

Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních
zdrojů**

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Mikrobiologická jakost drobných semen rostlin

Diplomová práce

Autor práce: Hana Kuřáková

Obor studia: Výživa a potraviny (AMD)

Vedoucí práce: Ing. Eva Popelářová, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Mikrobiologická jakost drobných semen rostlin" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Evě Popelářové, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a odborné vedení mé diplomové práce.

Mikrobiologická jakost drobných semen rostlin

Souhrn

Drobná semena rostlin k přímé spotřebě jsou oblíbenou součástí jídelníčků lidí. Konzumují se pro svou chuť a pro významnou nutriční hodnotu. V poslední době jsou velmi oblíbenou skupinou potravin i u malých dětí, a tak je důležité, aby splňovala zdravotní nezávadnost.

Cílem diplomové práce bylo zhodnotit 20 vzorků jedlých semen rostlin a získat tak přehled o jejich mikrobiologické jakosti. K rozborům byly použity vzorky sezamu, slunečnice, konopného semene, lnu, chia, quinoi, tykve a máku.

U sledovaných produktů bylo hodnoceno množství plísní a bakterie *Escherichia coli*. Plísně byly následně určeny na úroveň rodu. Tyto mikroorganismy byly vybrány proto, že dle vyhlášky 132/2004 Sb. byly stanoveny přípustné hodnoty pro *E. coli* a pro plísně v jedlých semenech rostlin. Tato vyhláška byla ale zrušena a nahrazena Nařízením komise (ES) 2073/2005 a 1441/2007, kde nejsou pro drobná semena rostlin limity uvedeny. Práce se tedy opírá o původní vyhlášku 132/2004 Sb.

Stanovení probíhalo ihned po zakoupení výrobků. Následně byla semena 3 měsíce skladována v původních, uzavřených obalech. Po uplynutí této doby bylo provedeno nové stanovení. Bylo zjištěno, že počty plísní u čerstvých a skladovaných vzorků se ve většině případů statisticky významně nelišily. Pouze u *Escherichia coli* nejen že nenastal skladováním nárůst, ale u vzorku lnu došlo dokonce k statisticky významnému poklesu množství KTJ/g.

Bakterií *E. coli* bylo v obou stanovení kontaminováno přibližně 80 % vzorků. Nejvíce byly znečištěny vzorky lnu, kde hodnoty přesáhly 10^5 KTJ/g. Celkem překročilo hodnoty 5×10^2 stanovené vyhláškou 132/2004 Sb. šest vzorků jedlých semen rostlin.

Téměř u poloviny vzorků nebyla prokázána žádná kontaminace mikromycetami. Nejvyšší obsah plísní (850 resp. 1350 KTJ/g) vykazoval vzorek slunečnice, ale i ten zdaleka nedosahoval doporučenou hodnotu 10^5 KTJ/g.

Při kvalitativním stanovení mikromycet byl dominantní *Aspergillus* spp., což není příznivé z hlediska možného výskytu mykotoxinů. Následovaly rody *Penicillium* a *Alternaria*, ostatní (*Cladosporium*, *Rhizopus*, *Rhizoktonium*, *Alternaria* a *Mycelia sterilia*) se vyskytovaly v mizivém množství. Pozitivním faktem bylo, že celkové počty plísní byly malé a vzorky splňují hygienickou jakost.

Hypotéza, která předpokládala, že vzorky všech semen budou splňovat podmínky legislativy po celou dobu jejich minimální trvanlivosti byla potvrzena pouze u plísní.

Klíčová slova: Drobná semena rostlin; mikromycety; *Escherichia coli*; sušení; hygiena potravin

Microbiological quality of small plant seeds

Summary

Small seeds of plants for direct consumption are one of the favourite parts of people's diet. They are being valued for their good taste and significant nutritional quality. Lately they have even won favour with small children, therefore it is important that they meet all the standards in terms of being harmless to health.

The focus of the thesis is to examine 20 samples of edible seeds and determine their microbiological quality. For the biological analysis there were used seeds of sesame, sunflower, hemp, linen, chia, quinoa, gourd and poppy.

In these selected products quantities of mold and *Escherichia coli* bacteria were measured. Subsequently, the molds were classified up to genus rank. Those microorganism were chosen because the regulation No 132/2004 Sb. sets permissible quantities of *E. coli* and mold in edible plant seeds. This has later been revoked and replaced with Commission Regulation (EC) No 2073/2005 and No 1441/2007 where there are no small seed limits listed. This work thus relies upon the former regulation No 132/2004 Sb.

The measurement was conducted right after purchase of the products. Later on the seeds were kept in their original, well-sealed packaging for 3 months. After that period, new measurements were made. It has been found that mold counts were not severely different for the fresh samples and the stored samples. It was only *E. Coli* which didn't increase by storing and, in linen sample it even recorded significant reduction of CFU/g.

Roughly 80% of the samples in both measurements were contaminated by *E. coli*. The most contaminated were the samples of linen, where the measured values exceeded 10^5 CFU/g. Altogether the values 2×10^2 given by regulation 132/2004 Sb. were exceeded in 6 samples.

In almost half of all samples no micromycetes contamination was proven. Micromycetes contamination was most prominent in sunflower sample (850 resp. 1350 CFU/g), but even this one was far from reaching the recommended value of 10^5 CFU/g.

In qualitative measurements of micromycetes *Aspergillus sp.*, was predominant which is not very convenient because of the probability of mycotoxine occurrence. Next came *Penicillium* a *Alternaria*. Other genera (*Cladosporium*, *Rhizopus*, *Rhizoktonium*, *Alternaria*, *Mycelia sterilia*) were found only in small volumes. The upbeat outcome is however, that total mold quantities were small and the samples met hygienic requirements.

The supposition that expected samples of all the seeds to meet the legislative requirements up until the expiration date was confirmed only in case of molds.

Keywords: Small seeds of plants; micromycetes; *Escherichia coli*; drying; hygiene of food

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce	2
3	Přehled literatury.....	3
3.1	Jedlá semena rostlin	3
3.1.1	Sezam indický.....	3
3.1.2	Slunečnice roční.....	4
3.1.3	Konopí seté.....	4
3.1.4	Len olejný.....	5
3.1.5	Šalvěj hispánská - chia.....	5
3.1.6	Merlík chilský – quinoa.....	6
3.1.7	Tykev.....	7
3.1.8	Mák setý.....	7
3.2	Konzervace	8
3.2.1	Aktivita vody	8
3.2.2	Sušení	10
3.3	Význam mikroorganismů	11
3.4	Bakterie	11
3.4.1	Escherichia coli.....	11
3.4.2	Salmonella	12
3.4.3	Bacillus	13
3.4.4	Clostridium	14
3.5	Plísně.....	14
3.5.1	Mucor	15
3.5.2	Rhizopus	16
3.5.3	Alternaria.....	16
3.5.4	Aspergillus.....	17
3.5.5	Cladosporium.....	18
3.5.6	Fusarium.....	18
3.5.7	Penicillium.....	19
3.5.8	Mycelia sterilia	20
3.6	Mykotoxiny.....	21
4	Materiál a metody	23
4.1	Vzorky	23
4.2	Použitá kultivační média.....	28
4.3	Pracovní postup.....	29
4.4	Vyhodnocení.....	30
5	Výsledky	30

5.1.1	Mikromycety.....	31
5.1.2	Escherichia coli.....	35
5.1.3	Porovnání výrobců.....	35
5.1.4	Porovnání výrobků.....	36
6	Diskuse	42
7	Závěr	48
8	Zdroje.....	49

1 Úvod

Drobná semena rostlin k přímé spotřebě jsou nejen v poslední době často využívána v potravinářství. Konzumují se jako čerstvé, pražené, přidávají se do kaší, do pečiva. Vyrábí se z nich nutričně ceněné oleje. Jsou oblíbené pro svou chuť, ale také pro vyvážené nutriční hodnoty. Zajišťují přísun esenciálních mastných kyselin i aminokyselin. Dále jsou výborným zdrojem mnoha minerálních látek a vitamínů (hlavně těch rozpustných v tucích).

Protože jsou semena konzumována jak dospělými, tak malými dětmi, je důležité, aby splňovala hygienické normy a byla tak zdravotně nezávadná. Je potřebné, aby se zdravotní nezávadnost hlídala v průběhu celého výrobního procesu, tj. pěstování, sklizně, transportu a zejména pak při skladování a konzervaci (Suchý, Herzig 2005). Jedlá semena rostlin jsou potravinou, která bývá často náchylná na napadení plísněmi. Nebezpečné pro člověka může být přítomnost mikromycet, které mohou produkovat sekundární metabolity - mykotoxiny, které patří mezi závažné kontaminanty a způsobují u člověka řadu onemocnění, zvané mykotoxinózy. Mají schopnost, přecházet z živočišných produktů do těla člověka, kde se mohou kumulovat. Působí karcinogenně, teratogenně, mutagenně, imunotoxicky, estrogenně (Egmond et al 2007).

Základní charakteristika drobných semen rostlin k přímé spotřebě je popsána spolu s problematikou kontaminace nežádoucími mikroorganismy v první části diplomové práce. V praktické části jsou nastíněny metody, pracovní postup a výsledky vlastního šetření.

2 Cíl práce

Semena různých druhů rostlin jsou často využívána v potravinářství a konzumována jak dospělými, tak malými dětmi. Proto je důležité, aby splňovala hygienickou kvalitu a byla tak zdravotně nezávadná.

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda vzorky semen od různých výrobců splňují hygienické normy (se zaměřením na mikromycety a bakterii *Escherichia coli*).

Vzorky pocházely z maloobchodní sítě. Rozbor byl proveden krátce po zakoupení výrobků.

Následně byla semena uskladněna 3 měsíce v místnosti při pokojové teplotě v původních uzavřených obalech. Po uplynutí této doby byla drobná semena rostlin opět podrobena stejným rozborům.

Hypotéza předpokládala, že vzorky všech semen budou splňovat podmínky legislativy po celou dobu jejich minimální trvanlivosti.

3 Přehled literatury

Potraviny, jakožto komodita, se kterou lidé přicházejí denně do styku, nesmí být zdraví nebezpečná. Požadavky jsou kladeny mimo jiné na hygienickou nezávadnost potravin, kam se řadí i mikrobiologická jakost.

3.1 Jedlá semena rostlin

Jedlá semena jsou rozmnožovací orgány semenných rostlin. Je v nich proto koncentrované větší množství živin. Čím dál tím víc jsou v poslední době v oblibě u konzumentů. Jejich výživové údaje jsou velmi příznivé a většina z nich se řadí mezi takzvané funkční potraviny. Funkční potraviny jsou takové, které mají vysokou koncentraci některých minerálních látek, vitamínů nebo jiných prospěšných látek pro lidské zdraví. Funkční potraviny jsou skloubení potravinářství, výživy a medicíny (Martirosyan & Singh 2015). Řadíme mezi ně například lněné semeno, chia, konopné semeno, sezam, slunečnici, mák, quinou.

3.1.1 Sezam indický

Sezam indický je dvouděložná, jednoletá rostlina z čeledi sezamovitých. Pochází pravděpodobně z oblasti Babylonu a Sýrie. Dnes se pěstuje hlavně v Africe, Indii, Íránu. Jedná se o nejstarší, lidmi využívanou olejninu, která byla pěstována již kolem 4000 př. n. l. (Lim 2012).

Dorůstá do výšky 0,5-1,5 m. Listy jsou jednoduché 7,5-14 cm dlouhé. Květy jsou bílé, žluté nebo světle růžové. Plodem je tobolka dlouhá až 5 cm. Semena o velikosti 2,5-3 mm jsou černé, hnědé, žluté, červené nebo bílé barvy, s hladkým nebo žebrovaným povrchem. (Ross 2005) Jejich velikost, forma a barvy se liší podle tisíců odrůd (Miraj & Kiani 2016).

K potravinářskému účelu je využíváno semeno. Přibližně 65 % celosvětové produkce je spotřebováno na olej, 35 % se používá jako koření a v potravinářství jako důležitý zdroj minerálních látek (Wrigley et al. 2016). Sezamové semeno je vhodné i ke krmným účelům a sezamový olej má využití i v medicíně. Používá se na léčbu zácpy, proti střevním parazitům, má pozitivní vliv na ledviny, játra a slezinu (Miraj & Kiani 2016).

Sezamové semeno obsahuje přes 50 % oleje. Sezamový olej obsahuje vysoké množství nenasycených mastných kyselin, hlavně kyseliny olejové a linolové, a i malé množství kyseliny linolenové, arachidonové a volných mastných kyselin. Větší množství nenasycených kyselin je sice zdraví prospěšné (podílí se na snižování LDL cholesterolu v krvi), ale z nutričního hlediska jsou náchylné na oxidaci, tzv. žluknutí tuků. Olej dále obsahuje malé množství nasycených mastných kyselin (palmitové, stearové). Tento olej vykazuje výrazně vyšší stabilitu než jiné dietní rostlinné oleje. To je připisováno poměrně vysoké hodnotě tokoferolu a lignanů, což jsou známé antioxidanty (Wan et al. 2014). V sezamovém semeni se nachází až 20 % bílkovin, které mají vhodnou sestavu aminokyselin. Dále je v něm 12 % vlákniny, významné množství vitamínů B1, B2, B3, B6. Z minerálních látek jsou zastoupeny fosfor, vápník, hořčík, draslík, sodík, železo, měď a zinek. Ve 100 gramech sezamového semene je 573 kcal (Miraj & Kiani 2016; USDA 2018).

3.1.2 Slunečnice roční

Slunečnice roční je rostlina patřící do čeledi hvězdnicovitých, pocházející z jihozápadní Ameriky, kde byla domestikována kolem 3000 př. n. l., kdy byla semena využívána k přímé konzumaci. Do Evropy byla dovezena Španěly v 16. století. Ve východní Evropě se stala jednou z hlavních okrasných rostlin, a to až do 19. stol., než z ní byla ruskými šlechtiteli vypěstována významná olejnína. Dnes se pěstuje téměř po celém světě v mírném a subtropickém podnebí. Je známo kolem 55 druhů slunečnice, z nichž 2/3 jsou pěstovány pro semeno, zbylé jako okrasné rostliny (Wrigley et al. 2016).

Semena slunečnice, pro které je rostlina pěstována, jsou významným zdrojem proteinů, až 20 %, které obsahují vysoké množství esenciálních aminokyselin. Z minerálních látek jsou hojně zastoupeny hořčík, draslík, selen, železo, měď, fosfor, mangan a zinek. Naopak sodíku obsahuje velmi málo, a tak jsou tato jedlá semena vhodná pro prevenci před vysokým krevním tlakem a tím spojenými kardiovaskulárními problémy. Slunečnicová semena dále obsahují vitamíny. Převládá vitamín rozpustný v tučích-tokoferol (vit. E), dále jsou dobrým zdrojem vitamínů skupiny B. Také obsahují významné množství lipidů. Hlavní složkou lipidů semen jsou neutrální triglyceridy, dále fosfolipidy nebo glykolipidy. Z mastných kyselin semena slunečnice obsahují nasycené kyseliny-palmitovou a stearovou. Nenasycené kyseliny-olejovou, linolovou a linolenovou. Šlechtitelé kladou význam na množství kyseliny olejové, která má významnou pozitivní nutriční hodnotu. Zvláště polynenasycené kyseliny linolová a linolenová mají pozitivní nutriční význam. Jsou potřebné pro strukturu buněčných membrán a svou úlohu hrají i při transportu cholesterolu v krvi. Ve slunečnicovém oleji nejsou obsaženy žádné trans mastné kyseliny. Na 100 g sušených slunečnicových semen připadá 633 kcal (Prugar et al. 2008; USDA 2018).

Podle skladby mastných kyselin v oleji, které chceme mít v dominanci, je vybrána odrůda. Průmysl, ve kterém je vyráběn olej na smažení preferuje množství kyseliny olejové nižší, kvůli sensorickým vlastnostem. Zatímco oleje vyráběné k přímé spotřebě, např. do salátů obsahují zpravidla vyšší množství kyseliny olejové.

Získávat olej můžeme třemi způsoby. Pomocí lisů, kdy jsou semena zbavena vnější slupky, dále jsou zahřáta na 85-90 °C, rozdrčena a následně je z drti získán lisováním olej. Druhý způsob je pomocí rozpouštědla, nejčastěji hexanu, které je přidáno do olejné drti. Získáme tím větší výnos, ale olej se musí následně opět hexanu zbavit pomocí destilace. Třetí způsob je kombinací předchozích metod a je také nejúčinnější (Wrigley et al. 2016).

Složení slunečnice se liší podle způsobu využití. Je známa cukrářská slunečnice, která obsahuje více bílkovin, cukrů a méně olejů a olejný typ, který má zvýšený podíl olejů. Množství a typy olejů jsou velmi variabilní. Závisí na mnoha faktorech jako je teplota prostředí, hnojení dusíkem nebo typ slunečnice (Prugar et al. 2008).

3.1.3 Konopí seté

Konopí seté je rychle rostoucí jednoletá, dvoudomá rostlina pocházející ze střední Asie. Patří do rodu *Canabinaceae*. V lidové medicíně a v potravinářství, jako zdroj vlákniny a živin se používalo už odpradáвна.

Využití rostliny je mnohostranné. Je vyšlechtěno mnoho odrůd se zaměřením na množství dané látky podle účelu, ke kterému bude rostlina využita (Chandra et al. 2017). Konopí indické je používáno ve farmacii, zejména kanabinoidy, pro zmírnění potíží při vážných, dlouhodobých nemocích. Konopí seté se používá ve stavebním průmyslu k výrobě bioplastů, tkanin, šňůr a materiálu podobného betonu (Frassinetti et al. 2018). Dále slouží jako krmivo. V potravinářství je konopné semínko bráno jako funkční potravina. Využívají se semena k přímě konzumaci, na mouku, krupici, případně k výrobě oleje (Andre et al. 2016).

Konopné semeno obsahuje 25-35 % tuků, z čehož jsou hojně zastoupeny nenasycené mastné kyseliny linolová a linolenová. Poměr těchto kyselin je 3:1, což je pro člověka ideální poměr. Dále obsahuje 20-25 % bílkovin, které jsou složeny ze všech esenciálních aminokyselin. Z minerálních látek jsou zastoupeny fosfor, hořčík, draslík, sodík, síra, vápník, železo, jód a zinek. Konopné semeno je dále bohaté na vitamín E, a proto vykazuje vysokou oxidační stabilitu. Dále jsou v něm obsaženy vitamíny skupiny B, C a vitamín rozpustný v tucích. (Frassinetti et al. 2018; Devi & Khanam 2019).

3.1.4 Len olejný

Len olejný je jednoletá rostlina patřící do čeledi lnovitých. Původní planý druh lnu pochází pravděpodobně ze severní Afriky a přední Asie. Vznik kulturních forem lnu se datuje do doby před pěti až šesti tisíci lety. Do Evropy se dostal před cca 5000 lety, když jej Egypťané pěstovali jako přadnou rostlinu. Dnes jsou největšími producenty Kanada, Rusko a Čína.

Rostlina dorůstá do výšky až 60 cm. Stonky jsou tenké a velmi vláknité. Listy jsou dlouhé až 4 cm a široké 4 mm. Květy jsou světle modré a semena rostlina produkuje 30-60 dní po rozkvetu.

Ve světě jsou známy tři typy lnu. A to přadný, olejný a olejnopřadný. U lnu olejného a olejnopřadného je jako surovina využíváno prvotně zrno, stonky na přízi se využívá jen sporadicky. Zatímco u lnu přadného je tomu přesně naopak (Prugar et al. 2008).

Dnes pěstované odrůdy lnu mají 40-50 % oleje, z toho je 55-57 % kyselina linolenová (omega 3), to je nejvíce mezi olejnatými rostlinami. Obsahuje i další nenasycené kyseliny ve významném množství. Kyseliny linolové (omega 6) je 16 %, olejové 18 %. Poměr polynenasycených mastných kyselin omega 3 a omega 6 ve stravě lidí je cca 20:1. Pro snížení poměru na optimálních 2:1-5:1 je tedy lněný olej nebo lněná semena ideální. Dále se v něm nachází i malé množství kyseliny stearové a palmitové (Wrigley et al. 2016). Lněný olej je také ceněný v kosmetickém nebo farmaceutickém průmyslu. Bílkovin lněné semeno obsahuje 20-30 % v závislosti na kultivaru. 28 % zaujímá vláknina. Z minerálních látek obsahují významné množství pro člověka vápníku, hořčíku, draslíku, fosforu, železa, manganu a selenu. Z vitamínů jsou v těchto jedlých semenech zastoupeny vitamíny skupiny B (B1, B3, B6) a vitamín E. Obsažené fenylypropanoidy a terpenoidy mají antibakteriální, protizánětlivé, antifungální účinky (Zuk et al. 2015).

3.1.5 Šalvěj hispánská - chia

Šalvěj hispánská, známá také jako chia je jednoletá bylina původně z jižního Mexika a Guatemale. Patří do čeledi hluchavkovitých. Z šalvěje hispánské jsou významná malá, tmavá

a bílá semena, která jsou ceněna pro svojí nutriční hodnotu. Tato semena byla velmi důležitou složkou potravy již v předkolumbijských dobách, kdy chia staří Mayové a Aztékové používali k vaření kaší, pro samotnou konzumaci, k výrobě olejů nebo jako zdroj mouky a spolu s kukuřicí, amarantem a fazolemi tvořila základní složení potravy ve středoamerické civilizaci. Na chia se postupem času zapomnělo a znovuobjevení nastalo v 90. letech minulého století (Falco et al. 2017).

Chia semena jsou považována za tzv. funkční potravinu. Ve 100 gramech je 429 kcal. Jsou významným zdrojem lipidů, proteinů, vlákniny i vitamínů. Oleje z chia byly od pradávna používány jako léčivé látky proti očním infekcím nebo žaludečním potížím. Obsah oleje v semenech se pohybuje v rozmezí 25-50 % s velkým podílem nenasycených mastných kyselin. Nejvíce je v oleji z chia semínek kyseliny α -linolenové, která zaujímá téměř 63 % ze všech mastných kyselin. Dále olej obsahuje nenasycené kyseliny linolovou a olejovou a nenasycené kyseliny palmitovou a stearovou. Dále jsou dobrým zdrojem bílkovin 19-26,5 %. První limitující aminokyselinou je dle Webera et al. (1991) threonin, následovaný lysinem a leucinem. Vláknina je zde zastoupena jak v rozpustné, tak v nerozpustné formě (celulóza, pentozany, lignin). Část vlákniny tvoří povrch semena. Při hydrataci se na obalu semena tvoří sliz a tím zvětšují svůj objem a pocit nasycení. Z vitamínů obsahují chia vitamín B12, E a C. Z minerálních látek je přítomno např. železo nebo vápník, kterého je v chia až 5x více než v mléce, ovšem využitelnost je o něco nižší. Dále bylo zjištěno, že chia semena obsahují fenolické sloučeniny-tokoferol, který je významný antioxidant a fytosterol, který má prooxidační aktivitu. Chia neobsahují lepek, čímž jsou vhodná pro bezlepkovou stravu. Neobsahují ani žádné antinutriční látky (Falco et al. 2017; USDA 2018).

3.1.6 Merlík chilský – quinoa

Merlík chilský je jednoletá, dvouděložná rostlina patřící do čeledi laskavcovitých. Pochází z oblasti Peru a Bolívie. Jedná se o rostlinu, která byla využívána již v dobách kolem 3500 let př. n. l. Po kolonizaci Španěly bylo pěstování merlíku zakazováno kvůli jeho významné nutriční hodnotě. Rostlinu pěstovali domorodci pouze v odlehlých horách ve výškách kolem 3800 m. Do Evropy se rostlina dostala kolem roku 1550 a byla pěstována pouze v dobách hladomoru a válek, kdy doplňovala obilné zrna. U nás se zájem o merlík chilský obnovil v 80. letech minulého století, kdy byla objevena jeho významná nutriční hodnota. Pro potravinářské účely jsou zužitkovány listy na salát, ale především je využíváno zrno.

Merlíků je známo mnoho druhů a převážná většina je plevelná. Rostlina je vysoká 120-180 cm, s malými, čočkovitými, světlými semeny, které se podobají prosu (Prugar et al. 2008).

Průměrné nutriční hodnoty semen merlíku jsou následující. Škrob 60 % s menším podílem amylosy, která se podílí na skladbě lepku, tím pádem jsou semena merlíku řazeny mezi bezlepkové potraviny hodící se pro lidi s celiakií. Bílkoviny 16 %, kde převládají albuminy a globuliny. Z hlediska aminokyselin se jedná o nejkomplexnější rostlinný protein s poměrně vysokým obsahem lyzinu, což je limitující aminokyselina v obilovinách a pseudocereáliích. Dále quinoa obsahuje 6 % tuku, který má velmi příznivou skladbu mastných kyselin pro lidské zdraví. Nenasycené mastné kyseliny jsou zastoupeny 88 %, zatímco nasycené jen 12 %. Vlákniny má quinoa 3,5-7 %. Z minerálních látek jsou zde zastoupeny vápník, hořčík, fosfor,

draslík, železo, zinek a měď. Sodík neobsahuje téměř žádný, a tak je quinoa vhodná pro snižování krevního tlaku. Vitamíny jsou v quinoe C, B a E. Obsahuje také provitamin beta-karoten. 100 gramů obsahuje 363 kcal (Kopáčová 2007; USDA 2018).

Z antinutričních látek obsahuje merlík chilský saponiny, hořké sloučeniny, které ovlivňují barvu a chuť semene. Dají se odstranit tepelnou úpravou, luštěním, promýváním.

Dnes je zrna používáno na mouku, která je přiměsí do pekařských výrobků, nebo jako příloha. Dá se zapékat, vařit, použít do salátů nebo připravit nasladko (Ranhotra et al. 1993).

3.1.7 Tykev

Čeď tykvovité (Cucurbitaceae) je velmi rozmanitý a obsahuje spoustu druhů. Například tykev obecná (*Cucurbita pepo*), která obsahuje mnoho variací, jako jsou patisony, cukety, dýně. Další druhy jsou tykev velkoplodá (*Cucurbita maxima*), tykev muškátová (*Cucurbita moschata*). Dýně má mnoho využití, používá se jako dekorativní rostlina, zelenina, semena se konzumují (Paris 2010).

Dýně je nenáročná na pěstování. Pro dýni je vhodná hnojená, měkká, výživná půda. Sklizeň nastává, když jsou plody tvrdé a ztrácejí lesk. Sklizeň probíhá hlavně na podzim v září a říjnu.

Díky mnoha různým druhům se obsah výživových látek v jednotlivých kultivarech liší. Obecně lze říct, že obsah oleje je v rozmezí 11-31 %, z toho nenasycených mastných kyselin je 73-81 %. Z mastných kyselin jsou v dýňovém semeni zastoupeny linoleová, olejová, stearová a palmitová (Stevenson et al. 2007). Bílkovin je zde 25-32 %, vlákniny 12-15 %. Z makroprvků mají hojné zastoupení draslík, vápník, hořčík, fosfor, sodík. Z mikroprvků je to pak železo, měď a zinek (Lazos 1986). Dále je dýňový olej významným zdrojem vitamínu E, karotenoidů, kterých je v některých kultivarech víc než u mrkve. Dýně má i nezanedbatelné množství vitamínu C. Ve 100 gramech je 536 kcal.

Konzumace dýňových semen je spojována se sníženou hypertenzí, hypercholesterolémií a artritid. Dále stojí za sníženým výskytem rakoviny plic, žaludku, prsu nebo kolorektálního karcinomu (Stevenson et al. 2007; USDA 2018).

3.1.8 Mák setý

Mák setý je jednoletá rostlina patřící do čeledi makovitých, původně ze Středozeří, rostoucí pouze ze semen. Je 30-150 cm vysoká, listy jsou přisedlé, podlouhle vejčité a pilovitě zubaté. Kvete bíle, červeně, růžově nebo fialově. Plodem je makovice o velikosti 3-8 cm, která obsahuje velké množství semen. Považuje se za funkční potravinu.

Mák setý je plodina, která se pěstuje v České republice na druhé největší ploše nejen v Evropě, ale i ve světě. Prvenství drží Turecko (Prugar et al. 2008). Dále se pěstuje v Číně nebo Indii. Pěstování je složitější, klíčivost je malá a rostliny jsou náchylné na houbové choroby.

Jedná se o plodinu, ze které je využíváno olejnaté semeno, pro jeho dietetické účinky. Spotřebovává se v pekárnách, cukrárnách i domácnostech. Dále je využívána vymláčená tobolka máku, tzv. makovina. Makovina se používá k izolaci opiových alkaloidů, hlavně morfinu, který slouží pro farmaceutické účely. Další využití je jak pro potravinářský, tak

technický olej. Zbylé pokrutiny jsou zdrojem potravy pro hospodářská zvířata (Prugar et al. 2008; Azcan et al. 2004; Šerá et al. 2013).

Makové semeno má významné množství olejů, které je u různých odrůd velmi variabilní, obecně se pohybuje kolem 50 %. Převažují nenasycené mastné kyseliny. Nejvíce je zastoupená kyselina linolová, které je kolem 70 %. Významný je také obsah kyseliny olejové a palmitové. V makovém semeni se dále nachází vitamín E a skupina vitamínů B (Bozan & Temelli 2008). Bílkovin se v makovém semeni nachází přibližně 20 %. Z minerálních látek jsou ve významném množství vápník, sodík, draslík, hořčík, fosfor, mangan, měď, železo a zinek (Azcan et al. 2004).

Jedlá semena rostlin obsahují velké množství lipidů, zvláště nenasycených, jsou náchylná na oxidaci. Dále obsahují širokou škálu vitamínů i minerálních látek. Obsahují i množství sacharidů. Přítomnost vody s výše zmíněnými složkami tvoří dobré podmínky pro růst mikroorganismů. Většina kontaminace se vyskytuje v předsklizňových nebo posklizňových podmínkách. Aby se potraviny nekontaminovaly, přistupuje se ke konzervaci (Bhat & Reddy 2017).

3.2 Konzervace

Jedlá semena rostlin, než se dostanou do našeho jídelníčku, musí projít fázemi sklizně, zpracování, balení, distribuce a skladování. Faktorů, které mohou ovlivnit kvalitu semen je tedy mnoho. Většina semen se po sklizni zpracuje a uskladní ve vhodných podmínkách. Zpracování semen probíhá sušením, případně pražením nebo solením, čímž se trvanlivost ještě více prodlužuje.

Vzhledem k faktu, že se při sušení používají vysoké teploty, produkt tím ztrácí aktivní vodu a tím mnoho mikroorganismů zaniká (Chen & Mujumdar 2008).

3.2.1 Aktivita vody

Mikroorganismy vyžadují pro svou metabolickou aktivitu vodu, avšak pouze určitá frakce celkového obsahu vody v potravine, tzv. „volná voda“, je pro mikroorganismy využitelná. Množství „volné vody“ označované jako vodní aktivita závisí na povaze a množství složek rozpuštěných ve vodné fázi potraviny. Mikroorganismy různých druhů tolerují vodní aktivitu pouze v určitém rozmezí. Vodní aktivitu lze proto použít k predikci růstu mikroorganismů a ke stanovení stability potraviny z mikrobiologického hlediska (ČSN 21807 2006).

Aktivita vody se pohybuje v rozmezí 0-1. Růst mikroorganismů se většinou zastavuje při vodní aktivitě menší než 0,9, ale některé mikroorganismy jsou schopné přežít do hodnoty aktivity vody 0,6 (Barbosa-Canovas et al. 2007).

V tabulkách (1 a 2) jsou vyobrazeny různé příklady potravin a jejich aktivita vody a dále hodnoty aktivity vody a mikroorganismy, které jsou ještě schopné při dané aktivitě vody nárůstu populace.

Tab. 1: Vybrané potraviny a jejich aktivita vody podle Barbosa-Canovas et al. (2007).

potravina	přibližná hodnota aktivity vody
čerstvé jídlo : mléko, zelenina, ovoce, maso	0.97-0.99
konzervované potraviny	0.97-0.98
jogurt	0,98
rajčatový protlak	0,98
klobása	0,97
mozzarella	0,97
zpracovaný sýr	0,97
krájený chleba	0,96
foia gras	0.95-0.96
mortadella	0,95
majonéza	0,95
margarín	0,94
olivy	0.93-0.95
čerstvé těstoviny	0.92-0.94
kečup	0,93
sójová omáčka	0,92
francouzský dresing	0,92
parmazán	0,91
salám	0,9
čokoládový sirup	0,86

Tab. 2: Hodnoty aktivity vody v potravinách a vybrané mikroorganismy, které jsou při dané hodnotě aktivity vody schopné růstu dle Barbosa-Canovas et al. (2007).

hodnoty aktivity vody	mikroorganismy
1.00-0.95	<i>Pseudomonas, Escherichia, Proteus, Shigella, Klebsiella, Bacillus, Clostridium perfringens, C. botulinum</i> , některé kvasinky
0.95-0.91	<i>Salmonella, Vibrio parahaemolyticus, Clostridium botulinum, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus</i>
0.91-0.87	<i>Staphylococcus aureus</i> , většina kvasinek (<i>Candida, Torulopsis, Hansenula</i>), <i>Micrococcus</i>
0.87-0.80	Většina plísní, <i>Staphylococcus aureus</i> , většina kvasinek, <i>Debaryomyces</i>
0.80-0.75	Většina halofilních plísní, rod <i>Aspergillus</i>
0.75-0.65	xerofilní plísně (<i>Aspergillus chavelieri, A. candidus</i>), <i>Saccharomyces bisporus</i>
0.65-0.61	Osmofilní kvasinky (<i>Saccharomyces rouxii</i>), některé plísně (<i>Aspergillus echinulatus, Monascus bisporus</i>)
<0.61	žádné množení bakterií

Aby bylo zabráněno množení mikroorganismů a tím znehodnocování potravin, snižuje se cíleně aktivní voda pomocí sušení.

3.2.2 Sušení

Sušení patří mezi jednu z nejstarších metod konzervování potravin. Sušení je primárně používáno u ovoce a zeleniny a u produktů s vlhkostí nad 80 %. Ale suší se i potraviny kapalné nebo pasty. Tím se prodlouží doba minimální trvanlivosti, je zajištěno lepší uskladnění, zpracování, transport. Dále se umožní dostupnost těchto potravin mimo sezónu.

Přes 85 % průmyslových sušiček jsou konvenčního typu založeném na spalování plynů a přenosu velkého množství tepla (Moses et al. 2014).

Na technologie tepelného sušení je vyvíjen tlak v oblasti výzkumu a vývoje v důsledku rostoucí poptávky po kvalitnějším výrobku, kdy tepelné sušení může inaktivovat bioaktivní látky. Vysoká teplota má tendenci poškozovat a denaturovat produkt, zničit aktivní složky, způsobit tuhost a změnu barvy apod. Dále je vyvíjen tlak na snížení provozních nákladů, stejně jako sníženého dopadu na životní prostředí (Mujumdal & Law 2010).

V posledních letech jsou využívány alternativní způsoby sušení, kdy se ke konvenčnímu způsobu přidávají podpůrné metody sušení, za pomoci mikrovln, ultrazvuku, silných elektrických polí nebo tepelných pump. Těmito způsoby je šetřena energie a při tom je zachována kvalita potravin. Nejvíce rozvíjející se technologií je v posledních letech sušení pomocí mikrovln a ultrazvuku (Moses et al. 2014).

Sušení pomocí ultrazvuku

Sušení pomocí ultrazvuku je charakterizováno nízkými frekvencemi (20-100 kHz) za vysoké intenzity (10-1000 W/cm), které způsobují smršťování a roztahování pórů v materiálu, což vede k zrychlenému odstranění tekutiny z materiálu. Sušení probíhá za nízkých teplot, což přispívá k delší udržitelnosti kvality produktů (Moses et al. 2014).

Sušení pomocí mikrovln

Sušení pomocí mikrovln využívá vlny o frekvenci 915-2450 MHz. Již je úspěšně v provozu v agroprůmyslu, farmacii, v sušení polymerů nebo dřeva. U mikrovlnného sušení je používáno přerušované aplikování mikrovln, čímž je snížena spotřeba energie (32-71 %) a riziko přehřátí. Dále je ušetřen čas (25-90 %), prostor a výrobky jsou kvalitnější v porovnání se sušením pouze vzduchem. Mezi nevýhody mikrovlnného sušení patří nerovnoměrné zahřívání (Moses et al. 2014).

Všechny mikroorganismy v jedlých semenech rostlin ovšem zničeny nejsou a semena tak mohou být napadena nežádoucími mikroorganismy. Mezi významné v potravinářství patří bakterie *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*. Mikroskopické houby *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Mucor* a další (Šilhánková 2008).

3.3 Význam mikroorganismů

Mikroorganismy na zemi jsou nezbytnou podmínkou pro život. Jsou důležité při koloběhu prvků v přírodě. Stojí za přeměnou organických sloučenin a dalších složek buněčné hmoty odumřelých částí živočichů na minerální látky. Jsou hlavní složkou čištění vodních toků, jsou používány v čističkách odpadních vod. Ubývání množství mikroorganismů by mělo vážné následky pro celé životní prostředí. V potravinářství jsou využívány k výrobě a konzervaci mnoha druhů potravin, například se využívá mléčného kvašení na výrobu kysaného zelí, dále k výrobě sýrů, jogurtů, kefiru, tempehu. Mikroorganismy jsou také používány ve farmacii k výrobě antibiotik, dále k výrobě vitamínů, enzymů, v drogerii k výrobě pracích prostředků, v textilním průmyslu atd.

Současně mají mikroorganismy i negativní účinky pro lidi a jejich zdraví. Způsobují nemoci, vyvolávají epidemie a pandemie. Jsou nežádoucími rozkladači dřeva, papíru a také potravin (Šilhánková 2008).

3.4 Bakterie

Bakterie můžeme dělit podle tvaru nebo podle struktury buněčné stěny na grampozitivní a gramnegativní. Hlavní složkou buněčné stěny grampozitivních je silná peptidoglykanová vrstva, která obsahuje kyselinu teichoovou. Zástupci grampozitivních bakterií jsou například rody: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Clostridium*. Gramnegativní bakterie mají tenkou vrstvu peptidoglykanů bez kyseliny teichoové. Mezi gramnegativní bakterie patří rody: *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Actinobacillus*, *Campylobacter*, *Helicobacter* a další (Šilhánková 2008, Bednář et al. 1999).

Mnohé bakterie jsou původci kažení potravin. Některé mohou být patogenní pro člověka. V masném průmyslu a v tepelné zpracovaných jídlech, které jsou nevhodně skladovány a následně ohřívány a podávány může být *Clostridium perfringens*, který je schopen produkovat enterotoxin. V mlékařském průmyslu se hojně vyskytuje sporotvorný *Bacillus cereus* (Andersson et al. 1995). Dalšími bakteriemi, které při nevhodných výrobních i skladovacích podmínkách napadají potraviny jsou *Escherichia coli* a *Salmonella* které jsou schopné produkovat endotoxiny (Šilhánková, 2008).

3.4.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli patří mezi koliformní bakterie. Tyto bakterie jsou velkou skupinou gram-negativních bakterií tyčinkovitého tvaru patřící do čeledi Enterobacteriaceae. Přirozeně se vyskytují ve vodě, půdě i vegetaci. U lidí a teplotokrevných zvířat se vyskytuje ve spodní části tlustého střeva.

Escherichia coli je fakultativně anaerobní krátká, nesporotvorná, pohyblivá tyčinka, která se nachází výhradně v trávicím traktu lidí, jiných savců a ptáků (Šilhánková 2008).

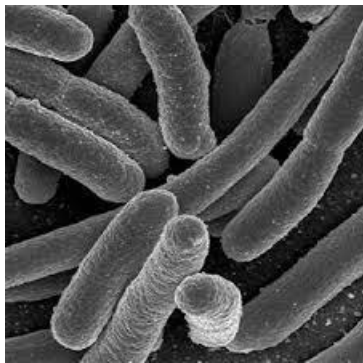
Tato střevní bakterie je do přírody přenášena pouze pomocí výkalů. Primárně je do životního prostředí přenášena přes odpadní vody a kal z čističek odpadních vod nebo přes hnůž či výkaly hospodářských zvířat. Prostřednictvím těchto zdrojů vstupuje bakterie do vod, jako

je pitná voda, voda na zalévání, koupání. Dále se dostává do vegetace přes hnojení a zavlažování.

E. coli je jediným členem koliformních bakterií, která splňuje většinu kritérií pro identifikaci fekálního znečištění, a proto se používá jako klíčový ukazatel fekálního znečištění v EU, USA, Kanadě i Austrálii. V neznečištěném prostředí se nevyskytuje vůbec. Je snadno zjištělná jednoduchými metodami.

Většina kmenů *E. coli* není pro člověka nebezpečná, ale jsou i takové, které ohrožují lidské zdraví, a proto je nesmírně důležité sledovat potenciální znečištění za účelem ochrany člověka a životního prostředí.

Patogenní kmeny rozdělujeme do několika virotypů. Enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), Enteropatogenní *E. coli* (EPEC), Enterohemorhagické *E. coli* (EHEC), nebo též Shiga-like toxigenní *E. coli* (STEC), Enteroinvazivní *E. coli* (EIEC), Enteroagragativní *E. coli* (EAEC), Difúzně adherentní *E. coli* (DAEC). Enterohemorhagické kmeny produkují shiga-like toxiny, které způsobují krvavé průjmy a hemolyticko-uremický syndrom. Onemocnění se vyskytuje zejména ve vyspělých zemích. EIEC, EAEC, DAEC způsobují dlouhodobé, zánětlivé průjmy. Některé z patogenních kmenů se stávají rezistentními proti antibiotikům (Paruch & Mæhlum 2012).

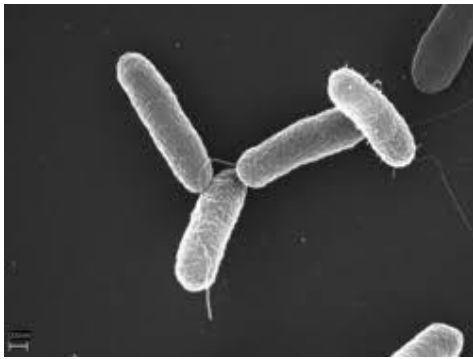


Obr. 1: *Escherichia coli*

<https://www.kompavacz.cz/escherichia-coli-nebezpecna-bakterie-z-potravin>

3.4.2 Salmonella

Jedná se o tyčinkovitou, fakultativně anaerobní, gram-negativní, nesporotvornou bakterii z čeledi Enterobacteriaceae. Nalezneme jí ve vodě, půdě, dále se nachází v drůbeži, plazech, ptácích, hospodářských zvířatech. Může tvořit biofilmy. Jedná se o známý lidský i zvířecí patogen (Johnson 2018).



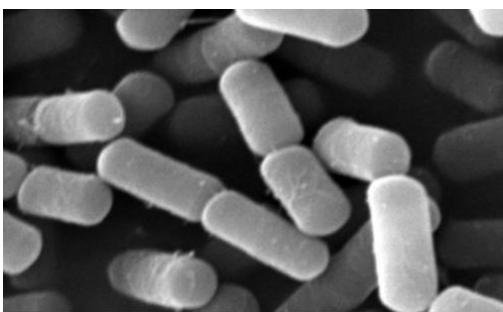
Obr. 2: *Salmonella*

<https://cs.wikipedia.org/wiki/Salmonella>

Bakterie *Salmonella* způsobuje onemocnění salmonelová enteritida. Za hlavní zdroje nákazy se považuje drůbež - primárně vnitřnosti a kůže, ale při zpracování se může dostat i do masa. Napadeny mohou být někdy i vejce. Mezi nejčastěji identifikované příčinné činitele potravinové salmonelózy patří *Salmonella typhimurium* a *Salmonella enteritidis*. Oba serotypy mají schopnost kolonizovat reprodukční orgány slepic, které způsobují hlavní onemocnění přenášené potravinami. Nejčastěji však způsobuje salmonelózu *S. enteritidis*. Nemoc probíhá jako průjmové onemocnění a může mít i fatální následky u imunokompromitovaných jedinců, jako jsou pacienti s HIV / AIDS (Okopi et al. 2016).

3.4.3 *Bacillus*

Bacillus je aerobní nebo fakultativně anaerobní, rovná tyčinka, která tvoří velmi odolné spory. Vyskytuje se běžně v půdě, vzduchu i vodě. Některé kmeny jsou psychrofilní, hydrofobní, a proto přežije i obtížné prostředí. Některé kmeny jsou schopné produkovat toxiny (Logan & Vos 2015).



Obr. 3: *Bacillus*

<https://phys.org/news/2013-01-toxin-bacillus-cereus-diarrhea.html>

Z rodu *Bacillus* je v potravinářství významný druh *Bacillus cereus*. Hlavní problémy způsobuje v mlékárenském průmyslu. Spory *Bacillus cereus* jsou hydrofobní a mají tendenci přežívat na mlékárenském potrubí. Dále se vyskytuje ve vařených potravinách, jako je rýže

nebo v majonéze. V tekutých produktech, mase a vejcích se naopak téměř nevyskytuje (Andersson et al. 1995; Agata et al. 2002).

3.4.4 Clostridium

Clostridium jsou sporulující, grampozitivní, obligátně anaerobní tyčinky. Účastní se rozkladu potravin, některé druhy jsou patogenní. Problémem jsou často odolné spory. Spory jsou odolné vůči vysoké teplotě. Zničí se až při 120 °C po 15 minutách. Klíčení spor dále zabraňuje kyselé pH. Některé druhy se však používají v průmyslové výrobě nebo se účastní koloběhu prvků v přírodě.

Některé druhy rodu *Clostridium* tvoří toxiny. Nejvýznamnější z potravinářského hlediska je *Clostridium botulinum*, který tvoří toxin botulotoxin. Ten je známý jako nejúčinnější přírodní jed. Toxiny jsou schopny tvořit i další druhy tohoto rodu (*Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*).

V potravinářství se vyskytují převážně v masových konzervách a v dalších masných potravinách, kde jsou nebezpečné z hlediska tvorby toxinů. Dále je můžeme najít v mlékárenském průmyslu, kde způsobují nežádoucí duření sýrů. Tvorbou kyseliny máselné znehodnocují potraviny zápachem (Šilhánková 2008; Hauschild 2018).



Obr. 4: *Clostridium*

<https://thenativeantigencompany.com/products/clostridium-difficile-toxin-a-ribotype-078/>

3.5 Plísňe

Plísňe neboli mikromycety jsou mikroskopické, vláknité houby, které vytvářejí jemné vláknité povlaky na různých substrátech (Fassatiová 1979). Plísňe jsou rozšířené po celém světě. Jsou důležitou skupinou organismů, jejichž význam pro lidstvo byl rozpoznán před více než stoletím. Studie plísní ale začaly již v 17. století s vynálezem mikroskopu. Klasifikace může být podle několika kritérií.

Stélka neboli thallus může být například jednobuněčná nebo může tvořit masivní vícebuněčné porosty. Stélka se hodně větví, čímž vzniká síť, tzv. mycelium. Jednobuněčnému řetězci se říká pseudomycelium. Thallus se může celý přeměnit na reprodukční orgány, tzv. holokarpický thallus. U většiny hub se thallus mění na vegetativní a reprodukční část, tzv. eukarpický thallus.

Hyfa je mikroskopické vlákno obsahující protoplazmu a je většinou bezbarvé nebo tmavě žluté až hnědé. U napadeného produktu tak nelze přesně vymezit, kam až houba zasahuje. Síť hyf tedy tvoří stélku (Sumbali 2005).

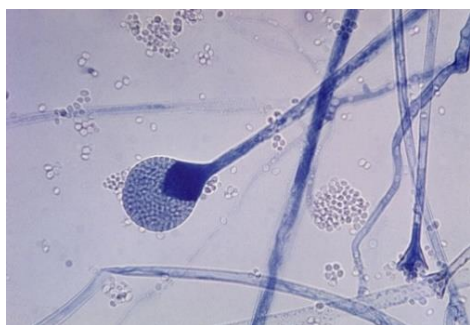
Rozmnožování plísní může být vegetativní rozrůstáním hyf nebo pohlavní, pomocí spájení (Šilhánková 2008).

Nejznámější zástupci mikroskopických hub v potravinách náleží do následujících kmenů:

- Kmen *Zygomycota* je charakterizován přítomností mnohojaderných, bezpřehrádkovaných hyf, asexuální reprodukci pro nepohyblivé sporangiospory a sexuální reprodukci pomocí gametangií, ze kterých v zygosporangiu vznikají zygospory. Jsou haploidní. Jejich buněčné stěny obsahují chitin, chitosan a polyglukoronovou kyselinu.
- Kmen *Ascomycota* je nejrozšířenější. Vyskytuje se například v půdě, vodě sladké i slané, v organických zbytcích. Jsou častými zvířecími a rostlinnými a lidskými patogeny. Charakteristickou vlastností je přítomnost vřecek, váčkovitých buněk, které obsahují většinou askospory, které jsou formovány karyogamicky a meioticky. Vegetativní část se skládá z přehrádkovaných hyf, které jsou tvořeny chitinem, aminocukry, proteiny, glukózou, manózou. Rozmnožování probíhá sexuálně i asexuálně pomocí pučení, dělení, fragmentace, chlamydiospor a konidií. Konidie jsou nejdůležitější. Jsou různých tvarů a barev. Nacházejí se na rozvětvených hyfách, tzv. konidioforách. Sexuální rozmnožování probíhá pomocí spojování jader (Sumbali 2005).

3.5.1 Mucor

Rod *Mucor* je všudypřítomná, morfologicky prostá suchozemská houba. Rod zahrnuje přes 100 druhů (Sumbali 2005). U *Mucoru* se vyskytuje dimorfismus. Za přítomnosti kyslíku se jedná o vláknitou formu a při zaplynování CO₂ vytvářejí pučivé buňky, podobně jako kvasinky (Fassatiová 1979).



Obr. 5: *Mucor*

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mature_sporangium_of_a_Mucor_sp._fungus.jpg

Mycelium je mnohojaderné, nepřehrádkované. Kolonie jsou většinou vatovité nebo plstnaté, bělavé s kulovitými nahnědlými sporangii (Šilhánková 2008).

Některé druhy mohou být pro člověka patogenní a některé druhy produkují mykotoxiny. Napadá hlavně produkty bohaté na jednoduché sacharidy jako je ovoce a zelenina, ale vyskytuje se i na chlebu, másle, mase. Nalezneme je dále v půdě, organických nečistotách, na hnoji, vzduchu nebo na skladovaných potravinách. Patří mezi nejrychleji rostoucí houby (O'Donnell et al. 2001; Šilhánková 2008; Sumbali 2005).

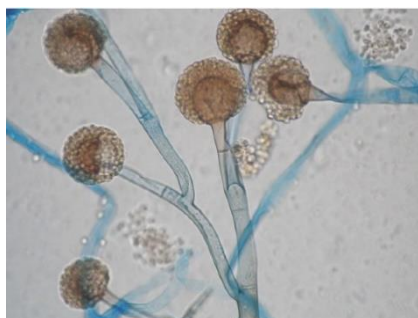
Další druhy mohou být i prospěšné. Používá se se kvašení sóji, k výrobě tempehu a sufu (O'Donnell et al. 2001).

3.5.2 *Rhizopus*

Tento rod je v přírodě velmi rozšířený. V potravinářském průmyslu se používá jako důležité fermentační činidlo pro výrobu alkoholických nápojů (Zheng et al. 2007) a dále k výrobě fermentovaných nápojů a jídel, jako jsou například tempeh, ragi, sufu (Ainsworth 2008). Dále se používá pro průmyslovou produkci kyseliny fumarové, mléčné, reninu a při rosení lnu na polích (Šilhánková 2008).

V zemědělství napadá rostliny hlavně při přepravě a skladování. Způsobuje onemocnění rostlin, zvířat i lidí. U lidí způsobuje mukormykózy. Dále způsobuje kažení ovoce a dalších potravin. Některé druhy tvoří mykotoxiny.

Kolonie které tvoří, mají šedou až černou barvu, zřídka zůstávají bílé. Vlákna jsou delší než má *Mucor*. Dlouhé sporangiofory vyrůstají po 2-3 ze šlahounovitých hyf v místech, kde vznikají rhizoidy (Šilhánková 2008). Sporangia jsou kulovitá. V mládí bílá, postupně však tmavnou až do černé. Kolumela je kulovitá nebo polokulovitá a má vyvinutou apofýzu. Po prasknutí sporangiální stěny se kolumela s apofýzou obrací a jednoznačně tak charakterizuje rod *Rhizopus* (Fassatiová 1979; Zheng et al. 2007; Šilhánková 2008).



Obr. 6: *Rhizopus*

https://www.researchgate.net/post/Rhizopus_spp_has_septa

3.5.3 *Alternaria*

Houby rodu *Alternaria* nalezneme v půdě, na rostlinách, v semenech, atmosféře. Výjimečně napadá i zvířata a lidi, u kterých způsobuje alergické reakce, infekce horních dýchacích cest. *Alternaria* je známa jako závažný rostlinný patogen, který způsobuje škody na široké škále rostlin (Woudenberg et al. 2013). Hostitelské druhy napadá při každé fázi růstu,

včetně osiva. Způsobuje léze, černé nebo hnědé tečky, které se zvětšují, napadají cévní systém (Meena et al. 2010). Dále napadá vzduch v mlékárenských provozech a stěny v provozech pivovarů (Šilhánková 2008).

Vegetativní mycelium je zčásti hyalinní, zčásti tmavě hnědě zbarvené. Konidiofory jsou hustě článkovány, málo větvené. Po stranách i na koncích vyrůstají konidie. Konidie jsou poměrně velkých rozměrů, mají širší bazální část oproti apikální a tvoří se v řetízcích (Fassatiová 1979).

Ideální pro růst je nízké pH 4-4,5. Při pH 9 a více se růst zastavuje. Jako sacharid je ideální maltóza, následuje glukóza, sacharóza (Ramjegathesh et al. 2012). Daří se jí ve vlhkém a deštivém prostředí (Meena et al. 2010).

Kolonie jsou přiléhavé, s ohraničenými pravidelnými i nepravidelnými okraji. Barva kolonií je světle až tmavě olivová (Sofi et al. 2013).



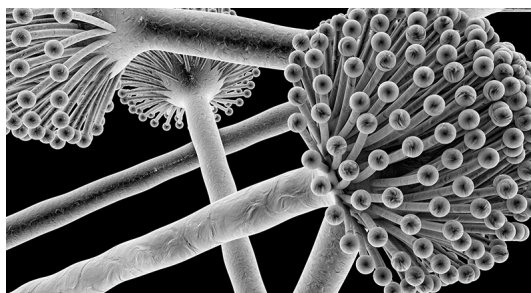
Obr. 7: *Alternaria*

<https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/hyphomycetes/alternaria/>

3.5.4 *Aspergillus*

Rod *Aspergillus*, je rozšířen po celém světě na různých stanovištích, nejčastěji v půdě. Tyto plísně jsou častým původcem kažení potravin a je všeobecně známo, že produkují mykotoxiny. Dále jsou lidskými a zvířecími patogeny (Samson et al. 2014).

Hyfy jsou velmi rozvinuté, rozvětvené. Přehrádky jsou mnohojaderné. Z některých hyf rostou konidiofory. Na konci vyrůstají jednobuněčné, kulovité konidie, které se snadno šíří větrem. Sexuální reprodukce je u *Aspergilla* velmi vzácná (Sumbali 2005).



Obr. 8: *Aspergillus*

<https://www.biocote.com/blog/five-facts-aspergillus/>

U lidí může způsobovat široké spektrum infekcí, kožní změny, plicní aspergilózu, endokarditidu (Balajee et al. 2007).

Na druhou stranu se mnoho druhů využívá v lékařství k výrobě enzymů nebo léků. V potravinářství se uplatňuje v pivovarnictví a konzervárenství. Dále je využíván pro výrobu organických kyselin nebo při výrobě pracích prášků (Šilhánková, 2008).

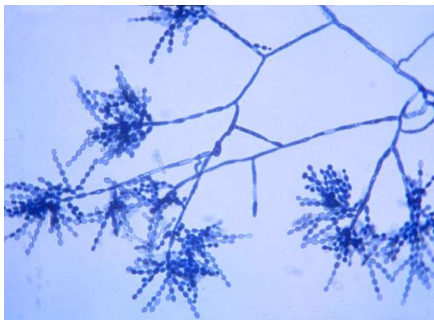
Aspergillus nejčastěji napadá obiloviny, ořechy kukuřici, kde mohou vznikat sekundární metabolity - mykotoxiny. Mykotoxiny, které *Aspergillus* produkuje, zejména aflatoxin B1 je silný karcinogen, vyvolávající většinou rakovinu jater. Aflatoxin B1, který je metabolizován na aflatoxin M1 je schopný přecházet z krmiva do mléka. Z tohoto důvodu byly v potravinářství nastaveny limity pro aflatoxin B1. Aflatoxiny produkované rodem *Aspergillus* vyskytující se v krmivech, mohou být příčinou úhynu zvířat (Cotty et al. 1994).

3.5.5 Cladosporium

Cladosporium má mycelium bohatě větveno. Mladé hyfy jsou tenkostěnné s delšími buněčnými úseky, starší hyfy jsou tlustostěnné, tmavší s kratšími buněčnými úseky (Fassatiová 1979). Tvoří řetízky vícebuněčných spor, které však vznikají pučením a vznikají blastospor. Spory i starší mycelium jsou tmavě zbarveny (Šilhánková 2008).

Kolonie tvoří plstnaté, nebo práškovité, rovinné nebo zvlněné. Barva je žlutozelená až tmavě zelená. Spodní strana je tmavě zelená až černá (Fassatiová 1979).

Vyskytuje na stěnách potravinářských provozoven, ve vinařských a pivovarských sklepích, na mase a vejcích. Je častým parazitem rostlin, jako je chmel, okurka, rajčata. U jablek způsobuje melanózu. *Cladosporium* je alergen, který dráždí dýchací cesty (Šilhánková 2008).



Obr. 9: *Cladosporium*

<https://mrnatural.ca/applications/mold-species-library/cladosporium-mold/>

3.5.6 Fusarium

Tento rod je velmi rozsáhlý a v přírodě velmi rozšířený. Druhy tohoto rodu žijí saprofytycky v půdě, na rostlinných částech. Mohou také parazitovat na vyšších rostlinách nebo s nimi žijí v symbióze (Fassatiová 1979).

Způsobuje kažení rajčat, brambor, jablek, obilí aj. Některé druhy produkují mykotoxiny (T2 toxin, nivalenol, neosolaniol, fusarová kyselina, deoxynivalenol a mnoho dalších), napadené produkty proto nemohou být využity ani na krmné účely.

Fusarium má i prospěšný efekt. Urychluje klíčení semen a růst rostlin, proto se využívá například ve sladovnách k naklíčení ječmene (Šilhánková 2008).

Kolonie jsou bohaté, plstnaté nebo vatovité s provazcovitými myceliárními svazky, které se rozlézají. Barva kolonií bývá světlá, avšak spodní strana bývá výrazně zbarvena.

Konidiofory jsou volně rozmístěné ve vzdušném myceliu. Jsou známy 2 druhy konidií: makrokonidie a mikrokonidie. Pro určení druhu jsou nejtypičtější makrokonidie, které jsou dvou až vícebuněčné a mají rozhlíčkovitý tvar (Fassatiová 1979).

Rozmnožování probíhá pomocí konidií, mikrokonidií, chlamydospor, popřípadě makrokonidií (Šilhánková 2008).



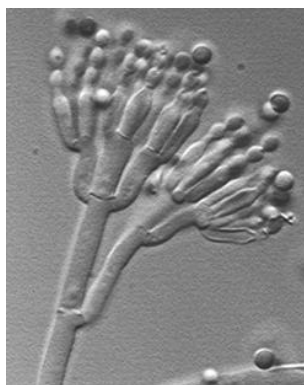
Obr. 10: *Fusarium*

<https://www.alamy.com/computer-illustration-of-conidia-asexual-spores-from-a-fusarium-sp-fungus-some-fusarium-fungi-are-pathogens-of-plants-and-humans-image276615080.html>

3.5.7 *Penicillium*

Jedná se o nejrozsáhlejší a nejrozšířenější rod, který obsahuje na 150 druhů (Sumbali 2005). Nachází se v půdě i na různém organickém substrátu.

Některé druhy produkují antibiotika, jiné zase organické kyseliny. Jsou využívány i v potravinářství pro produkci sýrů nebo zrání salámů.



Obr. 11: *Penicillium*

<http://website.nbm-mnb.ca/mycologywebpages/Moulds/Penicillium.html>http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/kitzmann_step/Classification.htm

Na druhou stranu jsou druhy rodu *Penicillium* producenty mykotoxinů. Toxiny, které tvoří jsou (kyselina penicilová, roquefortin, patulin, citrinin, ochratoxin A, atd.). Dále jsou původci hnilobných procesů v plodinách. Některé druhy mohou vyvolat alergické reakce (Fassatiová 1979; Rundberget et al. 2004).

Mycelium je tvořeno z hyalinu, přehrádek a rozvětvených hyf. Konidiofory jsou jednoduché, vztyčené. Na konci jsou rozvětvené a tvoří štětcovitou strukturu, které se říká *penicillus*. Konidiofor končí skupinou fialid, na kterých mají dlouhé řetězce konidií. Konidie jsou kulovité až oválné, pigmentované a koloniím dávají jejich charakteristickou barvu (Sumbali 2005)

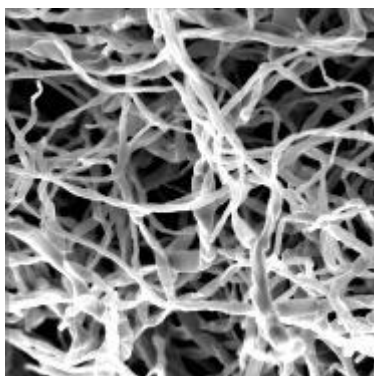
Kolonie tvoří zelené, žlutozelené až modrozelené, sametové až moučnaté povlaky. Okraj kolonií, na nichž nejsou spory jsou viditelné jako bílé povlaky (Šilhánková 2008).

3.5.8 *Mycelia sterilia*

Tato skupina hub tvoří pouze myceliární porosty. Rozmnožování probíhá vegetativně odlamováním vláken, shluky buněk nebo sklerociem, což jsou tvrdé shluky hyf. Jejich stélka nevykazuje charakteristické znaky, a tak lze houba obtížně klasifikovat. Fylogeneticky patří mezi vřeckaté i stopkovýtrusné houby.

Jedním z nejznámějších rodů je rod *Rhizoktonium*, jehož mycelium je hnědé až černé, rychle rostoucí. Hyfy jsou poměrně široké a větvení probíhá v pravých úhlech.

Napadá některé kulturní rostliny. Působí chorobu bramborových hlíz a způsobuje skládkovou hnilobu mrkve (Fassatiová 1979).



Obr. 12: *Mycelia sterilia*

<http://www.schimmel-schimmelpilze.de/mycelia-sterilia.html>

Podle Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) je přibližně 25 % vyprodukovaných potravin na světě kontaminováno mykotoxiny. Ty představují vážné zdravotní riziko u lidí. Mykotoxiny způsobují respirační, alergické, ale i karcinogenní účinky, a proto je důležité jejich sledování v potravinách (Lugauskas et al. 2006).

3.6 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou sekundární metabolické produkty mikroskopických vláknitých hub. Výsledkem sekundární produkce mykotoxinů jsou nízkomolekulární látky. Termín „mykotoxin“ je odvozený z řeckého slova „mykes“, což znamená houba a slova „toxicum“ označující jed (Suchý, Herzig 2005). Je třeba je v potravinách sledovat, protože mají negativní účinky na lidské zdraví a ohrožují i zdraví zvířat. Jsou karcinogenní, mutagenní, imunotoxické, teratogenní a neurotoxické. Nejčastějšími rody, které tyto toxiny produkují jsou *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Pro tvorbu mykotoxinů je žádoucí optimální (vyšší) vlhkost a vyšší skladovací teplota, proto je důležité hlídat tyto faktory v potravinách (Chen & Mujumdar 2008; Bhat & Reddy 2017).

Vzhledem k faktu, že mykotoxiny nelze z potravin prakticky odstranit, Požadavky na maximální množství mykotoxinů jsou v Evropské unii zakotveny v Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006, kterým jsou stanoveny limity jednotlivých mykotoxinů pro konkrétní potraviny. Sledovány jsou aflatoxiny, patulin, ochratoxin a fusariové mykotoxiny.

Aflatoxiny

Prvními známými mykotoxiny byly aflatoxiny. Tyto mykotoxiny produkuje rod *Aspergillus*. Popsány jsou cca dvě desítky aflatoxinů, z nichž se přirozeně v rostlinných produktech vyskytují aflatoxiny B1 a B2, které produkuje *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*. G1 a G2, které jsou produktem *Aspergillus parasiticus*. M1 a M2 jsou hydrolyzované metabolity aflatoxinů B1 a B2. Častá je kontaminace mykotoxiny skupiny M kravského mléka po pozření krmiva kontaminovaného aflatoxinem skupiny B. Aflatoxiny můžeme dále nejčastěji najít v ořechách, kukuřici, sušeném ovoci nebo koření, v potravinách živočišného původu. Mezi hlavní toxické účinky aflatoxinů je hepatotoxicita a karcinogenita. Aflatoxin B, je nejsilnějším známým karcinogenem vůbec (Prugar et al. 2008; Sakuda et al. 2015).

Ochratoxin

Dalším mykotoxinem je ochratoxin. Nejvýznamnějším z této skupiny je ochratoxin A, který produkuje v tropických a subtropických oblastech houba rodu *Aspergillus*, zejména *Aspergillus ochraceus* a v chladnějších oblastech houba rodu *Penicillium*. V přírodě byl poprvé objeven v roce 1965. Ochratoxin A má nefrotoxické, teratogenní a karcinogenní účinky. Způsobuje ochratoxikózy drůbeže, nefropatie prasat a nádory močových cest u lidí. Dalšími známými ochratoxiny jsou ochratoxin B a ochratoxin C. Ke kontaminaci dochází nejčastěji až po sklizni při nevhodných skladovacích podmínkách a zpracování. Nejčastěji bývá kontaminováno sušené ovoce, všechny druhy obiloviny, káva, kakao, hroznové víno, víno, rozinky, krmiva. Vyskytuje se i v živočišných produktech (Heussner & Bingle 2015; Prugar et al. 2008).

Patulin

Patulin je mykotoxin, který produkují houby *Penicillium expansum*, *Aspergillus*, *Byssochlamys*. Napadá nejčastěji ovoce, zejména jablka, na jejichž povrchu se běžně nachází. Ke kontaminaci dochází při vnějším poškození ovoce. Jeho výskyt byl zaznamenán i na sýrech. V EU je pro patulin stanoven limit až 50 mg / kg pro jablečnou šťávu a jablečný mošt, do 25 mg / kg v pevné látce (Wright 2015).

Mykotoxiny produkované houbou *Fusarium*

Deoxynivalenol, nivalenol, T-2 toxin, HT-2 toxin, zearalenon a fumonisiny produkuje houba z rodu *Fusarium*. Napadá převážně obiloviny již během vegetace a u člověka vyvolávají rozmanité účinky (Prugar et al. 2008).

4 Materiál a metody

V experimentální části diplomové práce bylo testováno 20 různých jedlých semen drobných rostlin. Od každého druhu byly zajištěny 2-3 balení od různých výrobců, vyjma konopného semene, od kterého bylo 1 balení. Nejvíce vzorků jedlých semen rostlin bylo od výrobců Druid a IBK trade. Snahou tohoto kroku bylo zjistit, zda se stejné druhy semen od různých výrobců liší.

Všechna semena byla následně podrobena mikrobiologickým rozborům, kdy byla využita desková kultivační metoda. Pozornost byla věnována mikromycetám a bakterii *Escherichia coli*. Tyto mikroorganismy byly vybrány proto, že dle vyhlášky 132/2004 Sb. byly stanoveny přípustné hodnoty pro *E. coli* 5×10^2 a pro plísně 10^5 . Tato vyhláška byla ale zrušena a nahrazena Nařízením komise (ES) 2073/2005 a 1441/2007, kde nejsou pro drobná semena rostlin limity uvedeny. Práce se tedy opírá o původní vyhlášku 132/2004 Sb.

Semena byla testována ve dvou termínech. První rozbor byl proveden ihned po otevření obalů, následně byla semena skladována v pokojové teplotě ve tmě za přístupu kyslíku, ale v původních uzavřených obalech po dobu 3 měsíců. Po uplynutí této doby byl proveden opětovný rozbor.

Výsledky byly následně vyhodnoceny a přepočítány na kolonie tvořící jednoty (KTJ) na 1 gram vzorku. Bylo provedeno kvantitativní vyhodnocení plísní i bakterie *Escherichia coli*. Plísně byli stanoveny na úrovni rodu.

4.1 Vzorky

Vzorky drobných semen rostlin byly zakoupeny v běžné maloobchodní síti.

Č. 1: Sezam

Výrobce: Druid

Minimální trvanlivost: 15.9.2018

Nutriční hodnoty na 100 g:

Tuk: 58,5 g

Sacharidy: 4,6 g, z toho cukry 0,5 g

Bílkoviny: 21,9 g

Sůl: <0,1 g

Č. 2: Sezam

Výrobce: IBK trade

Minimální trvanlivost: 30.5.2018

Nutriční hodnoty na 100 g:

Tuk: 49,7 g

Sacharidy: 23,5 g, z toho cukry 0,3 g

Vláknina: 11,8 g

Bílkoviny: 17,7 g

Sůl: > 0,2 g

Č. 3: Sezam

Výrobce: Delmart

Minimální trvanlivost: 02/18

Nutriční hodnoty na 100 gramů:

Tuk: 50 g

Sacharidy: 23 g, z toho cukry 0,3 g

Bílkoviny: 18 g

Vláknina: 12 g

Sůl: 0,03 g

Č. 4: Slunečnice

Výrobce: Poex

Minimální trvanlivost: 26.3.2018

Nutriční hodnoty na 100 gramů:

Tuky: 44 g

Sacharidy: 19 g, z toho cukry 1,7 g

Bílkoviny: 25 g

Vláknina: 6 g

Sůl < 0,01 g

Č. 5: Slunečnice

Výrobce: IBK trade

Minimální trvanlivost: 30.1.2018

Nutriční hodnoty na 100 gramů:

Tuky: 51 g

Sacharidy: 20 g, z toho cukry 2,6 g

Bílkoviny: 21 g

Vláknina: 8,6 g

Sůl < 0,01 g

Č. 6: Slunečnice pražená

Výrobce: IBK trade

Minimální trvanlivost: 10.1.2018

Nutriční hodnoty na 100 gramů:

Tuky: 51,5 g

Sacharidy: 20 g, z toho cukry 2,6 g

Bílkoviny: 20,8 g

Vláknina: 8,6 g

Sůl: 1,4 g

Č. 7: Konopné semínko

Výrobce: Druid

Minimální trvanlivost: 31.3. 2018

Nutriční hodnoty na 100 gramů:

Tuk: 52 g

Sacharidy: 2,4 g, z toho cukry 1 g

Bílkoviny: 30 g

Sůl: 0 g

Č. 8: Len

Výrobce: DM

Minimální trvanlivost: 12/17

Nutriční hodnoty na 100 gramů:

Tuk: 30,9 g

Sacharidy 0 g

Vláknina: 38,6 g

Bílkoviny: 28,8 g

Sůl: 0,15 g

Č. 9: Len

Výrobce: IBK trade

Minimální trvanlivost: 12.4.2018

Nutriční hodnoty na 100 gramů:

Tuk: 42,2 g

Sacharidy: 28,9 g, z toho cukry 1,6 g

Vláknina: 27,3 g

Bílkoviny: 18,3 g

Sodík: < 0,075 g

Č. 10: Len

Výrobce: Druid

Minimální trvanlivost: 5.3.2018

Nutriční hodnoty na 100 gramů:

Tuk: 42,2 g

Sacharidy: 28,9 g, z toho cukry 1,6 g

Bílkoviny: 18,3 g

Sůl: < 0,1 g

Č. 11: Chia

Výrobce: Druid

Minimální trvanlivost: 4.6.2018

Nutriční hodnoty na 100 gramů

Tuk: 30,7 g

Sacharidy: 25 g, z toho cukry 3 g

Bílkoviny: 20 g

Sůl: 0,1 g

Č. 12: Chia

Výrobce: La food

Minimální trvanlivost: 10/2018

Nutriční hodnoty ve 100 g:

Tuk: 31,44 g

Sacharidy: 33,3 g, z toho cukry 0 g

Vláknina: 0 g

Bílkoviny: 23 g

Sůl: 0 g

Č. 13: Chia

Výrobce: Diana company

Minimální trvanlivost: 01/2018

Nutriční hodnoty na 100 g:

Tuk: 31 g

Sacharidy: 2 g, z toho cukry 1 g

Bílkoviny: 20 g

Vláknina: 37,9 g

Sodík: 20 mg

Č. 14: Quinoa

Výrobce: La food

Minimální trvanlivost: 22.12.2018

Nutriční hodnoty na 100 gramů:

Tuk: 6 g

Sacharidy: 64 g, z toho cukry 0 g

Vláknina: 7 g

Bílkoviny: 14 g

Sůl: 0,005 g

Č. 15: Quinoa

Výrobce: Albert

Minimální trvanlivost: 15.2.2018

Nutriční hodnoty na 100 g:

Tuk: 6,1 g

Sacharidy: 64,2 g, z toho cukry 0 g

Vláknina: 7 g

Bílkoviny: 14,1 g

Sůl: 0 g

Č. 16: Dýně

Výrobce: Dýňová jádra Herůfkovi

Minimální trvanlivost: 30.10.2017

Nutriční hodnoty na 100 gramů:

Tuk: 50 g

Sacharidy: 9,4 g, z toho cukry 1,9 g

Bílkoviny: 30 g

Sůl: 0,03 g

Č. 17: Tykev loupaná

Výrobce: Druid

Minimální trvanlivost: 15.2.2018

Nutriční hodnoty na 100 gramů:

Tuk: 45,9 g

Sacharidy: 13,9 g, z toho cukry 1,4 g

Bílkoviny: 24,5 g

Sůl: < 0,1 g

Č. 18: Tykev loupaná

Výrobce: IBK trade

Minimální trvanlivost: 31.1.2018

Nutriční hodnoty na 100 gramů:

Tuk: 49 g

Sacharidy: 10,8 g, z toho cukry 1,4 g

Vláknina: 6 g

Bílkoviny: 30,5 g

Sodík: < 0,007 g

Č. 19: Mák

Výrobce: Tesco

Minimální trvanlivost: 15.3.2018

Nutriční hodnoty na 100 gramů:

Tuk: 42 g

Sacharidy: 21 g, z toho cukry 2,6 g

Bílkoviny: 22 g

Sůl: 0,01 g

Č. 20: Mák

Výrobce: IBK trade

Minimální trvanlivost: 14.11.2017

Nutriční hodnoty na 100 gramů:

Tuk: 41,6 g

Sacharidy: 28,1 g, z toho cukry 2,99 g

Bílkoviny: 18 g

Vláknina: 19,5 g

Sodík: 0,0326 g

4.2 Použitá kultivační média

Ředící roztok - 0,1% peptonová voda

Pepton: 1 g

destilovaná voda: 1 l

D-glukóza: 20-35 %

Pepton byl rozpuštěn s D-glukózou v destilované vodě. Takto připravený roztok byl sterilován v autoklávu o teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Použití uvedeného roztoku je doporučováno k minimalizaci osmotického šoku pro xerofilní plísňe a osmofilní kvasinky.

Dichloran glycerol agar (DG18) (Oxoid)

Pro určení plísni v jedlých semenech rostlin byl zvolen Dichloran glycerol agar – DG18. Jde o selektivní agarovou půdu, která má nízkou vodní aktivitu a splňuje kritéria ČSN ISO 21527-2.

Pepton (enzymaticky natrávený kasein) 5 g/l

D-glukóza 10 g/l

Dihydrogenfosforečnan draselný 1 g/l

Síran hořečnatý 0,5 g/l

Dichloran 0,002 g/l

Glycerol 110 g/l

Agar 12-15 g/l
Chloramfenikol 0,1 g/l
Destilovaná voda 1000 ml

Agar byl podle návodu navážen do Erlenmayerových baněk, kde byl doplněn, glycerolem, chloramfenikolem a destilovanou vodou a poté byl celý obsah promíchán. Následně byl sterilován v autoklávu o 121 °C po dobu 15 minut. Po této době byl udržován ve vodní lázni při teplotě cca 50 °C.

MacConkey agar (Oxoid)

Pro bakterii *Escherichii coli* byl zvolen MacConkey agar. Jde o selektivní půdu pro kultivaci gramnegativních bakterií.

Pepton 20 g/l
Laktóza 10 g/l
Žlučová sůl 5 g/l
Chlorid sodný 5 g/l
Přírodní červen (natural red) 0,75
Agar 12 g/l

Agar byl podle návodu navážen do Erlenmayerových baněk, kde byl doplněn destilovanou vodou a promíchán. Následně byl sterilován v autoklávu o 121 °C po dobu 15 minut. Po této době byl udržován ve vodní lázni při teplotě cca 50 °C

4.3 Pracovní postup

Pro přípravu testovaných vzorků by použit desítkový ředící systém. Od každého ze vzorků bylo ihned po otevření obalu asepticky naváženo 10 g. Vzorek byl převeden do Erlenmayerovy baňky s 90 ml fyziologického roztoku. Následně byly vzorky třepány na třepačce. Do zkumavky s 9 ml fyziologického roztoku byl převeden 1 ml vzorku. Do dalších zkumavek byl napipetován 1 ml roztoku vždy z předešlé zkumavky. Tím byla vytvořena ředící řada. Další postup se mírně odlišoval pro mikroskopické houby od stanovení pro *Escherichia coli*.

Pro mikroskopické houby byl agar (DG 18) připraven předem v Petriho miskách. Na vysušený agar bylo pipetováno 0,2 ml vzorku, který byl okamžitě rozetřen kličkou po celé ploše misky. Kultivace proběhla v termostatu po dobu 5 dnů o teplotě 22 °C dnem vzhůru. Postup byl proveden podle ČSN ISO 21527-2.

Pro stanovení *Escherichia coli* byl napipetován 1 ml vzorku, který byl zalit agarem a promíchán. Kultivace probíhala v Petriho miskách dnem vzhůru při 37 °C po dobu 24 - 48 hodin. Po ukončení kultivace bylo spočítáno množství kolonií. Pro odlišení *Escherichia coli* od ostatních kolonií bylo použito selektivní médium - MacConkey agar. Tento agar obsahuje pro inhibici gram pozitivních bakterií žlučové soli a specifická barviva, která odliší hledaný rod bakterie od ostatních.

4.4 Vyhodnocení

Narostlé kolonie plísní (Obr. 13) byli spočítány u vhodných ředění a přepočteny na gram výrobku. Nejprve proběhlo vyhodnocení makroskopicky, kdy byl sledován tvar a barva kolonie. Následně byly připraveny preparáty (zvětšení 150 ×, resp. 675 ×). Pod mikroskopem byly sledovány morfologické znaky (konidie, barva mycelia, přehrádkování mycelia atd.). K rodovému zařazení plísní byl použit klíč Hamppl, Šilhánková (1957).

Obr. 13: Narostlé kolonie plísní na DG18 na Petriho misce

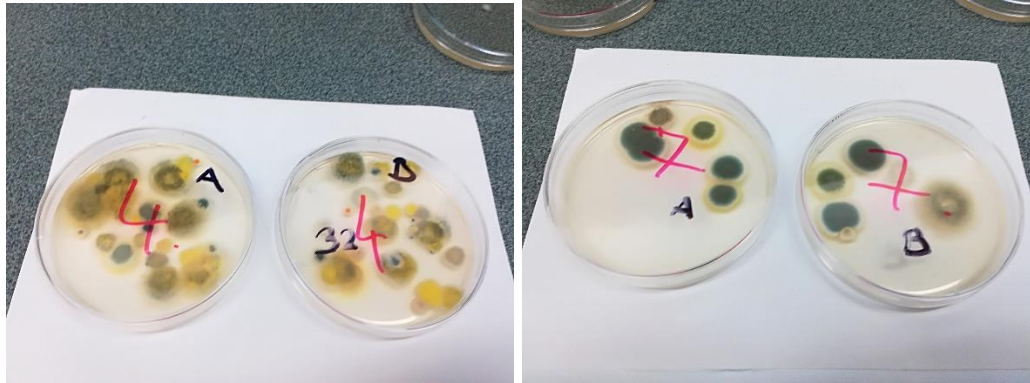


Foto: autor práce

5 Výsledky

V experimentální části diplomové práce byla zkoumána jedlá semena rostlin a jejich mikrobiologická kontaminace. Pozornost byla věnována přítomnosti mikroskopických hub, které byly stanoveny jak kvantitativně, tak kvalitativně na úrovni rodu. Dále byla zjišťována přítomnost a počty bakterie *Escherichia coli*. Výsledky byly zjišťovány deskovou kultivační metodou a získané hodnoty byly následně přepočítány na kolonie tvořící jednotky (KTJ)/gram výrobku. Výsledky byly statisticky porovnány programem Minitab s použitím Tukeyho testu na hladině významnosti $<0,05$.

5.1.1 Mikromycety

Tab. 3: Kvantitativní zastoupení mikromycet přepočítané na KTJ/gram

Číslo vzorku	Jedlá Semena	Výrobce	1. stanovení	2. stanovení
1	Sezam	Druid	30	30
2	Sezam	IBK trade	<10	<10
3	Sezam	Delmart	30	<10
4	Slunečnice	Poex	850	1380
5	Slunečnice	IBK trade	30	<10
6	Slunečnice pražená	IBK trade	<10	<10
7	Konopné semínko	Druid	400	300
8	Len	DM	30	<10
9	Len	IBK trade	350	450
10	Len	Druid	200	<10
11	Chia	Druid	<10	<10
12	Chia	La food	50	50
13	Chia	Diana company	80	<10
14	Quinoa	La food	30	30
15	Quinoa	Albert	<10	<10
16	Dýně	Dýňová jádra Herůfkovi	<10	<10
17	Tykev loupaná	Druid	<10	<10
18	Tykev loupaná	IBK trade	<10	25
19	Mák	Tesco	30	<10
20	Mák	IBK trade	230	230

První stanovení proběhlo po zakoupení výrobků. Následně byly vzorky tři měsíce skladovány. Po uplynutí této doby bylo provedeno druhé stanovení.

Z testovaných vzorků obsahovala víc jak polovina tak malé množství plísní, že nebyly danou metodou zjištěny nebo dosahovaly hodnot max. 5×10^1

Pouze 5 výrobků (sezam, konopí, len, mák) přesáhl počet 10^2 . Tyto hodnoty byly v rozmezí 2×10^2 - $13,8 \times 10^2$.

Po skladování nedošlo k výrazné změně v počtu plísní, pouze u vzorku slunečnice (Poex) byl zaznamenán nárůst z 8×10^2 na $13,8 \times 10^2$.

Výraznější snížení počtu kolonií plísní po skladování bylo zjištěno pouze u lnu (Druid) z hodnoty 2×10^1 na hodnotu $< 10^1$.

Průměrná hodnota mikromycet v gramu vzorku byla při prvním stanovení 117 KTJ/gram, při druhém stanovení 125 KTJ/gram, nebyl mezi nimi významný rozdíl.

Celkově lze konstatovat, že zastoupení plísní v jedlých semenech rostlin je velmi nízké, žádný ze vzorků nebyl zdaleka kontaminován hodnotami více než 10^5 , tudíž lze říct, že jedlá semena rostlin nejsou zdravotně závadná.

Tab. 4: Rodové zastoupení mikromycet ve vzorcích (plísně jsou seřazeny sestupně od nejvíce zastoupené po nejméně zastoupené)

číslo vzorku	Jedlá Semena	1. stanovení	2. stanovení
1	Sezam	<i>Rhizoktonium</i>	<i>Cladosporium</i>
2	Sezam	N	N
3	Sezam	A	N
4	Slunečnice	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i> <i>Mucor</i> <i>Penicillium</i>
5	Slunečnice	<i>Cladosporium</i>	N
6	Slunečnice pražená	N	N
7	Konopné semínko	<i>Penicillium</i> <i>Rhizopus</i> <i>Rhizoktonium</i>	<i>Penicillium</i>
8	Len	<i>Cladosporium</i>	N
9	Len	<i>Alternaria</i> <i>Cladosporium</i> <i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> <i>Cladosporium</i> <i>Alternaria</i>
10	Len	<i>Alternaria</i>	N
11	Chia	N	N
12	Chia	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> <i>Mucor</i>
13	Chia	<i>Mycelia sterilia</i>	N
14	Quinoa	<i>Cladosporium</i>	<i>Mycelia sterilia</i>
15	Quinoa	N	N
16	Dýně	N	N
17	Tykev loupaná	N	N
18	Tykev loupaná	N	<i>Aspergillus</i>
19	Mák	<i>Aspergillus</i>	N
20	Mák	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>

Vysvětlivky: N = v daném vzorku nebyla zjištěna žádná kolonie

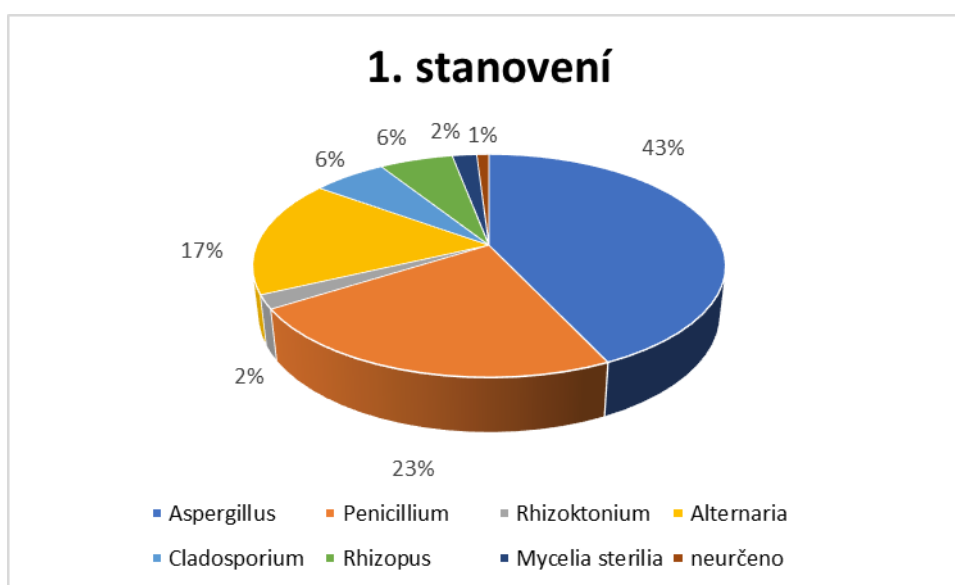
A = neurčeno

Ve 20 vzorcích jedlých semen rostlin, jak je uvedeno v tab. (4), bylo identifikováno celkem 6 významných rodů plísní: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Rhizoktonium* a *Alternaria*.

Všechny rody plísní, které byly identifikovány v 1. stanovení se nacházely i ve 2. stanovení, avšak pozměnilo se jejich procentuální zastoupení, které je uvedeno v grafech 1 a 2.

Celkově se vyskytoval nejčastěji rod *Aspergillus*. Objevil se na 6 výrobcích a jeho procentuální zastoupení bylo nejvyšší. Následoval *Penicillium* i přes fakt, že byl zjištěn jen na dvou výrobcích. Poslední významější plísní byla *Alternaria*. Ostatní rody (*Rhizoktonium*, *Cladosporium* a *Rhizopus*) byly zastoupeny v malých množstvích. Dále byla nalezena skupina mikroskopických hub *Mycelia sterilia*. 2 % nalezených plísní nebyla určena.

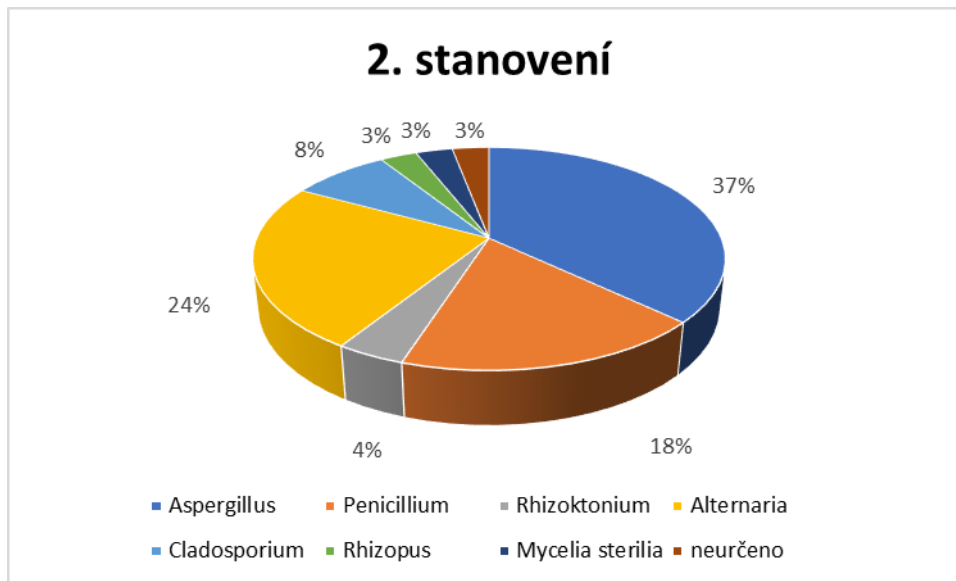
Graf 1: Rodové zastoupení plísní v 1. stanovení.



V grafu 1 jsou k nahlédnutí rody plísní a jejich procentuální zastoupení u čerstvých vzorků, které byly identifikovány v 1. stanovení ve vzorcích jedlých semen rostlin.

Dominantní byl v prvním stanovení rod *Aspergillus*. O téměř polovinu nižší počet má na druhém místě v zastoupení plísní rod *Penicillium*. Třetím nejčastějším kontaminantem je rod *Alternaria*. Ostatní 3 rody a jedna skupina (*Rhizoktonium*, *Cladosporium*, *Rhizopus* a *Mycelia sterilia*) zaujímaly celkem přibližně šestinu z celkového množství. 1 % plísní nebylo stanoveny.

Graf 2: Rodové zastoupení plísní ve 2. stanovení (po skladování)



V grafu 2 jsou zobrazeny rody plísní a jejich procentuální zastoupení, které byly identifikovány ve vzorcích jedlých semen rostlin.

Po skladování se změnilo procentuální zastoupení plísní, ale rodové zastoupení zůstalo stejné. Prvenství zaujímal opět rod *Aspergillus*, i když jeho celkové procentuální zastoupení bylo menší než při prvním stanovení. Naopak nárůst o 7 % byl zaznamenán u plísně *Alternaria*, což bylo druhé největší množství. Třetím v pořadí byl rod *Penicillium*, který měl procentuální zastoupení ve vzorcích menší o 5 % než při prvním stanovení. Ostatní rody byly zastoupeny maximálně do 10 %, resp. 5 %. 3 % plísní nebyla určena.

Rozdíly mezi počty plísní čerstvě otevřených výrobků a po uplynutí 3 měsíců nebyly statisticky významné.

5.1.2 Escherichia coli

Tab. 5: Kvantitativní zastoupení *E. coli* (KTJ/gram)

Číslo vzorku	Jedlá Semena	Výrobce	1. stanovení	2. stanovení
1	Sezam	Druid	<10	<10
2	Sezam	IBK trade	<10	<10
3	Sezam	Delmart	<10	<10
4	Slunečnice	Poex	200	10
5	Slunečnice	IBK trade	20	10
6	Slunečnice pražená	IBK trade	70	10
7	Konopné semínko	Druid	20	10
8	Len	DM	100000	39500
9	Len	IBK trade	100000	50500
10	Len	Druid	100000	1300
11	Chia	Druid	<10	<10
12	Chia	La food	40	<10
13	Chia	Diana company	60	90
14	Quinoa	La food	60	50
15	Quinoa	Albert	1600	780
16	Dýně	Dýňová jádra Herůfkovi	50	10
17	Tykev loupaná	Druid	250	950
18	Tykev loupaná	IBK trade	80	30
19	Mák	Tesco	13600	370
20	Mák	IBK trade	1500	150

První stanovení proběhlo po zakoupení výrobků. Následně byly vzorky tři měsíce skladovány. Po uplynutí této doby bylo provedeno druhé stanovení.

Průměrný počet *E. coli* v prvním stanovení byl 2×10^4 a po skladování 4×10^3 . To bylo ovšem dáno vysokým množství *E. coli* ve vzorcích lnu.

Celkově byla ve vzorcích malá množství *E. coli*. Jen 6 vzorků překročilo 10^3 , z toho len po zakoupení dokonce 10^5 , což vysoce překračuje ČSN 132/2004.

5.1.3 Porovnání výrobců

Dále byly porovnány počty mikromycet i bakterie *Escherichia coli* ve vybraných drobných semenech rostlin k přímé spotřebě od výrobců Druid a IBK trade (sezam, len, tykev). Bylo provedeno statistické zhodnocení pomocí programu Minitab, kde byl použit Tukeyho test, ze kterého vyplývá, že nejsou žádné statisticky významné rozdíly na hladině významnosti ($P < 0,05$) v počtu mikromycet ani *E. coli* mezi těmito dvěma výrobci.

5.1.4 Porovnání výrobků

V následující části jsou porovnávána drobná semena rostlin od různých výrobců a zároveň jsou v některých případech znázorněny statistické rozdíly mezi prvním a druhým stanovením, které proběhlo po třech měsících skladování.

Vzhledem k celkově nízkému počtu plísní u sezamu nebyly výsledky mezi výrobci, ani v rámci skladování statisticky významné.

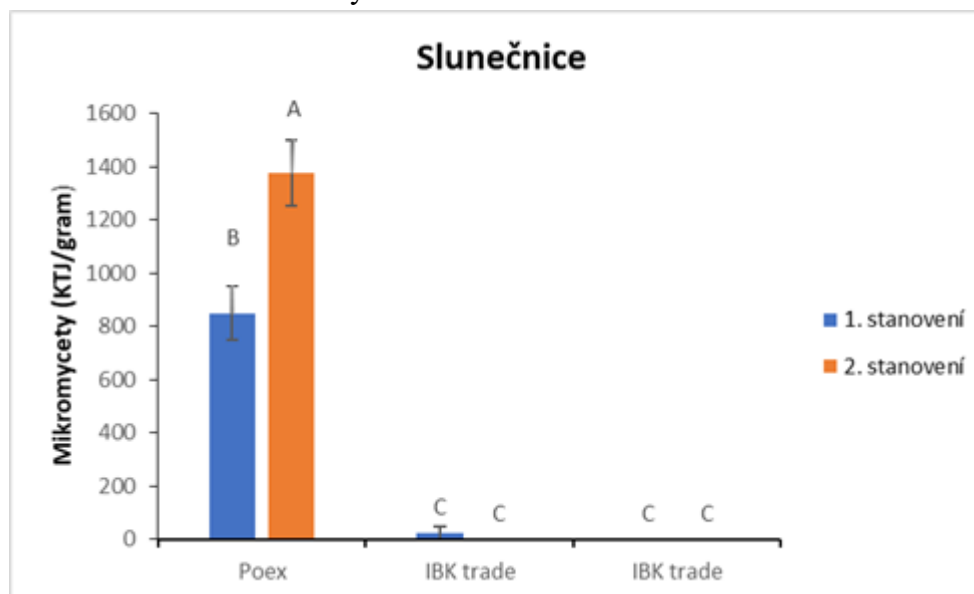
Ve vzorcích sezamových semen byly všechny získané hodnoty pro bakterii *Escherichia coli* $<10^1$. Mezi výsledky nebyl statisticky významný rozdíl.

Od konopného semena byl analyzován jeden vzorek, který nevykazoval výraznější rozdíly v počtech mikromycet mezi hodnocením před a po skladování. To samé platí pro hodnoty *E. coli*.

Quinoa obsahovala celkově velmi nízké počty mikromycet i *Escherichia coli*. Výsledky mezi výrobci, ani v rámci skladování nebyly statisticky významně rozdílné.

Slunečnice od výrobce Poex je v počtu mikromycet odlišná od ostatních. Statisticky rozdílné je u této slunečnice 1. a 2. stanovení. Obě slunečnice od IBK trade (loupaná i pražená) nevykazují statistické rozdíly, jak mezi sebou, tak ani před a po skladování.

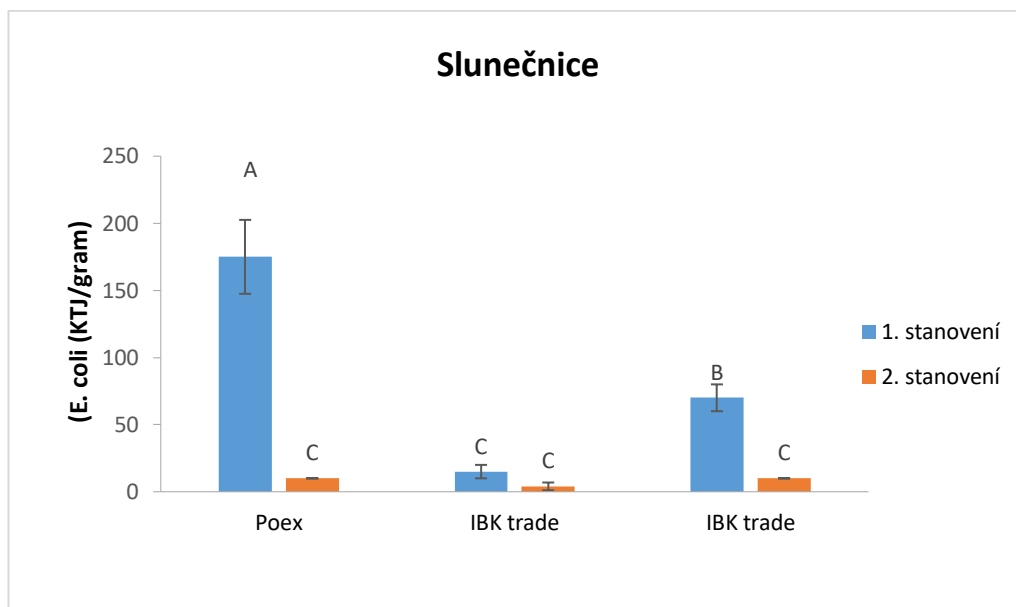
Graf 3: Porovnání mikromycet v semenech slunečnice v 1. i 2. stanovení



Chybové úsečky představují průměry \pm SE ($n = 3$). Hodnoty ve sloupcích, označené stejným písmenem, nejsou podle Tukeyho testu ($P < 0,05$) signifikantně odlišné.

U prvního stanovení u slunečnice, kdy experiment probíhal neprodleně po nákupu byly výsledky statisticky rozdílné. Druhé stanovení, které proběhlo po třech měsících od prvního stanovení nám ukázalo, že hodnoty *E. coli* naopak nebyly statisticky rozdílné.

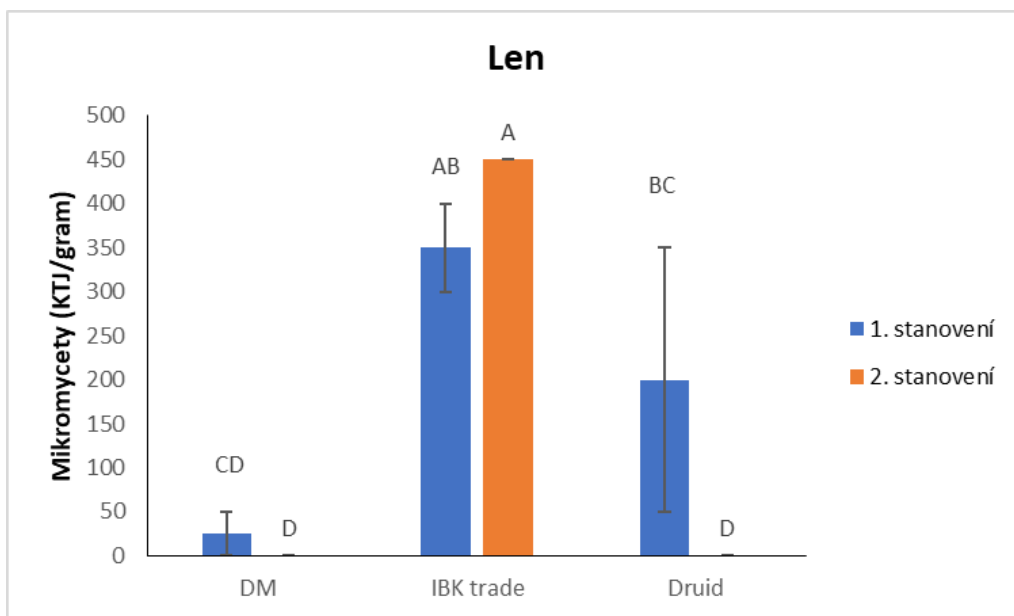
Graf 4: Porovnání *E. coli* v semenech slunečnice v 1. i 2. stanovení.



Chybové úsečky představují průměry \pm SE (n = 3). Statistika odpovídá popisu u grafu 3

Hodnoty mikromycet byly u lnu rozdílné. V prvním stanovení mezi počty plísni od výrobců DM a Druid nebyl statisticky významný rozdíl. Současně nebyl rozdíl mezi Druid a IBK trade. Ve druhém stanovení nebyly statisticky rozdílné výsledky u lnu z DM a od výrobce Druid. Len od výrobce IBK trade vykazoval vysoké hodnoty a tento výsledek byl statisticky rozdílný od ostatních.

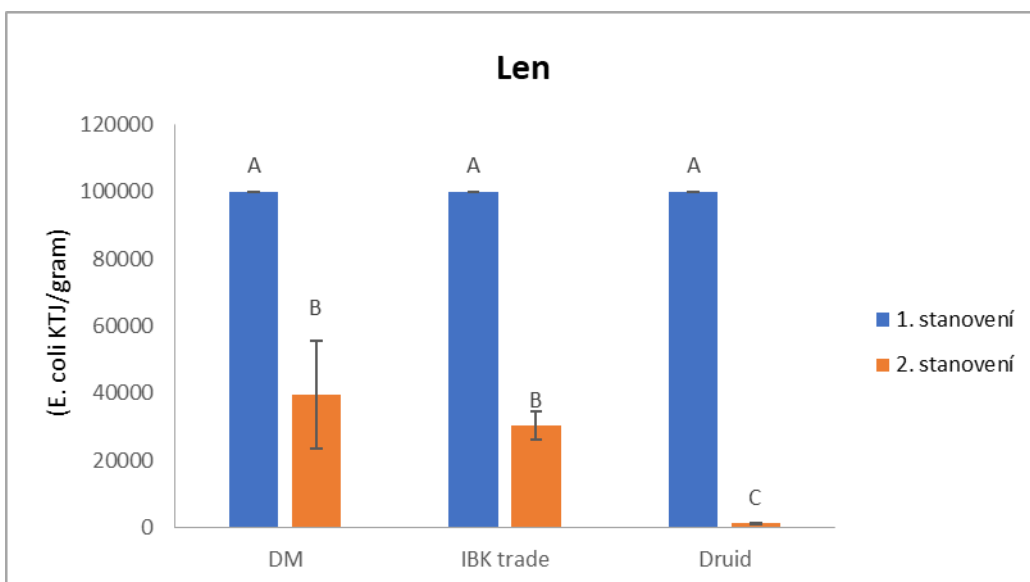
Graf 5: Porovnání mikromycet v semenech lnu v 1. i 2. stanovení



Chybové úsečky představují průměry \pm SE (n = 3). Statistika odpovídá popisu u grafu 3

U prvního stanovení u lnu bylo ve všech třech vzorcích od třech různých výrobců zjištěno velké množství bakterie *E. coli*. Výsledky nejsou statisticky rozdílné. Výsledky porovnání v druhém stanovení jsou nevyrovnané. Statisticky rozdílné výsledky nejsou mezi vzorky z DM a IBK trade. Hodnoty u lnu (Druid) jsou po skladování statisticky rozdílné od ostatních.

Graf 6: Porovnání *E. coli* v semenech lnu v 1. i 2. stanovení

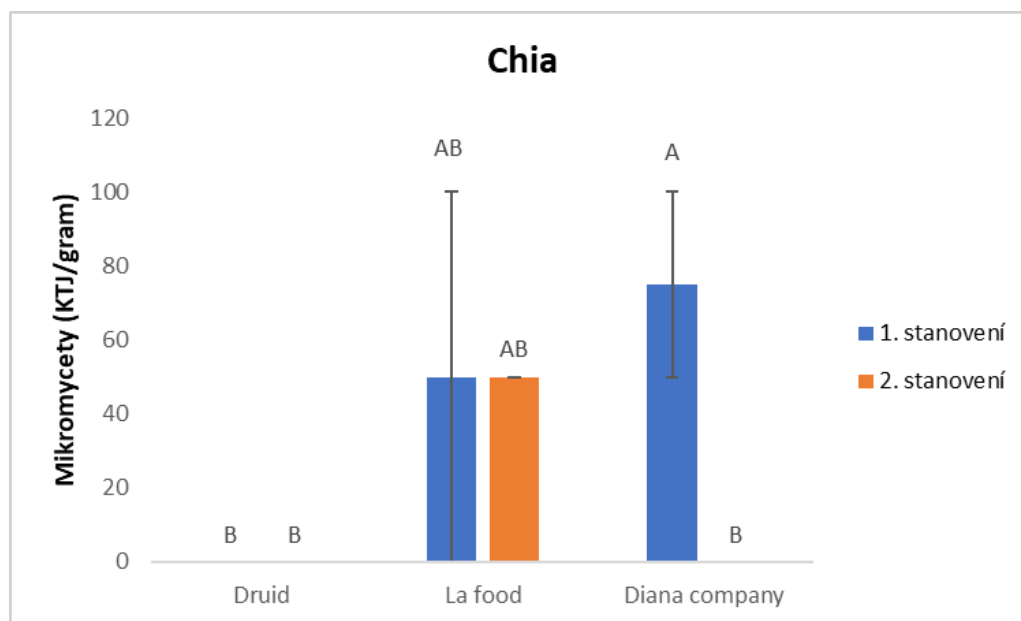


Chybové úsečky představují průměry \pm SE (n = 3). Statistika odpovídá popisu u grafu 1

Chia

Hodnoty mikromycet u chia jsou v prvním stanovení variabilní. Chia od La food nejsou statisticky rozdílné s chia od Diana company, ani od chia (Druid). Zároveň jsou ale statistické rozdíly mezi chia (Druid) a chia (Diana company). Po skladování nenastaly ve vzorcích statisticky významné rozdíly.

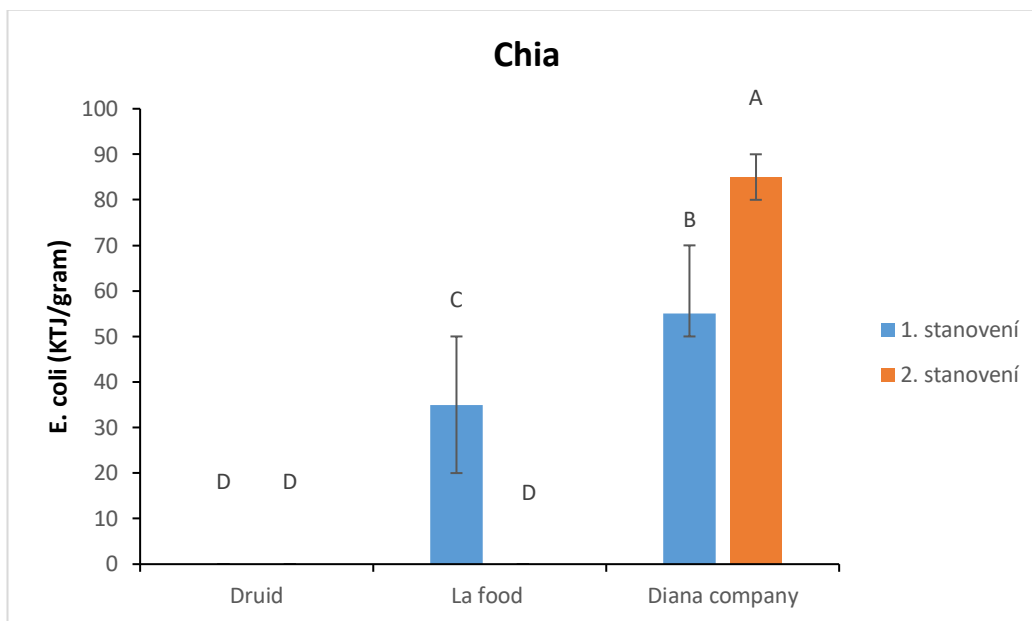
Graf 7: Porovnání mikromycet v semenech chia v 1. i 2. stanovení



Chybové úsečky představují průměry \pm SE ($n = 3$). Statistika odpovídá popisu u grafu 3

U chia semen bylo množství *E. coli* ve vzorcích velmi rozdílné. Kontaminace byla způsobena při prvním stanovení pravděpodobně vlivem skladování. Chia od výrobce Druid byla zcela bez *E. coli*. Množství *E. coli* bylo statisticky rozdílné u chia od La food a Diana company, kde byla kontaminace zaznamenána. Po skladování se statisticky shodovala chia od výrobců Druid a La food, zatímco u chia od Diana company byl zaznamenán nárůst KTJ/g vzorku.

Graf 8: Porovnání *E. coli* v semenech chia v 1. i 2. stanovení

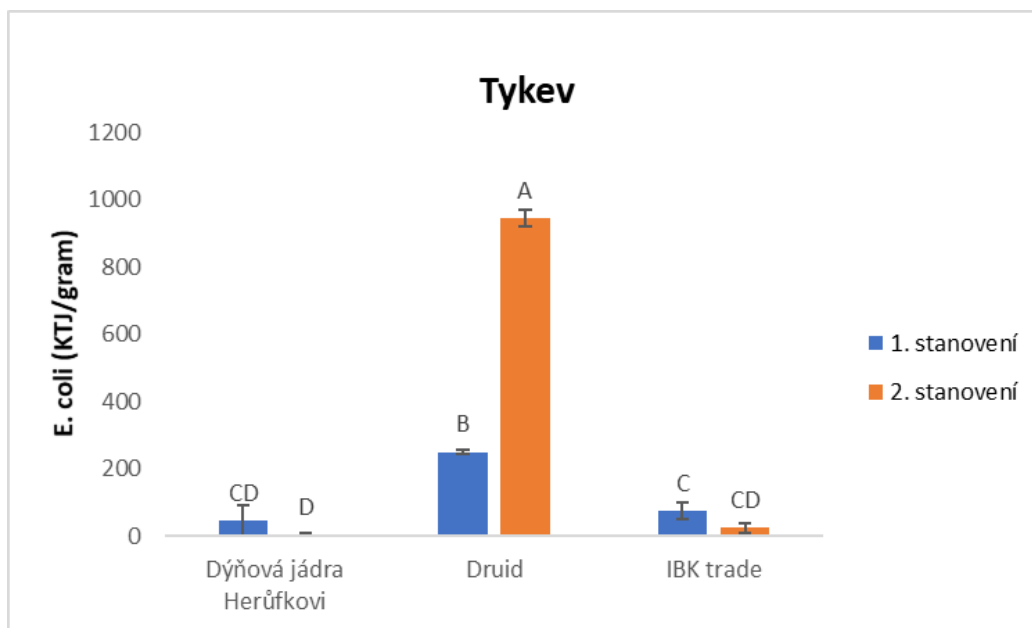


Chybové úsečky představují průměry \pm SE ($n = 3$). Statistika odpovídá popisu u grafu 3

U tykve byla zjištěna kontaminace danou metodou pouze v jednom případě, a to při druhém stanovení u tykve od výrobce Druid. Avšak výsledky nejsou statisticky rozdílné.

U vzorků tykve byly výsledky *E. coli* ze všech analyzovaných semen nejvariabilnější. Stanovené hodnoty jsou statisticky rozdílné a vykazují významné rozdíly.

Graf 9: Porovnání *E. coli* v semenech tykve v 1. i 2. stanovení

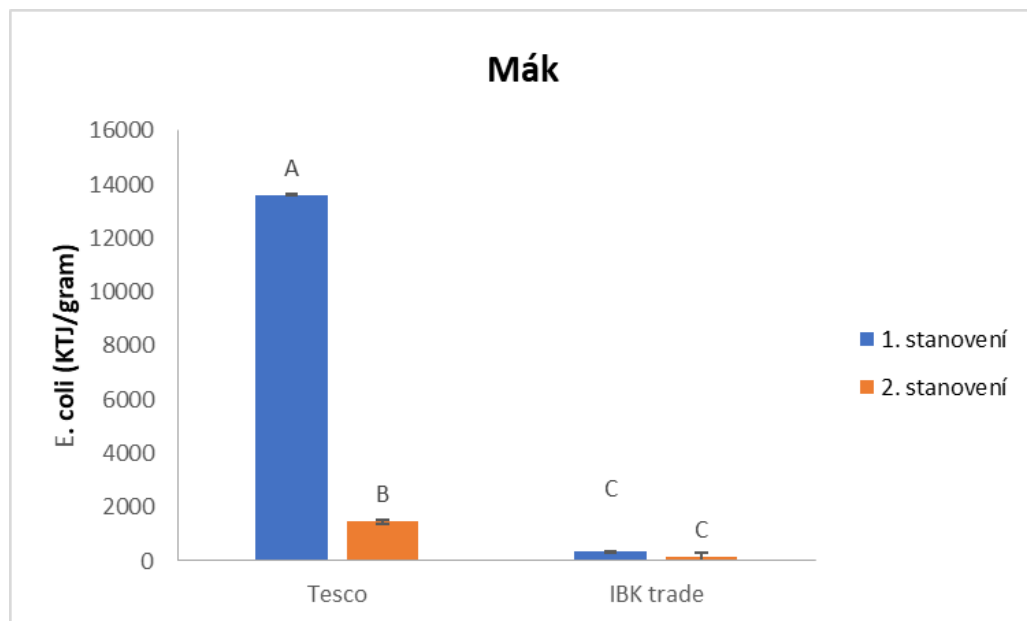


Chybové úsečky představují průměry \pm SE ($n = 3$). Statistika odpovídá popisu u grafu 3

U máku byly zjištěny rozdíly v počtu mikromycet. Avšak ze statistického hlediska nebyly významné.

Hodnoty *Escherichie coli* u vzorků máku jsou statisticky odlišné. Mák (Tesco) vykazoval výrazně vyšší hodnoty. Ve druhém stanovení nastal pokles, ovšem výsledky byly statisticky rozdílné.

Graf 10: Porovnání *E. coli* v semenech máku v 1. i 2. stanovení



Chybové úsečky představují průměry \pm SE (n = 3). Statistika odpovídá popisu u grafu 3

6 Diskuse

Souhrnně bylo v maloobchodní síti nakoupeno 20 druhů konzumních semen rostlin celkem od 8 druhů (sezam, slunečnice, konopí, len, chia, quinoa, dýně, mák), které byly podrobeny mikrobiologickým rozborům.

U vzorků byly zjišťovány 2 znaky mikrobiologické jakosti. Byla hodnocena bakterie *Escherichia coli*, která slouží jako indikátor fekálního znečištění a mikromycety. Některé plísně mají negativní účinky na lidské zdraví. Mohou být původci mykotoxinů nebo vyvolat alergickou reakci. Tyto mikroorganismy byly vybrány proto, že dle vyhlášky 132/2004 sbírky byly stanoveny přípustné hodnoty pro *E. coli* 5×10^2 a pro plísně 10^5 v drobných semenech rostlin pro lidskou výživu. U plísni zjištěné hodnoty v žádném ze vzorků zdaleka nepřesáhly limity určené vyhláškou. U *E. coli* celkem 6 vzorků přesáhlo limit 5×10^2 stanovený již zrušenou vyhláškou 132/2004 Sb. Nařízení EK, kterým byla vyhláška nahrazena, tuto problematiku zcela opomíjí. V současné době tedy neexistuje žádná legislativní úprava stanovující limitní množství *E. coli* a mikromycet v jedlých semenech rostlin. Na trh se tak mohou dostávat potenciálně nebezpečné produkty z hlediska kontaminace bakterií *E. coli*. Cílem odborné veřejnosti by mělo být seznámení zákonodárců ČR a evropských institucí s možnými riziky pro zdraví obyvatel a apelovat na zaplnění této mezery v zákoně.

Plísněmi bylo při prvním stanovení kontaminováno 65 % vzorků. Při druhém stanovení to bylo 40 %.

Největší znečištění plísněmi bylo zaznamenáno u slunečnice (Poex), kde byly zjištěné hodnoty 8×10^2 , resp. $1,4 \times 10^3$.

Celkem bylo nalezeno 6 rodů a jedna skupina mikromycet (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Rhizoktonium*, *Alternaria* a *Mycelia sterilia*) a jeden rod nebyl určen.

Bakterií *E. coli* bylo kontaminováno během obou stanovení přibližně 80 % vzorků. Nejvyšší znečištění bakterií *E. coli* vykazovaly vzorky lnu, kde byly zjištěné hodnoty $> 10^5$ KTJ/gram. Studie zaměřená na rody *Salmonella* a *E. coli*, kterou provedli Willis et al. (2009) ve Velké Británii na 3735 vzorcích jedlých semen zjistila, že *E. coli* byla přítomna pouze v 9 %. Taktéž ve Velké Británii proběhla podobná studie na 2886 vzorcích suchých skořápkových plodů. Little et al. (2010) se zabývali kontaminací bakteriemi *Salmonella* a *Escherichia coli*. Kontaminováno bylo bakterií *Salmonella* pouze 0,1 a bakterií *E. coli* 0,8 % hodnocených vzorků.

Všechny vzorky pocházely od deseti výrobců. Z nich byli náhodně zvoleni 2 výrobci (Druid a IBK trade) od kterých bylo zajištěno více druhů jedlých semen rostlin. Výsledky od těchto výrobců byly statisticky porovnány za účelem zjištění, zda jsou významné rozdíly v kontaminacích mikroorganismy jedlých semen od různých výrobců. K hodnocení byl použit program Minitab, kde byl proveden Tukeyho test na hladině významnosti $< 0,05$. Bylo zjištěno, že mezi výrobci nejsou statisticky významné rozdíly.

V sezamovém semeni bylo v porovnání s ostatními vzorky nalezeno mizivé množství mikromycet. Kontaminace byla zaznamenána pouze při prvním stanovení v sezamu od výrobců Druid a Delmart. Po skladování nebyla kontaminace sezamu zaznamenána. Sezamová semena

obsahují velmi malé množství cukrů, a tak nemusí být pro mikromycety vhodným potravním substrátem.

U sezamu od výrobce Druid byl při prvním stanovení zjištěn rod *Rhizoktonium*, ve druhém stanovení pak rod *Cladosporium*. Sezam tedy neobsahoval žádné toxinogenní plísně. Kollia et al. (2016) provedli studii na přítomnost aflatoxinu B1 v sezamovém semeni pomocí HPLC. Pozitivní bylo 77,6 % analyzovaných vzorků. To značí na přítomnost plísně *Aspergillus*. Výsledky Kollia et al. (2016) se s našimi tedy neshodují.

Ve všech námi hodnocených vzorcích sezamových semen nebyly zaznamenány žádné nárůsty kolonií bakterie *Escherichia coli*. To je v souladu se studií Silva et al. (2017), která provedla v Portugalsku hodnocení 42 semen, včetně šesti sezamových. Ani v jednom vzorku nebyla přítomna *Escherichia coli*.

Nejvíce plísni ze všech hodnocených vzorků bylo zaznamenáno u slunečnicových semen od výrobce Poex a to jak v prvním, tak ve druhém stanovení (850 a 1375 KTJ/gram). Druhý vzorek slunečnice od IBK trade byl podstatně méně kontaminován a 3 vzorek slunečnice, kde se jednalo o slunečnici ošetřenou navíc pražením nebyly zjištěny žádné narostlé kolonie ani v jednom stanovení. Hodnoty jsou tedy velmi variabilní a pravděpodobně došlo ke kontaminaci špatným zacházením během zpracování či v potravinářském provozu. Ošetření drobných semen rostlin pomocí pražení by mohlo být prospěšné pro mikrobiologickou jakost.

Slunečnice byla kontaminována rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Rhizopus*. Některé z těchto plísni mohou tvořit mykotoxiny a jimi pak kontaminovat potravinu. Tímto problémem se zabývala studie Tabuce & Stefana (2005) v letech 2002-2004, která byla mimo jiné zaměřena na plísně tvořící mykotoxiny ve slunečnicovém semeni. Tabuc and Stefan (2005) našli ve slunečnicovém semeni rody plísni *Aspergillus*, *Penicilium*, *Fusarium*. Pierce (1970) uvádí, že jsou slunečnicová semena mikrobiologicky čistší než jiná jedlá semena, z důvodu vyššího vzrůstu rostliny a faktu, že se semena nachází v poměrně velké vzdálenosti od země. To se ovšem v našem testování neprokázalo. Slunečnice od výrobce Poex vykázala dokonce největší počet plísni KTJ v prvním i druhém stanovení ze všech testovaných semen.

E. coli byla identifikována ve všech vzorcích slunečnice. V prvním stanovení byly její hodnoty vyšší než při druhém stanovení. Hodnoty *E. coli* v semenech slunečnice byly celkově nízké a vyrovnané v porovnání s ostatními hodnocenými semeny. Ve studii zaměřené na slunečnicový olej jako inhibiční činidlo pro bakterie *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* bylo zjištěno, že potlačuje růst těchto bakterií (Aboki et al. 2012), což by mohlo být příčinou nízké kontaminace slunečnicových jedlých semen. Studie provedená v Portugalsku na 42 druzích jedlých semen, včetně šesti vzorků slunečnice, nezjistila žádné bakterie *Escherichia coli* (Silva et al. 2017).

Konopné semeno zakoupené pro diplomovou práci bylo pozitivní na mikromycety. V prvním stanovení byl zaznamenán druhý největší počet kolonií a ve druhém stanovení pak třetí největší množství mikromycet ze všech hodnocených vzorků.

Rodové zastoupení bylo rozdílné. V prvním stanovení byl dominantní rod *Penicillium*, následoval *Rhizopus* a dále byl identifikován i rod *Rhizoktonium*. Ve druhém stanovení se vyskytoval pouze rod *Penicillium*. McPartlanda & McKernan (2017) tvrdí, že konopí

je náchylné na rody plísní *Penicillium*, *Rhizopus*, *Aspergillus* a *Mucor*. Jedná se však o kontaminaci v rostlinné biomase, nikoliv pouze v semenech. Mezi těmito a našimi výsledky nicméně panuje částečná shoda.

Hodnoty *E. coli* byly v podstatě zanedbatelné. Při prvním stanovení bylo zjištěno 20 KTJ/gram vzorku a při druhém stanovení 10 KTJ. The Office of Medicinal Cannabis v Nizozemsku určil nejvyšší přípustné hodnoty *E. coli* 0 KTJ/gram vzorku. Nejedná se ovšem o jedlá semena rostlin, nýbrž o léčebné konopí (McPartlanda & McKernan 2017). Olej z konopných semen vykazuje dle Ali et al. (2012) střední inhibiční aktivitu proti *Escherichia coli*, což by odpovídalo výsledkům v této práci.

Lněné semeno mělo rozlišné hodnoty v množství mikromycet. Nejméně postižený houbovou kontaminací byl v prvním stanovení len (DM), který obsahoval 30 KTJ/gram. Následoval len (Druid 200 KTJ/gram a len (IBK trade) 350 KTJ/gram. Ve druhém stanovení klesl na nulu počet mikromycet u lnů (DM a Druid). Naopak u lnu IBK trade byl zaznamenán nárůst kolonií, což by pravděpodobně mohlo být způsobeno kontaminací při skladování mezi prvním a druhém stanovením.

Ve lněném semeni byly dominantní rody *Alternaria* (IBK trade, Druid) a *Cladosporium* (DM), dále byl nalezen rod *Aspergillus*, který měl při prvním stanovení menšinové zastoupení, ale při stanovení po třech měsících skladování byl dominantní před rody *Cladosporium* a *Alternaria*. Ve studii provedené na 122 vzorcích lněných semen zaměřené na mykotoxiny produkující plísní *Alternaria* bylo pozitivní na některý ze zjišťovaných toxinů 26 analyzovaných vzorků (Králová et al. 2006). Bhat & Reddy (2017) uvádějí že jsou lněná semena náchylná na toxinogenní plísně *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* a další patogenní rody *Colletotrichum*, *Rhizoktonium*, *Alternaria*. Napadení těmito kontaminanty nastává během zrání semen. Sahay et al. (2006) ve studii provedené na 105 druzích vzorků semen lnu zjistili jako dominantní rod *Aspergillus* a dále uvádějí, že 46 vzorků bylo pozitivních na aflatoxin B1. Tyto konfrontace jsou tedy částečně shodné s našimi výsledky.

Všechny vzorky lnu měly nejvyšší hodnoty *Escherichia coli* ze všech hodnocených suchých semen rostlin. V prvním stanovení jako jediné překročily hodnoty vyšší než 10^5 . Při druhém stanovení se množství *E. coli* snížilo o 1 až 2 řády. Silva et al. (2017) prováděla studii mimo jiné na 6 semenech lnu se zjištěním nulového výskytu bakterie *E. coli*. Tyto výsledky jsou v rozporu s námi zjištěnými hodnotami. Ke kontaminaci mohlo dojít použitím napadené vody při zpracování, případně špatnými hygienickými podmínkami při zpracování, skladování nebo distribuci. Vzhledem k tomu, že byly napadeny všechny vzorky lnu a zároveň stanovení probíhalo s ostatními vzorky, u kterých nebyly hodnoty bakterie *Escherichia coli* tak vysoké, můžeme vyloučit chybu při manipulaci se vzorky v laboratoři.

Chia semena nejsou pravděpodobně náchylná na houbovou kontaminaci, protože všechny hodnocené vzorky obsahovaly jen malé množství nebo žádné mikromycety. Chia (Druid) nebyla kontaminována vůbec. Chia (La food) měla v prvním i druhém stanovení shodně 50 KTJ/gram a chia (Diana company) obsahovala v prvním stanovení 80 KTJ/gram, ve druhém stanovení už nebyla danou metodou zjištěna žádná kontaminace.

Z rodů plísní byl u chia (La food) zjištěn *Aspergillus*, při druhém stanovení se k němu přidal *Mucor*. V chia (Diana company) byla zjištěna skupina *Mycelia sterilia*.

Kontaminace bakterií *Escherichia coli* byla zaznamenána v prvním stanovení u dvou vzorků chia semen. Konkrétně chia (La food) měla 40 KTJ/gram a chia (Diana company) 60 KTJ/gram. Ve druhém stanovení došlo u chia (La food) k poklesu hodnot na $<10^1$ KTJ/gram a u chia (Diana company) bylo naopak zaznamenáno zvýšení počtu kolonií tvořící jednotky na 90/gram. Chia od výrobce Druid nebyl touto bakterií kontaminovaný ani v jednom stanovení.

Quinoa vykazovala jednu z nejnižších kontaminací mikromycetami. Semeno quinoi (La food) obsahovalo shodně v prvním i druhém stanovení po 30 KTJ/gram. Vzorek quinoi (Albert) byl čistý, danou metodou nebyla zjištěna žádná kontaminace.

V prvním stanovení se u quinoi (La food) objevila plíseň rodu *Cladosporium*. Ve druhém stanovení byla zaznamenána skupina hub *Mycelia sterilia*. Papier et al. (2008) se zabývali plísněmi v semenech quinoi. Vzorky pocházely ze tří lokalit v Bolívii a Brazílii. Nejčastějšími kontaminanty, bez ohledu na geografický původ, byly rody *Penicillium* a *Aspergillus*. Jedná se o nejčastější kontaminanty potravin, avšak v našem stanovení nebyly tyto rody plísní zjištěny. Dále Papier et al. (2008) zjistili v menších počtech plísně rodů *Eurotium*, *Fusarium*, *Mucor* a *Rhizopus*. Sporadicky zaznamenali rody *Alternaria* a *Cladosporium*.

E. coli byla v quinoe (La food) zjištěna v průměrném množství 60 KTJ/gram při prvním stanovení. Ve druhém se počty o něco snížily na 50 KTJ/gram. Quinoa (Albert) vykazovala vysoké hodnoty *E. coli*. V prvním stanovení byl zaznamenán pátý největší počet (první tři místa zaujímají všechna semena lnu) kolonií: 1650/gram. Ve druhém stanovení nastal pokles na 780 KTJ/gram. Antimikrobiální potenciál semen quinoi pocházejících z Chile studovala Miranda et al. (2014). Ti došli k závěru, že extrakty ze semen quinoi jsou inhibiční pro *E. coli* a *S. aureus*. Tato studie není v souladu s šetřením v této práci.

Podle tabulky č. (3) je patrné, že nejméně náchylná na kontaminaci plísněmi jsou dýňová semena, která nebyla při prvním stanovení kontaminována. Pouze při skladování byla kontaminována tykev loupaná od výrobce IBK trade v množství 30 KTJ/gram plísní rodu *Aspergillus*.

V námi 3 hodnocených vzorcích byla zaznamenána *Escherichia coli* v každém vzorku při prvním stanovení. Dýně od Dýňová jádra Herůfkovi obsahovala 50 KTJ/gram. Nepatrně více, 80 KTJ/gram byl zjištěn u dýně (IBK trade). Nejvyšší počet *E. coli* byl zjištěn u tykve loupané (Druid) v množství 250 KTJ/gram. Při druhém stanovení byl v jednom případě (Tykev Druid) zaznamenán výrazný nárůst kolonií na 950 KTJ/gram, což je v souladu s následujícími studii. U dalších dvou byla zjištěn částečný pokles nebo úplné vymizení *E. coli*. Podle Hammera et al. (1999), kteří prováděli studii na 52 rostlinných olejích, včetně dýňového neinhibuje dýňový olej žádný z následujících mikroorganismů: *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica subsp.*, *Serratia marcescens* a *Staphylococcus aureus*. Ovšem Silva et al. (2017) nezjistili žádné bakterie *Escherichia coli* v dýňových semenech. To může být způsobeno nekontaminovaným výrobním prostředím, dobrými předsklizňovými i skladovacími a přepravními podmínkami.

Semena máku jsou náchylná na houbové kontaminace (Prugar et al. 2008). V námi stanovených semenech máku byl identifikován pouze rod *Aspergillus* a množství kolonií

na gram bylo u máku z řetězce Tesco 30 KTJ a při druhém stanovení $<10^1$ KTJ. V máku od výrobce IBK trade bylo shodně 2x 230 KTJ/gram. Oproti námi stanoveným výsledkům bylo Jesenskou (1987) zjištěno v průměru 378 KTJ/gram a převládal rod *Cladosporium*, který měl více než 90% zastoupení. Následoval rod *Penicillium*. Menší než 1% zastoupení měly rody *Alternaria*, *Mucor*, *Syncephalastrum* a *Aspergillus*. Výsledky Jesenské (1987) se s našimi neshodují. V souladu s našimi výsledky je studie Feroze et al. (2016), kteří se zabývali mikrobiální kontaminací 46 vzorků koření a suchých plodů. Všechna hodnocená semena máku vykazovala hodnoty > 104 KTJ/ml.

Semena máku byla *E. coli* kontaminovaná výrazně. Mák (Tesco) vykazoval čtvrtý největší počet: 13600 KTJ/gram v prvním stanovení. Ve druhém stanovení poklesl počet na 370 KTJ/gram. Mák (IBK trade) měl v jednom gramu vzorku 1454 KTJ. Ve druhém stanovení nastal taktéž výrazný pokles na 150 KTJ/gram. Tyto výsledky jsou v souladu se studií Feroze et al. (2016), kteří našli v makovém semeni bakterie *Escherichia coli*. Přítomnost této bakterie není v potravinách samozřejmostí. Do potravin se dostane sekundární kontaminací, kdy je použita špatná voda nebo je potravina pěstována v blízkosti živočišné výroby. Ke znečištění může dojít i vlivem špatných hygienických návyků pracovníků, přicházejících s potravinou do styku.

Obecně je *Aspergillus* nejvíce rozšířenou plísní v suchých plodech. Tato informace se potvrdila i v rámci diplomové práce, kde plísně tohoto rodu tvořily téměř polovinu všech mikromycet. Přibližně pětinu zaujímal rod *Penicillium* a velmi podobné zastoupení měl rod *Alternaria*. To není příliš povzbudivé vzhledem k tomu, že rody *Aspergillus* i *Penicillium* tvoří mykotoxiny, které se negativně podepisují na zdraví lidí. Tyto rody jsou považovány za skladištní plíseň a k napadení tedy dochází až po sklizni. Rodem *Aspergillus* byla v této práci kontaminována slunečnice, len, chia, tykev a mák. Rodem *Penicillium* byla znečištěna slunečnice a konopné semeno. Z hlediska produkce mykotoxinů je ještě významný rod *Fusarium*, který ovšem v této práci nebyl zaznamenán. Food and Agriculture Organisation odhaduje, že 25 % světových zásob zrnin je ročně kontaminováno mykotoxiny a dá se předpokládat, že ještě větší množství může být kontaminováno mykotoxiny dosud neidentifikovanými (Suchý & Herzig 2005).

Studie provedená na 117 vzorcích suchých plodů zaměřená na mykotoxiny a zvláště pak na ochratoxin A dospěla k závěru, že nejčastěji znečišťujícími plísněmi jsou zástupci druhu *Aspergillus niger*, z nichž 15 % bylo producenty ochratoxinu A, následuje *Aspergillus ochraceus* a *Aspergillus carbonarius* (Lamanaka et al. 2005). Ve studii, která se zabývala problematikou nežádoucí mikrobioty v suchých plodech v Brazílii, zjistili téměř totožné informace, jako jsou výsledky této práce. V suchých plodech převažuje rod *Aspergillus*, následuje *Penicillium* (Freitas-Silva et al. 2011).

Možnostmi odstranění toxinogenních plísní ze suchých plodů se v posledních letech zabývá řada studií. Například Jogee et al. (2011) hledali vhodné antifungální látky proti plísním *Aspergillus*, *Fusarium* a *Cladosporium*. Maximální aktivitu proti těmto houbám vykazoval hřebíčkový olej. Dalšími vhodnými látkami jsou nanočástice stříbra nebo olej z koriandru. Naopak se neosvědčily oleje ze semen kořenových rostlin.

Jako pozitiva lze uvést velmi malé celkové kontaminace mikromicetami a nepřítomnost plísně *Fusarium*, která může být původcem mykotoxinů. Všechna testovaná drobná semena rostlin k přímé spotřebě z hlediska obsahu plísní splňují legislativu. Za negativa můžeme považovat přítomnost toxinogenních plísní *Aspergillus* a *Penicillium* a také přítomnost bakterie *E. coli* ve $\frac{3}{4}$ analyzovaných semen, což indikuje fekální znečištění.

7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo zjistit mikrobiologickou jakost drobných semen rostlin pro přímou spotřebu, kde byly kvantitativně hodnoceny mikromycety a bakterie *Escherichia coli* a kvalitativně byly plísně určeny na úroveň rodu. Vybraná byla semena sezamu, slunečnice, konopí, merlíku chilského, šalvěže hispánské, lnu, tykve a máku, která byla zajištěna od různých výrobců.

Stanovení proběhlo ihned po zakoupení. Následně byly vzorky tři měsíce skladovány a po uplynutí této doby bylo uskutečněno další stanovení.

Nejvíce vzorků bylo pořízeno od výrobců Druid a IBK trade s cílem zjistit, zda jsou v mikrobiologické kvalitě jedlých semen od různých výrobců rozdíly. Bylo zjištěno, že mezi výrobci není statisticky významný rozdíl. Také po skladování se počty mikroorganismů významně nelišily.

Ve zkoumaných vzorcích byly nalezeny rody plísní *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Rhizoktonium*, *Alternaria* a skupina hub Mycelia sterilia. Dominantním rodem byl *Aspergillus* následoval *Penicillium* a *Alternaria*, což není příznivé z hlediska možného výskytu mykotoxinů. Pozitivní bylo zjištění, že celkové počty nalezených plísní byly velmi malé (od $<10^1$ KTJ/g do 1350 KTJ/g)

Hypotéza, vycházející z předpokladu, že vzorky všech semen budou splňovat podmínky legislativy po celou dobu jejich minimální trvanlivosti, se nepodařilo u *Escherichia coli* potvrdit. Bakterií *Escherichia coli* bylo kontaminováno přibližně 80 % vzorků. Nejvíce znečištěné byly všechny vzorky lnu, kde byla překročena hodnota $> 10^5$. Celkem přesáhlo hodnoty 2×10^2 KTJ/g (stanovené vyhláškou 132/2004 Sb.) dohromady šest vzorků jedlých semen rostlin. Ostatní vzorky legislativu splnily.

8 Zdroje

- Aboki MA, Mohammed M, Musa SH, Zuru BS, Aliyu HM, Gero M, Alibe IM, Inuwa B. 2012. Physicochemical and Anti-Microbial Properties of Sunflower (*Helianthus Annuus L.*) Seed Oil. *International Journal of Science and Technology*. **2**:151-154
- Agata N, Ohta M, Yokoyama K. 2002. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *International Journal of Food Microbiology*. **73**:23-27
- Ainsworth GC. 2008. *Ainsworth & Bisbys Dictionary of the fungi*. Cab international. Wallingford
- Ali EMM, Almagboul AZI, Khogali SME, Gergier UMA. 2012. Antimicrobial Activity of *Cannabis sativa L.* Chimese Medicine. **3**:61-64
- Andersson A, Rönner U, Granum PE. 1995. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology*, **28**:145–155
- Andre CHM., Hausman J-F, Guerriero G. 2016. *Cannabis sativa*. The plant of the Thousand and One Molecules. **2016**:1-2.
- Azcan N, Ozturk Kalender B & Kara M. 2004. Investigation of Turkish Poppy Seeds and Seed Oils. *Chemistry of Natural Compounds*. **40**:370-372.
- Balajee SA, Houbraken J, Verweij PE, Hong S-B, Yaghuchi T, Varga J, Samson RA. 2007. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Studies in Mycology*. **59**:39-46
- Barbosa-Canovas GV, Fonata AJ, Schmidt SJ. 2007. *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons. Hoboken
- Bednář M, Fraňková V, Schindler J, Souček A, Vávra J. 1999. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Marvil. Praha.
- Bhat R & Reddy KRN (2017). Challenges and issues concerning mycotoxins contamination in oil seeds and their edible oils: Updates from last decade. *Food Chemistry*. **215**:425–437
- Bozan B & Temelli F. 2008. Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Bioresource Technology*, **99**:6354–6359
- Cotty PJ, Bayman P, Egel DS, Elias KS. 1994. Agriculture, Aflatoxins and *Aspergillus*. The Genus *Aspergillus*. **69**:1-27

- Devi V & Khanam S. 2019. Comparative study of different extraction processes for hemp (*Cannabis sativa*) seed oil considering physical, chemical and industrial-scale economic aspects. *Journal of Cleaner production*. **207**:645-657
- Egmond HP, Schothorst RC, Jonker MA. 2007. Regulations relating to mycotoxins in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**:147-157
- Falco DB, Amato M, Lanzotti V. 2017. Chia seeds products: an overview. *Phytochemistry Reviews*, **16**:745–760.
- Fassatiová O. 1979. Plísňe a vláknité houby v technické mikrobiologii. Nakladatelství technické literatury. Praha.
- Frassinetti S, Moccia E, Caltavuturo L, Gabriele M, Longo V, Bellani L, Giorgetti L. 2018. Nutraceutical potential of hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds and sprouts. *Food Chemistry*. **262**:56–66.
- Feroz F, Shimuzu H, Nishioka T, Mori M, Sakagami Y. 2016. Bacterial and Fungal Counts of Dried and Semi-Dried Foods Collected from Dhaka, Bangladesh, and Their Reduction Methods. *Biocontrol Science*. **21**:243-251
- Freitas-Silva O & Venâncio A. 2011. Brazil nuts: Benefits and risks associated with contamination by fungi and mycotoxins. *Food Research International* **44**:1434–1440
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, **86**:985–990
- Hampel B, Šilhánková L. 1957. Klíč k určování technicky důležitých plísní. Státní nakladatelství technické literatury. Praha.
- Hauschild AHW. 2018. *Clostridium botulinum: ecology and control in foods*. Taylor & Francis Group. Boca Raton
- Heussner AH & Bingle LEH. 2015. Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data. *Toxins*. **7**:4253-4282
- Chandra S, Lata H, Mahmoud A, ElSohly. 2017. *Cannabis sativa* L. Botany and Biotechnology. Springer. Oxford
- Chen DX & Mujumdar SA. 2008. *Drying Technologies in Food Processing*. Blackwell Publishing. India.
- Jesenská Z. 1987. Mikroskopické huby v poživatinách a v krmivách. Vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry. Bratislava

- Jogee SP, Ingle AP, Gupta IR, Bonde SR, Rai MK. 2012. Detection and Management of Mycotoxigenic Fungi in Nuts and dry Fruits. *Acta Horticulturae*. **963**:69 - 77
- Johanson DI. 2018. *Salmonella* spp. Bacterial Pathogens and Their Virulence Factors. Springer International Publishing. Burlington
- Kollia E, Tsourouflis K, Markaki P. 2016. Aflatoxin B1 in sesame seeds and sesame products from the Greek market. *Food additives & Contaminants: Part B*. **9**:217-222
- Kopáčová, O. 2007. Trendy ve zpracování cereálií s přihlédnutím zejména k celozrnným výrobkům. Ústav zemědělských a potravinářských informací
- Králová J, Hajšlová J, Poustka J, Hochman M, Bjelková M, Odstrčilová L. 2006. Occurrence of *Alternaria* Toxins in Fibre Flax, Linseed, and Peas Grown in Organic and Conventional Farms: Monitoring Pilot Study. *Czech Journal of Food Science*. **24**: 288–296
- Lamanaka BT, Taniwaki MH, Menezes HC, Vicente E, Fungaro MHP. 2005. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. *Food Additives & Contaminants*. **22**:1258-1263
- Lazos ES. 1986. Nutritional, Fatty Acid, and Oil Characteristics of Pumpkin and Melon Seeds. *Journal of Food Science*. **51**:1382–1383
- Lim, T. K. 2012. *Sesamum indicum*. *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants*. **2012**:187-219
- Little CL, Rawal N, Pinna E, McLauchlin J. 2010. Survey of *Salmonella* contamination of edible nut kernels on retail sale in the UK. *Food Microbiology*. **27**:171-174
- Logan NA & Vos PD. 2015. *Bacillus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. **1**:1–163.
- Lugauskas A, Raila A, Railiene M, Raudoiene V. 2006. Toxic micromycetes in grain raw material during its processing. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. **13**:147-148
- Martirosyan D & Singh J. 2015. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? *Functional Foods in Health & Disease*. **6**:209-210
- McPartland JM & McKernan KJ. 2017. Contaminants of Concern in Cannabis: Microbes, Heavy Metals and Pesticides. *Cannabis Sativa L. - Botany and Biotechnology*. **2017**:457–474
- Meena PD, Awasthi RP, Chattopadhyay C, Kolte SJ, Kumar A. 2010. *Alternaria* blight: a chronic disease in rapeseed-mustard. *Journal of Oilseed Brassica*. **1**:1-11

- Miraj S & Kiani S. 2016. Bioactivity of *Sesamum indicum*: A review study. *Der Pharmacia Lettre*. **8**:328-334
- Moses JA, Norton T, Alagusundaram K, Tiwari BK. 2014. Novel Drying Techniques for the Food Industry. *Food Engineering Reviews*. **6**:43-55
- Miranda M, Delatorre-Herrera J, Vega-Gálvez A, Jourquera E, Quispe-Fuentes I, Martínez EA. 2014. Antimicrobial Potential and Phytochemical Content of Six Diverse Sources of Quinoa Seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Agricultural Sciences*. **5**:1015-1024
- Mujumdal AS & Law ChL. 2010. Drying Technology: Trends and Applications in Postharvest Processing. *Food and Bioprocess Technology*. **3**:843-85
- O'Donnell K, Lutzoni FM, Ward TJ, Benny GL. 2001. Evolutionary Relationships among Mucoralean Fungi (Zygomycota): Evidence for Family Polyphyly on a Large Scale. *Mycologia*. **93**:286-287
- Okopi JA, Isa SE, Audu O, Fagbamila IO, Iornenge JC, Smith IS. 2016. Isolation and polymerase chain reaction detection of virulence *invA* gene in *Salmonella* spp. *Journal of Medicine in the Tropics*. **18**:98-102
- Paruch AM, Mæhlum T. 2012. Specific features of *Escherichia coli* that distinguish it from coliform and thermotolerant coliform bacteria and define it as the most accurate indicator of faecal contamination in the environment. **23**:140-142
- Paris HS. 2010. History of the Cultivar-Groups of *Cucurbita pepo*. *Horticultural Reviews*. **25**:71-74
- Pappier U, Pinto VF, Larumbe G, Vaamonde G. 2008. Effect of processing for saponin removal on fungal contamination of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd). *International Journal of Food Microbiology*. **125**:153-157
- Pierce RM. 1970. Sunflower processing technique. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **47**:247A-251A
- Prugar J et al. 2008. Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., ve spolupráci s Komisí jakosti rostlinných produktů ČAZV.
- Ramjegathesh R, Ebenezar EG. 2012. Morphological and Physiological Characters of *Alternaria alternata* Causing Leaf Blight Disease of Onion. *International Journal of Plant Pathology*. **3**:34-44
- Ranhotra GS, Gerloth JA, Glaser BK, Lorenz KJ, Johnson DL. 1993. Composition and Protein Nutritional Quality of Quinoa. *Cereal Chemistry*. **70**:303-305

- Ross IA. 2005. *Sesamum Indicum*. Medicinal plants of the World. **3**:487-505
- Rundberget T, Skaar I, Flåøyen A. 2004. The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food wastes. International Journal of Food Microbiology. **90**:181-188
- Sahay SS, Prasad T, Sinha KK. 2006. Postharvest incidence of aflatoxins in *Linum usitatissimum* seeds. Journal of the Science of Food and Agriculture **53** 169–174
- Sakuda S, Yoshinari T, Furukawa T, Jermnak U, Takagi K, Limura K, Yamamoto T, Suzuki M, Nagasawa H. 2015. Search for aflatoxin and trichothecene production inhibitors and analysis of their modes of action. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. **80**:43-54
- Samson et al. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Studies in Mycology. **78**:141-173
- Silva D, Oliveira M, Quintas, C. Microbiological Quality of Seeds Sold at Supermarkets in Southern Portugal. International Congress on Engineering and Sustainability in the XXI Century. **2017**:253-256
- Sofi. TA, Being NA, Haasan Dar, Gh., Mushtaq Ahmad, Aflaq Hamid, Ahangar, F. A., Padder, B. A. Shah, M. D. 2013. Cultural, morphological, pathogenic and molecular characterization of *Alternaria mali* associated with *Alternaria* leaf blotch of apple. African Journal of Biotechnology. **12**:370-381
- Stevenson DG, Eller FJ, Wang L, Jane J.-L, Wang T, Inglett GE. 2007. Oil and Tocopherol Content and Composition of Pumpkin Seed Oil in 12 Cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **55**:4005–4013
- Suchý P, Herzig, I. 2005. Plísně a mykotoxiny, prevence jejich vzniku a dekontaminace v krmivech. Vědecký výbor výživy zvířat. Praha
- Sumbali, G. 2005. The Fungi. Alpha Science International. Harrow.
- Šerá B, Gajdová I, Šerý M, Špatenka P. 2013. New Physicochemical Treatment Method of Poppy Seeds for Agriculture and Food Industries. Plasma Science and Technology. **15**:935-938.
- Šilhánková, L. 2008. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologie. 3. vyd. Academia. Praha.
- Tabuc C, Stefan G. 2005. Assessment of mycologic and mycotoxicologic contamination of soybean, sunflower and rape seeds and meals during 2002 - 2004. Archiva Zootechnica. **8**:51-56

USDA. 2018. National nutrient database for standard reference. 2018. USDA Food Composition Databases. United States Department of Agriculture Agricultural Research Service. Available from <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list?home=true> (accessed October 2019)

Wan Y, Li H, Fu G, Chen X, Chen F. 2014. The relationship of antioxidant components and antioxidant activity of sesame seed oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **95**:2571-2578

Weber CW, Gentry HS, Kohlhepp EA, McCrohan PR. 1991. The nutritional and chemical evaluation of Chia seeds. *Ecology of Food and Nutrition*. **26**: 119–125.

Willis C, Little ChL, Sagoo S, Pinna E, Threlfall J. 2009. Assessment of the microbiological safety of edible dried seeds from retail premises in the United Kingdom with a focus on *Salmonella* spp. *Food Microbiology*. **26**:847-852

Woudenberg JHC, Groenewald JZ, Binder M, Crous PW. 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*. **75**:171-212

Wright SA. 2015. Patulin in food. *Current Opinion in Food Science*. **5**:105-109

Wrigley C, Corke H, Seetharaman K, Faubion J. (eds.) 2016. *Encyclopedia of Food Grains*. 4th ed. Academic Press. Oxford.

Zuk M, Richter D, Matula J, Szopa J. 2015. Linseed, the multipurpose plant. *Industrial Crps and Products*. **75**:165-177

Zheng R, Chen G, Huang H, Liu X. 2007. A monograph of *Rhizopus*. *Sydowia*. **59**:273-372

ČSN ISO 21527-2 (560650). Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísní - Část 2: Technika počítání kolonií u výrobků s aktivitou vody nižší než nebo rovnou 0,95

ČSN EN ISO 21807. Mikrobiologie potravin a krmiv - Stanovení vodní aktivity. 2006. Český normalizační institut. Praha. 12 s.

Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006. maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. Úřední věstník Evropské unie. 2006.