 a na obrázcích 9-32.

Tabulka 1: Seznam analyzovaných vzorků ovoce

Ovoce pěstované u nás	Připraveno v laboratorních podmínkách	Lyofilizované ovoce dodané firmou	Ovoce lyofilizované	Ovoce sušené horkým vzduchem
Jablka	✓	✓	✓	✓
Hrušky	✓		✓	✓
Švestky	✓	✓	✓	✓
Meruňky	✓		✓	✓
Višně		✓	✓	
Jahody		✓	✓	
Maliny		✓	✓	
Borůvky	✓	✓	✓	✓
Brusinky		✓		✓
Ovoce exotické				
Banán	✓	✓	✓	✓
Ananas	✓		✓	✓
Mango	✓	✓	✓	✓
Kiwi	✓		✓	✓
Pitaya	✓		✓	✓



Obrázek 9: Vzorek sušeného jablka



Obrázek 10: Vzorek lyofilizovaných jablečných plátků



Obrázek 11: Vzorek lyofilizovaných jablek



Obrázek 12: Vzorek sušené hrušky



Obrázek 13: Vzorek lyofilizované hrušky



Obrázek 14: Vzorek sušených švestek



Obrázek 15: Vzorek lyofilizovaných švestek



Obrázek 16: Vzorek lyofilizovaných švestek



Obrázek 17: Vzorek sušené meruňky



Obrázek 18: Vzorek lyofilizované meruňky



Obrázek 19: Vzorek lyofilizované višně



Obrázek 20: Vzorek lyofilizované jahody



Obrázek 21: Vzorek lyofilizované maliny



Obrázek 22: Vzorek sušené borůvky



Obrázek 23: Vzorek lyofilizované borůvky



Obrázek 24: Vzorek lyofilizovaných borůvek



Obrázek 25: Vzorek sušených brusinek



Obrázek 26: Vzorky banánu – vlevo lyofilizovaný, vpravo sušený



Obrázek 27: Vzorek lyofilizovaných banánů



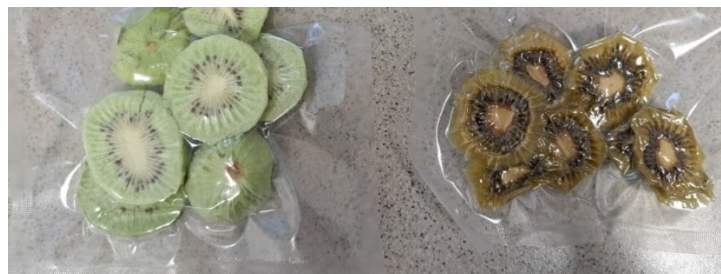
Obrázek 28: Vzorky ananasu – vlevo lyofilizovaný, vpravo sušený



Obrázek 29: Vzorky manga – vlevo lyofilizovaný, vpravo sušený



Obrázek 30: Vzorek lyofilizovaného manga



Obrázek 31: Vzorky kiwi – vlevo lyofilizovaný, vpravo sušený



Obrázek 32: Vzorky pitaya – vlevo lyofilizovaná, vpravo sušená

5.2 Zjišťované mikroorganismy

V lyofilizovaných a sušených vzorcích ovoce byly analyzovány vybrané skupiny indikátorových mikroorganismů. Zjišťované skupiny mikroorganismů a použítá kultivační média jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Detekované skupiny mikroorganismů a kultivační půdy použité k jejich stanovení

Indikátorové mikroorganismy	Kultivační média
Celkový počet mikroorganismů	Plate Count Agar (PCA)
Aerobní mikroorganismy	Plate Count Agar (PCA)
Plísně a kvasinky	Chloramphenicol Yeast Glucose Agar (ChYGA)
Růstově náročné bakterie	Brain Heart Infusion Broth (BHI)

5.3 Metodika

5.3.1 Kultivační média a jejich příprava

Kultivační média, která byla použita při mikrobiologické analýze, byla připravena z komerčních dehydratovaných směsí. Při mikrobiologické analýze lyofilizovaných potravin byl použit Plate Count Agar, Chloramphenicol Yeast Glucose Agar, Brain Heart Infusion Broth, všechny od výrobce HiMedia (Bombai, Indie).

Do sterilní lahve bylo dle návodu výrobce naváženo určené množství příslušné dehydratované kultivační půdy. Následně byla navážka doplněna destilovanou vodou do objemu 400 ml. Obsah láhve byl promíchán a láhev byla vložena do autoklávu ke sterilizaci. Sterilizace probíhala při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Po vysterilizování a vychladnutí půd na teplotu kolem 50 °C byly půdy rozlity na Petriho misky. Petriho misky byly ponechány ve sterilním flowboxu do jejich zatuhnutí, byly řádně označeny. Takto připravené kultivační půdy byly ponechány v chladničce a v temnu.

Plate Count Agar (PCA)

PCA je neselektivní kultivační médium, které bylo při této analýze použito pro stanovení celkového počtu mikroorganismů a pro aerobní sporotvorné bakterie. Složení kultivační půdy je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 3: Složení PCA (M091, 2018)

Látka	Množství
enzymatický hydrolyzát kaseinu	5 g/l
kvasniční extrakt	2,5 g/l
glukosa	1 g/l
agar	15 g/l

Chloramphenicol Yeast Glucose Agar (ChYGA)

Toto kultivační médium se řadí mezi selektivně diagnostické půdy a při této analýze bylo použito pro stanovení plísní a kvasinek. Složení kultivační půdy je uvedeno v tabulce 4.

Tabulka 4: Složení ChYGA (M1008, 2018)

Látka	Množství
kvasničný extrakt	5 g/l
dextróza	20 g/l
chloramfenikol	0,1 g/l
agar	14,9 g/l

Brain Heart Infusion Broth (BHI)

BHI řadíme mezi neselektivní médium a při této analýze bylo použito pro stanovení kultivačně náročných mikroorganismů. Složení kultivační půdy je uvedeno v tabulce 5.

Tabulka 5: Složení BHI (M210, 2018)

Látka	Množství
telecí mozková infuse (sušina)	12,5 g/l
mozkovo srdcová infuse (sušina)	5 g/l
proteosový pepton	10 g/l
chlorid sodný	5 g/l
hydrogenfosforečnan (di)sodný	2,5 g/l
dextrosa	2 g/l

5.3.2 Příprava vzorků, inokulace a kultivace

Nepřímou kultivační kvantitativní metodou byly stanovovány indikátorové mikroorganismy v testovaných vzorcích lyofilizovaného a sušeného ovoce. Suspenze byla zaočkována na povrch kultivační média metodou roztěru.

Vzorky ovoce, které byly zabaleny v obalech, byly u kahanu sterilně otevřeny, aby nedošlo k jejich kontaminaci. Asepticky bylo naváženo 5 g vzorku do sterilních lahví a doplněno 45 ml fyziologickým roztokem (poměr 1:9). Lahve se vzorky byly uzavřeny a třepány na třepačce při 120 otáčkách po dobu 10 minut.

Desítkové ředění vzorků

Při přípravě vzorků bylo použito desítkové ředění. Práce byla prováděna ve sterilním flowboxu. Do první sterilní zkumavky s označením 10^{-1} bylo napipetováno 5 ml vzorku z lahve a obsah zkumavky byl promíchán na vortexu. Do druhé sterilní zkumavky s označením 10^{-2} bylo napipetováno 500 μ l z první zkumavky (s označením 10^{-1}) a opět byl obsah zkumavky promíchán na vortexu. Stejným způsobem bylo provedeno třetí i čtvrté ředění.

Inokulace a kultivace

Bylo pracováno asepticky ve sterilním flowboxu. Na Petriho misky bylo pipetováno 100 μ l vzorku ze zkumavky s ředěním 10^{-1} a suspenze byla pomocí sterilní hokejky rozetřena krouživým pohybem po celém povrchu misky. Stejný postup byl opakován i pro ostatní kultivační média a ředění. Každá Petriho miska byla označena názvem půdy, ředěním

a názvem použitého vzorku. Takto zaočkované půdy byly kultivovány v termostatu dnem vzhůru dle podmínek uvedených v tabulce 6.

Tabulka 6: Stanovované mikroorganismy, doba a teplota kultivace

Mikroorganismy	Teplota kultivace [°C]	Doba kultivace
Celkový počet mikroorganismů	30	24–48 hodin
Růstově náročné mikroorganismy	30	24 hodin
Plísně a kvasinky	25	2–5 dní
Aerobní sporulující bakterie	37	24-48 hodin

Pro stanovení aerobních sporulujících bakterií byly vzorky vloženy do vodní lázně o teplotě 80 °C. Vzorky zde byly ponechány po dobu 10 minut, aby došlo k inaktivaci vegetativních forem bakterií. Po uplynutí dané doby byly vzorky rychle ochlazeny a asepticky zaočkovány na určené Petriho misky. Petriho misky s inokulem byly kultivovány v inkubátoru.

Hodnocení výsledků

Na jednotlivých Petriho miskách byly spočítány počty kolonií a vše bylo zapsáno do tabulek. Ze zjištěných údajů bylo vypočítáno CFU/g (kolonie tvořící jednotky v 1 gramu vzorku).

Výpočet CFU/g:

$$\text{CFU/g} = \frac{\text{průměrný počet kolonií}}{\text{ředění}} \cdot \frac{1 \text{ (ml)}}{\text{pipetovaný objem (ml)}}$$

Pokud na Petriho miskách nebyly detekovány žádné kolonie, jako výsledek byly uvedeny do tabulky písmena ND (nedetekováno).

5.3.3 Použité pomůcky a přístroje

Během práce byly použity následující pomůcky: sterilní nůžky, pinzeta, sterilní lahve s víčkem, hokejky, mikrobiologické zkumavky s víčkem, odměrné válce, sterilní fyziologický roztok, Petriho misky, automatické pipety.

Pro analýzu byly použity následující přístroje: flowbox, laboratorní váhy, plynový kahan, vortex, homogenizátor Stomacher, inkubátory, vodní lázeň, autokláv, počítačka kolonií.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Mikrobiologická analýza sušeného a lyofilizovaného ovoce

K mikrobiologické analýze bylo podrobena celkem 29 vzorků lyofilizovaného a sušeného ovoce. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 7–20. Vzorky uvedeny jako "sušené" byly sušeny horkým vzduchem, zbývající vzorky byly lyofilizovány v laboratorních podmínkách nebo dodány v lyofilizované formě firmou.

Sušená a lyofilizovaná jablka

Analyzované vzorky sušených jablek byly v lyofilizované formě dodány firmou, další sušené a lyofilizované byly připraveny v laboratoři. Výsledné hodnoty, které jsou uvedeny v tabulce 7, nepoukazují u sušeného jablka na přítomnost mikroorganismů. U lyofilizovaného jablka (tabulka 7) byl oproti sušenému jablku detekován výskyt růstově náročnějších mikroorganismů, aerobně sporulujících mikroorganismů a počet mikroorganismů aerobních a fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů (CPM). U vzorku lyofilizovaného jablka dodaného firmou byl detekován vyšší výskyt celkového počtu mikroorganismů a růstově náročnějších mikroorganismů oproti lyofilizovanému jablku, ale žádný výskyt aerobně sporulujících mikroorganismů. U všech třech vzorků jablka nebyl detekován výskyt plísní a kvasinek.

Tabulka 7: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušených a lyofilizovaných jablek

	Celkový počet mikroorganismů [CFU/g]	Růstově náročné mikroorganismy [CFU/g]	Plísně a kvasinky [CFU/g]	Aerobní sporulující bakterie [CFU/g]
Sušená jablka	ND	ND	ND	ND
Lyofilizovaná jablka	$1,8 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$	ND	$2,3 \cdot 10^3$
Lyofilizovaná jablka (firma)	$1,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	ND	ND

ND...mikroorganismy nedetekovány

Sušené a lyofilizované hrušky

Analyzované vzorky byly připraveny v laboratoři. Výsledné hodnoty, které jsou uvedeny v tabulce 8, nepoukazují u sušené hrušky na přítomnost mikroorganismů. U lyofilizované

hrušky byly detekovány aerobní a fakultativně anaerobní mezofilní mikroorganismy (CPM). Aerobní sporulující bakterie, růstově náročné mikroorganismy, plísňe a kvasinky nebyly u lyofilizované hrušky detekovány.

Tabulka 8: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušených a lyofilizovaných hrušek

	Celkový počet mikroorganismů [CFU/g]	Růstově náročné mikroorganismy [CFU/g]	Plísňe a kvasinky [CFU/g]	Aerobní sporulující bakterie [CFU/g]
Sušená hruška	ND	ND	ND	ND
Lyofilizovaná hruška	$7,7 \cdot 10^3$	ND	ND	ND

ND...mikroorganismy nedetekovány

Sušené a lyofilizované švestky

Sušené, resp. lyofilizované švestky byly vyrobeny v laboratoři i dodány firmou. Výsledky mikrobiologické analýzy, které jsou uvedeny v tabulce 9, nepoukazují u sušené švestky na přítomnost mikroorganismů. U lyofilizované hrušky taktéž nebyla detekována přítomnost mikroorganismů. U lyofilizované švestky dodané firmou byl detekován vyšší počet aerobních a fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů (CPM). Ostatní testované mikroorganismy nebyly detekovány.

Tabulka 9: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušených a lyofilizovaných švestek

	Celkový počet mikroorganismů [CFU/g]	Růstově náročné mikroorganismy [CFU/g]	Plísňe a kvasinky [CFU/g]	Aerobní sporulující bakterie [CFU/g]
Sušená švestka	ND	ND	ND	ND
Lyofilizovaná švestka	ND	ND	ND	ND
Lyofilizovaná švestka (firma)	$1,5 \cdot 10^4$	ND	ND	ND

ND...mikroorganismy nedetekovány

Sušené a lyofilizované meruňky

Vzorky meruněk byly připraveny v laboratorních podmínkách. Výsledné hodnoty, které jsou uvedeny v tabulce 10, nepoukazují u sušené meruňky na přítomnost mikroorganismů.

U lyofilizované meruňky byl oproti sušené meruňce detekován výskyt růstově náročnějších mikroorganismů, aerobních sporulujících mikroorganismů a aerobních a fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů. U obou vzorků meruňky nebyl detekován výskyt plísni a kvasinek.

Tabulka 10: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušených a lyofilizovaných meruněk

	Celkový počet mikroorganismů [CFU/g]	Růstově náročné mikroorganismy [CFU/g]	Plísně a kvasinky [CFU/g]	Aerobní sporulující bakterie [CFU/g]
Sušená meruňka	ND	ND	ND	ND
Lyofilizovaná meruňka	$1,7 \cdot 10^3$	$4,1 \cdot 10^3$	ND	$1,8 \cdot 10^3$

ND...mikroorganismy nedetekovány

Lyofilizované višně

Výsledné hodnoty, které jsou uvedeny v tabulce 11, ukazují u lyofilizované višně na přítomnost růstově náročných mikroorganismů a aerobních a fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů. Aerobní sporulující bakterie, plísně a kvasinky nebyly u tohoto vzorku detekovány.

Tabulka 11: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) lyofilizované višně

	Celkový počet mikroorganismů [CFU/g]	Růstově náročné mikroorganismy [CFU/g]	Plísně a kvasinky [CFU/g]	Aerobní sporulující bakterie [CFU/g]
Lyofilizované višně (firma)	$1,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	ND	ND

ND...mikroorganismy nedetekovány

Lyofilizované jahody

Výsledné hodnoty, které jsou uvedeny v tabulce 12, ukazují na to, že u lyofilizovaných jahod nebyly mikroorganismy detekovány.

Tabulka 12: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) lyofilizovaných jahod

	Celkový počet mikroorganismů [CFU/g]	Růstově náročné mikroorganismy [CFU/g]	Plísně a kvasinky [CFU/g]	Aerobní sporulující bakterie [CFU/g]
Lyofilizované jahody (firma)	ND	ND	ND	ND

ND...mikroorganismy nedetekovány

Lyofilizované maliny

Výsledné hodnoty, které jsou uvedeny v tabulce 13, poukazují u lyofilizovaných malin na přítomnost růstově náročných mikroorganismů, mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů, plísni a kvasinek. Aerobní sporulující bakterie nebyly u tohoto vzorku detekovány.

Tabulka 13: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) u malin

	Celkový počet mikroorganismů [CFU/g]	Růstově náročné mikroorganismy [CFU/g]	Plísně a kvasinky [CFU/g]	Aerobní sporulující bakterie [CFU/g]
Lyofilizované maliny (firma)	$4,2 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^4$	ND

ND...mikroorganismy nedetekovány

Sušené a lyofilizované borůvky

Byly analyzovány sušené a lyofilizované borůvky laboratorní výroby a také lyofilizované výrobky získané od komerčního dodavatele. Výsledné hodnoty, které jsou uvedeny v tabulce 14, neukazují u sušených borůvek na přítomnost mikroorganismů. U lyofilizovaných borůvek dodaných firmou taktéž nebyla detekována přítomnost mikroorganismů. U lyofilizovaných borůvek (laboratorní výroba) byl detekován vyšší počet aerobních a fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů (vyjádřených jako CPM), výskyt růstově náročných mikroorganismů, plísni a kvasinek. Aerobní sporulující bakterie nebyly detekovány (tabulka 14).

Tabulka 14: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušených a lyofilizovaných borůvek

	Celkový počet mikroorganismů [CFU/g]	Růstově náročné mikroorganismy [CFU/g]	Plísně a kvasinky [CFU/g]	Aerobní sporulující bakterie [CFU/g]
Sušené borůvky	ND	ND	ND	ND
Lyofilizované borůvky	$2 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$	ND
Lyofilizované borůvky (firma)	ND	ND	ND	ND

ND...mikroorganismy nedetekovány

Sušené brusinky

Výsledné hodnoty, které jsou uvedeny v tabulce 15, nepoukazují u sušených brusinek na přítomnost mikroorganismů.

Tabulka 15: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušených brusinek

	Celkový počet mikroorganismů [CFU/g]	Růstově náročné mikroorganismy [CFU/g]	Plísně a kvasinky [CFU/g]	Aerobní sporulující bakterie [CFU/g]
Sušené brusinky (firma)	ND	ND	ND	ND

ND...mikroorganismy nedetekovány

Sušené a lyofilizované banány

Pro analýzu byly použity vzorky sušených a lyofilizovaných banánů z laboratorní výroby a lyofilizáty získané od firmy. Z tabulky 16 je patrné, že u vzorků z laboratorní výroby (sušené i lyofilizované banány) nebyla přítomnost mikroorganismů zjištěna. U lyofilizovaných banánů dodaných firmou byla zjištěna přítomnost růstově náročných mikroorganismů aerobních a fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů a aerobních sporulujících bakterií. Plísně a kvasinky nebyly detekovány.

Tabulka 16: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušených a lyofilizovaných banánů

	Celkový počet mikroorganismů [CFU/g]	Růstově náročné mikroorganismy [CFU/g]	Plísně a kvasinky [CFU/g]	Aerobní sporulující bakterie [CFU/g]
Sušené banány	ND	ND	ND	ND
Lyofilizované banány	ND	ND	ND	ND
Lyofilizované banány (firma)	$2,9 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	ND	$1,5 \cdot 10^4$

ND...mikroorganismy nedetekovány

Sušený a lyofilizovaný ananas

V tomto případě se jednalo o vzorky laboratorní výroby. Z výsledných hodnot uvedených v tabulce 17, lze usuzovat na to, že u vzorků ananasu nebyla detekována přítomnost mikroorganismů.

Tabulka 17: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušeného a lyofilizovaného ananasu

	Celkový počet mikroorganismů [CFU/g]	Růstově náročné mikroorganismy [CFU/g]	Plísně a kvasinky [CFU/g]	Aerobní sporulující bakterie [CFU/g]
Sušený ananas	ND	ND	ND	ND
Lyofilizovaný ananas	ND	ND	ND	ND

ND...mikroorganismy nedetekovány

Sušené a lyofilizované mango

Pro analýzu byly použity vzorky sušeného a lyofilizovaného manga z laboratorní výroby a lyofilizáty dodané firmou. Výsledné hodnoty, které jsou uvedeny v tabulce 18, ukazují na to, že u sušeného i lyofilizovaného manga vyrobených v laboratoři byly přítomny růstově náročné mikroorganismy a aerobní a/nebo anaerobní mikroorganismy (CPM), přičemž u lyofilizovaného manga byl oproti sušenému detekován vyšší výskyt růstově náročných mikroorganismů i celkový počet mikroorganismů (cca o 1 řád). U lyofilizovaného manga dodaného firmou byl oproti lyofilizovanému mangu detekován nižší počet mezofilních mikroorganismů (CPM) a růstově náročnějších mikroorganismů. Naopak byla zjištěna

přítomnost plísní a kvasinek oproti sušenému a lyofilizovanému mangu (tabulka 18). U všech třech vzorků manga nebyl detekován výskyt aerobních sporulujících bakterií.

Tabulka 18: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušeného a lyofilizovaného manga

	Celkový počet mikroorganismů [CFU/g]	Růstově náročné mikroorganismy [CFU/g]	Plísně a kvasinky [CFU/g]	Aerobní sporulující bakterie [CFU/g]
Sušené mango	$1,2 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$	ND	ND
Lyofilizované mango	$8 \cdot 10^4$	$8,4 \cdot 10^3$	ND	ND
Lyofilizované mango (firma)	$1,8 \cdot 10^4$	$2,4 \cdot 10^3$	$3,4 \cdot 10^3$	ND

ND...mikroorganismy nedetekovány

Sušené a lyofilizované kiwi

Vzorky sušeného a lyofilizovaného kiwi byly připraveny v laboratoři. Výsledné hodnoty uvedené v tabulce 19, ukazují na to, že u obou typů vzorků kiwi byla zjištěna mezofilních mikroorganismů (CPM), přítomnost mezofilních mikroorganismů (CPM), plísní a kvasinek, a také růstově náročnějších bakterií. U sušeného kiwi byl oproti lyofilizovanému kiwi zaznamenán mírně vyšší výskyt plísní a kvasinek. Počty ostatních indikátorových skupin mikroorganismů byly téměř shodné u obou typů vzorků. U vzorků kiwi nebyl detekován výskyt aerobních sporulujících bakterií.

Tabulka 19: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušeného a lyofilizovaného kiwi

	Celkový počet mikroorganismů [CFU/g]	Růstově náročné mikroorganismy [CFU/g]	Plísně a kvasinky [CFU/g]	Aerobní sporulující bakterie [CFU/g]
Sušené kiwi	$1,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$5,9 \cdot 10^3$	ND
Lyofilizované kiwi	$1,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^3$	ND

ND...mikroorganismy nedetekovány

Sušená a lyofilizovaná pitaya

Podobně jako u kiwi, byly i v tomto případě připraveny vzorky v laboratoři. Výsledky sumarizované v tabulce 20, ukazují na to, že u obou typů vzorků pitayi byly přítomny růstově

náročnější bakterie. Dále zde byla zjištěna přítomnost fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů (vyjádřeno jako CPM). U sušené pitayi (tabulka 20) byl oproti lyofilizovanému vzorku zjištěn nižší výskyt celkového počtu mikroorganismů (cca o 1 řád) a nižší výskyt růstově náročných bakterií. U vzorků pitayi nebyly detekovány aerobní sporulující bakterie ani kvasinky a plísňe.

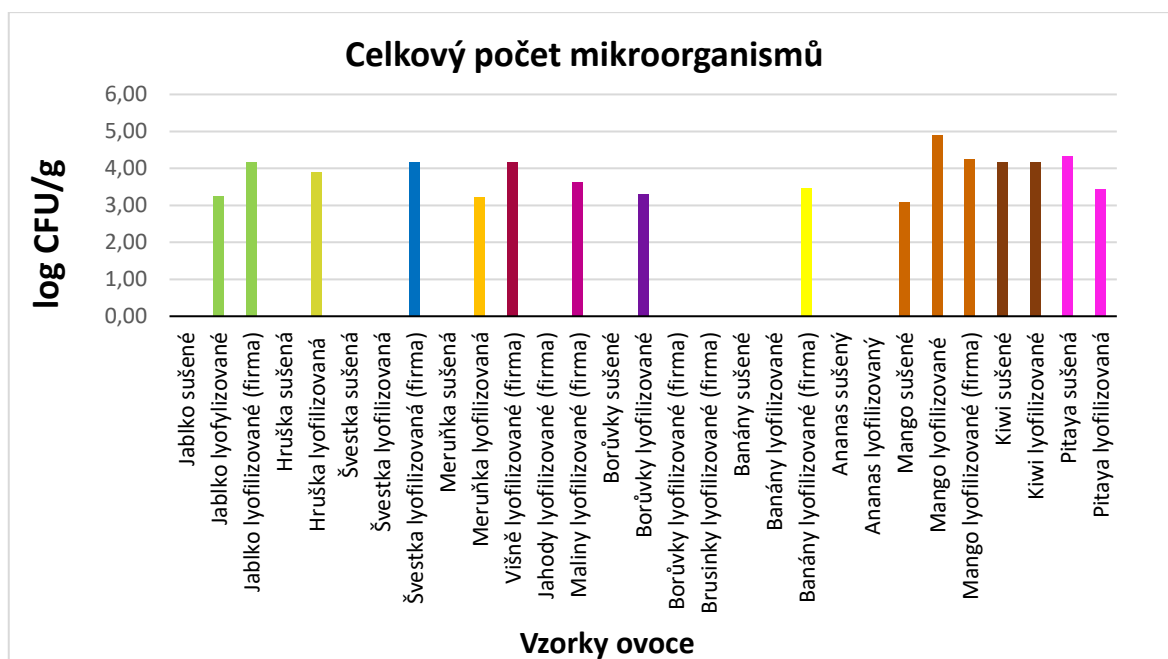
Tabulka 20: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušené a lyofilizované pitayi

	Celkový počet mikroorganismů [CFU/g]	Růstově náročné mikroorganismy [CFU/g]	Plísňe a kvasinky [CFU/g]	Aerobní sporulující bakterie [CFU/g]
Sušená pitaya	$2,8 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^3$	ND	ND
Lyofilizovaná pitaya	$2,2 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^3$	ND	ND

ND...mikroorganismy nedetekovány

Souhrnné výsledky

Z výsledných hodnot zanesených v grafu (obrázek 33) vyplývá, že u 15 z 29 vzorků ovoce byla detekována přítomnost mikroorganismů. U lyofilizovaného ovoce byla zjištěna přítomnost těchto mikroorganismů celkem u 12 vzorků, kdežto u sušeného ovoce to bylo jen u 3 vzorků. Z jednotlivých druhů ovoce byl nejvyšší celkový počet mikroorganismů přítomen u sušeného manga.



Obrázek 33: Celkový počet mikroorganismů ve vzorcích ovoce

Z výsledných hodnot zanesených do grafu (obrázek 34) vyplývá, že u 14 z 29 vzorků ovoce byla detekována přítomnost růstově náročných mikroorganismů. U lyofilizovaného ovoce byla zjištěna přítomnost těchto mikroorganismů celkem u 11 vzorků, kdežto u sušeného ovoce to bylo jen u 3 vzorků. Z jednotlivých druhů ovoce byl nejvyšší počet růstově náročných mikroorganismů přítomen u lyofilizovaného a sušeného kiwi, lyofilizovaných višní a lyofilizovaných jablečných plátků.



Obrázek 34: Růstově náročné bakterie ve vzorcích ovoce

Přítomnost kvasinek a plísní byla zaznamenána u 5 z 29 vzorků ovoce. U lyofilizovaného ovoce byla zjištěna přítomnost těchto mikroorganismů celkem u 4 vzorků a u sušeného ovoce pouze u 1 vzorku. Z jednotlivých druhů ovoce byl nejvyšší počet plísní a kvasinek přítomen u lyofilizovaných malin a dále u sušeného kiwi.

Sporulující aerobní bakterie byly zjištěny pouze u 3 z 29 vzorků ovoce. Přítomnost těchto mikroorganismů byla detekována pouze u vzorků lyofilizovaného ovoce. Z jednotlivých druhů ovoce byl nejvyšší počet sporulujících bakterií přítomen u lyofilizovaného manga, banánových plátků a lyofilizovaných meruněk.

6.2 Diskuze

V rámci této bakalářské práce byla provedena mikrobiologická analýza sušených vzorků ovoce, které bylo sušeno horkým vzduchem nebo lyofilizací. Jednalo se o vzorky ovoce, které je původní v našich zeměpisných oblastech (jablka, hrušky, švestky, meruňky, jahody maliny, višně, borůvky a brusinky), i ovoce u nás nepůvodní (banán, ananas, mango, kiwi, pitaya). Část analyzovaných vzorků byla připravena v laboratorních podmínkách, část byla získána z firmy, která používá lyofilizované ovoce při výrobě müsli směsí nebo je prodává jako hotový výrobek. Z celkového počtu 29 analyzovaných vzorků bylo 19 vzorků lyofilizovaného ovoce a 10 vzorků ovoce sušeného horkým vzduchem. U všech vzorků bylo provedeno stanovení přítomnosti aerobních a/nebo fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů (celkového počtu mikroorganismů), růstově náročných bakterií, aerobních sporulujících bakterií, plísní a kvasinek.

Sušené ovoce je poměrně odolnou potravinou z hlediska možné mikrobiologické kontaminace díky nízké hodnotě vodní aktivity. I přesto je však vhodným prostředím pro některé mikroorganismy, zejména takové, které dokážou přežít proces sušení. (Bourdoux et al., 2016)

Dle nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny nesmí být v potravinách přítomny mikroorganismy, ani jejich toxiny nebo metabolity, které představují nebezpečí pro zdraví spotřebitele. Tato nařízení stanovují mikrobiologické standardy jen pro malý počet mikroorganismů a typu potraviny. (Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005, 2005)

Pro přesnější mikrobiologické stanovení je vhodné využít další mikrobiologický standard, kterým je Česká technická norma ČSN 56 9609 Pravidla správné hygienické a výrobní praxe – Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace. Pro zajištění bezpečnosti potravin je doporučováno dodržovat limity uvedené v této normě. (ČSN 56 9609, 2008)

Do celkového počtu mikroorganismů řadíme hlavně mezofilní aerobní a fakultativně anaerobní mikroorganismy. CPM informují o stupni kontaminace produktu, špatném technologickém zpracování nebo skladování potravin. (Cupáková, Karpíšková a Necidová, 2010)

Převážná část testovaných vzorků ovoce byla kontaminována mikroorganismy. U lyofilizovaného ovoce byla tato kontaminace detekována u 12 vzorků a u sušeného ovoce pouze u 3 vzorků. Z jednotlivých druhů ovoce byl nejvyšší počet CPM přítomen u lyofilizovaného manga ($8 \cdot 10^4$ CFU/g). U potravin ke přímé spotřebě je dle normy ČSN 56 9606 mezní hodnota pro celkový počet mikroorganismů stanovena na 10^8 /g. U všech testovaných vzorků nebyla tato limitní hodnota překročena. Pro lyofilizované či sušené ovoce nejsou stanoveny žádné limity. (ČSN 56 9609, 2008)

Studie Ntuli et al. zabývající se hodnocením mikrobiologického stavu sušeného ovoce a zeleniny porovnávala vzorky komerčně sušeného a domácího sušeného ovoce a zeleniny. Získané výsledky poukázaly na přítomnost vysokého počtu mezofilních mikroorganismů (CPM). Hodnoty pro komerčně sušenou zeleninu a ovoce činily cca $5,4 \cdot 10^1 - 1 \cdot 10^3$ CFU/g a pro domácí výrobu byla hodnota $2 \cdot 10^2 - 1 \cdot 10^3$ CFU/g. (Ntuli et al., 2017)

Plísně i kvasinky se řadí mezi indikátory mikrobiologické jakosti potravin. A právě přítomnost plísní a kvasinek může poukazovat na kažení potravin, jelikož lyofilizované a sušené ovoce se vyznačuje sníženou aktivitou vody, je to ideální místo pro růst právě těchto mikroorganismů. Výskyt plísní v potravinách může být nebezpečný z důvodu produkce mykotoxinů. (Görner a Valík, 2004)

U testovaných vzorků byla detekována přítomnost plísní a kvasinek u 5 z nich, přičemž největší počet byl přítomen u sušeného kiwi ($5,9 \cdot 10^3$ CFU/g). U lyofilizovaného ovoce byl zaznamenán větší počet kontaminovaných vzorků (konkrétně 4), než u sušeného ovoce (pouze 1 vzorek). U sušené zeleniny a ovoce je dle normy ČSN 56 9606 mezní hodnota pro počet mikroskopických vláknitých hub stanovena na 10^4 /g. Tato limitní hodnota byla překročena u jednoho testovaného vzorku, konkrétně u lyofilizovaných malin. U tohoto vzorku byla stanovena hodnota $1 \cdot 10^4$ CFU/g. Ostatní testované vzorky tuto limitní hodnotu nepřekračují. (ČSN 56 9609, 2008) Náchylnost lyofilizovaných vzorků ke kontaminaci mikroorganismy může být způsobena tím, že lyofilizované vzorky neprošly během technologického zpracování dostatečně vysokými teplotami na rozdíl od sušeného ovoce.

Mykotoxiny jsou hlavním důvodem sledování výskytu mikroskopických vláknitých hub v potravinách. Mezi hlavní producenty mykotoxinů můžeme zařadit mikroskopické vláknité houby řazených do rodů *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Například ochratoxin A,

produkovány výše jmenovanými rody plísní byl detekován u většiny vzorků sušeného ovoce určených pro španělský trh. (Abarca et al., 2003)

Dříve byla přítomnost ochratoxinu A v rozinkách překračující limitní hodnoty poměrně hojná, a proto byl Evropskou komisí stanoven limit pro obsah ochratoxinu A v rozinkách na množství 10 µg/kg. V dnešní době je sice stále detekován výskyt ochratoxinu A v rozinkách, ovšem jeho množství už nepřekračuje stanovené limitní hodnoty. (Pitt a Hocking, 2009)

V další studii provádějící mikrobiologickou analýzu 50 vzorků sušeného ovoce byla zjištěna jen minimální kontaminace plísněmi. Nejvyšší hodnoty kontaminace vykazovaly rozinky, u ostatních testovaných vzorků ovoce byla zjištěna minimální nebo žádná kontaminace. Nejčastěji identifikovanými plísněmi přítomnými v těchto vzorcích byly *Aspergillus niger* a *Penicillium* spp. (Tournas, Niazi a Kohn, 2015)

Mezi další indikátorové mikroorganismy řadíme sporulující aerobní/anaerobní bakterie. Přítomnost sporulujících bakterií poukazuje hlavně na primární a sekundární kontaminaci potravin, například při špatném skladování. (Görner a Valík, 2004)

U testovaných vzorků, byla detekována přítomnost aerobních sporulujících bakterií u 3 vzorků ovoce, přičemž největší počet byl přítomen u lyofilizovaných banánů, a to v množství $1,5 \cdot 10^4$ CFU/g. Kontaminace byla detekována pouze u lyofilizovaných vzorků ovoce. Limitní mikrobiologické hodnoty pro lyofilizované nebo sušené ovoce či potraviny nejsou uvedeny v normě ČSN 56 9606. (ČSN 56 9609, 2008)

V potravinářském průmyslu je kladen velký důraz na bezpečnost spotřebitelů. Proto je nutné, aby každý potravinářský podnik dodržoval mikrobiologická kritéria pro danou potravinu. Je také kladen důraz na suroviny, zpracování a skladování těchto surovin. Mikrobiologicky kontaminovaná surovina může ovlivnit celý technologický proces a znehodnotit tak celkový výsledný produkt. (Kłębukowska, Zadernowska a Chajęcka-Wierzchowska, 2015)

Lyofilizované a sušené ovoce představuje zdroj vitaminů, zachovává si svou chuť i barvu a je déle trvanlivé oproti čerstvému ovoci. Po mikrobiologické stránce je to o něco horší. Ať už se jedná o jakýkoliv typ sušení, k zajištění dostatečné mikrobiální nezávadnosti ovoce je to často nedostačující. Snahou je tento technologický proces neustále zdokonalovat, aby bylo dosahováno lepších a kvalitnějších výsledků. Například použití oxidu siřičitého

před sušením ovoce ovlivnilo výskyt mikroorganismů při skladování. Negativem tohoto plynu ovšem bylo, že při vyšším množství může u člověka vyvolat zdravotní komplikace jako jsou alergie či dušnost. Biologické metody byly účinné proti potravinovým patogenům u čerstvého ovoce. Ovšem jak už bylo dříve zmíněno všechny tyto metody musí projít dalšími testy. (Sheng a Wang, 2023)

Jelikož se sušené ovoce řadí mezi potraviny s nízkou vodní aktivitou, existuje zde riziko výskytu mikrobiální kontaminace včetně patogenních a podmíněně patogenních mikroorganismů. Aby bylo zajištěno zdraví spotřebitelů, využívají se kombinace sušení a předúprav. Při předúpravách ovoce se nejčastěji používají roztoky jako chlorid sodný, kyselina askorbová nebo sloučeniny síry a siřičitanů. Ovšem i tyto kombinace vyžadují další studie. Je třeba zaměřit se na teploty, předúpravy, kvalitu vstupních surovin a stanovení počátečního počtu mikroorganismů, aby bylo jasné, zda jsou metody účinné na inaktivaci mikroorganismů. Komě zdokonalování technologie sušení potravin je důležitá i správná výrobní praxe a systém HACCP. (Alp a Bulantekin, 2021)

Vyšší mikrobiální kontaminace byla detekována u lyofilizovaného ovoce oproti sušenému. Nejmenší mikrobiální kontaminace byla zaznamenána u sušených a lyofilizovaných banánů a ananasů, nejvyšší pak u lyofilizovaného manga a lyofilizovaného kiwi. Jelikož probíhá sušení za vyšších teplot než u lyofilizace, dochází tak pravděpodobně u sušení k inaktivaci většího množství mikroorganismů. Z výsledků mikrobiologické analýzy tak vychází lépe sušené ovoce než lyofilizované ovoce.

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na mikrobiologickou analýzu lyofilizovaného a sušeného ovoce. Celkem bylo testováno 29 vzorků lyofilizovaného a sušeného ovoce. Cílem mikrobiologické analýzy těchto druhů ovoce bylo stanovit počty vybraných indikátorových mikroorganismů, a to hlavně počet aerobních a/nebo fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů (celkový počet mikroorganismů), růstově náročných bakterií, plísni, kvasinek a aerobních sporulujících bakterií.

Výsledné hodnoty poukazují na to, že:

- U sušeného ovoce byla menší mikrobiologická kontaminace než u lyofilizovaného ovoce.
 - Nižší přítomnost mikroorganismů u sušeného ovoce je pravděpodobně zapříčiněna technologickým procesem, při kterém se dosahuje obvykle vyšších teplot.
- Přítomnost aerobních a/nebo fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů (CPM) byla zjištěna u více než poloviny testovaných vzorků (u 15 vzorků z 29). Nejvyšší počet uvedených mikroorganismů byl stanoven u sušeného manga.
- Růstově náročné bakterie byly detekovány u 14 vzorků z 29 testovaných. Nejvyšší počty růstově náročných bakterií byly stanoveny u lyofilizovaných višňi, jablečných plátků a kiwi.
- Přítomnost kvasinek a plísni byla zjištěna u 5 vzorků ovoce. Nejvyšší počet plísni a kvasinek byl stanoven u lyofilizovaných malin.
- Aerobní sporulující bakterie byly detekovány zhruba v desetině vzorků (3 vzorky z 29). Nejvyšší počty sporulujících bakterií byly stanoveny u lyofilizovaných banánových plátků.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABARCA, M.L. et al., 2003. Aspergillus carbonarius as the Main Source of Ochratoxin A Contamination in Dried Vine Fruits from the Spanish Market. *Journal of Food Protection* [online]. **66**(3), 504-506 [cit. 2023-05-16]. ISSN 0362028X. Dostupné z: doi:10.4315/0362-028X-66.3.504

AHMAD-MANSOUR, Nour et al., 2021. Staphylococcus aureus Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. *Toxins* [online]. **13**(10) [cit. 2023-03-21]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins13100677

ALP, Duygu a Özcan BULANTEKIN, 2021. The microbiological quality of various foods dried by applying different drying methods: a review. *European Food Research and Technology* [online]. **247**(6), 1333-1343 [cit. 2023-04-01]. ISSN 1438-2377. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-021-03731-z

BEUCHAT, Larry et al., 2009. Cronobacter sakazakii in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **136**(2), 204-213 [cit. 2023-03-21]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.029

BEUCHAT, Larry et al., 2013. Low--Water Activity Foods: Increased Concern as Vehicles of Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection* [online]. **76**(1), 150-172 [cit. 2023-03-26]. ISSN 0362028X. Dostupné z: doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-211

BOURDOUX, Siméon et al., 2016. Performance of Drying Technologies to Ensure Microbial Safety of Dried Fruits and Vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. **15**(6), 1056-1066 [cit. 2023-05-16]. ISSN 15414337. Dostupné z: doi:10.1111/1541-4337.12224

BURSOVÁ, Šárka et al., 2014. *Mikrobiologické laboratorní metody*. 1. vydání. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-676-6.

BURSOVÁ, Šárka et al., 2014. *Mikrobiologie potravin – praktická cvičení I. Obecná mikrobiologie. Revidované vydání*. 2. vydání. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-683-4.

BURSOVÁ, Šárka, Lenka NECIDOVÁ a Marta DUŠKOVÁ, 2014. *Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-741-1.

CROXATTO, Antony, Guy PROD'HOM a Gilbert GREUB, 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. **36**(2), 380-407 [cit. 2023-03-30]. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x

CUPÁKOVÁ, Šárka, Renáta KARPÍŠKOVÁ a Lenka NECIDOVÁ, 2010. *Mikrobiologie potravin - praktická cvičení II.: metody stanovení mikroorganismů v potravinách*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita. ISBN 978-80-7305-126-6.

ČSN 56 9609: *Pravidla správné hygienické a výrobní praxe - Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace.*, 2008. Praha: Český normalizační institut.

DEEPAK, Bisht, 2013. LYOPHILIZATION - PROCESS AND OPTIMIZATION FOR PHARMACEUTICALS. *International Journal of Drug Regulatory Affairs* [online]. New Delhi, **3**(1), 30-40 [cit. 2023-03-18]. ISSN 2321 - 6794.

FELLOWS, P.J., 2022. Freeze drying and freeze concentration. In: *Food Processing Technology* [online]. Elsevier, s. 619-630 [cit. 2023-03-21]. ISBN 9780323857376. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-85737-6.00023-6

FODDAI, Antonio a Irene GRANT, 2020. Methods for detection of viable foodborne pathogens: current state-of-art and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **104**(10), 4281-4288 [cit. 2023-03-30]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-020-10542-x

GAIDHANI, Kunal A., 2015. LYOPHILIZATION / FREEZE DRYING – A REVIEW. *World Journal of Pharmaceutical Research* [online]. Nashik, **4**(8), 526 [cit. 2022-10-18]. ISSN 2277– 7105. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/292047227_LYOPHILIZATION_FREEZE_DRYING_-_A_REVIEW

GOERING, Richard et al., Jaroslav JULÁK, ed., 2016. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Přeložil Jan BOBEK, přeložil Renáta ČERMÁKOVÁ, přeložil Karel HOLADA, přeložil Zora MĚLKOVÁ, přeložil Tibor MOŠKO, přeložil Jan NOVÁK, přeložil Ludmila PROKEŠOVÁ, přeložil Jiřina SUCHANOVÁ. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton. ISBN 978-80-7387-928-0.

GÖRNER, Fridrich a Lubomír VALÍK, 2004. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum. ISBN 80-967064-9-7.

HOLÝ, O. a S. FORSYTHE, 2014. Cronobacter spp. as emerging causes of healthcare-associated infection. *Journal of Hospital Infection* [online]. **86**(3), 169-177 [cit. 2023-03-21]. ISSN 01956701. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhin.2013.09.011

HOUBRAKEN, Jos, Jens FRISVAD a Robert SAMSON, 2011. Fleming's penicillin producing strain is not Penicillium chrysogenum but P. rubens. *IMA Fungus* [online]. **2**(1), 87-95 [cit. 2023-03-24]. ISSN 2210-6359. Dostupné z: doi:10.5598/imafungus.2011.02.01.12

CHITRAKAR, Bimal, Min ZHANG a Benu ADHIKARI, 2019. Dehydrated foods: Are they microbiologically safe?. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. **59**(17), 2734-2745 [cit. 2023-03-21]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2018.1466265

Introduction to Freeze Drying [online], 2020. Winchester, UK [cit. 2022-10-13]. Dostupné z: <https://biopharma.co.uk/introduction-to-freeze-drying/>

KADLEC, Pavel, 2003. *Procesy potravinářských a biochemických výrob.* Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 80-7080-527-7.

KłĘBUKOWSKA, Lucyna, Anna ZADERNOWSKA a Wioleta CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, 2015. Microbiological contamination of dried and lyophilized garlic as a potential source of food spoilage. *Journal of Food Science and Technology* [online]. **52**(3), 1802-1807 [cit. 2023-04-02]. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-013-1169-6

KOUKALOVÁ, Dagmar, 2013. *Praktická cvičení z lékařské mikrobiologie I.* 3., nezměn. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-3395-0.

KUMAR, Pramod, 2019. LYOPHILIZATION: AN IMPORTANT FORMULATION TECHNIQUE. *International Journal of Research -GRANTHAALAYAH* [online]. **7**(9), 11-15 [cit. 2023-04-29]. ISSN 2350-0530. Dostupné z: doi:10.29121/granthaalayah.v7.i9.2019.552

M091: HiMedia Laboratories [online], 2018. In: . [cit. 2023-05-01]. Dostupné z: https://www.himedialabs.com/eu/catalogsearch/result/?category_ids=&q=M1008

M1008: HiMedia Laboratories [online], 2018. In: . [cit. 2023-05-01]. Dostupné z: https://www.himedialabs.com/eu/catalogsearch/result/?category_ids=&q=M1008

M210: HiMedia Laboratories [online], 2018. In: . [cit. 2023-05-01]. Dostupné z: <https://www.himedialabs.com/eu/m210-bhi-broth-brain-heart-infusion-broth.html>

MUJUMDAR, Arun S., 2006. *Handbook of Industrial Drying* [online]. 3rd. Florida USA: CRC Press [cit. 2022-11-17]. ISBN 978-1574446685. Dostupné z: https://luchosoft.com/pdf/Hand_Book_Of_Industrial_Drying_2006.pdf

Nariadení Komise (ES) č. 2073/2005: o mikrobiologických kritériách pro potraviny, 2005. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A02005R2073-20190228>

NĚMEC, Miroslav a Dagmar MATOULKOVÁ, 2015. *Základy obecné mikrobiologie.* 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-7923-6.

NTULI, Victor et al., 2017. Microbiological quality of selected dried fruits and vegetables in Maseru, Lesotho. *African Journal of Microbiology Research* [online]. **11**(5), 185-193 [cit. 2023-05-16]. ISSN 1996-0808. Dostupné z: doi:10.5897/AJMR2016.8130

OYARZABAL, Omar a Steffen BACKERT, ed., 2012. *Microbial Food Safety* [online]. New York, NY: Springer New York [cit. 2023-03-30]. Food Science Text Series. ISBN 978-1-4614-1176-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4614-1177-2

PERRONE, Giancarlo a Antonia SUSCA, 2017. Penicillium Species and Their Associated Mycotoxins. In: MORETTI, Antonio a Antonia SUSCA, ed., Antonio MORETTI, Antonia SUSCA. *Mycotoxigenic Fungi* [online]. New York, NY: Springer New York, s. 107-119 [cit. 2023-03-24]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-6705-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-6707-0_5

PITT, John a Ailsa HOCKING, 2009. *Fungi and Food Spoilage* [online]. Boston, MA: Springer US [cit. 2023-05-16]. ISBN 978-0-387-92206-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-0-387-92207-2

PROSAPIO, Valentina a Estefania LOPEZ-QUIROGA, 2020. Freeze-Drying Technology in Foods. *Foods* [online]. **9**(7), 1 [cit. 2023-03-11]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods9070920

RAMBOUSKOVÁ, Jolana a Dana HRNČÍŘOVÁ, 2008. *PREVENCE ONEMOCNĚNÍ Z POTRAVIN* [online]. [cit. 2022-11-21]. Dostupné z: https://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/File/Publikace/Prevence_nahled_final.pdf

RATTI, C, 2001. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *Journal of Food Engineering* [online]. **49**(4), 311-319 [cit. 2023-03-11]. ISSN 02608774. Dostupné z: doi:10.1016/S0260-8774(00)00228-4

RAY, Bibek, 2003. *Fundamental Food Microbiology* [online]. 3rd edition. Florida: CRC Press [cit. 2022-12-10]. ISBN 0849316103. Dostupné z: <http://nuristianah.lecture.ub.ac.id/files/2014/09/fundamental-food-microbiology.pdf>

SHENG, Lina a Luxin WANG, 2023. Approaches for a more microbiologically and chemically safe dried fruit supply chain. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. **80** [cit. 2023-04-01]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2023.102912

SHUKLA, Soham, 2011. Freeze drying process: A review. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH* [online]. **2**(12), 3061-3068 [cit. 2022-12-10]. ISSN 0975-8232. Dostupné z: doi:http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2(12).3061-68

ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila, 2002. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha: Academia. ISBN 80-200-1024-6.

TANTRAY, Javeed et al., 2023. Gram staining of bacteria. In: *Basic Life Science Methods* [online]. Elsevier, s. 181-183 [cit. 2023-03-04]. ISBN 9780443191749. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-443-19174-9.00043-X

The Freeze Drying Theory and Process: Things to Consider [online], 2018. **08**(18), 16 s. [cit. 2022-10-12]. Dostupné z: https://www.ellab.com/wp-content/uploads/2020/08/the-freeze-drying-theory-and-process_ellab-whitepaper.pdf

TORTORA, Gerard, Berdell FUNKE a Christine CASE, 2018. *Microbiology an introduction*. 13th Edition. Boston: Pearson. ISBN 10: 0-13-460518-7; ISBN 13: 978-0-13-460518-0.

TOURNAS, V.H., N.S. NIAZI a J.S. KOHN, 2015. Fungal Presence in Selected Tree Nuts and Dried Fruits. *Microbiology Insights* [online]. **8** [cit. 2023-05-17]. ISSN 1178-6361. Dostupné z: doi:10.4137/MBI.S24308

TYLŠOVÁ, Petra a Šárka BURSOVÁ, 2015. *MIKROBIOLOGICKÝ ATLASUKÁZKY RŮSTU VYBRANÝCH PŮVODCŮ ALIMENTÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ* [online]. Brno [cit. 2022-10-21]. Dostupné z: https://www.vfu.cz/files/2340_60_tylsova_atlas_mb_elektronicky.pdf

VARZAKAS, Theodoros, 2015. *Handbook of food processing: Food preservation*. 1st edition. Florida: CRC Press. ISBN 978-1-4987-2176-9.

VOTAVA, Miroslav, 2000. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. 1. vyd. Brno: Hortus. ISBN 80-238-5058-X.

WEE, Liang et al., 2023. Relapsing *Aspergillus* otomycosis despite prolonged systemic antifungal therapy and resolution after topical voriconazole administration: A case report. *Medical Mycology Case Reports* [online]. **39**, 23-25 [cit. 2023-03-24]. ISSN 22117539. Dostupné z: doi:10.1016/j.mmcr.2022.12.006

WIESER, Andreas et al., 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **93**(3), 965-974 [cit. 2023-03-30]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-011-3783-4

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

Atd.	A tak dále
BMK	Bakterie mléčného kvašení
BHI	Brain Heart Infusion
CMP	Celkový počet mikroorganismů
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ESIA	<i>Enterobacter sakazakii</i> izolační agar
ChYGA	Chloramphenicol Yeast Glucose Agar
MPN	Most probable number
ND	Mikroorganismy nedetekovány
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polymerázová řetězová reakce
Spp.	Subspecies (poddruh)
UV	Ultrafialové záření

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Složení lyofilizátoru (Mujumdar, 2006)	15
Obrázek 2: <i>Echerichia coli</i> na Endo agaru (Koukalová, 2013).....	19
Obrázek 3: <i>Cronobacter</i> spp. na ESIA agaru (Tylšová a Bursová, 2015).....	20
Obrázek 4: <i>Salmonella enterica</i> na Endo agaru (Koukalová, 2013)	21
Obrázek 5: <i>Staphylococcus aureus</i> na krevním agaru (Koukalová, 2013).....	22
Obrázek 6: <i>Penicillium rubens</i> (Houbraken, Frisvad a Samson, 2011).....	22
Obrázek 7: <i>Aspergillus niger</i> (Wee et al., 2023)	23
Obrázek 8: Nárůst <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na <i>Pseudomonas</i> agaru P (Votava, 2000)...	30
Obrázek 9: Vzorek sušeného jablka.....	35
Obrázek 10: Vzorek lyofilizovaných jablečných plátků.....	35
Obrázek 11: Vzorek lyofilizovaných jablek	35
Obrázek 12: Vzorek sušené hrušky	35
Obrázek 13: Vzorek lyofilizované hrušky	36
Obrázek 14: Vzorek sušených švestek.....	36
Obrázek 15: Vzorek lyofilizovaných švestek	36
Obrázek 16: Vzorek lyofilizovaných švestek	36
Obrázek 17: Vzorek sušené meruňky	37
Obrázek 18: Vzorek lyofilizované meruňky.....	37
Obrázek 19: Vzorek lyofilizované višně	37
Obrázek 20: Vzorek lyofilizované jahody	37
Obrázek 21: Vzorek lyofilizované maliny.....	38
Obrázek 22: Vzorek sušené borůvky	38
Obrázek 23: Vzorek lyofilizované borůvky.....	38
Obrázek 24: Vzorek lyofilizovaných borůvek.....	38
Obrázek 25: Vzorek sušených brusinek.....	39
Obrázek 26: Vzorky banánu – vlevo lyofilizovaný, vpravo sušený	39
Obrázek 27: Vzorek lyofilizovaných banánů	39
Obrázek 28: Vzorky ananasu – vlevo lyofilizovaný, vpravo sušený.....	39
Obrázek 29: Vzorky manga – vlevo lyofilizovaný, vpravo sušený	40
Obrázek 30: Vzorek lyofilizovaného manga	40
Obrázek 31: Vzorky kiwi – vlevo lyofilizovaný, vpravo sušený	40
Obrázek 32: Vzorky pitaya – vlevo lyofilizovaná, vpravo sušená	40
Obrázek 33: Celkový počet mikroorganismů ve vzorcích ovoce	52
Obrázek 34: Růstově náročné bakterie ve vzorcích ovoce	53

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Seznam analyzovaných vzorků ovoce	34
Tabulka 2: Detekované skupiny mikroorganismů a kultivační půdy použité k jejich stanovení	41
Tabulka 3: Složení PCA (M091, 2018)	42
Tabulka 4: Složení ChYGA (M1008, 2018).....	42
Tabulka 5: Složení BHI (M210, 2018)	43
Tabulka 6: Stanovované mikroorganismy, doba a teplota kultivace	44
Tabulka 7: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušených a lyofilizovaných jablek	45
Tabulka 8: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušených a lyofilizovaných hrušek	46
Tabulka 9: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušených a lyofilizovaných švestek	46
Tabulka 10: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušených a lyofilizovaných meruněk	47
Tabulka 11: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) lyofilizované višně	47
Tabulka 12: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) lyofilizovaných jahod	48
Tabulka 13: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) u malin	48
Tabulka 14: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušených a lyofilizovaných borůvek	49
Tabulka 15: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušených brusinek	49
Tabulka 16: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušených a lyofilizovaných banánů	50
Tabulka 17: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušeného a lyofilizovaného ananasu	50
Tabulka 18: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušeného a lyofilizovaného manga	51
Tabulka 19: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušeného a lyofilizovaného kiwi	51
Tabulka 20: Stanovená množství vybraných indikátorových mikroorganismů (CFU/g) sušené a lyofilizované pitayi	52

SEZNAM PŘÍLOH

Foto 1: Plísně a kvasinky – lyofilizované mango, 1. ředění	68
Foto 2: Plísně a kvasinky – lyofilizované kiwi, 2. ředění	68
Foto 3: Celkový počet mikroorganismů – lyofilizované jablko, 1. ředění	69
Foto 4: Růstově náročné bakterie – lyofilizované jablko, 1. ředění	69
Foto 5: Růstově náročné bakterie – lyofilizované banánové plátky, 1. ředění	70
Foto 6: Růstově náročné bakterie – lyofilizované mango, 1. ředění	70
Foto 7: Celkový počet mikroorganismů – lyofilizované mango, 1. ředění	71
Foto 8: Sporulující bakterie – lyofilizované jablko, 1. ředění	71

PŘÍLOHA P I: PETRIHO MISKY S NAROSTLÝMI KOLONIEMI

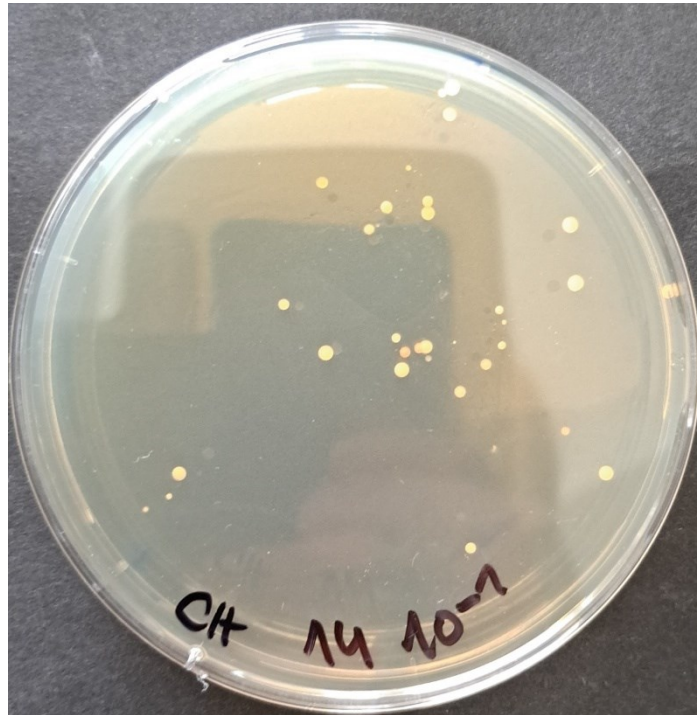


Foto 1: Plísňe a kvasinky – lyofilizované mango, 1. ředění

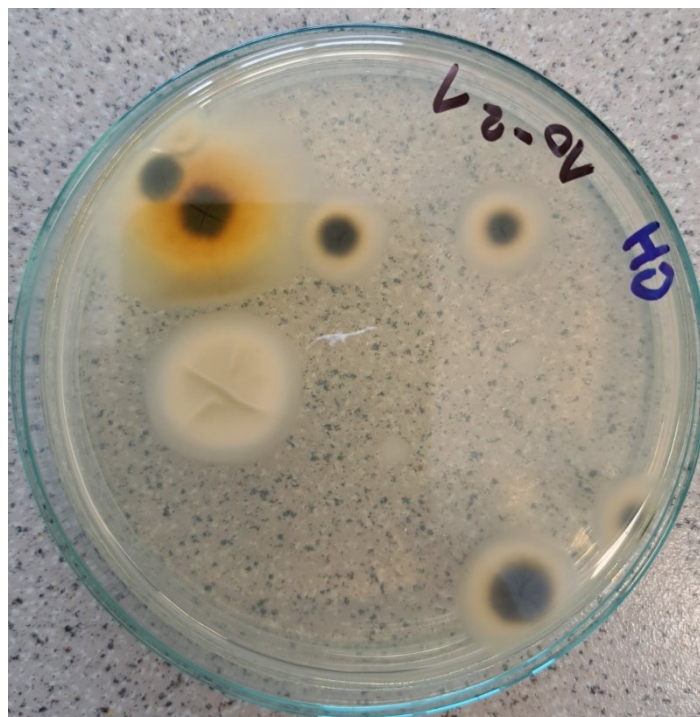


Foto 2: Plísňe a kvasinky – lyofilizované kiwi, 2. ředění

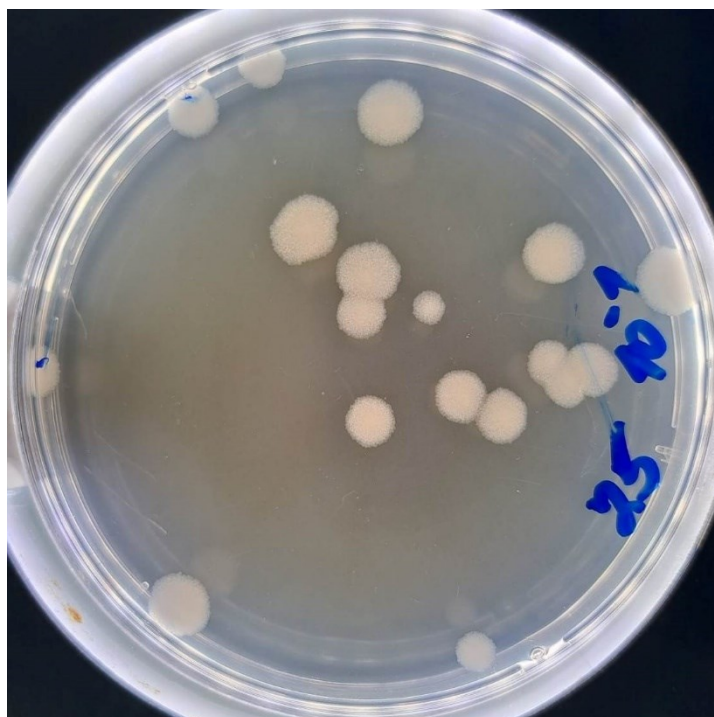


Foto 3: Celkový počet mikroorganismů – lyofilizované jablko, 1. ředění

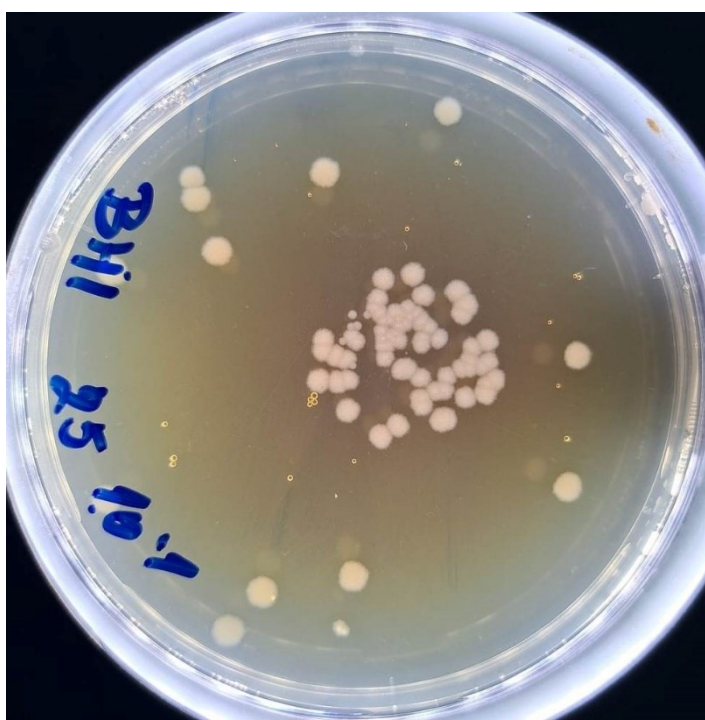


Foto 4: Růstově náročné bakterie – lyofilizované jablko, 1. ředění

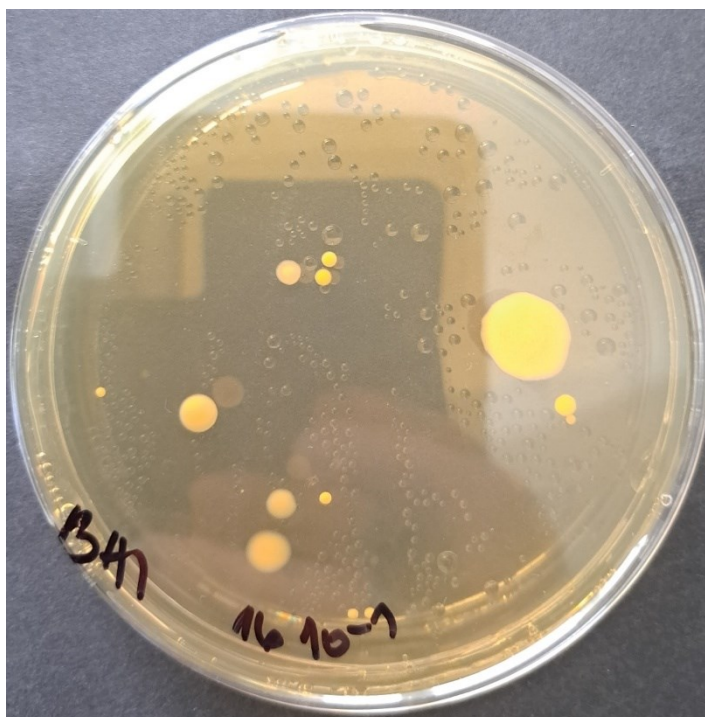


Foto 5: Růstově náročné bakterie – lyofilizované banánové plátky, 1. ředění

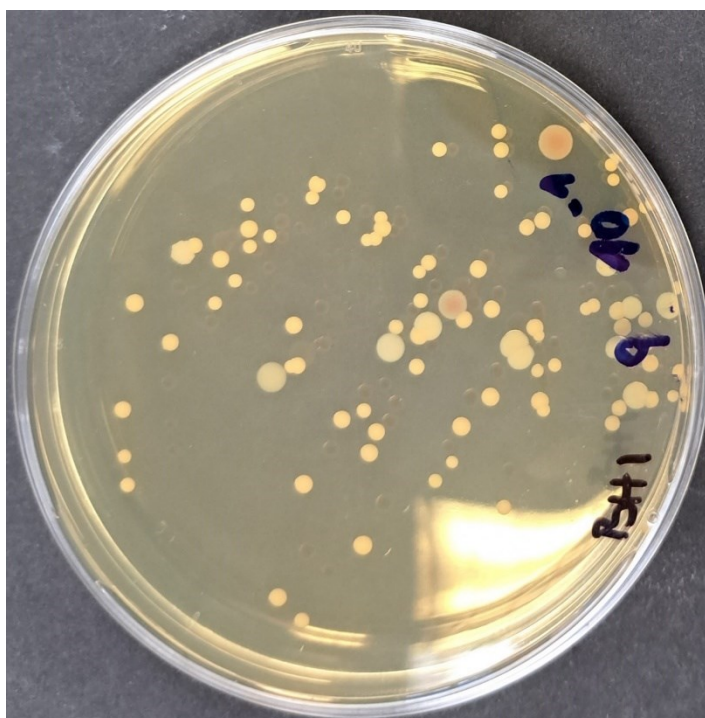


Foto 6: Růstově náročné bakterie – lyofilizované mango, 1. ředění

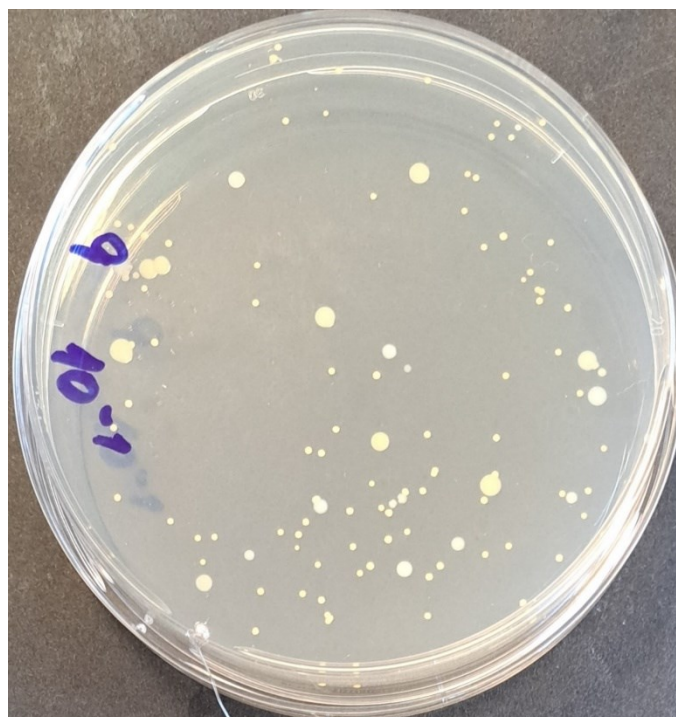


Foto 7: Celkový počet mikroorganismů – lyofilizované mango, 1. ředění

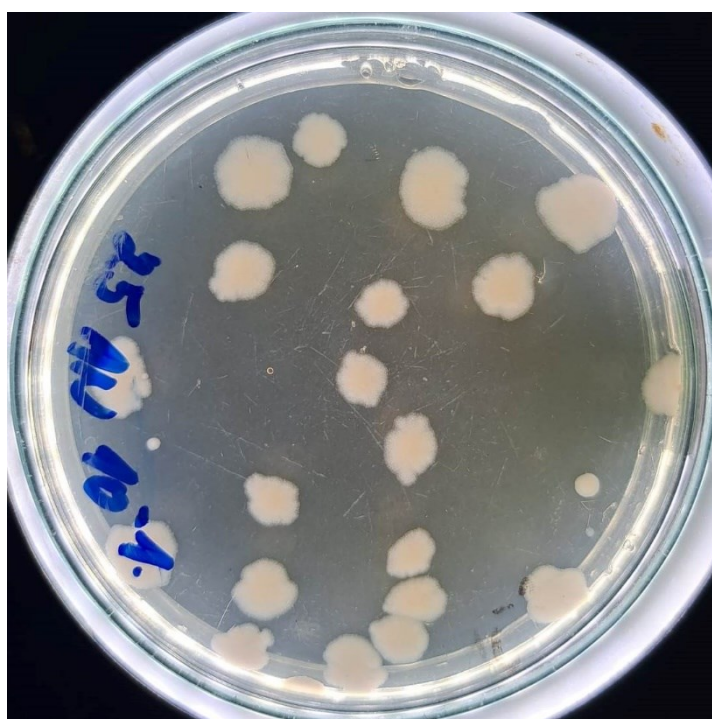


Foto 8: Sporující bakterie – lyofilizované jablko, 1. ředění