

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
DIPLOMOVÁ PRÁCE

2018

Bc. Rozálie Peřinová

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Monitoring mikroorganismů v nutričně vyvážených přesnídávkách a vliv
přírodních extraktů na výskyt mikroorganismů

Bc. Rozálie Peřinová

Diplomová práce

2018

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Monitoring of microorganisms in nutritionally balanced snacks and influence
of natural extracts on the occurrence of microorganisms

Bc. Rozálie Peřinová

Diploma thesis

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Rozálie Peřinová**
Osobní číslo: **C16618**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Monitoring mikroorganismů v nutričně vyvážených
přesnídávkách a vliv přírodních extraktů na výskyt
mikroorganismů**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

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

1. Zpracujte literární rešerši cílenou na problematiku zdravé výživy. Zaměřte se na suroviny využití v experimentální části. V odborných člancích naleznete využití přírodních extraktů s antimikrobiálními účinky.
2. V experimentální části popište jednotlivé použité postupy stanovení mikroorganismů, mikroorganismy v surovinách vyizolujte a identifikujte zástupce. Popište přípravu extraktů a metodiku stanovení jejich antimikrobiální účinnosti na vyizolované bakterie.
3. Výsledky vyhodnoťte, vyvoďte závěry, doporučte použití nejvhodnějších extraktů a porovnejte je s dostupnou literaturou.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Iveta Brožková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce:

doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **20. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 1. 5. 2018

Bc. Rozálie Peřinová

Poděkování:

Úvodem bych velice ráda poděkovala Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. za její odborné vedení mé diplomové práce, cenné rady a připomínky při vypracování. Velký dík také patří Ing. Petře Mořkové, Ph.D. za její rady a pomoc v laboratoři. Ráda bych také poděkovala panu doc. Ing. Liboru Červenkově, Ph.D. za přípravu rostlinných extraktů. Velice děkuji své rodině a nejbližším za podporu během celé doby studia.

ANOTACE

Tato práce se zabývá monitoringem mikroorganismů u několika druhů proteinových přesnídávek, jež se lišily svým složením a způsobem úpravy a vlivem přírodních extraktů na přítomnost mikroorganismů. V teoretické části jsou popsány suroviny používané ve zdravé výživě, chemické látky přirozeně se vyskytující v rostlinách, jež mohou mít antimikrobiální účinky a v neposlední řadě jsou popsány právě jednotlivé rostliny. V experimentální části je kromě monitoringu mikroorganismů v přesnídávkách sledována i antimikrobiální aktivita u vybraných etanolových rostlinných extraktů. Antimikrobiální aktivita je zaměřena na bakterii *Bacillus cereus*, která se v přesnídávkách vyskytovala nejčastěji, a která tvoří dva druhy toxinů, jež mohou způsobovat alimentární onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA: alternativní strava, proteinové přesnídávky, přírodní extrakty, mikrobiologie

ANNOTATION

This work deals with the monitoring of microorganisms in several types of protein snacks, which are different in their composition and method of treatment and influence of natural extracts for the presence of microorganisms. The theoretical part describes the raw materials used in healthy nutrition, chemicals naturally occurring in plants, which can have antimicrobial effects and then there are individual plants described. In the experimental part, except for the monitoring of microorganisms in overdoses, antimicrobial activity is also monitored in selected ethanol plant extracts. The antimicrobial activity is focused on *Bacillus cereus*, which occurs most often in snacks, and which produces two kinds of toxins that can cause foodborne illness.

KEYWORDS: alternative diet, protein snacks, natural extracts, microbiology

OBSAH

ÚVOD.....	10
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1.1 Alternativní strava.....	11
1.1.1 Dieta s vysokým příjmem proteinů.....	12
1.2 Proteiny.....	13
1.3 Zdroje proteinů.....	14
1.3.1 Proteiny živočišného původu.....	14
1.3.2 Proteiny rostlinného původu.....	14
1.4 Syrovátka.....	15
1.4.1 Druhy syrovátkových proteinů.....	16
1.4.1.1 Syrovátkový proteinový koncentrát (WPC - Whey Protein Concentrate)...	16
1.4.1.2 Syrovátkový proteinový izolát (WPI – Whey Protein Isolate).....	16
1.4.1.3 Hydrolyzovaný syrovátkový protein.....	16
1.5 Kasein.....	16
1.6 Suroviny používané ve zdravé stravě.....	17
1.6.1 Ořechová másla.....	17
1.6.1.1 Arašídové máslo.....	17
1.6.1.2 Mandlové máslo.....	17
1.6.2 Oleje.....	18
1.6.2.1 Lněný olej.....	18
1.6.2.2 Chia olej.....	18
1.6.2.3 Kokosový olej.....	18
1.6.3 Mouky.....	19
1.6.3.1 Rýžová mouka.....	19
1.6.3.2 Pohanková mouka.....	19
1.6.3.3 Kukuřičná mouka.....	20
1.6.3.4 Čiroková mouka.....	20
1.6.3.5 Jáhlová mouka.....	21
1.6.4 Kolagen.....	21
1.6.5 Inulin.....	21
1.7 Rostlinné extrakty.....	22
1.7.1 Antimikrobiální aktivita přírodních extraktů.....	23

1.8	Antimikrobiální látky a antioxidanty obsažené v rostlinách.....	24
1.8.1	Rostlinné fenoly.....	24
1.8.2	Tokoferoly.....	25
1.8.3	Karotenoidy.....	26
1.8.4	Kyselina askorbová.....	27
1.9	Charakteristika vybraných druhů rostlin.....	28
1.9.1	Lékořice.....	28
1.9.2	Šalvěj.....	29
1.9.3	Tymián.....	30
1.9.4	Galgán.....	31
1.9.5	Anýz.....	31
1.9.6	Chilli.....	32
1.9.7	Rakytník.....	32
1.9.8	Skořice.....	32
1.9.9	Zázvor.....	33
1.9.10	Zelená káva.....	33
1.10	Rod <i>Bacillus</i>	34
1.10.1	<i>Bacillus cereus</i>	34
1.11	Stanovení antimikrobiální aktivity.....	36
1.11.1	Diskový difúzní test.....	36
1.11.2	Diluční metoda.....	37
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
2.1	Pomůcky.....	39
2.2	Přístroje.....	40
2.3	Příprava půd a kultivačních médií.....	40
2.4	Testované vzorky (proteinové přesnídávky).....	44
2.5	Homogenizace vzorků.....	45
2.6	Metody mikrobiologické analýzy.....	46
2.6.1	Stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů (ČSN EN ISO 4833-2).....	46
2.6.2	Stanovení enterokoků.....	47
2.6.3	Horizontální metoda stanovení počtu presumptivního <i>Bacillus cereus</i> - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C (ČSN EN ISO 7923).....	47

2.6.4	Stanovení celkového počtu kvasinek a plísni u výrobků s vodní aktivitou vyšší než 0,95 (ČSN EN ISO 21527-1)	48
2.7	Identifikace mikroorganismů	48
2.8	Příprava rostlinných extraktů	48
2.9	Metody sledování antimikrobiální účinnosti extraktů	50
2.9.1	Difúzní disková metoda	50
2.9.2	Diluční bujónová metoda	51
2.10	Ověření účinnosti extraktu v reálných vzorcích	51
2.11	Stanovení aktivity vody	52
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	53
3.1	Celkové počty mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů (ČSN EN ISO 4833-2)	53
3.2	Stanovení enterokoků	54
3.3	Horizontální metoda stanovení počtu presumtivního <i>Bacillus cereus</i> (ČSN EN ISO 7932)	55
3.4	Stanovení celkového počtu kvasinek a plísni s aktivitou vody vyšší než 0,95 (ČSN EN ISO 21527-1)	56
3.5	Identifikace mikroorganismů	57
3.6	Sledování antimikrobiální aktivity přírodních extraktů	58
3.6.1	Difúzní disková metoda	58
3.6.2	Diluční bujónová metoda	62
3.6.3	Ověření účinnosti vybraného extraktu na reálných vzorcích	64
3.7	Stanovení aktivity vody	65
4	ZÁVĚR	66
5	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68
6	PŘÍLOHA	87

SEZNAM ZKRATEK

AMK	aminokyselina
a_w	aktivita vody
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
BCAA	branched chain amino acids – aminokyseliny s rozvětveným řetězcem
CPM	celkové počty mikroorganismů
ČSN	česká technická norma
DRBC	Dichloran Rose Bengal Chlormaphenicol Agar – agar s dichloranem, chloramfenikolem a bengálskou červení
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
G+	Gram pozitivní
HCCA	α-kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
GTK	agar s glukózou, tryptonem, kvasničným extraktem
HDL	high density cholesterol – lipoprotein s vysokou hustotou
Kcal	kilokalorie
LDL	low density cholesterol – lipoprotein s nízkou hustotou
MALDI-TOF	hmotnostní spektrometrie s laserovou desorbci a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem
MALT	sladinový agar
MBC	minimální baktericidní koncentrace
McF	McFarlandova zákalová stupnice
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MK	mastné kyseliny
MRSA	met icilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MYP	Mannitol Yolk Polymyxine B agar – půda s mannitolem, žloutkem a polymyxinem
PM	Petriho miska/misky
ROS	reactive oxygen species – reaktivní formy kyslíku
S-B	Slanetz-Bartley agar
VP test	Voges-Proskauerův test
TTC	trifenyltetrazolium chlorid
USA	Spojené státy americké
WPC	Whey Protein Concentrate – Syrovátkový proteinový koncentrát
WPI	Whey Protein Isolate – Syrovátkový proteinový izolát

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Obecný model vyváženého jídelníčku.....	11
Obrázek 2: 20 základních AMK.....	13
Obrázek 3: Chemická struktura vybraných polyfenolů.....	25
Obrázek 4: Chemická struktura vybraných tokoferolů	26
Obrázek 5: Chemická struktura vybraných karotenoidů.....	26
Obrázek 6: Chemická struktura kyseliny askorbové.....	27
Obrázek 7: Vzhled bakterie <i>B. cereus</i> na půdách a) KA, b) MYP, 30 °C, 24 hodin (foto autor)	35
Obrázek 8: Diskový difúzní test.....	36
Obrázek 9: Schéma přípravy extraktů.....	49
Obrázek 10: Vzorčky proteinových přesnídávek (foto autor).....	87
Obrázek 11: G+ tyčinky izolované z proteinových přesnídávek na půdách MYP a KA z testování provedeném po 1 měsíci, 30 °C, 24 hodin (foto autor)	90
Obrázek 12: Plíseň <i>Penicillium</i> , půda DRBC, 25 °C. 3-5 dní, vzorek 1-A, série č. 1 (foto autor)	90
Obrázek 13: Mikroskopický preparát plísně <i>Penicillium</i> , vzorek 1-A, série č. 1, zvětšeno 400x (foto autor)	91
Obrázek 14: Mikroskopický preparát barvení dle Grama bakterie <i>Bacillus cereus</i> , zvětšeno 1000x (foto autor)	91
Obrázek 15: Testování antimikrobiální aktivity difúzní diskovou metodou, půda M-H, 30 °C (foto autor)	92
Rovnice 1: Vztah pro výpočet CFU/g ve vzorcích potravin	46
Rovnice 2: Vztah pro výpočet nízkých počtů ve vzorcích potravin	46

Tabulka 1: Zastoupení jednotlivých složek potravy u normální a vysokoproteinové diety (Antonio <i>et al.</i> , 2014).....	13
Tabulka 2: Varianty proteinových předsnídávek	38
Tabulka 3: Suroviny použité k výrobě proteinových předsnídávek.....	45
Tabulka 4: Časový rozestup testování vzorků proteinových předsnídávek	45
Tabulka 5: Extrakty použité ke sledování antimikrobiální aktivity	49
Tabulka 6: Celkové počty mikroorganismů v proteinových předsnídávkách.....	54
Tabulka 7: Celkové počty <i>Bacillus cereus</i> ve vzorcích proteinových předsnídávek v časovém sledu	56
Tabulka 8: Vyhodnocení vybraných bakterií metodou MALDI-TOF	57
Tabulka 9: Vyhodnocení difúzní diskové metody u vybraných rostlinných extraktů	60
Tabulka 10: Vyhodnocení difúzní diskové metody u vybraných rostlinných extraktů	61
Tabulka 11: Vyhodnocení difúzní diskové metody u vybraných rostlinných extraktů	61
Tabulka 12: Počty <i>Bacillus cereus</i> CFU/ml při jednotlivých koncentracích rostlinných extraktů	63
Tabulka 13: Aktivita vody u proteinových předsnídávek	65
Tabulka 14: Celkové množství enterokoků v CFU/g ve vzorcích proteinových předsnídávek v časovém sledu	87
Tabulka 15: Celkové množství kvasinek v CFU/g ve vzorcích proteinových předsnídávek v časovém sledu	88
Tabulka 16: Celkové množství plísní v CFU/g ve vzorcích proteinových předsnídávek v časovém sledu	89
Tabulka 17: Počty <i>Bacillus cereus</i> CFU/g v reálných vzorcích proteinových předsnídávek ..	92

ÚVOD

V poslední době je trendem sledovat složení jídelníčku. Čím dál častěji jsou do něj zařazovány potraviny, které jsou nejen nutričně zajímavé, ale mají příznivý vliv na naše zdraví a kondici. V literatuře či na internetu lze nalézt několik druhů diet, které slibují váhový úbytek, svalový přírůstek či více energie. Mezi takové patří i diety s vysokým obsahem proteinů. Dříve diety zahrnovaly v jídelníčku velká množství vajec nebo masa, což přinášelo riziko například v obsažených tucích, které dlouhodobým užíváním mohly způsobit závažné zdravotní problémy. Na trhu jsou nyní k dostání druhy potravin, které jsou jak s vysokým obsahem proteinů, tak i vitamínů, minerálů a dalších cenných látek, jako fenolické látky, které působí proti oxidačnímu stresu. Většina těchto surovin je bezlepková, a proto je vhodná pro alergiky. Použití těchto ingrediencí však nese řadu rizik. Potravinová strava z těchto surovin často neprochází výraznou tepelnou úpravou, aby se zachovala biologická hodnota bílkovin, a proto je velké riziko přítomnosti mikrobů. Dalšími kritickými body jsou pak transport a skladování.

Protože všechny tyto suroviny či hotové produkty lze zařadit do zdravé výživy, je nepřijatelné, aby pro lepší udržitelnost byly použity chemické látky, které zaručí delší trvanlivost. Proto jsou výrobci nuceni použít takové látky, které jsou v souladu se zdravým životním stylem a zvýší kvalitu a údržnost výrobků. Přírodní extrakty jsou ideální volbou, protože řada rostlin obsahuje spoustu cenných a zdraví prospěšných látek, které mimo jiné vykazují antimikrobiální aktivitu.

Cílem této diplomové práce bylo monitorovat mikrobiální čistotu 7 druhů proteinových přesnídávek, které se lišily jak složením, tak technologickou úpravou. Součástí experimentu byla izolace převládající kontaminující bakterie, kterou byla bakterie *Bacillus cereus*. Tato bakterie vyizolovaná z proteinových přesnídávek byla použita ke sledování antimikrobiální aktivity u vybraných rostlinných extraktů.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Alternativní strava

Optimální složení jídelníčku a zastoupení jednotlivých složek stravy se může u různých diet lišit. Obecně by měl jídelníček obsahovat z největší části sacharidy, které jsou nejrychlejším zdrojem energie, dále tuky a jako poslední bílkoviny (Obrázek 1). Tyto poměry jsou však orientační, a nejdůležitějším faktorem je především to, z jaké potravin jsou jednotlivé složky získány. Z největší části by měly být zastoupeny obiloviny, zelenina a ovoce. V menším množství pak ořechy, luštěniny, maso, vejce a mléčné výrobky (Kunová, 2005; Skolnik a Chernus, 2011).



Obrázek 1: Obecný model vyváženého jídelníčku

(převzato z <http://www.ferpotravina.cz/clanky/jak-by-mel-vypadat-vyvazeny-jidelnicek>, staženo dne 1. 5. 2018)

V posledních letech je trendem dodržování určitých typů diet nebo zařazování nových potravin do stravy, a to jak ze zdravotních důvodů, tak z morálního přesvědčení. Mezi takové výživové směry patří vegetariánství a veganství. Tedy diety, které neobsahují žádné maso, či potraviny živočišného původu. Alternativní strava může pro lidský organismus přinést několik pozitiv, jako snížení váhy či množství cholesterolu v krvi. Důležitý je i psychologický efekt, protože pokud člověk konzumuje zdravé potraviny, sám se cítí zdravě a spokojeně (Evers *et al.*, 2013).

Potravinové diety lze rozdělit z několika aspektů, ať je to z hlediska obsahu jedné nebo více složek ve stravě, či způsobem úpravy daného pokrmu. Příkladem je tzv. raw, neboli syrová strava, při které se potravina upravuje maximálně při teplotě 45 °C, což je hraniční teplota, při které jsou zachovány všechny cenné látky a enzymy. Někteří lidé jsou nuceni dodržovat určité druhy diet ze zdravotních důvodů. Příkladem je strava bezlepková, či bezlaktózová (Kunová, 2005).

Alternativní způsoby stravy mají však i svá rizika. Lidé neznají správných výživových pravidel, si často sestavují svůj jídelníček sami, a přestože jsou v něm zastoupeny suroviny, které jsou na první pohled „zdravé“, může být ve stravě významný deficit cenných živin. Tělo může postrádat železo, vápník nebo jód. Dlouhodobým praktikováním takových diet pak mohou nastat zdravotní problémy. Některé druhy diet jsou například pro děti vysloveně nevhodné, jako již zmiňovaná „raw“ strava (Cundiff a Harris, 2006).

1.1.1 Dieta s vysokým příjmem proteinů

Tento typ diety je oblíbený zejména u sportovců. Během posledních let se však tento typ stravy stal populárním i při snižování tělesné hmotnosti. Existuje několik typů vysokoproteinových diet, například dle Atkinsona, přičemž základem této stravy je užívání nízkého obsahu sacharidů a vysokého množství bílkovin a tuků. Několik studií však prokázalo, že větší ztrátu hmotnosti, a to během 3 až 6 měsíců, může podpořit dieta obsahující naopak nízký obsah tuků a vysoké množství bílkovin a sacharidů. Výhodou diety dle Atkinsona je ten, že vysoký obsah proteinů navazuje pocit sytosti a snižuje chuť k jídlu. V souvislosti s dietou obsahující vysoké množství proteinů je však podezření, že tento typ stravy zvyšuje riziko onemocnění srdce, ledvin, kostí a jater (Johnston *et al.*, 2004; Araya *et al.*, 2000).

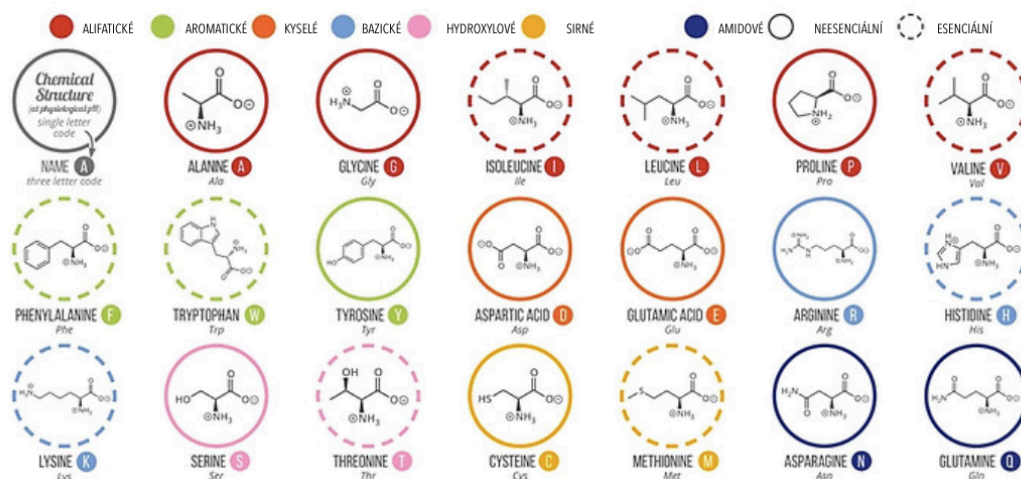
V závislosti na složení jednotlivých jídel u vysokoproteinové diety, je doporučován celkový denní příjem v rozmezí od 2000 do 2800 kcal (kilokalorií) za den. Zvýšený příjem bílkovin podporuje fyzickou aktivitu, díky které dochází ke snižování váhy a ztrátě tuku v těle (Kim, J., *et al.*, 2016). Některé diety s velice vysokým příjmem proteinů (až 4,4 g/kg za den) jsou často praktikovány u sportovců se zvýšeným výdejem energie. Pro udržení svalové hmoty u sportovců je optimální příjem 1,3 gramů bílkovin na 1 kg váhy (Rafii *et al.*, 2015). V tabulce 1 jsou uvedeny hodnoty jednotlivých složek potravy včetně celkového denního příjmu, a to jak u normální, tak i u vysokoproteinové diety. Celkový denní příjem, zastoupení sacharidů i tuků jsou u obou diet podobné, liší se pouze zastoupením právě proteinů (Antonio *et al.*, 2014).

Tabulka 1: Zastoupení jednotlivých složek potravy u normální a vysokoproteinové diety (Antonio *et al.*, 2014)

g/kg/den	Normální dieta	Vysokoproteinová dieta
Kcal	26,2 - 29,2	28,9 - 39,9
Sacharidy	2,9 - 3,0	2,8 - 3,2
Proteiny	1,8 - 1,9	2,3 - 4,4
Tuky	77 - 79	79 - 87

1.2 Proteiny

Proteiny, někdy zvané bílkoviny, jsou látky obsahující dusík a jsou formovány z aminokyselin (AMK). Slouží jako hlavní strukturální složka svalů a dalších tkání v lidském těle. Kromě toho ovlivňují produkci hormonů, enzymů, hemoglobinu a mohou být i zdrojem energie, přestože primárně tělo využívá energii ze sacharidů a tuků (Whitford, 2005). Proteiny, které jsou pro lidský organismus potřebné, je nutno metabolizovat na jejich nejjednodušší formu, tedy aminokyseliny (Obrázek 2). Lidské tělo pro svůj správný růst a metabolismus potřebuje 20 AMK, z nichž 12 (u dětí 11), je neesenciálních, a mohou být tělem samy syntetizovány. Zbývající AMK nelze syntetizovat, a proto musí být přijmuty ze stravy (Sharma a Shan, 2010).



Obrázek 2: 20 základních AMK

(převzato z <https://www.redbubble.com/people/compoundchem/works/14423088-20-amino-acids-physiological-structure-version>, upraveno, staženo dne 1. 5. 2018)

1.3 Zdroje proteinů

Zdroje proteinů jsou velice rozmanité. Patří mezi ně potraviny živočišného i rostlinného původu a doplňky stravy (Jay a Falvo, 2004). Mimo to, je důležité určit takzvanou účinnost bílkoviny, která určuje její kvalitu a stravitelnost. Kvalita udává dostupnost a zastoupení jednotlivých AMK a stravitelnost uvažuje nad nejlepším využitím proteinů pro lidské tělo. Typicky se bílkoviny živočišného původu považují za tzv. kompletní bílkoviny, protože obsahují všechny esenciální AMK. Naopak rostlinné bílkoviny jsou neúplné, protože postrádají jednu či dvě esenciální AMK. To může být problémem u alternativních způsobů stravy, například u vegetariánů, kteří by měli konzumovat několik druhů zeleniny, ovoce a luštěnin, aby si zajistili příjem všech nezbytných AMK (Sharma a Shan, 2010).

1.3.1 Proteiny živočišného původu

Právě proteiny živočišného původu jsou z hlediska kvality potravin hodnoceny nejlépe, a to díky kompletnímu zastoupení jednotlivých AMK. Patří mezi ně vejce, mléko, maso a ryby. Přestože bílkoviny živočišného původu jsou spojovány s vysokým příjmem nasycených tuků a cholesterolu, existuje řada studií, jež prokazují jejich pozitivní přínos pro lidské zdraví (Lim *et al.*, 2008; Ustunol, 2014; Nadathur *et al.*, 2017).

Příjem živočišných proteinů byl hodnocen u těhotných žen v pozdním stádiu těhotenství, přičemž se ukázalo, že konzumace bílkovin má pozitivní vliv na optimální porodní váhu u novorozenců. Naopak nízká konzumace proteinů získaných z masné a mléčné stravy vedla k nízké hmotnosti u narozených dětí (Ustunol, 2014). Na druhou stranu bylo zjištěno několik zdravotních rizik spojených s konzumací proteinů pocházejících z živočišných zdrojů. A to především kardiovaskulární onemocnění způsobené zvýšenou konzumací nasycených tuků a cholesterolu, jež jsou součástí tohoto typu bílkovin nebo onemocnění pohybového aparátu (Sharma a Shan, 2010).

1.3.2 Proteiny rostlinného původu

Rostlinné proteiny jsou vysokým zdrojem AMK, avšak nejsou tzv. kompletním zdrojem bílkovin, a proto je nutné kombinovat několik typů potravin, aby lidské tělo přijmulo všechny esenciální AMK, které si nedokáže vytvořit samo. Kromě AMK obsahují rostlinné proteiny vlákninu a fytochemikálie, tedy biologicky aktivní látky, jako karotenoidy nebo kyselinu linolenovou. Výhodou oproti živočišným proteinům, je u rostlinných proteinů nízký obsah nasycených tuků a cholesterolu. Mezi hlavní zdroje rostlinných proteinů patří luštěniny, ořechy a sója (Sharma a Shan, 2010).

1.4 Syrovátka

Syrovátka je bílá až nažloutlá tekutina, která se získává při srážení mléka. Syrovátka je jednou ze dvou hlavních složek kravského mléka, přičemž druhou složkou je kasein. Poměr syrovátky a kaseinu je 1:4. Všechny složky syrovátkové bílkoviny obsahují vysoká množství esenciálních a rozvětvených AMK, vitamínů a minerálů, přestože dříve byla tato složka kravského mléka považována za odpad. Největší využití má syrovátka ve zdravé a sportovní výživě, je součástí pečených výrobků, emulgátorů, dětských výživ a používá se při léčebných procedurách. Mezi důležitou složku v syrovátce je AMK cystein, která zvyšuje hladinu glutathionu, jež má silné antioxidační účinky, a tím napomáhá organismu bojovat s nepříznivými vlivy z okolí a chránit před oxidačním stresem. Také obsahuje vysokou koncentraci AMK s rozvětveným řetězcem (BCAA - branched chain amino acids), které hrají velkou roli v regeneraci tkáně, a proto jsou oblíbeným sportovním doplňkem. Způsobů, jak se syrovátka získává, je několik a liší se konečným zastoupením jednotlivých složek ve výsledných produktech (Counous, 2000; MacLeann *et al.*; 1994; Ha a Zemel, 2003).

Základním způsobem je filtrace syrovátky, při které je odstraněna velká část laktózy a tuků. Výsledný produkt je následně sušen při vysokých teplotách, což způsobí denaturaci bílkovin a tím vznikne méně kvalitní produkt s nižší biologickou využitelností. Dalším způsobem přípravy syrovátkových proteinů je iontová výměna, kdy se jednotlivé složky syrovátky dělí dle jejich elektrických nábojů a suší, ale jedná se opět o denaturovaný produkt. Mikrofiltrace, neboli Cross-Flow Microfiltration, je metoda překřížené filtrace, která se provádí za nízkých teplot, tlaku a normálním pH. Při této metodě jsou použity filtry o různých velikostech pórů a dochází tak k několika stupňům filtrace (mikrofiltrace, ultrafiltrace). Touto metodou se získává méně denaturovaný a dobře biologicky využitelný protein s vysokým obsahem vápníku. Nevýhodou je pak finanční náročnost této techniky. Nejvyšším stupněm při zpracování syrovátky je pak hydrolýza, a to díky enzymatickému štěpení peptidových vazeb, díky kterým je výsledný produkt natrávený a rozdělený na jednotlivé a lépe vstřebatelné řetězce AMK. Právě díky tomu je proces trávení a zařazení do metabolismu zrychlený, a tak dochází k podpoře anabolických procesů v metabolismu a zkrácení regenerace po fyzickém výkonu. Opět je nevýhodou finanční náročnost této metody (Onwulata a Huth, 2008; Foegeding *et al.*, 2002).

1.4.1 Druhy syrovátkových proteinů

Při zpracování syrovátky vznikají rozdílné produkty, které se liší nejen technologií přípravy, ale i zastoupením jednotlivých složek jako bílkovin a minerálů. Tyto produkty jsou nazývány syrovátkový proteinový koncentrát (WPC), syrovátkový proteinový izolát (WPI) a hydrolyzovaný syrovátkový protein (Jay a Falvo, 2004; De Wit, 1998)

1.4.1.1 Syrovátkový proteinový koncentrát (WPC - Whey Protein Concentrate)

Syrovátkový proteinový koncentrát je produkt vznikající při zpracování syrovátky, obsahuje 20 – 89 % proteinů a obsahuje vysoké množství biologicky aktivních látek. Při výrobě WPC je ze syrovátky odstraněna voda, laktóza a některé minerály, a tak je vhodným doplňkem pro sportovce (Sharma a Shan, 2010; Onwulata a Huth, 2008).

1.4.1.2 Syrovátkový proteinový izolát (WPI – Whey Protein Isolate)

Dalším produkt při zpracování syrovátky je nazýván syrovátkový proteinový izolát a patří k nejdostupnějšímu zdroji bílkovin (více než 90 %). Během zpracování dochází k odstranění významného množství tuku a laktózy, a proto je vhodný i pro jedince s intolerancí k laktóze (Geiser, 2003; Onwulata a Huth, 2008).

1.4.1.3 Hydrolyzovaný syrovátkový protein

Hydrolyzovaný protein vzniká rozštěpením dlouhých řetězců syrovátkového proteinu (koncentrátu nebo izolátu), díky čemuž je snadněji tělem absorbován, a je velice cenným a dostupným zdrojem bílkovin. Díky hydrolýze se snižuje biologická využitelnost, a proto je to jeden z nejdostupnějších zdrojů bílkovin. Je součástí dětské stravy a výživových doplňků (Peña-Ramos a Xiong, 2003).

1.5 Kasein

Kasein je hlavní složkou kravského mléka, obsahuje až 80 % bílkovin a je zodpovědný za jeho bílou barvu. Bílkoviny obsažené v mléce, a tedy i kaseinu, mají významný podíl pro udržení správného poměru živin a vitamínů v lidském těle. Stejně jako syrovátka, je kasein kompletním proteinem a obsahuje důležité minerály jako vápník a fosfor (Deutz *et al.*, 1998). Kromě složení je kasein atraktivní díky svým chemickým vlastnostem. Díky schopnosti kaseinu tvořit micely, jsou v žaludku uvolňovány AMK do krevního řečiště i několik hodin, čímž je zajištěno lepší využití dusíku (Boirie *et al.*, 1997).

1.6 Suroviny používané ve zdravé stravě

1.6.1 Ořechová másla

V rámci alternativní stravy jsou v oblibě používána ořechová másla, a to díky jejich složení. Obsahují totiž vysoké množství proteinů, nenasycených mastných kyselin (MK) a vápníku. Mezi nejznámější patří arašídové máslo, ale na trhu jsou k dostání i másla z mandlí, kešu nebo vlašských ořechů (Ros, 2010). Nevýhodou ořechových másel je možné riziko spojené s přítomností aflatoxinů a dalších cizorodých látek (Truckess *et al.*, 1994).

1.6.1.1 Arašídové máslo

Arašídové, jinak zvané burákové máslo, je oblíbenou potravinou již několik desítek let, a to především v USA (Spojené státy americké). Nyní se arašídové máslo objevuje v několika alternativních stravách, jako je „raw“ (syrová) strava nebo při dietách bohatých na proteiny (Blomhoff *et al.*, 2006). Přestože je arašídové máslo tvořeno téměř z poloviny tuky, obsahuje pro tělo cenné polynenasycené MK a žádné trans MK, které naopak mohou tělu škodit. Kromě tuků je arašídové máslo i významným zdrojem proteinů, minerálních látek, jako je draslík či mangan, ale je i bohatým zdrojem vitamínů. Nejvýznamnější je vitamín E, který je silným antioxidantem, a tak napomáhá lidskému organismu zbavovat se volných radikálů (Hathorn a Sanders, 2012).

1.6.1.2 Mandlové máslo

Tento druh másla je díky svému složení a vlastnostem čím dál častěji zařazován do jídelníčku. Obsahuje mononenasycené MK, vlákninu a vysoké množství AMK (Ros, 2010). Je bohatým zdrojem vitamínu E, riboflavinu (vitamín B₂), hořčíku, vápníku a manganu. Dále je silným antioxidantem. Mandlové máslo napomáhá udržet správnou hladinu glukózy v krvi, snižuje hladinu cholesterolu a má protizánětlivé účinky (Spiller *et al.*, 2003).

1.6.2 Oleje

1.6.2.1 Lněný olej

Lněný olej se získává lisováním semínek lnu setého za studena. Obsahuje vysoké množství MK, které podporují správnou činnost srdce a nervové soustavy (Okinyo-Owiti *et al.*, 2015). Snižuje množství LDL (lipoprotein s nízkou hustotou) cholesterolu v krvi a má protizánětlivé a antioxidační účinky díky obsahu fenolických látek. Vysoký obsah bílkovin a vlákniny napomáhají snižovat hladinu cukru v krvi a podporují správné zažívání (Goyal, *et al.*, 2014). Zajímavostí u lněného oleje je přítomnost fytoestrogenů, tedy rostlinných látek podobajících se ženským hormonům, které mají vliv na menstruační cyklus a mohou napomáhat při léčbě neplodnosti (Brooks *et al.*, 2004).

1.6.2.2 Chia olej

Tento olej, který je vhodnou alternativou živočišného oleje pro vegetariány, je bohatým zdrojem esenciálních MK a dalších vitamínů a minerálů. Vyrábí se lisováním chia semínek, které v kontaktu s tekutinou bobtnají, a tak ve střevech působí jako prebiotikum. Mimo to obsahuje vysoké množství vlákniny, která podporuje správné zažívání a navazuje rychlý pocit nasycení, proto je vhodný při dietách. Obsahuje linolovou a linolenovou kyselinu, vitamíny A, B, E, D a minerály jako železo, síra, hořčík a je bohatým zdrojem antioxidantů (Ayerza Jr. a Coates, 2007). Právě díky antioxidantům je vhodným kosmetickým doplňkem. Chia olej je významným rostlinným zdrojem bílkovin, a je doplňkem stravy pro sportovce. Díky schopnosti vázat na sebe vodu napomáhá lepšímu vstřebávání živin a může pomoci dehydratovanému organismu (Marineli *et al.*, 2014).

1.6.2.3 Kokosový olej

Tento druh oleje je jeden z nejpoužívanějších rostlinných olejů po celém světě jak v potravinářství, tak i v kosmetickém průmyslu. Výhodou je jeho složení, díky kterému je kokosový olej stálý na vzduchu, nežlukne a je vhodný i pro tepelnou úpravu. Kyselina laurová obsažená v oleji upravuje hladinu cholesterolu, působí preventivně proti vysokému tlaku a má antibakteriální a antimikrobiální účinky (Nevin a Rajamohan, 2004). Kokosový olej má blahodárné účinky na pleť a při použití v dutině ústní zabraňuje tvorbě zubního kazu. Díky obsahu MK se středně dlouhým řetězcem snižuje pocit hladu a bylo prokázáno, že dlouhodobou konzumací kokosového oleje může dojít ke snížení váhy (McClernon *et al.*, 2007).

1.6.3 Mouky

Pšeničná mouka je nejvíce pěstovaná potravinářská obilnina na celém světě, avšak lepek může způsobovat řadu zdravotních problémů (Åkerberg a Zacchi, 2000). Čím dál více obyvatel trpí intolerancí k lepku či dokonce alergií na tuto bílkovinnou složku v mouce. A proto lze na trhu nalézt mouky z jiných obilovin, které mají jak mnohem pestřejší složení, tak dokonce příznivé účinky na lidské zdraví (Pourafshar *et al.*, 2015).

1.6.3.1 Rýžová mouka

Tento druh mouky, který je nejvíce používán v Asii, Japonsku a Indii, je pouze rozemletá rýže na jemný prášek, kterým lze nahradit klasickou mouku. Dle druhu použité rýže a technologie, jakou je rýžová mouka připravována, rozlišujeme několik druhů (Kim, 2013). Na trhu lze nalézt rýžovou mouku z bílé, či hnědé rýže. Hnědá rýže je bohatá na vlákninu a obsahuje vyšší množství vitamínů a minerálů oproti rýži bílé a obsahuje fenolické sloučeniny a flavonoidy (Deng *et al.*, 2013). Kromě toho bylo provedeno několik studií, které potvrzují pozitivní účinky hnědé rýže na lidské zdraví. U mužů a žen středního věku, byla bílá rýže nahrazena hnědou, přičemž u sledované skupiny došlo ke snížení vyššího tlaku (Behall, *et al.*, 2006). Dále bylo týmem vědců zjištěno, že hnědá rýže může snížit riziko diabetu 2. typu (Panlasigui a Thompson, 2009). Rýžová mouka je běžně používána jako zahušťovadlo, do omáček, polévek a při pečení, avšak čím dál častěji nahrazuje mouku pšeničnou, protože narozdíl od ní neobsahuje lepek. Mimo to chrání játra a je vysokým zdrojem vlákniny (Baek a Suyong, 2014).

1.6.3.2 Pohanková mouka

Pohanka původně pochází z Asie, ale díky nepřítomnosti lepku se stala skvělou alternativou pšeničné mouky, a tak je rozšířená po celém světě. Obsahuje rutin, tedy glykosid, který snižuje hladinu cholesterolu v krvi a zvyšuje pružnost cév (Kreft *et al.*, 2006). V pohankové mouce jsou přítomny další polyfenoly, ale také vitamíny, jako thiamin (vitamín B₁), riboflavin (vitamín B₂) a vitamíny E a C. Z hlediska nutričního složení, je pohanka zajímavá díky přítomnosti velkého množství AMK a polynenasycených MK (Quettier-Deleu *et al.*, 2000). Kyseliny linolová a linolenová obsažené v pohance mohou snižovat hladinu cholesterolu a upravovat hladinu cukru v krvi (Su-Que *et al.*, 2013).

1.6.3.3 Kukuřičná mouka

Kukuřice je po pšenici a rýži nejčastěji pěstovanou obilovinou na světě. Kukuřičná mouka je základem mnoha pokrmů, ať už kukuřičných placek nebo polenty. Díky škrobu, který obsahuje, se hodí k zahušťování polévek a kukuřičnou strouhankou se často obaluje maso. Je bohatým zdrojem vitamínů A, B, E a minerálů. Mezi nejdůležitější prvky v kukuřičné mouce patří fosfor, hořčík, mangan, zinek, železo a měď (Gwirtz a Garcia-Casal, 2014). Obsažená vláknina napomáhá správnému zažívání a kukuřičná mouka vykazuje antioxidační účinky. Dále napomáhá vstřebávat cholesterol, a tím snižovat riziko srdečního onemocnění. Má příznivé účinky na pokožku, protože kukuřice je bohatým zdrojem β -karotenu (Burton a Ingold, 1984).

1.6.3.4 Čiroková mouka

Tento druh mouky je odolný vůči suchu, a proto je pěstován v nejrůznějších koutech světa. Stejně jako rýžová, i mouka z čiroku neobsahuje lepek, a proto je oblíbenou alternativou pšeničné mouky. Čiroková mouka se používá jako přísada do pekárenských výrobků, obilných kaší, ale i samostatně jako příloha. Její výhodou je opět výživová hodnota. Přestože také obsahuje vysoké množství bílkovin, oproti rýžové a kukuřičné mouce má vyšší obsah železa, karotenu, niacinu (vitamín B₃) a tryptofanu. Jedinou nevýhodou této mouky je nedostatečné množství lysinu, tedy esenciální AMK (Keregero a Mtebe, 1994). Tento nedostatek je řešen vývojem nových odrůd s vyšším obsahem lysinu a lepší výtěžností. Čirok napomáhá lidskému organismu zbavovat se oxidačního stresu. Je silným antioxidantem a má dokonce vyšší antioxidační kapacitu než ovoce (Lee *et al.*, 2011). Zajímavostí je, že tepelná úprava nesnižuje antioxidační vlastnosti této mouky, naopak ji zvyšuje. Dalším pozitivem čiroku jsou jeho protizánětlivé a antibakteriální účinky (Benson *et al.*, 2013). Má také schopnost snižovat hladinu cholesterolu v krvi a játrech a naopak zvyšuje hladinu „zdravého“ cholesterolu, tedy HDL (lipoprotein s vysokou hustotou). Čirok obsahuje vysoké množství polyfenolických látek a snižuje hladinu cukru v krvi (Kim, J., 2012; Benson *et al.*, 2013).

1.6.3.5 Jáhlová mouka

Jáhly se získávají loupáním prosa, a proto je tato mouka často nazývána prosná. Loupáním prosa vznikají asi milimetr velké žluté kuličky, které jsou všestranným doplňkem v kuchyni. Stejně jako předchozí mouky, je i jáhlová bezlepková. Je vhodná k přípravě slaných a sladkých druhů pečiva, či k zahuštění omáček a polévek. Jáhlová mouka obsahuje vysoké množství bílkovin, vlákniny, a je zásaditá, takže napomáhá proti pálení žáhy a zažívacím problémům. Proso působí jako prebiotikum, a tak vyživuje střevní mikroflóru (Kam *et al.*, 2016). Je bohatým zdrojem niacinu (vitamin B₃), hořčíku, železa a zinku (Devi *et al.*, 2014). Mimo jiné vykazuje silnou antioxidační kapacitu a obsahuje serotonin, tedy hormon ovlivňující náladu, napětí hladkého svalstva a spánek (Dykes a Rooney, 2006; Young, 2007).

1.6.4 Kolagen

Hovězí kolagen je často přidáván do proteinových doplňků stravy k podpoře svalového růstu. Získává se ze zbytků při zpracování v masném průmyslu (chrupavky, pojiva, odřezky kůže). V takovém stavu je v meziprojektu obsaženo vysoké množství tuku, a proto je chemickými procesy odstraněn, a tak výsledný produkt obsahuje až 97 % bílkovin (Wu *et al.*, 1981). Hovězí kolagen obsahuje vysoké množství AMK a mimo to má kolagen příznivé účinky na spánek a správné zažívání (Declan Troy *et al.*, 2006).

1.6.5 Inulin

Inulin, neboli rostlinná rozpustná vláknina, je často přidávána do doplňků zdravé výživy. Plní totiž funkci prebiotik, a tak vyživuje bakterie v tlustém střevě, kde je dále štěpen na MK a podporuje tak správné zažívání a vstřebávání živin (Meyer a Stasse-Wolthuis, 2009). Inulin se nejčastěji získává z kořene cikorky, ale i synteticky. Kromě doplňků stravy, lze inulin nalézt přirozeně v cibuli, česneku a chřestu (Niness, 1999).

1.7 Rostlinné extrakty

Byliny a koření byly člověkem používány již od pradávna. Ať už jako léčiva ve starém Egyptě a Číně, nebo jako konzervační látky v antickém Řecku a Římě. V dnešní době jsou byliny a koření využívány jako ochucovadla, konzervanty, ale i k medicínským účelům. V gastronomii jsou přidávány do pokrmů pro své široké použití (Charles, 2013). Mimo sensorických vlastností, které příjemně ovlivní chuť hotového pokrmu, jsou byliny a koření považovány za látky protizánětlivé, hypoglykemické a látky snižující hladinu lipidů. Z hlediska složení mají nízkou kalorickou hodnotu a jsou považovány za vysoký zdroj antioxidantů a látek s možnou biologickou aktivitou (Wong a Kitts, 2006).

Otrava z jídla je poměrně častým problémem, ať už v rozvojových nebo vyspělých zemích. Výrobci potravin se snaží neustále zdokonalovat své technologie, včetně konzervace, uchování a údržnosti samotných výrobků. Protože v dnešní době je trendem přidávat do potravin, nebo potravinových výrobků co nejméně syntetických konzervantů, je snahou vyvinout takovou ochranu, která bude pocházet z přírody. Proto jsou rostlinné extrakty skvělou volbou i díky jejich dostupnosti. Složky obsažené v rostlinách vykazují jak příznivé účinky na lidské zdraví, tak i antimikrobiální aktivitu, kterou lze využít při technologické úpravě potravin. Proto jsou léčivé rostliny podrobně studovány ve farmaceutickém průmyslu, a díky tomu jsou u velké části z nich popsány fyziologické, terapeutické a klinické pochody. Bylo popsáno přes 1000 sloučenin zodpovědných za antimikrobiální aktivitu, které byly izolovány z rostlin (Hashish a Amani, 2013).

V dnešní době přibývá onemocnění, které jsou způsobeny patogeny a sporotvornými organismy v potravě. Problémem však je, že čím dál více bakterií je vůči pomocným látkám v potravinách, jako jsou stabilizátory nebo konzervanty, rezistentní. Více než 90 % onemocnění způsobených z potravin je způsobeno bakteriemi *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* nebo *Bacillus cereus* (*B. cereus*). Tyto bakterie jsou přítomny především ve vejcích, produktech rostlinné výroby a vodě (Miladi *et al.*, 2016).

1.7.1 Antimikrobiální aktivita přírodních extraktů

Škála použitých rostlin, bylin či koření je velice rozmanitá. Antimikrobiální účinnost byla testována u extraktů z rostlin, které jsou běžně v kuchyni používány jako pepř, cibule, oregano, rozmarýn, majoránka nebo česnek. Ale i netypické, jako lékořice, cypřiš, levandule nebo ylang-ylang (Hammer *et al.*, 1999). Důležitým faktorem u sledování antimikrobiální aktivity je i to, jak byl daný extrakt připraven. Nejčastěji to pak bývají extrakty vodné, etanolové, metanolové nebo v acetonu (Shan *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2017).

Antimikrobiální aktivitu lze sledovat u kvasinek, plísní, ale i u patogenních bakterií, které mohou způsobit závažné zdravotní problémy. Nejčastějšími testovanými kvasinkami jsou *Candida albicans* nebo *Saccharomyces cerevisiae*, z plísní pak *Aspergillus niger* nebo *Penicillium chrysogenum*. Antimikrobiální aktivita přírodních extraktů je často sledována na bakteriích *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* či *B. cereus* (Liu *et al.*, 2017; Hashish a Amani, 2013; Shan *et al.*, 2007). Některé studie sledovaly antimikrobiální aktivitu u čistých extraktů a komerčně zakoupených kmenů bakterií. Některé práce se pak zabývaly i izolací bakterií z určitých typů potravin, jako ovocné šťávy nebo maso (Zhang *et al.*, 2009). Najdou se i zajímavé a praktické studie, při kterých byl sledován vliv extraktů na bakterie přítomné přirozeně v ústní dutině člověka (Palombo, 2011).

1.8 Antimikrobiální látky a antioxidanty obsažené v rostlinách

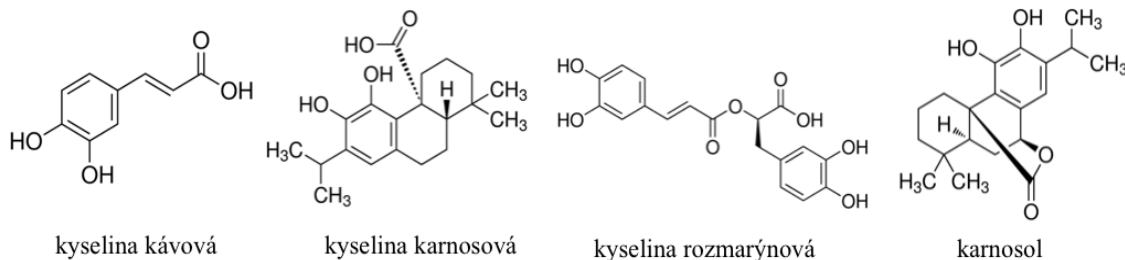
Mnoho chemických sloučenin, které jsou přítomny v potravinách přirozeně nebo jsou do potravin cíleně přidávány, mají vliv na růst či množení přítomných mikroorganismů. Mezi přirozené antimikrobiální látky patří například enzym lysozym, jež je přítomen ve vaječném bílku nebo organické kyseliny obsažené v citrusech. Chemické látky se však mohou tvořit v průběhu zpracování potravin, jako kyselina mléčná, která vzniká při fermentaci jogurtu. Některé sloučeniny jsou účinné na širokou škálu mikroorganismů, jiné jsou zas specifické a působí pouze na Gram pozitivní, či Gram negativní bakterie nebo spory. Antimikrobiální látky schopné mikroorganismy usmrtit, jsou nazývány mikrobicidní. Ty látky, které pouze zastavují růst mikroorganismů, jsou nazývány mikrobistatické (Ray, 2008).

Význam přirozených antioxidačních účinků u rostlin je využíván jak při samotné konzervaci potravin, tak k aplikování esenciálních antioxidantů *in vivo*. Rostliny obsahují vysoké koncentrace antioxidantů jako polyfenoly, karotenoidy, tokoferoly, glutationy, kyselinu askorbovou a enzymy s antioxidační aktivitou. Mimo rostlin byly antioxidanty nalezeny v mikroorganismech, houbách a ve tkáních živočichů (Charles, 2012).

1.8.1 Rostlinné fenoly

Fenolické sloučeniny neboli fenoly tvoří důležitou skupinu látek, které se nachází v rostlinách a zahrnují přes 8000 sloučenin různých struktur. Vyskytují se v ovoci, zelenině, oříškách, semínkách a květinách. Mnoho z nich je studováno pro svou potencionální antioxidační aktivitu a mají karcinogenní, antibakteriální, antivirové a protizánětlivé účinky (Charles, 2012). Několik experimentálních a klinických studií naznačuje, že pravidelné užívání přírodních produktů bohatých na polyfenoly, může zlepšit endoteliální dysfunkci, jež je zodpovědná za rozvoj aterosklerózy (Yamagata *et al.*, 2015). Tvoří doplňkový mechanismus antioxidační aktivity včetně vyhledávání volných radikálů (Xing, 2001). Zvýšená konzumace potravin bohatých na polyfenoly je spojována s lepší kognitivní funkcí u starších pacientů s vysokým rizikem kardiovaskulárního onemocnění (Fresco *et al.*, 2006).

Fenolické látky jsou obvykle děleny na fenolické kyseliny a jejich analogy, flavonoidy, taniny, stilbeny, kurkuminoidy, kumariny a další látky s chemickou strukturou, kde je přítomen fenolový kruh (Corella *et al.*, 2012). Významné fenolické sloučeniny jsou včetně struktury znázorněny v obrázku č. 3.



Obrázek 3: Chemická struktura vybraných polyfenolů

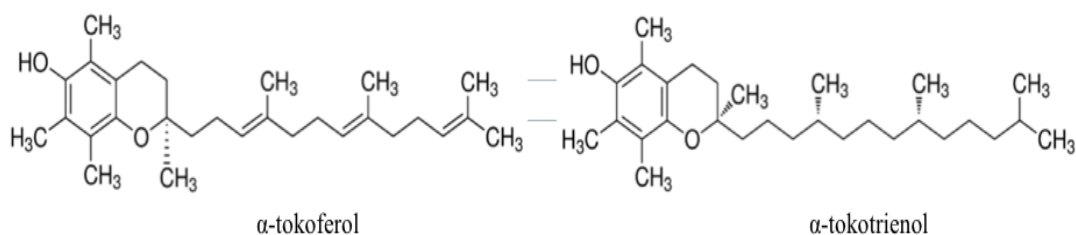
(převzato z

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c0625?lang=en®ion=CZ>; <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/carnosicacid33243365009711?lang=en®ion=CZ>; <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/rosmarinicacid360312028392511?lang=en®ion=CZ>; <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/carnosol33042595780211?lang=en®ion=CZ>, upraveno, staženo dne 1. 5. 2018)

1.8.2 Tokoferoly

Skupina tokoferolů a tokotrienolů (Obrázek 4) patří do skupiny vitamínů E, která byla popsána v roce 1922 Evansem a Bishopem. Jsou přítomny v oříškách, rostlinném oleji, zatímco tokotrienoly se nachází v obilných zrnech (Evans a Bishop, 1922). Tokoferoly jsou stabilní, v tucích rozpustné antioxidanty (Parker, 1989). Vitamín E, tokotrienoly a homology tokoferolu vykazují silnou antioxidační aktivitu a chrání tělo před kardiovaskulárními nemocemi, aterosklerózou a některými druhy rakovin. Do skupiny tokoferolů řadíme 4 strukturně odlišné látky známé jako α -tokoferol (vitamín E), β -tokoferol, δ -tokoferol a γ -tokoferol.

Vitamín E je pro tělo velice důležitý přírodní antioxidant, jež má pro lidský organismus prospěšné účinky. Kromě toho, že chrání tělo před oxidačním stresem a má protirakovinotvorné účinky, je α -tokoferol stabilizátor kožní bariéry, a proto je široce používán při výrobě kosmetických produktů (Sen *et al.*, 2006). Často jsou tokoferoly přidávány do syrového a vařeného masa, které si tak zachovává svoji barvu a vitamín E zabraňuje oxidaci tuků (Formanek *et al.*, 2001, Lavelle *et al.*, 1996). Tokoferoly přítomné v extraktech rostlin z čeledi zázvořníkovitých vykazují antimikrobiální aktivitu proti plísni *Aspergillus ochraceus* a bakteriím *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* a MRSA (meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*) (Habsah *et al.*, 2000).



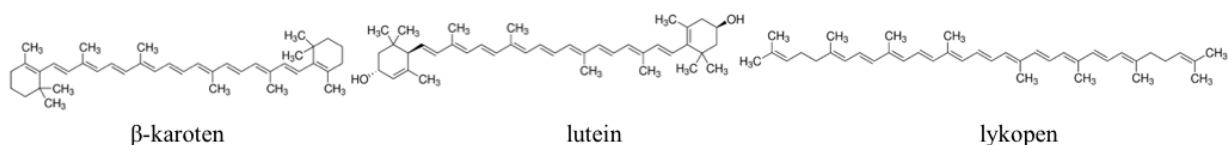
Obrázek 4: Chemická struktura vybraných tokoferolů

(převzato <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w530066?lang=en®ion=CZ;>
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/07205?lang=en®ion=CZ;>
 upraveno, staženo dne 1. 5. 2018)

1.8.3 Karotenoidy

Karotenoidy jsou v tuku rozpustné žluté až červené pigmenty, jež jsou syntetizovány v rostlinách, řasách, bakteriích a kvasinkách. V lidském těle jsou karotenoidy součástí antioxidačního obranného systému. Stejně tak v rostlinách mají díky své chemické struktuře antioxidační vlastnosti (Charles, 2012). Lidská plazma a tkáně obsahují okolo 20 druhů karotenoidů, zejména β -karoten, lykopen, lutein, β -kryptoxantin a α -karoten (Delgado-Vargas *et al.*, 2000; Stahl a Sies, 2003).

Za důležité zástupce karotenoidů (Obrázek 5) v lidské stravě jsou považovány β -karoten, lutein, lykopen, astaxantin, zeaxantin a β -kryptoxantin (Fraser, 2004). Karotenoidy pomáhají předcházet očním chorobám, kardiovaskulárním onemocněním a některým druhům rakoviny (Paiva a Russell, 1999). Extrakty z řasy *Chlorococcum huminola* mají vysoké antimikrobiální a antifungální účinky. Nejvíce účinný byl extrakt proti bakteriím *Escherichia coli* (*E. coli*), *Vibrio cholerae*, *Salmonella Typhimurium*, proti kvasince *Candida albicans* a plísni *Aspergillus niger* (Bhagavathy *et al.*, 2011).

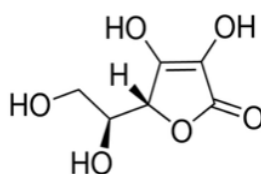


Obrázek 5: Chemická struktura vybraných karotenoidů

(převzato z <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/usp/1065480?lang=en®ion=CZ;>
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/lycopene5368750265811?lang=en®ion=CZ;>
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/lutein5688712740211?lang=en®ion=CZ;>
 upraveno, staženo dne 1. 5. 2018)

1.8.4 Kyselina askorbová

Kyselina askorbová je považována za jeden z antioxidantů (Du *et al.*, 2012). Její L forma (L-askorbová kyselina) je známa jako vitamín C (Obrázek 6). Hlavními zdroji této kyseliny jsou ovoce, především citrusy a zelenina. V lidské plazmě je přirozeně přítomen askorbát, který reaguje s ROS, tedy reaktivními formami kyslíku (Weber *et al.*, 1996). Extrakt z hroznového vína, který je bohatý na vitamín C, vykazuje antimikrobiální účinky proti Gram pozitivním (G+) bakteriím, jako *Bacillus subtilis*, *B. cereus* a *Staphylococcus aureus* (Jayaprakasha *et al.*, 2003).



kyselina askorbová

Obrázek 6: Chemická struktura kyseliny askorbové

(převzato z <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/ascorbicacid176125081711?lang=en®ion=CZ>

upraveno, staženo dne 1. 5. 2018)

1.9 Charakteristika vybraných druhů rostlin

1.9.1 Lékořice

Tato vytrvalá bylina pocházející z jihovýchodní Evropy, Středního východu a Indie, je nyní hojně pěstovaná v Evropě (Španělsko, Itálie, Francie), Středním východě (Írán, Írák, Sýrie, Turecko) a Asii (Čína, Indie). Dorůstá do výšky až 2 metrů, stonky jsou dále rozvětveny, na jejichž koncích vyrůstají malé, načervenalé plody. Existuje několik druhů lékořice, jako perská, ruská, španělská nebo čínská. Nejvíce se používají sušené kořeny nebo oddenky ve formě černých tvrdých tyčinek, ale na trhu je k dostání i samotný extrakt. Lékořice má specifické aroma, které je velice výrazné, se sladkým až hořkým nádechem a je podobné anýzu (Charles, 2013).

Mezi aktivní látky v lékořici patří flavonoidy, polysacharidy, asparagin, kumariny, steroly, taniny a glycyrrhizin (5-10 %). Dále cukry (30 %), AMK, aminy a esenciální olej. V potravinářském průmyslu je lékořice hojně využívána především do sladkostí, sirupů, zmrzlin, likérů a alkoholických nápojů (Charles, 2013).

Přípravky z lékořice zklidňují podrážděnou pokožku a působí jako slabé projímadlo. V čínské tradiční medicíně je používána k léčbě zažívacích problémů, malárie, tuberkulózy, abscesů, otrav z jídla, ale i rakoviny. Je součástí sirupů, tonik a pastilek proti kouření. Zajímavostí je, že lékořice je také považována za afrodiziakum a je součástí mnoha receptů z kámásútry pro zvýšení libida. Obsažené flavonoidy, jako likogrodin, vykazují protinádorové, antiparazitické a antioxidační účinky (Yang *et al.*, 2015). Retrokalchony izolované ze stonků se ukázaly být efektivní ochranou proti oxidačnímu stresu. Obsažené přírodní antioxidanty mimo jiné snižovaly výskyt aterosklerózy, infarktu a snižují hladinu cukru v krvi (Kataya *et al.*, 2011).

1.9.2 Šalvěj

Šalvěj je stálezelený polokeř pocházející ze Středozeří, který dorůstá do výšky až 1 metru a kvete v červnu a červenci. Má dlouhá dřevěná stébla s rovnými větvemi, které jsou pokryty jemnými chloupky a šedo zelenými listy. Větvě jsou zakončeny fialovými květy, jež jsou pokryty chloupky a chrání tak medové žlázy před nepovolaným hmyzem (Charles, 2013). Mezi používané části z této vytrvalé rostliny patří stříbrně šedivé listy a nať. Listy se používají čerstvé, suché, celé, nasekané či drcené. Esenciální olej obsažený v šalvěji se získává destilací částečně usušených listů s výtěžkem okolo 2-3 %, jež je čirý, bezbarvý až světle žlutý. Usušené části šalvěje jsou silně aromatické, sladce bylinné až kořeněné. Vůně a chuť jsou nasládlé, citrónové až hořké (Charles, 2013; Korbelář a Endris, 1981).

Aktivními látkami jsou esenciální olej, flavonoidy, karotenoidy a organické kyseliny. K hlavním složkám esenciálního oleje patří α -thujon (15-43 %), β -thujon (3-9 %), kafr (4 - 24 %), eukalyptol (10 %), kamfen, α -pinen, limonen, α -humulen, β -karyofylen a borneol. Mezi hlavní fenolické látky šalvěje řadíme kyselinu rozmarýnovou, kávovou, karnosovou nebo karnosol. Mezi další látky, které lze v šalvěji nalézt, patří vitamíny C, E, A nebo vápník a nasycené mastné kyseliny (Charles, 2013). Šalvěj se používá jako koření a dochucovadlo do pokrmů, především v Itálii a Řecku. Má antiseptické, antifungální účinky, udržuje v normě krevní tlak a obsahuje estrogen. Pomáhá bojovat proti průjmům a šalvějový čaj po jídle napomáhá trávení, snižuje pocení, zklidňuje kašel a mírní příznaky nachlazení (Adam *et al.*, 1998). Šalvěj mimo jiné obsahuje estrogen, má antiseptické a antifungální účinky. Karnosol, kyselina ursolová, oleanová, betulin a další látky obsažené v šalvěji vykazují antimikrobiální aktivitu proti vankomycin-rezistentním enterokokům, *Streptococcus pneumoniae* a MRSA (Horiuchi *et al.*, 2007). Také esenciální olej má vysokou antimikrobiální aktivitu, především k bakteriím *E. coli*, *Salmonella Typhi*, *Salmonella Enteritidis*, *Shigella sonnei*, ale i kvasinice *Candida albicans* (Bozin *et al.*, 2007).

1.9.3 Tymián

Tymián pochází z jižní a jihovýchodní Evropy a nyní je pěstován především ve Španělsku, Francii, Itálii, Řecku, Turecku, Maroku a Jižní Americe. Jedná se o trvalý, bylinný keř rostoucí do výšky okolo 45 cm s dřevnatým kořenem, rozvětvenými stonky přecházející do větviček. Oproti jiným bylinám je tato menší, stálezelená, až šedá s aromatickými listy, květy jsou světle fialové. Mezi používané části patří celá sušená rostlina, sušené listy, esenciální oleje a oleoresin. Esenciální olej je získáván pomocí destilace vodou a parou částečně vysušených, nadzemních částí rostlin. Aroma tymiánu je květinové, pronikavé až palčivě kořeněné. Chuť pak mátová, vonící po seně a zatuslině (Charles, 2013). Mezi aktivní látky v tymiánu patří již zmíněné esenciální oleje, taniny, triterpeny (kyselina ursulová), několik polymethoxyflavonů a polysacharidy. Esenciální olej obsahuje thymol (30-75 %), karvakrol, cymen, γ -terpinen a eukalyptol. V tymiánu je také obsaženo několik flavonoidů a fenolických kyseliny jako apigenin, luteolin, disosmetin, kaempferol, kvercetin, hesperidin, kyselina kávová a rozmarýnová (Bozin *et al.*, 2006).

Tymián je jedna z nejčastěji používaných bylin v italské a francouzské kuchyni, jež dává pokrmům typické aroma. (Charles, 2013). Kromě gastronomie je tymián používán při nachlazení, bolestech v krku, bronchitidách, infekcích horních dýchacích cest a zažívacích problémech. Tymián a tymiánový olej mají antibiotické, protizánětlivé, antispasmodické a antitusivní účinky. Extrakt z tymiánu a olej jsou vhodné při kožních problémech, ale mají i antimikrobiální, antifungální a antibakteriální účinky (Beddows a Charanjit Jagait, 2009). Esenciální olej působí antibakteriálně proti 13 druhům bakterií a 6 druhům plísní, dokonce i na multirezistentní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a *E. coli*. Bylo prokázáno, že více než samotný tymián, je silným antioxidantem právě esenciální olej. Přidáním extraktu z tymiánu do slunečnicového oleje bylo zpožděno žluknutí a při smažení okolo teplot 85-105 °C zůstal zachován α -tokoferol, tedy vitamín E. Týmlem vědců bylo také objeveno, že tymiánový olej vykazoval velice vysoké antibakteriální a antioxidační účinky při aplikaci na kuřecí maso, a tak by tento olej mohl být použit jako prevence před onemocněními, které mohou být způsobeny nevhodnou úpravou masa (Fратиanni *et al.*, 2010).

1.9.4 Galgán

Galgán je léčivá rostlina podobná zázvoru jak vzhledem, tak svou chutí, avšak mnohem aromatictější. Nejvíce je galgán populární v Asii, kde je součástí pokrmů, a to zeleninových směsí a polévek. Sušený může sloužit jako koření, ale i čerstvě nastrouhaný nebo nakrájený, stejně jako zázvor. Dorůstá do výšky až 2 metrů a na koncích stonků vyrůstají bílé vonné květy (Mayachiew a Devahastin, 2008). Plody jsou červené tobolky, které obsahují hořká zrna. Z rostliny se používá právě oddenek. Mezi fenolické látky obsažené v galgánu patří kyseliny galová, ferulová a askorbová (Nampoothiri *et al.*, 2014).

Kromě gastronomie je galgán znám pro své blahodárné účinky. Podporuje trávení, napomáhá při nevolnostech, bolestech žaludku a snižuje horečku. Při lokální aplikaci na kůži pomáhá bojovat s bakteriálními a plísňovými infekcemi. Mimo zažívacího traktu má galgán příznivý vliv na horní cesty dýchací a extrakt z kořene se používá jako ústní voda nebo kloktadlo při léčbě zánětu dásní. Dále bylo provedeno několik studií, které se zabývají možnými účinky galgánu proti rakovině, a to pankreatu, žaludku, střev, jater a prsu (Zeng *et al.*, 2015). Může také zvyšovat mužskou plodnost a má protizánětlivé účinky (Jung *et al.*, 2014; Banan Khojasteh a Javanmard Khameneh, 2016). Galgán také vykazuje antimikrobiální aktivitu, a to proti bakteriím rodu *Staphylococcus*, *Listeria*, *Salmonella*, *Clostridium* a *E. coli* (Weerakkody *et al.*, 2011).

1.9.5 Anýz

Anýz je jednoletá rostlina pocházející z Egypta, Řecka a západní Asie, jež dorůstá do výšky okolo půl metru. Země exportující anýz jsou Turecko, Libanon a Španělsko. Z anýzu se nejvíce používají vyzrálá suchá semena, esenciální olej a čerstvé listy. Anýz má výrazné mátové, kafrové až sladké aroma připomínající lékořici nebo fenykl, za které je často zaměňován. Mezi aktivní látky v anýzu patří anetol, který je i součástí fenyklu či badyánu a často je používán v potravinářství nebo přidáván do ústních vod. Další složkou anýzu je glykosid rutin, který je obsažen například i v pohance a upravuje hladinu cholesterolu v krvi (Charles, 2013). Anýz vykazuje silné antimikrobiální účinky proti bakterii *Staphylococcus aureus*, která způsobuje alimentární onemocnění, naopak proti bakteriím *E. coli* nebo *Pseudomonas aeruginosa* nebyly prokázány žádné inhibiční účinky (Gülçin *et al.*, 2003).

1.9.6 Chili

Z této rostliny, která je považována za afrodisiakum, jsou v gastronomii používány čerstvé plody, ale i uvnitř obsažená semínka. Pokrmům dává chilli typické kořeněné aroma a pikantní chuť. Právě pikantní chuť je díky přítomnosti kapsaicinu v chilli papričkách (Floyd, 2007). Kapsaicin se stal předmětem studie antimikrobiální aktivity proti několika bakteriím přítomných v potravě, a to proti patogenům *Staphylococcus aureus* a *E. coli*, ale inhiboval i růst bakterie *Bacillus subtilis* (A Omolo, 2014). Chili je silným antioxidantem, upravuje hladinu cukru v krvi a obsahuje vysoké množství vitamínu C, K a železa (Bhattacharya *et al.*, 2010).

1.9.7 Rakytník

Tento až dva metry trnitý keř kvete v dubnu až v květnu. Má dlouhé podzemní výhonky a větve, které jsou v mládí šupinaté, na kterých jsou střídavě umístěny řapíkaté a krátce kopinaté listy. Květy jsou směstnané do krátkých jehněd, pestíkové tvoří krátké, chudé hrozny. Plody jsou žluté a hnědě tečkované (Korbelář a Endris, 1981). Rakytník se vyskytuje především v jihoevropských zemích, u nás jako ozdobný keř a nyní je hojně pěstován pro svou širokou škálu vitamínů A, C, E, K a minerálů jako hořčík, železo a fosfor. Rakytník napomáhá organismu bojovat proti oxidačnímu stresu, ochraňuje játra před cirhózou a posiluje imunitní systém (Gao, 2003; Ganju *et al.*, 2005). Extrakt z rakytníku vykazuje antimikrobiální účinky, a to k bakteriím *E.coli*, *Salmonella Typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Streptococcus pneumoniae* a *Staphylococcus aureus* (Yogendra Kumar *et al.*, 2013).

1.9.8 Skořice

Skořice pochází původem ze Srí Lanky a Indie, ale dnes je hojně pěstována i v Africe a Jižní Americe. Jedná se o tropický, středně velký stálezelený strom, přičemž nejvíce aromatické jsou listy a kůra. Právě střední část kůry se používá jako koření, které má sladké, dřevité až kořeněné aroma. Chuť je velice pronikavá a mírně pikantní. Hlavní složkou esenciálního oleje je cinnamaldehyd (až 80 %), který dává skořici typické aroma (Charles, 2013). Kromě potravinářství, je skořice používána ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Působí proti akné a má příznivý vliv na zažívání. Vykazuje také antibakteriální účinky, a to proti bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis* nebo *E. coli* (Nabavi *et al.*, 2015).

1.9.9 Zázvor

Zázvor, pocházející pravděpodobně z jihovýchodní Indie, je listnatá, trvalá bylina dorůstající do výšky jednoho metru. Zázvor se využívá nejčastěji ve formě oddenků, jako esenciální olej a oleoresin. Vůně i aroma jsou velice výrazné, čerstvé, sladké a štiplavé. Čerstvý zázvor je velice kořeněný, vonící po citrónu (Charles, 2013). Hlavní složky v esenciálním oleji tvoří zingiberen (40 %) a kurkumen (20 %). Čerstvá a pronikavá chuť je dána díky netěkavým látkám, jako gingerol a paradol, kterému jsou připisovány příznivé účinky na lidské zdraví (Charles, 2013; Kundu *et al.*, 2009). Čerstvě nadrcený zázvor je hojně používán především při výrobě perníčků, sušenek, nakládané zelenině a je součástí kari koření. Zázvor je široce používán při vaření, zejména v asijské a orientální kuchyni k dochucení potravin (Charles, 2013).

Zázvor je antibakteriální, antifungální a působí proti parazitům. Je součástí sirupů proti trávicím a žaludečním potížím, způsobené cestovatelskými nemocemi (Iwami *et al.*, 2011). Je také hypoglykemický, snižuje hladinu cholesterolu v krvi, protizánětlivý a příznivě ovlivňuje imunitu. Stimuluje peristaltiku, sekreci slin a žaludečních šťáv. Sloučeniny gingerol, shogaol, paradol a zingeron, jsou studovány díky své antioxidační, protizánětlivé a antiemetické aktivitě. Gingerol také vykazuje antimikrobiální aktivitu proti *Bacillus subtilis* a *E. coli* (Ficker *et al.*, 2011). Bakterie a plísně je schopný inhibovat i esenciální olej přítomný v zázvoru. Několik studií také prokázalo, že esenciální olej ze zázvoru působí proti volným radikálům, a snižuje růst tumorů. Zázvor obsahuje více než 12 důležitých sloučenin, díky nimž je až 40x účinnější antioxidant, než vitamín E (Singh *et al.*, 2008; Masuda *et al.*, 2004).

1.9.10 Zelená káva

Zelenou kávou jsou nazývána nepražená kávová zrna z rostliny *Coffea Arabica*. Z pražených kávových zrn se připravuje řada lahodných nápojů, ale právě pražením káva ztrácí většinu svých cenných látek (Daglia *et al.*, 2000). Zelená káva obsahuje vysoké množství chlorogenové kyseliny, která je velice silným antioxidantem. Upravuje hladinu cukru v krvi a snižuje krevní tlak (Priftis *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2014). Zelená káva má také antimikrobiální účinky, a to proti Gram pozitivním bakteriím jako *Bacillus cereus* nebo *Clostridium sporogenes* (Suárez-Quiroz *et al.*, 2013).

1.10 Rod *Bacillus*

Rod *Bacillus* zahrnuje velice rozsáhlou skupinu aerobních či fakultativně anaerobních Gram pozitivních tyčinek, které za přítomnosti kyslíku tvoří jednu endosporu (Votava, 2010). Spory bývají častými kontaminanty potravin a klinického materiálu. Jsou rezistentní k chemickým dezinfekčním látkám a k teple, UV záření, avšak autoklávování je při 120 °C ničí během 15 minut (Peutherer *et al.*, 1999).

Bakterie rodu *Bacillus* jsou enzymově bohatě vybaveny a rozkládají nejrůznější organické sloučeniny. Obsahují amylolytické enzymy (amylasy), tedy enzymy štěpící škrob, či pektolytické enzymy, které štěpí rostlinné pektiny. Nejvíce se však projevují proteolytickými enzymy, které se podílejí při aerobním a anaerobním rozkladu bílkovin. Mezi nejznámější druhy patří *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* či *Bacillus anthracis* (Votava, 2010; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

Pro přesnou identifikaci bacilů lze použít metodu hmotnostní spektrometrie MALDI -TOF, při které je na krystaly matrice se vzorkem aplikováno laserové zařízení, jež způsobí desorbci molekul. Po vypočítání poměru m/z a porovnání s knihovnou je vzorek identifikován. Mezi používané matrice patří např. kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (HCCA). Metoda patří k nejpřesnějším, a proto je tento přístroj v dnešní době součástí špičkových laboratoří i přesto, že jeho pořizovací cena činí okolo 7 milionů (Croxatto *et al.*, 2012).

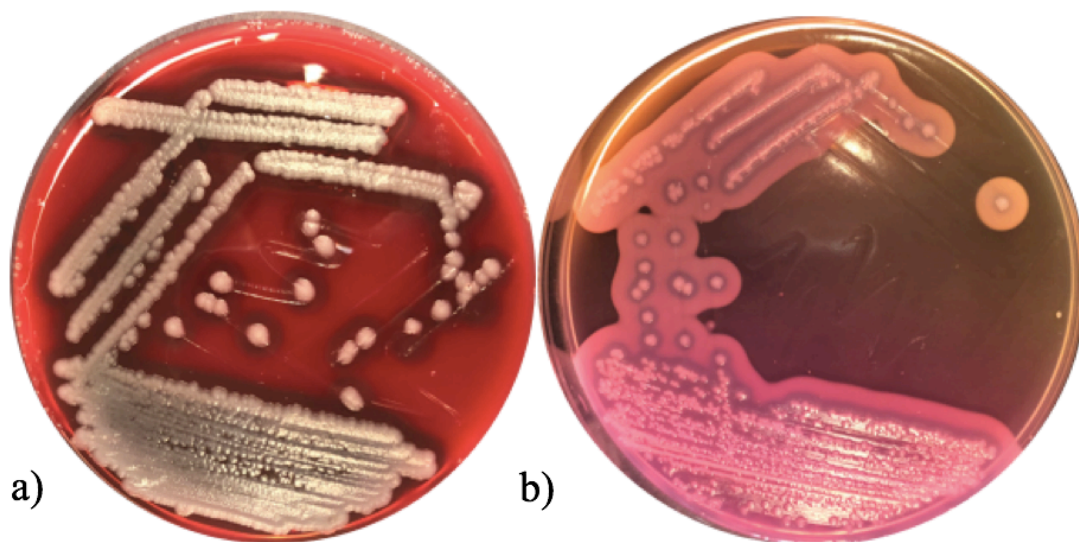
1.10.1 *Bacillus cereus*

Mezi nejznámější zástupce rodu *Bacillus* patří bakterie *Bacillus cereus*, která oproti jiným druhům z rodu *Bacillus* tvoří velké buňky (1 x 3 až 5 μm). Je pohyblivá, nemá pouzdro, běžně se vyskytuje v prostředí a bývá kontaminantem potravin. *B. cereus* je schopen růst rozmezí od 4 do 50 °C, avšak optimální růstová teplota je 30 °C. Dalším parametrem je i široká škála optimálního pH (4,9 – 9,3).

Na krevním agaru roste *B. cereus* v nepravidelných šedožlutých až zelených drsných koloniích a vytváří β -hemolýzu se zápachem po myšíně. Mezi další média sloužící k identifikaci bakterie *B. cereus* patří půda MYP (mannitol, yolk, polymyxin B), na které tvoří typické drsné růžové kolonie (negativní mannitol) s růžovou zónou precipitace (přítomnost lecitinázy) (Peutherer *et al.*, 1999; Ray, 2001; Ehling-Schulz *et al.*, 2004).

Jako konfirmace se provádí zaočkování typických kolonií *B. cereus* do glukózového agaru, kdy žluté zbarvení celého sloupce půdy značí využívání glukózy. Dále se provádí VP test (Voges-Proskauerův test), přičemž růžové zbarvení značí tvorbu acetoinu. Lze také provést test na redukci dusičnanů, který je opět v přítomnosti *B. cereus* pozitivní (červené zbarvení) (ČSN EN ISO 7932).

B. cereus tvoří dva typy enterotoxinů, které mohou způsobovat enterotoxikózy projevující se do 12 až 13 hodin po požití potravin nevolností, průjmem či zvracením. První, termostabilní emetický toxin odolává žaludeční šťávě, vyvolává emetickou formu enterotoxikózy a způsobuje zvracení. Druhý, termolabilní enterotoxin je příčinou vodnatého průjmu a často je zaměňován s toxinem produkovaným bakterií *Vibrio cholerae*. Enterotoxiny této bakterie poškozují strukturu buněk střevního epitelu a vyvolávají tak zánětlivou reakci (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008; Votava, 2010; Peutherer *et al.*, 1999). Infekční dávka u obou toxinů, která vyvolá zdravotní problémy, je v rozmezí 10^5 - 10^8 CFU/g. Některé studie však udávají, že zažívací potíže spojené s přítomností enterotoxinů vyvolá dávka už v množství 10^2 CFU/g. Mezi rizikové potraviny patří vařená rýže, pudinky, bramborová kaše či játrová paštika, tedy potraviny obsahující obiloviny nebo škrob (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).



Obrázek 7: Vzhled bakterie *B. cereus* na půdách a) KA, b) MYP, 30 °C, 24 hodin (foto autor)

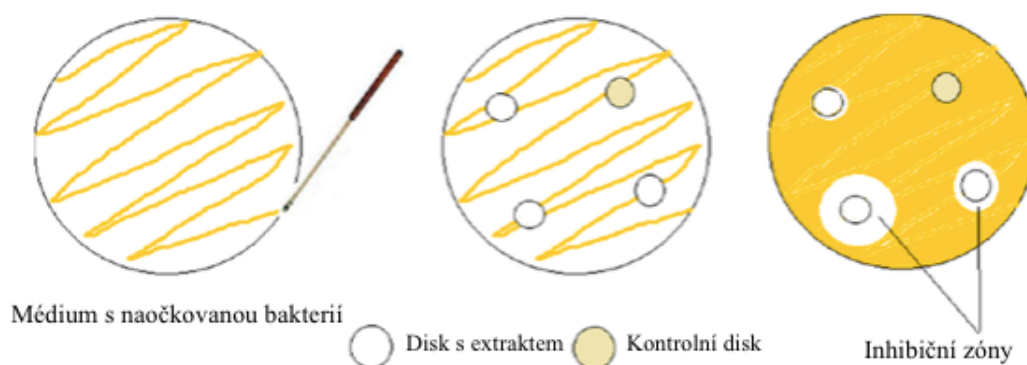
1.11 Stanovení antimikrobiální aktivity

Stanovení citlivosti bakterií k antimikrobiálním látkám je jedna z nejpoužívanějších metod, jak vyhodnotit růst dané bakterie v přítomnosti antimikrobiální látky. V praxi to nejčastěji bývá stanovení citlivosti konkrétních bakterií na vybraná antibiotika. Avšak velký problém dnešní doby je rezistence bakterií k antibiotikům. To vede k hledání nových, bezpečných a efektivních látek s antimikrobiálním účinkem z alternativních zdrojů, jako jsou rostlinné extrakty (Hashish a Amani, 2013).

Mezi základní metody, které se ke zjišťování citlivosti používají, dělíme na kvalitativní (difúzní diskový test) a kvantitativní (MIC, E-testy). Principem těchto metod je určení citlivosti dané bakterie k antimikrobiální látce (Hashish a Amani, 2013).

1.11.1 Diskový difúzní test

Tato rychlá, jednoduchá a spolehlivá metoda slouží ke stanovení citlivosti mikroorganismů k antimikrobiální látce. Evropské země ve spolupráci s odbornými pracovišti vyvinuli techniku zvanou EUCAST, která slouží pro stanovení citlivosti na ATB a zahrnuje všechny kritické body při práci v laboratoři. Po inkubaci za daných podmínek (teplota, čas), je odečítána zóna inhibice (Matuschek *et al.*, 2014). Během inkubace dochází k růstu až do inhibiční koncentrace gradientu difuze testované látky. Poté, co je této koncentrace dosaženo, přestává bakterie růst a dojde k vytvoření inhibiční zóny. Inhibiční zóny jsou kulovitěho tvaru a „opisují“ tvar papírového disku. Dle tloušťky, pH a koncentrace agaru se však tvar i velikost zóny mohou lišit. Mezi předepsanými agary se nejčastěji používá půda Mueller-Hinton (Hashish a Amani, 2013; Jorgensen a Turnidge, 2015).



Obrázek 8: Diskový difúzní test

(převzato z https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-disk-diffusion-assay-for-evaluation-of-antibacterial_fig6_275772079, upraveno, staženo dne 1. 5. 2018)

1.11.2 Diluční metoda

Tato metoda se používá ke kvantitativnímu stanovení antimikrobiální aktivity určité skupiny látek. Cílem této metody je určit minimální inhibiční koncentraci (MIC), tedy koncentraci, při které testovaná látka inhibuje viditelný růst bakterií. Lze i stanovit minimální baktericidní koncentraci (MBK), což je minimální koncentrace látky, při které je inhibován růst mikroorganismů z 99,9%. Nejčastěji bývá u testované látky provedeno dvojkové ředění tak, aby vznikla co nejširší škála koncentrací. Jako médium lze použít půdy dle Mueller-Hintona či BHI. Dle povahy metody (mikrodiluční, makrodiluční) se pipetuje určitý objem média spolu s testovanou látkou a suspenzí testovaného mikroorganismu s následnou inkubací (16-24 hodin) při teplotě, která je pro daný mikroorganismus nejvhodnější. Pokud je metoda prováděna na mikrotitračních destičkách, dojde k vyhodnocení zákalu pomocí fotometru nebo zvětšovacího zrcadla. Pro stanovení MBK se po inkubaci obsah zkumavek vyočkuje na pevné půdy a po kultivaci dojde k vyhodnocení. Je sledováno, zda mikroorganismus v přítomnosti určité koncentrace antimikrobiální látky roste, či nikoliv (Hasish a Amani, 2013; Jorgensen a Turnidge, 2015).

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem diplomové práce byla mikrobiologická analýza proteinových předsnídávek dle platných ČSN EN ISO norem (ČSN EN ISO 4833-2, ČSN EN ISO 7923, ČSN EN ISO 21527 - 1) a běžně používaných metod v laboratoři. Předsnídávek bylo 7 druhů, které se lišily složením a technologií přípravy, jako dobou pasterace, či použitím konzervantu a stabilizátoru (Tabulka 2). Byl prováděn monitoring mikroorganismů, kdy nejprve byly zjištěny původní počty a zástupci mikroorganismů a poté byly nejčastější mikroorganismy izolovány identifikovány pomocí biochemických testů a metodou MALDI-TOF. Ve všech vzorcích byly nejčastější mikroorganismy izolovány a byl u nich testován antimikrobiální efekt připravených extraktů. Mezi vybrané rostliny, ze kterých byly extrakty připraveny, patřily zázvor, chilli, skořice, tymián, ale i méně obvyklé jako rakytník, anýz, zelená káva, lékořice či galgán.

Tabulka 2: Varianty proteinových předsnídávek

Označení vzorku	1-A	2-B	3-C	4-A	5-B	6-C	7-A
Varianta předsnídávky	Dospělá 120 g + xylitol	Dospělá 120 g	Dětská 100 g	Dospělá 120 g + xylitol	Dospělá 120 g	Dětská 100 g	Dospělá 120 g + xylitol
Způsob stabilizace předsnídávky	1 x pasterace	1x pasterace	1x pasterace	2x pasterace	2x pasterace	2x pasterace	1x pasterace + sorban (1 mg)
Nejvyšší dosažená teplota během pasterace	80,7 °C	80,7 °C	80,7 °C	80,9 °C; 80, 6 °C	80,9 °C; 80, 6 °C	80,9 °C; 80, 6 °C	80,7 °C
Čas pasterace	20 minut	20 minut	20 minut	2x 20 minut	2x 20 minut	2x 20 minut	20 minut

2.1 Pomůcky

automatické mikropipety

černá podložka

Erlenmayerovy baňky

homogenizační sáčky s membránou

kádinky

injekční stříkačka plastová

filtry na injekční stříkačku

kahan

L-hokejky (skleněné, plastové)

nůžky

očkovací jehla

očkovací kličky

odměrné válce (500 ml, 100 ml, 50 ml)

Petriho misky plastové

pipety 0,1 ml (skleněné, plastové)

plastové špičky

plastové zkumavky

podložní a krycí sklíčka

pomůcky k navažování (lodičky, lžičky)

prázdné disky na testování antimikrobiální aktivity

sterilní vatové tampony

stojan na zkumavky

zkumavky (skleněné, plastové)

2.2 Pístroje

analytické váhy KERN 442-43, Kern, Německo
autokláv PS 20A, BMT Medical Technology s.r.o.
autokláv Sterilab, BMT Medical Technology s.r.o., ČR
AW Sprint Novasina TH-500, Švýcarsko
dekontaminační autokláv SYSTEC VX40, BioTech, ČR
denzitometr McFarland DEN-1, BIOSAN, Lotyšsko
homogenizátor Masticator IUL Basic, Španělsko
horkovzdušný sterilizátor STERIMAT 51042, BMT Medical Technology s.r.o., ČR
chladnička Liebherr, Německo
mikroskop BX 41, OLYMPUS, Japonsko
termostat Lovibond, Thermo Scientific, USA
vodní lázeň CERTOMAT WR, B. BRAUN, Německo
vortex Bio Vortex V1. BIOSAN, Lotyšsko

2.3 Příprava půd a kultivačních médií

BHI – Brain Heart Infusion Broth – bujón z mozkosrdcové infuse (HiMedia, Indie)

Složení:	gramů/litr
telecí mozková infuse (extrakt)	200 (7,78)
hovězí srdcová infuse (extrakt)	250 (9,72)
proteosový pepton	10,00
chlorid sodný	5,00
hydrogenfosforečnan (di)sodný	2,50
dextrosa	2,00

Příprava: Navážít 37,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody a zahřívát do úplného rozpuštění. Sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

DRBC – Dichloran Medium Base with Rose Bengal – půda s dichloranem, chloramfenikolem a bengálskou červení (HiMedia, Indie)

Složení:	gramů/litr
masový pepton	5,00
D-glukóza	10,00
dihydrogenfosforečnan draselný	1,00
síran hořečnatý	0,50
bengálská červeň	0,025
dichloran	0,002
agar	15,00

Příprava: Navážit 15,75 g přípravku do 500 ml destilované vody. Sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut a po ochlazení na cca 50 °C asepticky přidat rozpuštěný obsah lahvičky antibiotika chloramfenikol (Chloramphenicol Selective Supplement).

Fyziologický roztok

Složení:	gramů/litr
chlorid sodný (Lachner, ČR)	8,50

Příprava: Navážit 8,5 g NaCl do 1000 ml destilované vody, sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Fyziologický roztok s peptonem

Složení:	gramů/litr
chlorid sodný (Lachner, ČR)	8,50
pepton (HiMedia, Indie)	1,00

Příprava: Navážit 8,5 g NaCl a 1 g peptonu do 1000 ml destilované vody. Sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

GTK – Plate Count Agar - půda s glukózou, tryptonem a kvasničným extraktem (HiMedia, Indie)

Složení:	gramů/litr
enzymatický hydrolyzát kaseinu	5,0
kvasničný extrakt	2,5
glukóza	1,0
agar	15,0

Příprava: Navážit 23,5 g přípravku do 1000 ml destilované vody a zahřívát do úplného rozpuštění. Sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

KA – Blood Agar Base No. 2 – krevní agar (HiMedia, Indie)

Složení:	gramů/litr
proteosový pepton	15,0
játrový extrakt	2,5
kvasničný extrakt	5,0
chlorid sodný	5,0
agar	15,0

Příprava: Navážit 21,25 g přípravku do 500 ml destilované vody a zahřívát do úplného rozpuštění. Sterilizovat v autoklávu při 115 °C po dobu 10 minut. Poochlazení na 40-50 °C asepticky přidat 7 % sterilní defibrinované krve.

MALT – MALT Extract Agar (HiMedia, Indie)

Složení:	gramů/litr
sladový extrakt	30,0
mykologický pepton	5,0
agar	15,0

Příprava: Navážit 50,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody a nechat 15 minut nabobtnat. Sterilizovat v autoklávu při 115 °C po dobu 10 minut.

M-H – Mueller Hinton Agar (HiMedia, Indie)

Složení:	gramů/litr
hovězí masová infuze (extrakt)	300 (2,0)
kyselý hydrolyzát kaseinu	17,5
škrob	1,5
agar	17,0

Příprava: Navážit 38,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody a zahřívát do úplného rozpuštění. Sterilizovat v autoklávu při 115 °C po dobu 10 minut.

MYP – Modified MYP Agar Base - půda s mannitolem, žloutkem a polymyxinem (HiMedia, Indie)

Složení:	gramů/litr
masový pepton	10,00
masový extrakt	1,00
D-mannitol	10,00
chlorid sodný	10,00
fenolová červeň	0,025
agar	12,00

Příprava: Navážit 43,0 g přípravku do 900 ml destilované vody a nechat zahřívát do úplného rozpuštění. Sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Ochladit cca na 55 °C a asepticky přidat sterilní roztok Polymyxinu B (FD 003 Polymyxin B Sulphate), aby jeho koncentrace byla 100 jednotek (UI) na 1 ml média a 100 ml sterilní žloutkové emulze (FD 045 Egg Yolk Emulsion) na 1000 ml média. Před nalitím dobře promíchat.

S-B – Slanetz and Bartley Medium – půda dle Slanetz-Bartleyové (HiMedia, Indie)

Složení:	gramů/litr
tryptóza	20,0
kvasničný extrakt	5,0
dextróza	2,0
hydrogenfosforečnan (di)sodný	4,0
azid sodný	0,4
trifenyltetrazolium chlorid	0,1
agar	15,0

Příprava: Navážit 46,5 g přípravku do 1000 ml destilované vody a za současného promíchávání opatrně zahřívát do úplného rozpuštění. Neautoklávovat! Poté ihned ochladit na 50 °C.

2.4 Testované vzorky (proteinové přesnídávky)

Mikrobiologická analýza byla provedena u 7 vzorků proteinových přesnídávek, které se lišily jak složením, tak technologickou úpravou (Tabulka 3). Před samotným zpracováním byly taštičky se vzorky řádně promnuty v rukou po dobu asi jedné minuty, aby byl jejich obsah řádně promíchán. Poté byly očištěny 60% etanolem, především u uzávěru.

Celkem bylo testováno 6 sérií proteinových přesnídávek ze stejné šarže s různým časovým rozstupem. Po první analýze následovaly další, a to po 2 a 4 týdnech, dále po 4, 5 a 6-ti měsících (Tabulka 4). Cílem bylo monitorovat, zda se s rozstupem času změní počty přítomných mikroorganismů v závislosti na složení přesnídávky a technologickém postupu přípravy. Pro ověření byla u vzorků přeměřena i aktivita vody.

Suroviny použité k výrobě proteinových přesnídávek jsou uvedeny v tabulce 3. Přesné složení není uvedeno z důvodu ochrany firemního tajemství.

Tabulka 3: Suroviny použité k výrobě proteinových předsnídávek

Suroviny	
syrovátkový proteinový koncentrát	řepkový olej
micelární kasein	lněný olej
mléčný proteinový koncentrát (dětská verze)	chia olej
hydrolyzovaný kolagen (hovězí)	kokosový olej
mandlové máslo	rýžová mouka
arašídové máslo	čiroková mouka
mleté lískové ořechy	jáhlová mouka
mleté vlašské ořechy	pohanková mouka
mletý kokos	kukuřičná mouka
inulin	voda
kyselina mléčná	citrusová vláknina
Dochucení	
limetková šťáva	mletá sušená jablka
100% jablečný koncentrát	mleté sušené hrušky
100% jablečno-hruškový koncentrát	rýžový sirup
nízkoťučné kakao	

Tabulka 4: Časový rozestup testování vzorků proteinových předsnídávek

Číslo série	Časový rozestup
1.	0*
2.	po 2 týdnech
3.	po 1 měsíci
4.	po 4 měsících
5.	po 5 měsících
6.	po 6 měsících

*první testování provedené ihned po obdržení vzorků

2.5 Homogenizace vzorků

Homogenizace byla provedena pro všechna mikrobiologická stanovení stejným způsobem. Vzorek byl po sterilním otevření asepticky navážen a zhomogenizován ve fyziologickém roztoku s peptonem (10 g vzorku + 90 ml roztoku) po dobu dvou minut v peristaltickém homogenizátoru. Po homogenizaci bylo ze sáčku s membránou odebráno potřebné množství k následné mikrobiologické analýze.

2.6 Metody mikrobiologické analýzy

Všechna stanovení byla vždy provedena dle platných ČSN EN ISO norem.

2.6.1 Stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů (ČSN EN ISO 4833-2)

Tato metoda slouží ke zjištění celkového počtu mezofilních a fakultativně anaerobních bakterií (CPM) ve vzorcích potravin. Principem je počítání vyrostlých kolonií na Petriho misce (PM) s půdou GTK (glukóza, trypton, kvasničný extrakt) po kultivaci při 30 °C po dobu 24-48 hodin. Následně jsou vyhodnoceny vyrostlé kolonie a dle vztahu (Rovnice 1) je vypočteno množství CFU na 1 gram vzorku, kde ΣC je součet kolonií na vybraných miskách, n_1 je počet misek z prvního použitého ředění, n_2 je počet misek z dalšího použitého ředění a d je faktor nejnižšího použitého ředění pro výpočet.

Rovnice 1: Vztah pro výpočet CFU/g ve vzorcích potravin

$$N = \frac{\Sigma C}{V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$$

Nastane-li situace, že na PM bude přítomno méně než 15 kolonií, pro výpočet se použije vztah pro odhad nízkých počtů (Rovnice 2), kde m je aritmetický průměr a d je faktor ředění výchozí suspenze.

Rovnice 2: Vztah pro výpočet nízkých počtů ve vzorcích potravin

$$N = \frac{m}{d}$$

Po sterilním otevření vzorku byla provedena homogenizace dle postupu v odstavci 2.5 s následným ředěním (10^{-1} , 10^{-2}). Poté bylo na půdu GTK zaočkováno 100 μ l vzorku metodou roztěru L-hokejkou s následnou inkubací při 30 °C po dobu 24 hodin a vyhodnocením dle ČSN EN ISO 4833-2.

2.6.2 Stanovení enterokoků

V potravinách není stanovení enterokoků zakotveno v normě, neboť některé druhy bývají součástí čistých kultur. Provádí se pouze v případě, je-li podezření na kažení potravin v přítomnosti enterokoků. Enterokoky jsou velmi odolné vůči podmínkám prostředí, snášejí vysoké obsahy solí, vyšší pH i teploty. Pro detekci bakterií rodu *Enterococcus* se používá půda dle Slanetz-Bartelyové (S-B). Ta obsahuje azid sodný (selekční tlak pro doprovodnou mikroflóru) a trifenylnitrotetrazolium chlorid (TTC), který enterokoky redukuje na červený formazán.

Po sterilním otevření vzorku byla provedena homogenizace dle postupu uvedeném v odstavci 2.5. Poté bylo na půdu S-B zaočkováno 100 μ l vzorku přímo z homogenizačního sáčku (ředění 10^{-1}) metodou roztěru L-hokejkou s následnou inkubací při 37 °C po dobu 24 hodin a následným počítáním typických kolonií. Počty enterokoků (CFU/g) byly počítány dle rovnice 1, případně dle rovnice 2.

2.6.3 Horizontální metoda stanovení počtu presumptivního *Bacillus cereus* - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C (ČSN EN ISO 7923)

Touto metodou je stanoven počet tzv. presumptivních bakterií *Bacillus cereus*, tedy předpokládaných příslušníků tohoto druhu. Arbitrážní půdou je MYP agar (Mannitol Yolk Polymyxine B agar), který je založen na proteolytických schopnostech bakterie *B. cereus*. Pro zjištění hemolytické činnosti bakterie *B. cereus* byly mimo normu sledované vzorky zaočkovány na pevnou půdu KA (krevní agar), na kterém roste *B. cereus* ve velkých šedo zelených koloniích se zónou β -hemolýzy a typickým zápachem po myšíně, ale také pro zjištění jiných mikroorganismů, které rostou jen na nutričně bohatých půdách (streptokoky, stafylokoky).

Po sterilním otevření vzorku byla provedena homogenizace dle postupu v odstavci 2.5 s následným ředěním (10^{-1} , 10^{-2}). Na půdy MYP a KA bylo zaočkováno 100 μ l vzorku metodou roztěru L-hokejkou s následnou inkubací (MYP – 30 °C, KA – 37 °C) po dobu 24 hodin a následným počítáním typických kolonií. Počet mikroorganismů byl počítán dle rovnice 1, případně dle rovnice 2.

2.6.4 Stanovení celkového počtu kvasinek a plísni u výrobků s vodní aktivitou vyšší než 0,95 (ČSN EN ISO 21527-1)

Zjišťování přítomnosti kvasinek a plísni se provádí společně na jedné půdě a z výsledků lze usuzovat trvanlivost a skladovatelnost výrobků, či úroveň hygieny a sanitace ve výrobě. Stanovení probíhá na půdě DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar), kdy jednotlivé složky půdy inhibují rozrůstání plísni, vzdušného mycelia a usnadňují rozlišení kvasinek od plísni. Současně byla použita i půda MALT pro zachycení všech kvasinek a plísni.

Po sterilním otevření vzorku byla provedena homogenizace dle postupu uvedeném v odstavci 2.5. Poté bylo na půdy MALT a DRBC zaočkováno 100 μ l vzorku přímo z homogenizačního sáčku (ředění 10^{-1}) metodou roztěru L-hokejkou s následnou inkubací při 25 °C po dobu 2-5 dní a následným počítáním typických kolonií.

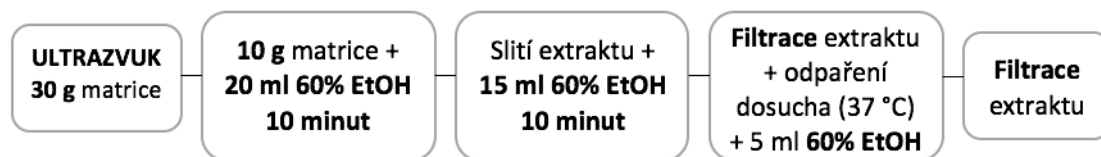
2.7 Identifikace mikroorganismů

Cílem práce bylo izolovat z proteinových přesnídávek převládající kontaminující bakterie, identifikovat je a následně použít ke stanovení antimikrobiální aktivity připravených extraktů. Prevládající kontaminující bakterie byly přeočkovány na půdy MYP a KA, protože na původních miskách mohly být přítomny ve směsi. Po kultivaci (30 °C, 24 hodin) bylo provedeno barvení dle Grama a test na tvorbu katalázy. Byly vybrány G⁺ tyčinky, které byly po celou dobu experimentu uchovávány na půdách MYP a KA. Vybrané kolonie použité k následnému stanovení antimikrobiální aktivity extraktů byly identifikovány metodou MALDI-TOF na VŠCHT Praha.

2.8 Příprava rostlinných extraktů

Extrakty byly vyráběny ve spolupráci s doc. Ing. Liborem Červenkou, Ph.D. způsobem uvedeným na obrázku 9 z běžně dostupných bylin a koření, které lze zakoupit v obchodních řetězcích, lékárnách a internetových obchodech.

Etanolové extrakty byly naředěny 60% etanolem tak, aby jejich výsledná koncentrace byla 100 mg/ml a u vybraných extraktů 60 mg/ml (Tabulka 5). Po rozpuštění byly pomocí injekční stříkačky s filtrem převedeny do sterilní plastové zkumavky a následně použity k analýze. Takto upravené extrakty byly po celou dobu experimentu uchovávány v chladničce ve sterilních plastových zkumavkách.



Obrázek 9: Schéma přípravy extraktů

Tabulka 5: Extrakty použité ke sledování antimikrobiální aktivity

Vzorky extraktů	Koncentrace extraktu (mg/ml)
Anýz 1 – Anýz plod, F-Dental	100
Chilli 1 – Chilli mleté, World of spices	100
Chilli 2 – Chilli papričky plod, F-Dental	100
Chilli 3 – Chilli papričky plod, F-Dental	100
Galgán 1 – Galgán oddenek, F-Dental	60
Káva 1 – Zelená káva surová, mletá arabica, Phoenix monopol	100
Káva 2 - Zelená káva surová, mletá arabica, Phoenix monopol	60
Lékořice 1 – Lékořice kořen, F-Dental	100
Lékořice 2 – Lékořice kořen, F-Dental	100
Rakytník 1 – Rakytník plod, F-Dental	100
Rakytník 2 – Rakytník plod, F-Dental	100
Skořice 1 – Skořice mletá, Kotányi	100
Šalvěj 1 – Šalvěj list, F-Dental	60
Tymián 1 – Tymián list, F-Dental	100
Tymián 2 – Tymián drhnutý, Kotányi	100
Zázvor 1 – Zázvor mletý, Kotányi	100
Zázvor 2 – Zázvor mletý, Kotányi	100
Zázvor 3 – Zázvor mletý, F-Dental	100

2.9 Metody sledování antimikrobiální účinnosti extraktů

V průběhu semestru bylo obdrženo několik vzorků přírodních extraktů, u kterých byla stanovena antimikrobiální aktivita pomocí diskového difúzního testu. Poté byly vybrány 4 nejlepší extrakty a použity pro diluční bujónovou metodu. Všechna stanovení byla provedena vždy v dubletu.

2.9.1 Difúzní disková metoda

Antimikrobiální aktivita u všech obdržených rostlinných extraktů byla hodnocena pomocí difúzní diskové metody. Cílem bylo vybrat rostlinné extrakty s nejvyšší antimikrobiální aktivitou. Pro analýzu byla zapotřebí vždy 24 hodinová kultura, a proto den předem, byly sledované bakterie naočkovány na KA a inkubovány (30 °C, 24 hodin). K analýze bylo použito 6 bakterií izolovaných z proteinových přesnídávek. Bakterie byly identifikovány metodou MALDI-TOF. Na PM s půdou Mueller-Hinton (M-H) byla po celé ploše misky naočkována pomocí sterilního vatového tamponu suspenze testovaných bakterií o hustotě 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice. Difúzní agarová metoda pro zjištění antimikrobiální aktivity extraktů byla prováděna dle článku (Matuschek *et al.*, 2014). Protože se tento článek zabývá stanovením citlivosti na antibiotika, postup jsme převzali a modifikovali ke stanovení antimikrobiální aktivity. Také kultivační teplota bakterie byla přizpůsobena dle identifikace bakterie pomocí MALDI-TOF na 30 °C. Na každou PM bylo umístěno maximálně 6 sterilních papírových disků tak, aby měly mezi sebou dostatečný rozestup a výsledné inhibiční zóny se nepřekrývaly. Poté bylo na každý disk nadávkováno pomocí automatické pipety přesně 10 µl testovaného extraktu. Na každé misce byl proveden i slepý pokus, v tomto případě bylo dávkováno 10 µl 60% etanolu. Misky byly inkubovány (30 °C, 24 hodin) a následně došlo k odečtení inhibičních zón.

Před samotným testováním bylo nutné optimalizovat pipetovaný objem na disky, přičemž ideální byl objem právě 10 µl extraktu. Pokud bylo pipetováno více, extrakt nebyl dostatečně diskem pohlcen a vzlínal.

2.9.2 Diluční bujónová metoda

Diluční bujónová metoda byla provedena u extraktů z galgánu, lékořice, šalvěže a tymiánu. Tyto extrakty byly naředěny dvojkovým ředěním, a to v koncentracích 50 – 0,0976 mg/ml. K provádění diluční bujónové metody byla použita bakterie izolovaná z proteinových přesnídávek.

Nejprve byla z 24 hodinové kultury inkubované na KA při 30 °C připravena suspenze bakterie o denzitě $1,5 \cdot 10^6$ CFU/ml do bujónu BHI. Pro ověření denzity buněk bylo ze suspenze bakterie o koncentraci $1,5 \cdot 10^4$ CFU/ml odpipetováno 100 μ l na půdu GTK. Po kultivaci při 30 °C, 24 hodin, byla spočítána skutečná koncentrace životaschopných buněk v CFU/ml.

Do první zkumavky byly pipetovány 2 ml BHI bujónu a 2 ml příslušného extraktu o koncentraci 100 mg/ml a poté bylo provedeno dvojkové ředění. Do každé z naředěných zkumavek bylo pipetováno 100 μ l suspenze bakterie, kdy výsledná koncentrace bakterie ve zkumavkách byla $7,1 \cdot 10^3$ CFU/ml. Poté byly zkumavky inkubovány (30°C, 24 hodin). Následně byl ve zkumavkách sledován zákal a jejich obsah byl vyočkován roztěrem i zálivem na půdu GTK a kultivován (30 °C, 24 hodin). Po kultivaci došlo ke spočítání vyrostlých kolonií.

2.10 Ověření účinnosti extraktu v reálných vzorcích

Pro ověření účinnosti rostlinného extraktu na reálných vzorcích proteinových přesnídávek, byl vybrán jeden přírodní extrakt, který vykazoval nejlepší antimikrobiální účinek. Extrakt byl přidán v účinné koncentraci do reálných vzorků přesnídávek současně s bakterií izolovanou z těchto přesnídávek.

Nejprve byla z 24 hodinové kultury inkubované na KA při 30 °C připravena suspenze bakterie o denzitě $1,5 \cdot 10^5$ CFU/ml do fyziologického roztoku. Pro ověření denzity buněk bylo ze suspenze bakterie o koncentraci $1,5 \cdot 10^4$ CFU/ml odpipetováno 100 μ l na půdu GTK. Po kultivaci při 30 °C, 24 hodin, byla spočítána skutečná koncentrace životaschopných buněk v CFU/ml. Následně bylo odváženo 10 g vzorku proteinové přesnídávky, do kterého bylo přidáno 100 μ l suspenze bakterie a 1 ml extraktu o koncentraci 100 mg/ml. Po řádném promíchání všech složek byl odebrán 1 g takto připravené směsi do 9 ml fyziologického roztoku. Z této suspenze bylo vyočkováno 100 μ l na půdy GTK, MYP a KA a po kultivaci (30 °C, 24 hodin) byly počítány typické kolonie na miskách. Směs přesnídávky, bakterie a extraktu byla uchována při laboratorní teplotě, stejným postupem upravena a vyočkována na pevné půdy po 24 a 48 hodinách.

2.11 Stanovení aktivity vody

Ve vzorcích proteinových přesnídávek byla změřena aktivita vody. Do sterilních a suchých plastových kalíšků bylo odváženo okolo 10 gramů vzorku, které byly jednotlivě umístěny do přístroje AW Sprint. Každý vzorek byl zanalyzován 3x.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Celkové počty mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů (ČSN EN ISO 4833-2)

Celkové počty byly stanoveny na půdě GTK u vzorků proteinových přeseňávek s různým časovým rozestupem tak, aby mohlo být porovááno, zdali se počty mikroorganismů s rozestupem času v proteinových přeseňávkách změní či nikoliv. Jelikož u většiny vzorků nebylo napočítáno více než 15 kolonií na misce, byl použit výpočet pro odhad nízkých počtů (Rovnice 2).

Jak je uvedeno v tabulce 6, která znázorňuje CPM v časovém sledu, nejvyšší počty MO byly hned po prvním zpracování u přeseňávky **1-A** (dospělá s xylitolem, 1x pasterovaná). Nejnížší pak u vzorku **5-B** (dospělá, 2x pasterovaná). Testování provedené po 2 týdnech ukázalo nejvyšší CPM u vzorku **2-B** (dospělá, 1x pasterovaná). Stanovení CPM po 2 týdnech ukázalo u některých vzorků (**2-B**, **3-C** a **5-B**) vyšší počty než po prvním testování a bylo zjištěno, že ředící roztok (fyziologický roztok), byl kontaminován. Sledování mikrobiální kontaminace provedené po jednom měsíci ukázalo, že hodnota CPM nepřesáhla u žádných ze vzorků hodnotu 10^3 CFU/g. Testování provedené po 4, 5 a 6 měsících ukázalo, že celkový počet nepřesáhl hodnotu 1.10^2 CFU/g ani u jednoho vzorku proteinových přeseňávek. Česká vyhláška 132/2004 Sb., která je však od 10. 10. 2006 neplatná v kategorii „Potraviny určené k uspokojení nároků při zvýšeném tělesném výkonu a ke snižování tělesné hmotnosti“, vymezuje nejvyšší přípustný celkový počet mikroorganismů (CPM), a to 5.10^5 /g vzorku. Z pohledu celkových počtů mikroorganismů lze proteinové přeseňávky považovat za zdravotně nezávadné.

Z provedeného monitoringu lze usoudit, že rozdílná technologická úprava přeseňávek (pasterace), měla vliv na CPM, protože vzorky **1-A**, **2-B** a **3-C**, které po prvním testování vykazovaly vyšší hodnoty celkových počtů oproti ostatním, byly pasterovány pouze jednou. Celkové počty mikroorganismů nám udávají udržitelnost dané potraviny a dle našich výsledků lze usoudit, že díky provedené pasteraci a použití kvalitních surovin, je doba spotřeby přeseňávek minimálně půl roku, neboť počty mikroorganismů s časem klesaly. Lze také vyvodit, že použití xylitolu ani sorbanu nemělo žádný vliv na mikrobiální kontaminaci nebo na údržnost potraviny.

Tabulka 6: Celkové počty mikroorganismů v proteinových přesnídávkách na půdě GTK v časovém sledu

Vzorek	První testování	Testování po 2 týdnech	Testování po 1 měsíci
	CFU/g	CFU/g	CFU/g
1-A	$7,4 \cdot 10^3$	$6,7 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^2$
2-B	$2,2 \cdot 10^3$	$9,5 \cdot 10^3$	$5,0 \cdot 10^2$
3-C	$1,8 \cdot 10^3$	$3,8 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^2$
4-A	$5,5 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
5-B	$<1,0 \cdot 10^2$	$5,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
6-C	$1,2 \cdot 10^3$	$5,3 \cdot 10^2$	$2,8 \cdot 10^2$
7-A	$5,0 \cdot 10^2$	$3,8 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
Vzorek	Testování po 4 měsících	Testování po 5 měsících	Testování po 6 měsících
	CFU/g	CFU/g	CFU/g
1-A	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
2-B	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
3-C	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
4-A	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
5-B	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
6-C	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
7-A	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$

* Vzorek – označení vzorku od výrobce (Tabulka 2)

3.2 Stanovení enterokoků

Enterokoky, přestože jsou rezistentní vůči nepříznivým podmínkám a přežívají i dlouhodobé zahřívání na vyšší teploty, ani v jedné z testovaných sérií v použitém ředění 10^{-2} nebyly detekovány (Tabulka 14 v příloze). Nepřítomnost enterokoků může být díky prováděné pasteraci proteinových přesnídávek a použití kvalitních surovin.

3.3 Horizontální metoda stanovení počtu presumtivního *Bacillus cereus* (ČSN EN ISO 7932)

U každé série testovaných vzorků byly vyhodnoceny typické kolonie na půdách MYP a KA. Na půdě MYP tvoří *B. cereus* charakteristické růžové velké kolonie se zónou precipitace. Na KA tvoří drsné šedo zelené kolonie se znatelnou β -hemolýzou. Protože na půdě byly přítomny i jiné mikroorganismy, než *B. cereus* (G+ koky, jiné G+ tyčinky), byly podezřelé kolonie přeočkovány opět na půdy MYP a KA. Po získání čistých kultur bylo provedeno barvení dle Grama (Obrázek 14 v příloze) a test na katalázu, jež má rod *Bacillus* pozitivní.

Testování mikrobiologické kontaminace po 5 a 6 měsících již neprokázalo přítomnost bakterie *B. cereus* (Tabulka 7).

Česká vyhláška 132/2004 Sb., která je však od 10. 10. 2006 neplatná, udává nejvyšší mezní hodnotu pro *B. cereus* v kategorii „Potraviny určené k přímé spotřebě“, a to 10^4 /g. Ve stejné vyhlášce, ale v kategorii „Potraviny určené pro kojeneckou a dětskou výživu“, je udávána nejvyšší mezní hodnota 10^2 /g. V nařízení Komise (ES) 1441/2007, které udává limitní hodnoty mikroorganismů v různých druzích potravin, je na *B. cereus* zaměřena kategorie potravin „Sušená počáteční kojenecká výživa a sušené dietní potraviny pro zvláštní léčebné účely určené pro kojence do šesti měsíců věku“, která definuje maximální přítomnost této bakterie při konci výrobního procesu, a to v nejvyšším množství 500 KTJ/g, tedy $5 \cdot 10^2$ CFU/g. Přestože vzorky proteinových přesnídávek nespádají do této kategorie potravin, obsahují i druhy určené pro dětskou výživu (vzorky 3-C a 6-C). Protože celkové počty bakterie *B. cereus* nepřesáhly po jednom měsíci 10^2 CFU/g, vzorky by uvedenou legislativu splňovaly.

B. cereus bývá kontaminantem v mnoha technologických procesech, například při výrobě sýra, která zahrnuje i produkci syrovátky. Právě syrovátka je jednou z ingrediencí v proteinových přesnídávkách. Ve článku monitorujícím přítomnost bakterie *B. cereus* v různých fázích výroby, byla bakterie přítomna nejvíce právě při výrobě syrovátky. Důvodem je, že *B. cereus* je součástí biofilmu, který je uvnitř nerezových trubek vedoucí syrovátku. Koncentrace bakterie byla nejvyšší právě na konci potrubí, kde se biofilm hromadí (Pirttijärvi, 1998). Další rizikovou surovinou může být i rýže, která je ve vzorcích přesnídávek přítomna ve formě rýžové mouky, a která je často kontaminovaná právě bakterií *B. cereus* (Sarrías, 2003).

Tabulka 7: Celkové počty *Bacillus cereus* ve vzorcích proteinových přesnídávek v časovém sledu

Vzorek	První testování	Testování po 2 týdnech	Testování po 1 měsíci
	CFU/g	CFU/g	CFU/g
1-A	2,8.10 ²	7,5.10 ²	<1,0.10 ²
2-B	2,8.10 ²	4,5.10 ²	<1,0.10 ²
3-C	2,3.10 ²	5,3.10 ²	2,3.10 ²
4-A	<1,0.10 ²	1,1.10 ²	<1,0.10 ²
5-B	2,5.10 ²	5,0.10 ²	<1,0.10 ²
6-C	8,9.10 ²	4,3.10 ²	<1,0.10 ²
7-A	5,5.10 ²	3,8.10 ²	<1,0.10 ²
Vzorek	Testování po 4 měsících	Testování po 5 měsících	Testování po 6 měsících
	CFU/g	CFU/g	CFU/g
1-A	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
2-B	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
3-C	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
4-A	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
5-B	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
6-C	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
7-A	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²

* Vzorek – označení vzorku od výrobce (Tabulka 2)

3.4 Stanovení celkového počtu kvasinek a plísní s aktivitou vody vyšší než 0,95 (ČSN EN ISO 21527-1)

Kvasinky nebyly v koncovém ředění 10⁻² identifikovány v žádné z testovaných sérií proteinových přesnídávek (Tabulka 15 v příloze). Plísně byly identifikovány na miskách s půdami DRBC a MALT, a to ihned po prvním zpracování proteinových přesnídávek a u testování provedeném po 2 týdnech (Tabulka 16 v příloze). Narostlé plísně byly přeočkovány na půdu MALT technikou přípravy obrovských plísní a byly posouzeny makroskopické i mikroskopické znaky. U plísně narostlé po prvním zpracování bylo následně dle atlasu určeno, že se jedná o plíseň rodu *Penicillium* (Obrázek 13 v příloze). Stejným způsobem byly identifikovány plísně vyrostlé v testování provedeném po 2 týdnech. Bylo určeno, že se jedná o plísně rodu *Cladosporium* a *Fusarium*. Všechny plísně byly s největší pravděpodobností kontaminace z okolního prostředí (materiál, vzduch, ...).

3.5 Identifikace mikroorganismů

Cílem práce bylo izolovat z proteinových přesnídávek převládající kontaminující bakterie, kterou v našem případě byla bakterie *B. cereus*. Tato bakterie byla použita ke stanovení antimikrobiální účinnosti extraktů. Po vyhodnocení vzhledu kolonií na miskách MYP a KA byly vybrány ty kolonie, které na MYP tvořily drsné růžové kolonie se zónou precipitace a na KA tvořily šedozelené neohrazené kolonie se zónou hemolýzy. Tyto vybrané kolonie byly přeočkovány na půdy MYP a KA, aby nebyly přítomny ve směsi, a po kultivaci (30 °C, 24 hodin) byla provedena konfirmace pomocí barvení dle Grama a test na tvorbu katalázy, který byl pozitivní. Ze všech testovaných vzorků proteinových přesnídávek byly vybrány G+ tyčinky, které byly po celou dobu experimentu uchovávány na půdách MYP a KA. Vybrané kolonie použité k následnému stanovení antimikrobiální aktivity byly identifikovány metodou MALDI-TOF na VŠCHT v Praze Ing. Sabinou Purkrťovou, Ph.D. (Tabulka 8). K identifikaci bylo vybráno 6 bakterií, které se vyskytovaly v různých typech přesnídávek (**5-B** 2x pasterovaná, **7-A** 2x pasterovaná + xylitol + sorban, **3-C** dětská 1x pasterovaná, **4-A** 2x pasterovaná + xylitol, **6-C** 2x pasterovaná) a byly izolovány z testování prováděné s časovým rozestupem (první testování, testování po 2 týdnech, po 1 měsíci).

Tabulka 8: Vyhodnocení vybraných bakterií metodou MALDI-TOF

Označení bakterie	Série vzorku	Vzorek	Vyhodnocená bakterie
1	1.	5-B	<i>Bacillus cereus</i>
2	1.	7-A	<i>Bacillus cereus</i>
3	2.	7-A	<i>Bacillus cereus</i>
4	3.	3-C	<i>Bacillus cereus</i>
5	3.	4-A	<i>Bacillus cereus</i>
6	3.	6-C	<i>Bacillus cereus</i>

*Série vzorku – časový rozestup testování vzorků (Tabulka 4), Vzorek – označení vzorku od výrobce (Tabulka 2)

3.6 Sledování antimikrobiální aktivity přírodních extraktů

V průběhu semestru bylo obdrženo několik vzorků přírodních extraktů, u kterých byla stanovena antimikrobiální aktivita pomocí difúzního diskového testu. Extrakty s nejvyšší antimikrobiální aktivitou byly následně použity pro diluční bujónovou metodu. Všechna stanovení byla prováděna vždy v dubletu.

3.6.1 Difúzní disková metoda

Cílem difúzní diskové metody bylo jednak určit extrakty s nejvyšší antimikrobiální aktivitou, ale i porovnat vliv původu vzorku, ze kterého byl extrakt připravován. Pro přípravu extraktu bylo použito běžně dostupné koření z obchodů balené v hermeticky uzavřených pytlíčcích a obsah byl nejmenší namletý (Kotányi). Pro porovnání byly použity rostliny od společnosti F-Dental, která dodala rostliny v papírových sáčcích. Všechny hodnoty inhibičních zón jednotlivých extraktů jsou uvedeny v tabulkách 9-11.

Extrakty **Káva 1**, **Káva 2**, stejně tak jako **Zázvor 1** a **Zázvor 2** byly připraveny ze surovin od stejného výrobce. Odlišné označení bylo pouze z důvodu rozdílné navážky při jejich přípravě a jejich výsledné inhibiční zóny byly téměř totožné. Je zajímavé, že extrakty **Káva 1** a **Káva 2** se lišily svými koncentracemi, ale při měření vykazovaly totožné inhibiční zóny (9,3 mm). Suroviny na přípravu extraktu **Tymián 1** a **Tymián 2** byly odlišné a právě u této dvojice extraktů se inhibiční zóny lišily. Větší antimikrobiální aktivitu vykazoval extrakt **Tymián 1**, který byl připraven z listů tymiánu od dodavatele F-Dental. **Tymián 2** byl připraven od výrobce Kotányi, pod názvem tymián drhnutý. Důvodem rozdílných hodnot může být i to, že firma Kotányi je mezinárodní společnost dodávající koření téměř do všech obchodních řetězců. Kvůli naplnění poptávky tak mohou být použity rostliny, které často bývají nejasného původu nebo horší kvality, oproti menším společnostem, jako je právě F-Dental. Největší inhibiční zóny tvořily extrakty z tymiánu, galgánu, lékořice a šalvěje, které byly použity k testování antimikrobiální aktivity extraktů diluční bujónovou metodou. Zajímavé je, že extrakt **Šalvěj 1** byl připraven o koncentraci 60 mg/ml, a i přesto vykazoval mnohem vyšší inhibiční účinky oproti některým extraktům připravených o koncentraci 100 mg/ml. Extrakt **Galgán 1** byl podroben difúzní diskové metodě 2x a pokaždé vykazoval odlišné hodnoty inhibiční zóny (9,1 a 13,4 mm). Důvodem může být nepatrně odlišná denzita připravené suspenze bakterie *B. cereus*. Extrakt **Lékořice 2** byl testován také 2x, u tohoto extraktu však byly zjištěny podobné inhibiční zóny (11,8 a 12 mm).

Rozdíly v naměřených hodnotách byly zjištěny i u stejných druhů extraktů. Protože byly extrakty obdrženy postupně v průběhu celého měření, byly pojmenovány odlišně (**Rakytník 1, 2, Zázvor 1, 2, Chilli 2, 3**). Přestože extrakty **Rakytník 1** a **Rakytník 2** byly vyrobeny ze surovin od stejného dodavatele (F-Dental) a byly připraveny o totožné koncentraci, vykazovaly odlišné inhibiční zóny (**8,4, 10,5 a 10,2** mm). Důvodem je rozdílná doba uchovávání extraktů v chladničce. Extrakt **Rakytník 1** byl dlouhodobě uchováván v chladničce (2 měsíce) a ukázalo se, že dlouhodobým skladováním se antimikrobiální účinnost snižuje. Extrakty **Chilli 2** a **Chilli 3**, které byly také připraveny ze stejných surovin, tvořily obdobné inhibiční zóny (**9,3 a 9,5** mm). Méně odlišnou inhibiční zónu (**10** mm) vykazoval extrakt **Chilli 1**, který byl připraven ze suroviny od výrobce World of Spices. Menší rozdíly byly také v naměřených inhibičních zónách u extraktů ze zázvoru. **Zázvor 1** a **Zázvor 2** z koření od Kotányi tvořily inhibiční zóny (**7,2 a 7,9** mm), **Zázvor 3** od dodavatele F-Dental pak **8,3** mm.

V článku sledujícím antimikrobiální aktivitu zázvoru proti *B. cereus* tvořil extrakt v závislosti na použité koncentraci inhibiční zóny v rozmezí od **9,6** do **11,6** mm, přičemž námi zjištěné inhibiční zóny byly v hodnotách **7,2 – 8,3** mm (Tajkarimi *et al.*, 2010). Ve studii autorů Gülçin *et al.* (2003) byla sledována antimikrobiální aktivita extraktu z anýzu proti bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Proteus mirabilis*, přičemž byly naměřeny inhibiční zóny pro obě bakterie **9** mm (Gülçin *et al.*, 2003). Námi naměřená inhibiční zóna pro **Anýz 1** byla **9,8** mm. V práci autorů Yogendra Kumar *et al.* (2013) studující antimikrobiální účinky extraktu z rakytníku, byly zjištěny inhibiční zóny proti bakterii *E. coli* v hodnotách **10,5 – 11,6** mm a proti *Staphylococcus aureus* **8,6 – 13,6** mm v závislosti na použité koncentraci extraktu (Yogendra Kumar *et al.*, 2013). Námi pak byly zjištěny inhibiční zóny pro extrakt **Rakytník 1** **8,4** mm a **Rakytník 2** **10,2** mm. Nízká hodnota u extraktu **Rakytník 1** je nejspíš z důvodu dlouhodobého skladování extraktu v chladničce.

Inhibiční zóna u extraktu ze skořice v práci autorů Tajkarimi *et al.* (2010) byla proti bakterii *B. cereus* v rozmezí **10,3 – 12** mm (Tajkarimi *et al.*, 2010). V dalším článku studující antimikrobiální aktivitu extraktů ze skořice proti *B. cereus* jsou uváděny hodnoty inhibiční zón **10, 14 a 15** mm, námi pak byla zjištěna inhibiční zóna extraktu ze skořice **8,9** mm (Ateb a Erdo, 2003). Důvodem rozdílných hodnot pak může být odlišná koncentrace extraktů.

V práci autorů Nader *et al.* (2017) studující etanolové extrakty připravené ze zázvoru vykazovaly proti bakteriím jako *Staphylococcus aureus* nebo *Pseudomonas aeruginosa* inhibiční zóny v rozmezí **13 – 16** mm, naše zjištěné hodnoty pak byly **7,2 – 8,3** mm (Nader *et al.*, 2010). Rozdílné hodnoty lze přisuzovat větší odolnosti *B. cereus* oproti bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*.

Ve studii Bacon *et al.* (2017) sledující antimikrobiální aktivitu chilli papriček došli k výsledku, že vodný extrakt právě z chilli inhiboval růst bakterií jako *E. coli* či *Listeria monocytogenes*, a to v hodnotách od 7,5 až 9,5 mm inhibiční zóny (Bacon *et al.*, 2017). Námi byla stanovena inhibiční zóna u extraktu z chilli v hodnotách 9,3 – 10 mm.

Největší inhibiční zóny tvořily extrakty z tymiánu, galgánu, lékořice a šalvěže. Extrakt z lékořice proti bakterii *Lactobacillus acidophilus* ve studii vykazoval inhibiční zónu 15,1 mm (Ajagannavar *et al.*, 2014). V další práci pak bylo zjištěno, že extrakt z lékořice tvořil zóny 8 a 9 mm u bakterie *B. cereus* (Ateb a Erdo, 2003). Námi byla naměřena inhibiční zóna u extraktu z lékořice v hodnotách 11,8, 12 a 14,1 mm. V článku sledujícím antimikrobiální aktivitu u šalvěže a tymiánu byly uvedeny inhibiční zóny u obou extraktů okolo 15 mm, přičemž námi bylo zjištěno, že extrakt **Tymián 1** vykazuje inhibiční zónu 11,3 mm a extrakt **Šalvěj 1** 14,4 mm (Liu *et al.*, 2017). Práce studující antimikrobiální aktivitu proti bakterii *B. cereus* zjistila inhibiční zónu extraktu z galgánu při difúzní diskové metodě 11 mm, námi byly zjištěny hodnoty 9,1 a 13,4 mm (Oonmetta-aree *et al.*, 2006). Přestože se většina námi naměřených hodnot s hodnotami v člancích lišila, lze rozdíly přisuzovat rozdílné přípravě extraktů, odlišným kmenům bakterií, které byly ke stanovení antimikrobiální aktivity použity i různým podmínkám v laboratoři.

Tabulka 9: Vyhodnocení difúzní diskové metody u vybraných rostlinných extraktů

Inhibiční zóna (mm)											
Testovaný kmen <i>B. cereus</i>	Použitý extrakt	Blank	Rakytník 2	Lékořice 1	Chilli 2	Anýz 1	Blank	Lékořice 2	Šalvěj 1	Tymián 1	Galgán 1
1		7	9	15	9	9	9	11	11	11	9
		8	10	14	9	10	9	13	11	12	9
2		6	9	12	10	12	7	12	11	12	9
		8	11	13	11	9	8	12	11	12	9
3		7	12	16	10	13	10	13	10	12	9
		8	8	14	9	9	10	12	11	12	10
4		8	11	16	11	11	11	12	10	11	9
		8	12	14	10	12	11	12	10	12	10
5		6	11	15	10	8	9	12	10	10	8
		6	12	15	9	9	7	11	9	12	9
6		7	9	12	8	8	7	12	10	9	9
		8	8	13	8	8	7	12	10	10	9
průměr		7,3	10,2	14,1	9,5	9,8	8,8	12,0	10,3	11,3	9,1

* Testovaný kmen – označení bakterie (Tabulka 8), Použitý extrakt – Tabulka 5

Tabulka 10: Vyhodnocení difúzní diskové metody u vybraných rostlinných extraktů

		Inhibiční zóna (mm)											
Testovaný kmen <i>B. cereus</i>	Použitý extrakt	Blank	Rakytník 1	Šalvěj 1	Chilli 1	Blank	Lékořice 2	Chilli 3	Skořice 1	Zázvor 3	Blank	Káva 1	Káva 2
1		11	9	13	10	7	12	8	9	8	9	7	8
		11	9	12	10	6	12	8	10	8	8	11	9
2		9	8	17	10	6	12	9	9	7	10	8	8
		9	7	15	9	6	11	10	9	8	11	10	12
3		13	9	17	10	7	12	11	10	10	12	8	8
		11	9	16	12	7	14	10	9	10	11	12	13
4		12	9	10	10	7	12	10	8	9	7	13	9
		11	9	14	11	7	11	11	8	8	7	9	10
5		10	8	14	10	6	12	7	8	8	6	9	10
		11	8	17	9	6	11	7	8	8	6	8	8
6		12	8	14	9	6	12	9	10	8	6	7	8
		12	8	14	10	7	11	11	9	8	6	9	8
průměr		11,0	8,4	14,4	10,0	6,5	11,8	9,3	8,9	8,3	8,3	9,3	9,3

* Testovaný kmen – označení bakterie (Tabulka 8), Použitý extrakt – Tabulka 5

Tabulka 11: Vyhodnocení difúzní diskové metody u vybraných rostlinných extraktů

		Inhibiční zóna (mm)										
Testovaný kmen <i>B. cereus</i>	Použitý extrakt	Blank	Zázvor 1	Zázvor 2	Tymián 1	Tymián 2	Blank	Tymián 1	Káva 1	Rakytník 1	Šalvěj 1	Galgán 1
1		8	8	9	10	8	7	12	8	10	13	12
		8	8	8	11	9	12	11	8	10	14	12
2		9	8	8	10	7	7	2	7	10	13	15
		9	7	8	9	8	6	11	8	11	14	14
3		10	8	9	10	8	7	12	7	10	13	13
		11	8	9	11	7	6	12	8	12	14	13
4		6	6	7	10	7	6	13	10	11	14	15
		6	6	7	10	7	6	12	11	12	15	13
5		6	6	7	9	8	-	-	-	-	-	-
		6	6	7	10	7	6	12	9	9	15	15
6		12	8	8	9	8	11	10	10	10	15	12
		13	7	8	9	7	7	11	11	11	15	13
průměr		8,7	7,2	7,9	9,8	7,6	7,4	10,7	8,8	10,5	14,1	13,4

* Testovaný kmen – označení bakterie (Tabulka 8), Použitý extrakt – Tabulka 5

3.6.2 Diluční bujónová metoda

Cílem diluční bujónové metody, která byla prováděna nad rámec diplomové práce, bylo zjistit koncentrace extraktů z galgánu, lékořice, tymiánu a šalvěje, při které dojde k inhibici bakterie *B. cereus*. Po vyhodnocení vyočkované samotné suspenze bakterie *B. cereus* bylo zjištěno, že počty kolonií na půdě GTK neodpovídaly připravené denzitě, protože na miskách odpovídaly počty kolonií koncentraci 10^2 CFU/ml, tedy o řád níže. Z toho lze vyvodit, že při experimentu bylo do zkumavek s extrakty reálně zaočkováno $7,1 \cdot 10^2$ CFU/ml bakterie *B. cereus*.

Znatelný byl zákal u všech extraktů s koncentracemi **0,196** a **0,0976** mg/ml. U koncentrace **0,781** mg/ml byl zákal přítomen pouze u extraktu z galgánu. Koncentrace extraktů **25** a **3,125** mg/ml s největší pravděpodobností inhibovaly růst bakterie *B. cereus*, protože ve zkumavkách nebyl viditelný zákal, jako u zkumavek s nižšími koncentracemi testovaných extraktů.

Protože bylo připraveno dvojkové ředění v široké škále, pro ověření inhibice byl na pevné misky vyočkován pouze obsah zkumavek s koncentracemi extraktů **25**, **3,125**, **0,781**, **0,196** a **0,0976** mg/ml. Dle počtů kolonií vyrostlých na miskách byly vypočteny hodnoty CFU/ml bakterie *B. cereus* při dané koncentraci extraktu (Tabulka 12). Při koncentracích extraktů **0,196** a **0,0976** mg/ml nebyl prokázán žádný inhibiční účinek. Při koncentracích **25** a **3,125** mg/ml byl inhibiční účinek u extraktů z lékořice, tymiánu a galgánu. Nejmenší inhibiční účinek vykazoval extrakt ze šalvěje, u kterého i při koncentraci **25** mg/ml bylo množství bakterie *B. cereus* $7,6 \cdot 10^2$ CFU/ml.

Práce zabývající se antimikrobiálními účinky etanolového extraktu z tymiánu uváděla koncentrace MIC v rozmezí **0,075** – **1,100** mg/ml pro testované bakterie (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Mycobacterium smegmatis*) (Liu *et al.*, 2017), některé pak v rozmezí **75** – **150** mg/ml, dle druhu bakterie (Hashish a Amani, 2013). MIC extraktu z tymiánu **0,075** mg/ml uvedená v práci autorů Liu *et al.* (2017), kterou lze přirovnat k námi sledované koncentraci **0,0967** mg/ml, by byla v našem případě nedostačující, protože při této koncentraci tymián nevykazoval žádné inhibiční účinky. Extrakt z šalvěje inhiboval růst různých bakterií v koncentracích **2** – **8** mg/ml (Kamatou *et al.*, 2007). V práci studující antimikrobiální aktivitu etanolového extraktu z lékořice byly uvedeny hodnoty MIC v rozmezí **6,25** – **12,5** mg/ml (Ajagannavar *et al.*, 2014). MIC metanolového extraktu z galgánu byla v článku uvedena v koncentracích **0,04** – **1,28** mg/ml (Liu *et al.*, 2017).

Protože denzita bakterie *B. cereus* byla velice nízká, nepodařilo se antimikrobiální účinky přírodních extraktů vyhodnotit ani stanovit MIC. Porovnáním námi zjištěných inhibičních účinků a MIC uvedených v člancích lze alespoň okomentovat tak, že jistý inhibiční účinek extrakty mají, nelze však s jistotou říci, při jaké koncentraci. Hlavním problémem byla příprava suspenze bakterie *B. cereus*, která neochotně tvoří celistvý zákal. Tato bakterie při inkubaci ve zkumavkách tvoří blanku na hladině pomnožovacího média, a tím nedojde k rovnoměrnému pomnožení v celém objemu zkumavky. Jedinou možností by bylo toto stanovení optimalizovat a zopakovat. Protože toto stanovení bylo prováděno nad rámec diplomové práce, nebyla z časových důvodů tato metoda více optimalizována. Jediný výsledek, který lze z tohoto pokusu interpretovat je, že při koncentraci extraktů 25 mg/ml došlo k inhibici růstu bakterie *B. cereus*. Vzhledem k aktuálnímu a zajímavému tématu je tato práce možným námětem pro další studenty, kteří se chtějí zabývat touto tematikou.

Tabulka 12: Počty *Bacillus cereus* CFU/ml při jednotlivých koncentracích rostlinných extraktů

Testovaný extrakt	Počty <i>Bacillus cereus</i> CFU/ml				
	c = 25 mg/ml	c = 3,125 mg/ml	c = 0,781 mg/ml	c = 0,196 mg/ml	c = 0,0976 mg/ml
Šalvěj	$7,6 \cdot 10^2$	$5,4 \cdot 10^3$	$7,2 \cdot 10^3$	$>300 \cdot 10^4$	$>300 \cdot 10^4$
Lékořice	$1,0 \cdot 10^2$	$3,7 \cdot 10^2$	$6,5 \cdot 10^3$	$>300 \cdot 10^4$	$>300 \cdot 10^4$
Tymián	$1,3 \cdot 10^2$	$2,6 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^4$	$>300 \cdot 10^4$	$>300 \cdot 10^4$
Galgán	$2,6 \cdot 10^2$	$3,7 \cdot 10^2$	$>300 \cdot 10^4$	$>300 \cdot 10^4$	$>300 \cdot 10^4$

3.6.3 Ověření účinnosti vybraného extraktu na reálných vzorcích

Pro ověření účinnosti přírodního extraktu na reálných vzorcích byl použit extrakt z galgánu o koncentraci 100 mg/ml a všech 7 druhů proteinových přesnídávek. Po vyhodnocení vyočkované samotné suspenze bakterie *B. cereus* bylo zjištěno, že počty kolonií na půdě GTK neodpovídaly připravené denzitě, protože na miskách počty kolonií odpovídaly koncentraci 10^2 CFU/ml. U všech vzorků proteinových přesnídávek byla zjištěna hodnota bakterie *B. cereus* menší než $1,0 \cdot 10^2$ CFU/g (Tabulka 17 v příloze). Z těchto výsledků nelze vyvodit, že extrakt z galgánu o koncentraci 100 mg/ml měl inhibiční účinky. Vysvětlením pro nepřítomnost bakterie *B. cereus* ve vzorcích je, že suspenze, která byla do reálných vzorků zaočkována nebyla vlivem homogenity vzorku správně rozptýlena. Také nebyl zaznamenán rozdíl v počtech při časovém rozestupu. Ke zjištění vhodné koncentrace extraktů pro použití v reálných vzorcích bude nutné provést další testování, které by zahrnovalo přípravu směsi s extraktem již ve výrobě, aby došlo k dostatečnému rozptýlení za současného posouzení vlivu extraktu ve směsi po pasteraci přesnídávek. V praxi je však použitá koncentrace 100 mg/ml extraktu příliš vysoká a reálná příprava takové koncentrace by vyžadovala vysokou spotřebu surovin na přípravu extraktu, což by prakticky i cenově bylo nevýhodné. V článku studujícím antimikrobiální aktivitu galgánu proti bakterii *Staphylococcus aureus* byla zjištěna hodnota MIC 0,325 mg/ml (Oonmetta-aree *et al.*, 2006).

3.7 Stanovení aktivity vody

Aktivita vody byla změřena u vzorků proteinových předsírávek pouze pro ověření, a to z důvodu, zda použít stanovení pro kvasinky a plísň s nižší (ČSN EN ISO 21527-2) či vyšší (ČSN EN ISO 21527-1) aktivitou vody. Hodnoty u všech vzorků byly právě okolo hodnoty 0,95 (Tabulka 13). Kvasinky a plísň byly nakonec stanoveny dle normy ČSN EN ISO 21527-1.

Tabulka 13: Aktivita vody u proteinových předsírávek

Vzorek	a_w
1-A	0,948
2-B	0,958
3-C	0,952
4-A	0,949
5-B	0,957
6-C	0,953
7-A	0,950

*Vzorek – označení vzorku (Tabulka 2)

4 ZÁVĚR

V diplomové práci byla nejprve vypracována rešerše zaměřující se na alternativní směr výživy, konkrétně na vysokoproteinovou dietu. Dále bylo popsáno několik méně známých druhů olejů, mouk, nebo surovin jako syrovátka a kasein, které jsou čím dál více zařazovány do jídelníčku a díky svému složení mají příznivé účinky na lidské zdraví. Rešerše se také zaměřuje na několik druhů rostlin, které díky obsahu polyfenolů a jiných chemických látek uvedených v teorii, mohou vykazovat antimikrobiální aktivitu a zároveň posilují organismus člověka.

Součástí experimentu byl monitoring přítomnosti mikroorganismů u 7 druhů proteinových přesnídávek, které se lišily technologií přípravy a svým složením. V horizontu půl roku byly prováděny mikrobiologické rozборы, jenž sledovaly počty přítomných mikroorganismů, a bylo zjištěno, že v převažujícím počtu se ve vzorcích přesnídávek vyskytovala bakterie *Bacillus cereus*. Tato bakterie může při vysokých koncentracích produkovat dva druhy enterotoxinů, které mohou způsobovat zažívací potíže. Právě bakterie *Bacillus cereus* byla z přesnídávek vyizolována a použita ke sledování antimikrobiální aktivity u přírodních extraktů.

V experimentální části byly testovány etanolové rostlinné extrakty diskovou difúzní metodou. Největší inhibiční účinky byly zjištěny u extraktů z lékořice, galgánu, tymiánu a šalvěže, u kterých byla provedena bujónová diluční metoda. Extrakt z galgánu byl také použit k posouzení inhibice bakterie *Bacillus cereus* v reálných vzorcích přesnídávek. U diluční bujónové metody se nepodařilo stanovit přesnou minimální inhibiční koncentraci u sledovaných extraktů. Příčinou byla obtížná a nepřesná příprava suspenze bakterie *Bacillus cereus*. Tato bakterie se v tekutých půdách neochotně pomnožuje a tvoří slizovitou blanku na hladině média ve zkumavce, což způsobí nehomogenní pomnožení v celém objemu pomnožovacího média.

Výsledkem této práce je, že počty mikroorganismů, které kontaminovaly vzorky proteinových přesnídávek, s rostoucím časem klesaly. Již po 4 měsících byl celkový počet mikroorganismů konstatní a nepřesáhl hodnotu 10^2 CFU/g, stejně tak jako počty bakterie *Bacillus cereus*. Ve vzorcích přesnídávek nebyly přítomny žádné kvasinky, ani enterokoky. Pouze u dvou vzorků byly identifikovány plísňe, které byly s největší pravděpodobností kontaminace z okolního prostředí.

Z prováděné difúzní diskové metody lze usoudit, že přírodní extrakty vykazují antimikrobiální účinek. U extraktů z galgánu, lékořice, tymiánu a šalvěje se však nepodařilo z nedostatku extraktů potřebných k analýze a z časových důvodů stanovit MIC. Na rozdíl od technologických procesů, jako pasterace, při které dochází ke znehodnocení cenných látek v potravinách (enzymy, bílkoviny), přírodní extrakty v nízkých koncentracích neovlivňují sensorické vlastnosti výrobku a jejich příprava není technologicky náročná. Díky pestrosti a rozmanitosti použití přírodních extraktů by se další studium antimikrobiální aktivity mohlo stát předmětem výzkumu dalšími studenty.

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

A OMOLO, M., Antimicrobial Properties of Chili Peppers. *Journal of Infectious Diseases and Therapy*, [online], 2014, vol. 2(4), [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.4172/2332-0877.1000145, ISSN 23320877

ADAM, K., Sivropoulou, A., Kokkini S., Lanaras, T., Arsenakis, M., Antifungal Activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* , and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [online], 1998, vol. 46(5), 139-1745, 1739-1745, [cit. 2017-12-07]. DOI: 10.1021/jf9708296, ISSN 0021-8561

AJAGANNAVAR , S. L., Battur, H., Shamarao, S., Sivakumar, V., Patil, P. U., Effect of Aqueous and Alcoholic Licorice (*Glycyrrhiza Glabra*) Root Extract Against *Streptococcus Mutans* and *Lactobacillus Acidophilus* in Comparison to Chlorhexidine: An In Vitro Study. *Journal of International Oral Health*, 2014, vol. 6, 29–34

ÅKERBERG, Ch., Zacchi G., An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. *Bioresource Technology*, [online], 2000, vol. 75, 119-126 [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1016/S0960-8524(00)00057-2, ISSN 09608524

ANTONIO, J., Peacock, C., Ellerbroek, A., The effects of consuming a high protein diet (4.4 g/kg/d) on body composition in resistance-trained individuals. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, [online], 2014, vol. 11(1), [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1186/1550-2783-11-19, ISSN 1550-2783

ARAYA, H., Hills, J., Alvina, M., Vera, G., Short-term satiety in preschool children: A comparison between high protein meal and a high complex carbohydrate meal. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2000, vol. 51, 119-124

ATEB, D., Erdo Urul O., Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts. *Turk. J.Biol.* , [online], 2003 , vol. 27, 157-162

AYERZA JR., R., Coates, W., Effect of Dietary α -Linolenic Fatty Acid Derived from Chia when Fed as Ground Seed, Whole Seed and Oil on Lipid Content and Fatty Acid Composition of Rat Plasma. *Annals of Nutrition and Metabolism*, [online], 2007, vol. 51(1), 27-34, [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1159/000100818, ISSN 0250-6807

BAEK, J.J., Suyong, L., Functional characterization of brown rice flour in an extruded noodle system. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, [online], 2014, vol. 57(4), 435-440, [cit. 2018-02-28]. DOI: 10.1007/s13765-014-4102-4, ISSN 1738-2203

BACON, K., Boyer, R., Denbow, C., Evaluation of different solvents to extract antibacterial compounds from jalapeño peppers. *Food Science & Nutrition*, [online], 2017, vol. 5(3), 497-503, [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1002/fsn3.423, ISSN 20487177

BANAN KHOJASTEH, S.M., Javanmard Khameneh, R., A Review on Medicinal Plants Used for Improvement of Spermatogenesis. *Biology and Medicine*, [online], 2016, vol. 08(04), [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.4172/0974-8369.1000292. ISSN 09748369

BEDDOWS, G., Charanjit Jagait, M., Clifford. Preservation of alpha-tocopherol in sunflower oil by herbs and spices. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, [online], 2009, vol. 51(5), 327-339, [cit. 2017-12-28]. DOI: 10.1080/096374800426920, ISSN 0963-7486

BEHALL, K. M., Scholfield, D., Hallfrisch, J., Whole-Grain Diets Reduce Blood Pressure in Mildly Hypercholesterolemic Men and Women. *Journal of the American Dietetic Association*, [online], 2006, vol. 106(9), 1445-1449, [cit. 2018-02-28]. DOI: 10.1016/j.jada.2006.06.010, ISSN 00028223

BENSON, K. F., Beaman, J.I., OU, B., Okubena, A., Okubena, O., Jensen, G.S., West African Sorghum bicolor Leaf Sheaths Have Anti-Inflammatory and Immune-Modulating Properties In Vitro. *Journal of Medicinal Food*, [online], 2013, vol. 16(3), 230-238, [cit. 2018-03-03]. DOI: 10.1089/jmf.2012.0214, ISSN 1096-620X

BHAGAVATHY, Sumathi, S. P., Sherene Jancy, B., Green algae *Chlorococcum humicola*- a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, [online], 2011, vol. 1(1), 1-7, [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.1016/S2221-1691(11)60111-1, ISSN 22211691

BHATTACHARYA, A., Chattopadhyay, A., Mazumdar, D., Chakravarty, Pal, A. S., Antioxidant Constituents and Enzyme Activities in Chilli Peppers. *International Journal of Vegetable Science*, [online], 2010, vol. 16(3), 201-211, [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1080/19315260903529709, ISSN 1931-5260

BLOMHOFF, R., Carlsen M. H., Andersen L.F., Jacobs, D. R., Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *British Journal of Nutrition*, [online], 2006, vol. 96, 52, [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1017/BJN20061864, ISSN 0007-1145

BOIRIE, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, M.P., Maubois, J.L., Beaufriere, B., Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proclamations of National Academy of Sciences*, 1997, vol. 94, 14930-14935

BOZIN, B., Mimica-Dukic, N., Samoljik, I., Jovin, E., Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [online], 2007, vol. 55(19), 7879-7885, [cit. 2018-01-30]. DOI: 10.1021/jf0715323, ISSN 0021-8561

BOZIN, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., Anackov, G., Characterization of the Volatile Composition of Essential Oils of Some Lamiaceae Spices and the Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Entire Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [online]. 2006, vol. 54(5), 1822-1828, [cit. 2017-12-28]. DOI: 10.1021/jf051922u, ISSN 0021-8561

BROOKS, J. D., Ward, W., Lewis, J., Hilditch, J., Nickell, L., Wong, E., Thompson, L., Supplementation with flaxseed alters estrogen metabolism in postmenopausal women to a greater extent than does supplementation with an equal amount of soy. *The American Journal of Clinical Nutrition*, [online], 2004, vol. 79(2), 318-325, [cit. 2018-03-11]. DOI: 10.1093/ajcn/79.2.318, ISSN 0002-9165

BURTON, G., Ingold, K., Beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, [online], 1984, vol. 224, 569-573, [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1126/science.6710156, ISSN 0036-8075

CORELLA, D., Estruch, R., Lamuela-Raventos, R.M., Medina-Remón, A., Martínez-González, M.A., Pintó, X., Quintana, M., Ros, E., Valls-Pedret, C., Polyphenol-rich foods in the Mediterranean diet are associated with better cognitive function in elderly subjects at high cardiovascular risk. *Journal of Alzheimer's disease*, 2012, vol. 29(4), 773-782

CONOUS, G., Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Research*, 2000, vol. 20, 4785-4792

CROXATTO, A., Prodhom, G., Greub, G., Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *Microbiology Reviews*, [online], 2012, vol. 36(2), 380-407, [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x, ISSN 1574-6976

CUNDIFF, D., Harris, W., 2006. Case report of 5 siblings: malnutrition Rickets DiGeorge syndrome Developmental delay, *Nutrition Journal*, [online], vol. 5(1), [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1186/1475-2891-5-1, ISSN 1475-2891

ČSN EN ISO 4833-2, Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů – Část 2: Technika roztěrem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. Praha: Český normalizační institut

ČSN EN ISO 7932:2004, Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu presumptivního *Bacillus cereus* – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. Praha: Český normalizační institut

ČSN ISO 21527-1, Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísní – Část 1: Technika počítání kolonií u výrobků s aktivitou vody vyšší než 0,95. Praha: Český normalizační institut

DAGLIA, M.Papetti, A., Gregotti, C., Berté, F., Gazzani, G., In Vitro Antioxidant and ex Vivo Protective Activities of Green and Roasted Coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [online], 2000, vol. 48, 1449-1454, [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1021/jf990510g, ISSN 0021-8561

DECLAN TROY, [ET AL.], Harnessing and exploiting global opportunities: 52nd International Congress of Meat Science and Technology : [13th -18th August, 2006, Dublin, Ireland], 2006. ISBN 9789086860104

DELGADO-VARGAS, F., Jiménez, A. R., Paredes-López, O., Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, [online], 2000, vol. 40(3), 173-289, [cit. 2017-12-12]. DOI: 10.1080/10408690091189257, ISSN 1040-8398

DENG, G. F., Xu, X. R., Zhang, Y., Li, D., Gan, R. Y., Li, H. B., Phenolic Compounds and Bioactivities of Pigmented Rice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, [online], 2013, vol. 53(3), 296-306, [cit. 2018-02-28]. DOI: 10.1080/10408398.2010.529624, ISSN 1040-8398

DEUTZ, N. E. P., Bruins, M. J., Soeters, P. B., Infusion of soy and casein protein meals affects interorgan amino acid metabolism and urea kinetics differently in pigs. *Journal of Nutrition*, 1998, vol. 128, 2435-2445

DEVI, P. B., Vijayabharathi, R., Sathyabama, S., Malleshi, N. G., Priyadharasini, V. B., Health benefits of finger millet (*Eleusine coracana* L.) polyphenols and dietary fiber: a review. *Journal of Food Science and Technology*, [online], 2014, vol. 51(6), 1021-1040, [cit. 2018-03-03]. DOI: 10.1007/s13197-011-0584-9, ISSN 0022-1155

DE WIT, J.N., Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. *Journal of Dairy Science*, [online], 1998, vol. 81(3), 597-608, [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75613-9, ISSN 00220302

DU, J., Cullen, J. J., Buettner, G. R., Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta, Reviews on Cancer*, [online], 2012, vol. 1822, 443-457, [cit. 2017-12-12]. DOI: 10.1016/j.bbcan.2012.06.003, ISSN 0304419x

DYKES, L., Rooney, W. L., Sorghum and millet phenols and antioxidants. *Journal of Cereal Science*, [online], 2006, vol. 44(3), 236-251, [cit. 2018-03-03]. DOI: 10.1016/j.jcs.2006.06.007, ISSN 07335210

EHLING-SCHULZ, M., Fricker, M., Scherer, M., *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Molecular Nutrition & Food Research*, [online], 2004, vol. 48(7), 479-487, [cit. 2018-01-29]. DOI: 10.1002/mnfr.200400055, ISSN 1613-4125

EVANS, H. M., Bishop, K. S., On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction, *Science*, [online], 1922, vol. 56, 650-651, [cit. 2017-12-11]. DOI: 10.1126/science.56.1458.650, ISSN 0036-8075

EVERS, C., Adriaanse, M., Ridder, D., 2013. Good mood food. Positive emotion as a neglected trigger for food intake. *Appetite*, [online], 68, 1-7, [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/j.appet.2013.04.007, ISSN 01956663

FICKER, C., Smith, M. L., Akpagana, K., Gbeassor, M., Zhang, J., Durst, T., Assabgiu, R. Arnason, J. T., Bioassay-guided isolation and identification of antifungal compounds from ginger. *Phytotherapy Research*, [online], 2003, vol.17(8), 897-902, [cit. 2017-12-12]. DOI: 10.1002/ptr.1335, ISSN 0951-418x

FLOYD, D., The hot book of chillies. 2007, [1st ed.], 10-11. ISBN 1845370341

FOEGEDING, E., Davis, P. J., Doucet, D., 2002. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, [online], vol. 13, 151-159, [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/S0924-2244(02)00111-5, ISSN 09242244

FORMANEK, Z., Kerry, J. P, Higgins, F. M. Buckley, D. J., Morrissey, P. A., Farkas, J., Addition of synthetic and natural antioxidants to α -tocopheryl acetate supplemented beef patties: effects of antioxidants and packaging on lipid oxidation. *Meat Science*, [online], 2001, vol. 58(4), 337-341, [cit. 2017-12-12]. DOI: 10.1016/S0309-1740(00)00149-2, ISSN 03091740

FRASER, P. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, [online], 2004, vol. 43, 228-265, [cit. 2017-12-12]. DOI: 10.1016/j.plipres.2003.10.002, ISSN 01637827

FRATIANNI, F., De Martino, L., Melona, A., De Feo, V., Coppola, R., Nazzaro, F., Preservation of Chicken Breast Meat Treated with Thyme and Balm Essential Oils. *Journal of Food Science*, [online], 2010, vol. 75(8), 528-535, [cit. 2017-12-28]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01791.x, ISSN 00221147

FRESCO, P., Borges, F., Diniz, C., Marques, M. P. M., New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medicinal Research Reviews*. [online], 2006, vol. 26(6), 747-766, [cit. 2017-12-10]. DOI: 10.1002/med.20060, ISSN 0198-6325

GANJU, L., Padwad, Y., Singh, R., Anti-inflammatory activity of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves. *International Immunopharmacology*, [online], 2005, vol. 5(12), 1675-1684 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.intimp.2005.03.017, ISSN 15675769

GAO, Z. L., 2003. Effect of Sea buckthorn on liver fibrosis: A clinical study. *World Journal of Gastroenterology*, [online], vol. 9(7), 1615-1620, [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.3748/wjg.v9.i7.1615, ISSN 1007-9327

GEISER, M., The wonders of whey protein. *NSCA's Performance Training Journal*, 2005, vol. 2, 13-15

GOYAL, A., Sharma, V., Upadhyay, N., Gill, S., Sihag, M., Sharma, V., Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. *Journal of Food Science and Technology*, [online], 2014, vol. 51(9), 1633-1653, [cit. 2018-03-11]. DOI: 10.1007/s13197-013-1247-9, ISSN 0022-1155

GÜLÇİN, İ., Oktay, M., Kirecci, E., Kufreviöglu, O. I., Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, [online], 2003, vol. 83(3), 371-382, [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1016/S0308-8146(03)00098-0, ISSN 03088146

GWIRTZ, J. A., Garcia-Casal, M. N., Processing maize flour and corn meal food products. *Annals of the New York Academy of Sciences*, [online], 2014, vol. 1312(1), 66-75, [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1111/nyas.12299. ISSN 00778923

Ha, E., Zemel, M. B., Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2003, vol. 14, 251-258

HABSAH, M., Amran, M., Mackeen, M. M., Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. *Journal of Ethnopharmacology*, [online], 2000, vol. 72(3), 403-410, [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.1016/S0378-8741(00)00223-3, ISSN 03788741

HAMMER, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V., Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, [online], 1999, vol. 86(6), 985-990, [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x, ISSN 1364-5072

HASHISH, M., Amani, A., 2013, Antibacterial activity of medicinal herb and spice extracts. *International Journal of Food, Nutrition and Public Health*, 2013, vol. 6., 269-290

HATHORN, CH. S., Sanders, T. H., Flavor and Antioxidant Capacity of Peanut Paste and Peanut Butter Supplemented with Peanut Skins. *Journal of Food Science*, [online], 2012, vol. 77(11), 407-411, [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02953.x, ISSN 00221147

HORIUCHI, K., Shiota, S., Kuroda, T., Hatano, T., Yoshida, T., Tsuchiya, T., Potentiation of Antimicrobial Activity of Aminoglycosides by Carnosol from *Salvia officinalis*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, [online], 2007, vol. 30(2), 287-290, [cit. 2018-01-30]. DOI: 10.1248/bpb.30.287. ISSN 0918-6158

CHARLES, D. J., Antioxidant properties of spices, herbs and other sources. New York: *Springer Science+Business Media*, 2013. ISBN 978-1-4614-4309-4, 39-536

IWAMI, M., Shina, T., Hirayama, H., Intraluminal administration of zingerol, a non-pungent analogue of zingerone, inhibits colonic motility in rats. *Biomedical Research*, [online], 2011, vol. 32(2), 181-185, [cit. 2017-12-12]. DOI: 10.2220/biomedres.32.181, ISSN 1880-313x

JAY R. H., Falvo, J. M., Protein - Which is Best Journal of Sports Science and Medicine, 2014, vol. 3, 118 – 130

JAYAPRAKASHA, G. K., Selvi, T., Sakariah, K. K., Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International*, [online], 2003, 36(2), 117-122, [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.1016/S0963-9969(02)00116-3, ISSN 09639969

JOHNSTON, C. S., Tjonn, S. L., Swan, P. D., High- protein, low-fat diets are effective for weight loss and favorably alter biomarkers in healthy adults. *Journal of Nutrition*, 2004, vol. 134, 586-591

JORGENSEN, J. H., Turnidge, J. D., Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods, Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition, *American Society of Microbiology*, [online], 2015, 1253-1273, [cit. 2018-04-16]

JUNG, Y. CH., Kim, M. E., Yoon, J. H., Park, P. R., Youn, H-Y., Lee, H.-W., Lee, J-S., Anti-inflammatory effects of galangin on lipopolysaccharide-activated macrophages via ERK and NF- κ B pathway regulation. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, [online]. 2014, vol. 36(6), 426-432, [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.3109/08923973.2014.968257, ISSN 0892-3973

KAM, J., Puranik, S., Yadav, R., Manwaring, H. R., Pierre, S., Srivastava, R. K., Yadav, R. S., Dietary Interventions for Type 2 Diabetes: How Millet Comes to Help. *Frontiers in Plant Science*, [online], 2016, vol. 7, [cit. 2018-03-03]. DOI: 10.3389/fpls.2016.01454, ISSN 1664-462X

KAMATOU, G.P.P., Van Vuuren, S. F., 2007. Antibacterial and antimycobacterial activities of South African *Salvia* species and isolated compounds from *S. chamelaeagnea*. *South African Journal of Botany* [online]. vol. 73(4), 552-557 [cit. 2018-04-25]. DOI: 10.1016/j.sajb.2007.05.001, ISSN 02546299

KATAYA, H. H, Hamza, A., Ramadan G. A., Khasawneh, M. A, Effect of licorice extract on the complications of diabetes nephropathy in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, [online], 2011, vol. 34(2), 101-108, [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.3109/01480545.2010.510524. ISSN 0148-0545

KEREGERO, M. M., Mtebe, K., Acceptability of wheat-sorghum composite flour products: An assessment. *Plant Foods for Human Nutrition*, [online], 1994, vol. 46(4), 305-312, [cit. 2018-03-03]. DOI: 10.1007/BF01088429, ISSN 0921-9668

KIM, J., Park, Y., Anti-diabetic effect of sorghum extract on hepatic gluconeogenesis of streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutrition & Metabolism*, [online], 2012, vol. 9(1), [cit. 2018-03-03]. DOI: 10.1186/1743-7075-9-106. ISSN 1743-7075

KIM, J. E., O'Connor, L., Sands, L., 2016. Effects of dietary protein intake on body composition changes after weight loss in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition Reviews*, [online], vol. 74(3), 210-224, [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1093/nutrit/nuv065. ISSN 0029-6643

KIM, M. H., Review on Rice Flour Manufacturing and Utilization. *Journal of Biosystems Engineering*, [online], 2013, vol. 38(2), 103-112, [cit. 2018-02-28]. DOI: 10.5307/JBE.2013.38.2.103, ISSN 1738-1266

KORBELÁŘ, J., Endris Z., Naše rostliny v lékařství. 5. vyd., Praha: *Avicenum*, 1981, 362-418

KREFT, I., Fabjan N., Yasumoto, K., Rutin content in buckwheat food materials and products. *Food Chemistry*, [online], 2006, vol. 98(3), 508-512, [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.05.081, ISSN 03088146

KUNDU, J. K., Na, H.-K., Surh Y.-J., Ginger-Derived Phenolic Substances with Cancer Preventive and Therapeutic Potential. *Food Factors for Health Promotion*, [online], 2009, vol. 61, 182-192, [cit. 2017-12-12]. DOI: 10.1159/000212750, ISBN 978-3-8055-9097-6

KUNOVÁ, V., Zdravá výživa a hubnutí v otázkách a odpovědích. Praha: *Grada*, 2005, Zdraví & životní styl, 43-105, ISBN 8024710501

LAVELLE, C. L., Hunt, M. C., Kropf, D. H., Display Life and Internal Cooked Color of Ground Beef from Vitamin E-Supplemented Steers. *Journal of Food Science*, [online], 1995, vol. 60(6), 1175-1178, [cit. 2017-12-12]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1995.tb04549.x, ISSN 0022-1147

LEE, B. H., Weller, C., Cuppett, S., Carr, T., Grain Sorghum Lipids: Extraction, Characterization, and Health Potential, *Advances in Cereal Science: Implications to Food Processing and Health Promotion*, [online], 2011, vol. 1089, 149-170, [cit. 2018-03-03]. DOI: 10.1021/bk-2011-1089.ch008., ISBN 0-8412-2636-9

LIM, Ch., Webster, C. D., Lee, Ch-S., Alternative protein sources in aquaculture diets. New York: *Haworth Press*, 2008, 12-50, ISBN 9781560221487

LIU, Q., Meng, X., Li, Y., Zhao, C-N., , Tang, G-Y., Li, H-B., Antibacterial and Antifungal Activities of Spices. *International Journal of Molecular Sciences*, [online], 2017, vol. 18(6), [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.3390/ijms18061283, ISSN 1422-0067

MACLEAN, D. A., Graham, T.E., Saltin, B., Branched-chain amino acids augment ammonia metabolism while attenuating protein breakdown during exercise. *American Journal of Physiology*, 1995, vol. 267, 1010-1022

MARINELI, R., Moraes, É-A., Lenquiste, S-A., Godoy, A-T., Eberlin, M-N., Marostica, R., Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *LWT - Food Science and Technology*, [online], 2014, vol. 59(2), 1304-1310, [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.04.014. ISSN 00236438.

MASUDA, Y., Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Nakatani, N., Antioxidant properties of gingerol related compounds from ginger. *BioFactors*, [online], 2004, vol. 21, 293-296, [cit. 2017-12-12]. DOI: 10.1002/biof.552210157, ISSN 09516433

MATUSCHEK, E., Brown, D.F.J., Kahlmeter, G., Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, [online], 2014, vol. 20(4), 255-266, [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1111/1469-0691.12373, ISSN 1198743X

MAYACHIEW, P., Devahastin, S., Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *Food Science and Technology*, [online], 2008, vol. 41(7), 1153-1159, [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1016/j.lwt.2007.07.019, ISSN 00236438

MCCLERNON, F. J., Yancy, W. S., Eberstein, J. A., Atkins, R. C., Westman, E. C., The Effects of a Low-Carbohydrate Ketogenic Diet and a Low-Fat Diet on Mood, Hunger, and Other Self-Reported Symptoms, [online], 2007, vol. 15(1), 182-182, [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1038/oby.2007.516, ISSN 1930-7381

MEYER, D., Stasse-Wolthuis, M., The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health. *European Journal of Clinical Nutrition*, [online], 2009, vol. 63(11), 1277-1289, [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1038/ejcn.2009.64, ISSN 0954-3007

MILADI, H.; Zmantar, T.; Chaabouni, Y.; Fedhila, K.; Bakhrouf, A.; Mandouani, K.; Chaieb, K., Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against foodborne pathogens, 2016, vol. 99, 95–100

NABAVI, S., Di Lorenzo, A., Izadi, M., Sobarzo-Sanchez, E., Daglia, M., Antibacterial Effects of Cinnamon: From Farm to Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries. *Nutrients*, [online], 2015, vol. 7(9), 7729-7748, [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.3390/nu7095359, ISSN 2072-6643

NADATHUR, S. R., Wanasundara, J. P. D., Scanlin, L., Sustainable protein sources. Amsterdam: *Academic Press in an imprint of Elsevier*, 2017, 1-7. ISBN 9780128027783

NADER, M., Kais, K., Abdalrasool, A., Antibacterial activity of ginger extracts and its essential oil on some of pathogenic bacteria. *Baghdad Science Journal*, 2010, vol. 7, 1159-1165

NAMPOOTHIRI, S. V., Esakkidurai, T., Pitchumani K., Identification and Quantification of Phenolic Compounds in *Alpinia galanga* and *Alpinia calcarata* and its Relation to Free Radical Quenching Properties: A Comparative Study. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, [online], 2014, vol. 21(2), 140-147, [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1080/10496475.2014.923358, ISSN 1049-6475

Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007 ze dne 5. prosince 2007, kterým se mění nařízení (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. Brusel, Úřední Věstník Evropské Unie.

Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32007R1441>

NEVIN, K. G., Rajamohan, T., Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. *Clinical Biochemistry*, [online], 2004, vol. 37(9), 830-835, [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2004.04.010, ISSN 00099120

NINESS, K. R., Inulin and oligofructose: What are they, 1999, vol. 129, 1402–1406

OKINYO-OWITI, D. P., Dong, Q., Ling, B., Evaluating the cytotoxicity of flaxseed orbitides for potential cancer treatment. *Toxicology Reports*, [online], 2015, vol. 2, 1014-1018, [cit. 2018-03-11]. DOI: 10.1016/j.toxrep.2015.06.011, ISSN 22147500

ONWULATA, Ch., Huth, P., Whey processing, functionality and health benefits. Ames, Iowa: *Wiley-Blackwell.*, 2010, 1-10. ISBN 9780813809038

OONMETTA-AREE, J., Suzuki, T., Gasaluck, P., Eumkeb, G., Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT - Food Science and Technology*, [online], 2006, vol. 39(10), 1214-1220, [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/j.lwt.2005.06.015, ISSN 00236438.

PAIVA, S. A. R., Russell, R. M., B-Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, [online], 1999, vol. 18(5), 426-433, [cit. 2017-12-12]. DOI: 10.1080/07315724.1999.10718880, ISSN 0731-5724

PALOMBO, E. A., Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, [online], 2011, 1-15, [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1093/ecam/nep067, ISSN 1741-427X

PANLASIGUI, L. N., Thompson, L. U., Blood glucose lowering effects of brown rice in normal and diabetic subjects. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, [online], 2009, vol. 57, 151-158, [cit. 2018-02-28]. DOI: 10.1080/09637480500410879, ISSN 0963-7486

PARKER, R. S., Dietary and Biochemical Aspects of Vitamin E, [online], 1989, vol. 33, 157-232 [cit. 2017-12-11]. DOI: 10.1016/S1043-4526(08)60128-X ISBN 9780120164332

PEÑA-RAMOS, A., Xiong, Y., Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties. *Meat Science*, [online], 2016, vol. 64(3), 259-263 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/S0309-1740(02)00187-0, ISSN 03091740

PEUTHERER, J. F., Slack, C. B., Greenwood, D., Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie. Vyd. 1., čes. Praha: *Grada*, 1999, 374-389, ISBN 80-7169-365-0

PIRTTIJÄRVI, T., *Bacillus cereus* in a whey proces, *International Journal of Food Microbiology*, [online], 1998, vol. 44(1-2), 31-41, [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/S0168-1605(98)00117-2, ISSN 01681605.

POURAFSHAR, S., Rosentrater, A. K., Krishnan, P. G., Using alternative flours as partial replacement of barbari bread formulation (traditional Iranian bread). *Journal of Food Science and Technology*, [online], 2015, vol. 52(9), 5691-5699, [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1007/s13197-014-1640-z, ISSN 0022-1155

PRIFTIS, A., Stagos, D., Konstantinopoulos, K., Tsitsimpikou, Ch., Spandidos, D. A., Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Molecular Medicine Reports*, [online], 2015, vol. 12(5), 7293-7302, [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.3892/mmr.2015.4377, ISSN 1791-2997

QUETTIER-DELEU, CH., Gressier, B., Vasseur, J., Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, [online], 2000, vol. 72(1-2), 35-42, [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1016/S0378-8741(00)00196-3 ISSN 03788741

RAFII, M., Chapman K., Ownes, J., Dietary Protein Requirement of Female Adults 65 Years Determined by the Indicator Amino Acid Oxidation Technique Is Higher Than Current Recommendations. *The Journal of Nutrition*, [online], 2016, vol. 145(1), 18-24, [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.3945/jn.114.197517, ISSN 1541-6100

RAY, B., Fundamental food microbiology. 2nd ed. Boca Raton: *CRC Press*, 2001, 391-395, ISBN 0-8493-0045-2

ROS, E., Health Benefits of Nut Consumption. *Nutrients*, [online], 2010, vol. 2(7), 652-682, [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.3390/nu2070652, ISSN 2072-6643

SARRÍAS, J., Elimination of *Bacillus cereus* contamination in raw rice by electron beam irradiation. *Food Microbiology*, [online], 2003, vol. 20(3), 327-332, [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/S0740-0020(02)00124-7, ISSN 07400020

SEN, CH. K., Khanna, S., Roy, S., Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. *Life Sciences*, [online], 2006, vol. 78(18), 2088-2098, [cit. 2017-12-12]. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.12.001, ISSN 00243205

SHAN, B., Cai, Y-Z., Brooks, J., Corke, H., Yi-Zhong C., The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, [online], 2007, vol. 117(1), 112-119, [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.03.003, ISSN 01681605

SHARMA, R., SHAH, N., Health benefits of whey proteins. *Nutrafoods*, [online], 2010, vol. 9(4), 39-45, [cit. 2018-02-27]. DOI: 10.1007/BF03223347, ISSN 1827-8590

SHELEF, L. A., ANTIMICROBIAL EFFECTS OF SPICES. *Journal of Food Safety*, [online], 1984, vol. 6(1), 29-44, [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1111/j.1745-4565.1984.tb00477, ISSN 0149-6085

SINGH, G., Kapoor, I. P. S., Singh, P., De Heluani, C. S., Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology*, [online], 2008, vol. 46(10), 3295-3302, [cit. 2017-12-12]. DOI: 10.1016/j.fct.2008.07.017, ISSN 02786915

SKOLNIK, H., Chernus, A., Výživa pro maximální sportovní výkon: správně načasovaný jídelníček. Praha: *Grada*, 2011, 105-220. ISBN 978-80-247-3847-5

SONG, S. J., Choi, S., Park, T., 2014, Decaffeinated Green Coffee Bean Extract Attenuates Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance in Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, [online], 2014, vol. 2014, 1-14, [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1155/2014/718379, ISSN 1741-427X

SPILLER, G. A., Miller, A., Olivera, K., Effects of plant-based diets high in raw or roasted almonds, or roasted almond butter on serum lipoproteins in humans. *Journal of the American College of Nutrition*, [online], 2003, vol. 22(3), 195–200

STAHL, W., Sies, H., Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, [online], 2003, vol. 24(6), 345-351, [cit. 2017-12-12]. DOI: 10.1016/S0098-2997(03)00030-X, ISSN 00982997

STENFORS ARNESEN, L. P., Fagerlund, A., Granum, E. P., From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins, [online], 2008, vol. 32(4), 579-606, [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x, ISSN 1574-6976

SU-QUE, L., Ya-Ning, M., Xing-Pu, L., Ye-Lun, Z., Effect of consumption of micronutrient enriched wheat steamed bread on postprandial plasma glucose in healthy and type 2 diabetic subjects. *Nutrition Journal*, [online], 2013, vol. 12(1), [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1186/1475-2891-12-64, ISSN 1475-2891

SUÁREZ-QUIROZ, M. L., Taillefer, W., Lopez Mendez, E. M., Gonzales-Rios, O., Vileneuve, P., Figueroa-Espinoza, M. C., Antibacterial Activity and Antifungal and Anti-Mycotoxigenic Activities Against *Aspergillus flavus* and *A. ochraceus* of Green Coffee Chlorogenic Acids and Dodecyl Chlorogenates. *Journal of Food Safety*, [online], 2013, vol. 33(3), 360-368, [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1111/jfs.12060, ISSN 01496085

TAJKARIMI, M.M., Ibrahim, S. A., Cliver, D. O., Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, [online], 2010, vol. 21(9), 1199-1218, [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.02.003, ISSN 09567135

TRUCKESS, M., Stack, M. E., Nesheim, S., Albert, R. H., Romer, T. R., Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in corn, almonds, brazil nuts, peanuts, and pistachio nuts: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 1994, vol. 77, 1512-21

USTUNOL, Z., Applied Food Protein Chemistry, Chichester, UK: *John Wiley & Sons*, 2014, 363-370[cit. 2018-04-17]. ISBN 9781118860588

VOTAVA, M., Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody. Brno: *Neptun*, 2010, 317-320 ISBN 978-80-86850-04-7

Vyhláška č. 132/2004 Sb., Vyhláška o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení, Praha: Poslanecká sněmovna Parlamentu České republiky

WEBER, P., Bendich, A., Schalch, W., Vitamin C and human health - A review of recent data relevant to human requirements. International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. *Journal international de vitaminologie et de nutrition*, 1996, vol. 66., 19-30

WEERAKKODY, N. S., Caffin, N., Lambert, L., Turner, M. S., Turner, M. S., Dykes, G., Synergistic antimicrobial activity of galangal (*Alpinia galanga*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and lemon iron bark (*Eucalyptus staigerana*) extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, [online], 2011, vol. 91(3), 461-468, [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1002/jsfa.4206, ISSN 00225142

WHITFORD, D., Proteins: structure and function. Hoboken, NJ: *J. Wiley*, 2005, 1-15, ISBN 978-0471498940

WONG, P., Kitts, D., 2006, Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chemistry*, [online], vol. 97(3), 505-515, [cit. 2018-03-21]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.05.031, ISSN 03088146

WU, J. J., Kastner, C. L., Hunt, M. C., Kropf, D. H., Allen, D. M., Nutritional Effects on Beef Collagen Characteristics and Palatability. *Journal of Animal Science*, [online], 1981, vol. 53(5), 1256-1261, [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.2527/jas1981.5351256x, ISSN 0021-8812

XING, N., Quercetin inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, [online], 2001, vol. 22(3), 409-414, [cit. 2017-12-10]. DOI: 10.1093/carcin/22.3.409, ISSN 14602180

YAMAGATA, K., Tagami, M., Yamori, Y., Dietary polyphenols regulate endothelial function and prevent cardiovascular disease. *Nutrition*, [online], 2015, vol. 31(1), 28-37, [cit. 2017-12-10]. DOI: 10.1016/j.nut.2014.04.011, ISSN 08999007

YANG, R., Wang, L., Yuan, B., Liu, Y., The Pharmacological Activities of Licorice. *Planta Medica*, [online], 2015, vol. 81(18), 1654-1669, [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1055/s-0035-1557893. ISSN 0032-0943

YOGENDRA KUMAR, M. S., Tirpude, R. J., Maheshwari, D. T., Bansal, A., Mirsa, K., Antioxidant and antimicrobial properties of phenolic rich fraction of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves in vitro. *Food Chemistry*, [online], 2013, vol. 141(4), 3443-3450, [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.06.057, ISSN 03088146

YOUNG, S. N., “How to Increase Serotonin in the Human Brain without Drugs.” *Journal of Psychiatry & Neuroscience* , [online], 2007, vol. 32(6), 394–399

ZENG, Q., Lu, Ch., Zhang, X., Jiang, J.G., Isolation and identification of ingredients inducing cancer cell death from the seeds of *Alpinia galanga*, a Chinese spice. *Food & Function*, [online], 2015, vol. 6(2), 431-443, [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1039/C4FO00709C, ISSN 2042-6496

ZHANG, H., Kong, B., Xiong, Y., Sun, X., Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4°C. *Meat Science*, [online], 2009, vol. 81(4), 686-692, [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1016/j.meatsci.2008.11.011, ISSN 03091740

6 PŘÍLOHA



Obrázek 10: Vzorky proteinových přesnídávek (foto autor)

Tabulka 14: Celkové množství enterokoků v CFU/g ve vzorcích proteinových přesnídávek v časovém sledu

Vzorek	První testování	Testování po 2 týdnech	Testování po 1 měsíci
	CFU/g	CFU/g	CFU/g
1-A	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
2-B	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
3-C	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
4-A	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
5-B	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
6-C	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
7-A	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
Vzorek	Testování po 4 měsících	Testování po 5 měsících	Testování po 6 měsících
	CFU/g	CFU/g	CFU/g
1-A	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
2-B	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
3-C	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
4-A	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
5-B	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
6-C	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
7-A	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²

*Vzorek – označení vzorku od výrobce (Tabulka 2)

Tabulka 15: Celkové množství kvasinek v CFU/g ve vzorcích proteinových přísadavek v časovém sledu

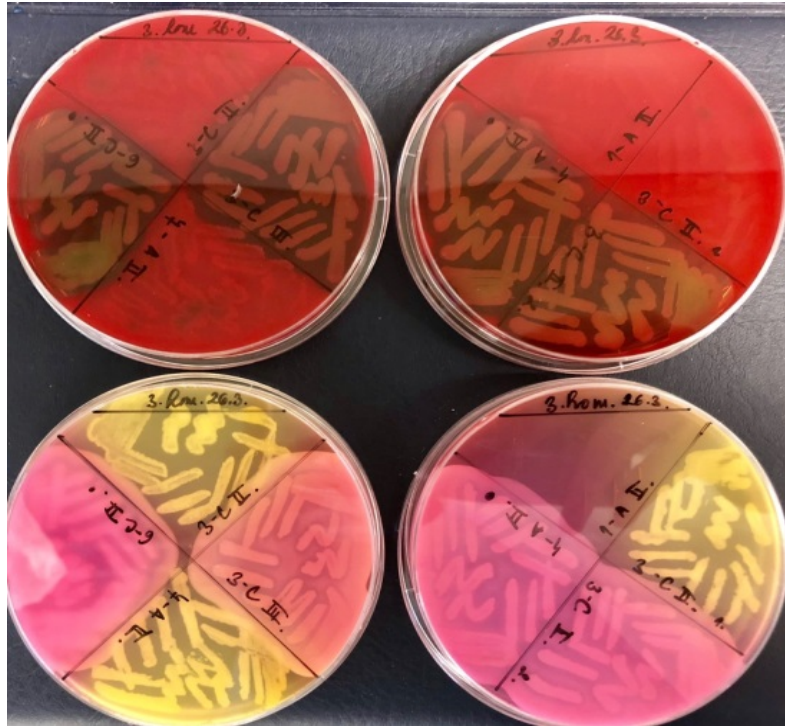
Vzorek	První testování	Testování po 2 týdnech	Testování po 1 měsíci
	CFU/g	CFU/g	CFU/g
1-A	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
2-B	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
3-C	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
4-A	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
5-B	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
6-C	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
7-A	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
Vzorek	Testování po 4 měsících	Testování po 5 měsících	Testování po 6 měsících
	CFU/g	CFU/g	CFU/g
1-A	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
2-B	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
3-C	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
4-A	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
5-B	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
6-C	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
7-A	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²

*Vzorek – označení vzorku od výrobce (Tabulka 2)

Tabulka 16: Celkové množství plísní v CFU/g ve vzorcích proteinových přesnídávek v časovém sledu

Vzorek	První testování	Testování po 2 týdnech	Testování po 1 měsíci
	CFU/g	CFU/g	CFU/g
1-A	$5,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
2-B	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
3-C	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
4-A	$<1,0 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
5-B	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
6-C	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
7-A	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
Vzorek	Testování po 4 měsících	Testování po 5 měsících	Testování po 6 měsících
	CFU/g	CFU/g	CFU/g
1-A	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
2-B	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
3-C	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
4-A	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
5-B	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
6-C	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$
7-A	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$	$<1,0 \cdot 10^2$

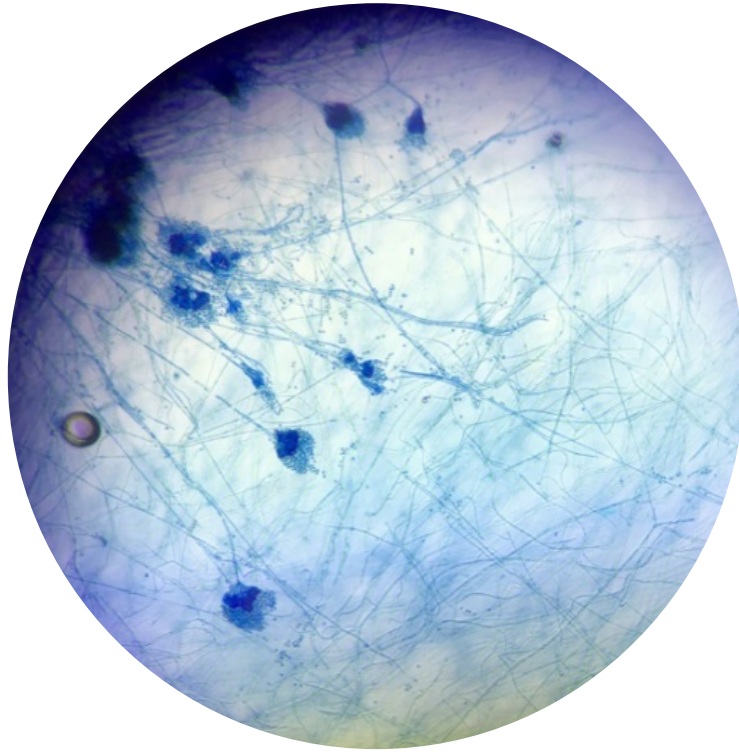
*Vzorek – označení vzorku od výrobce (Tabulka 2)



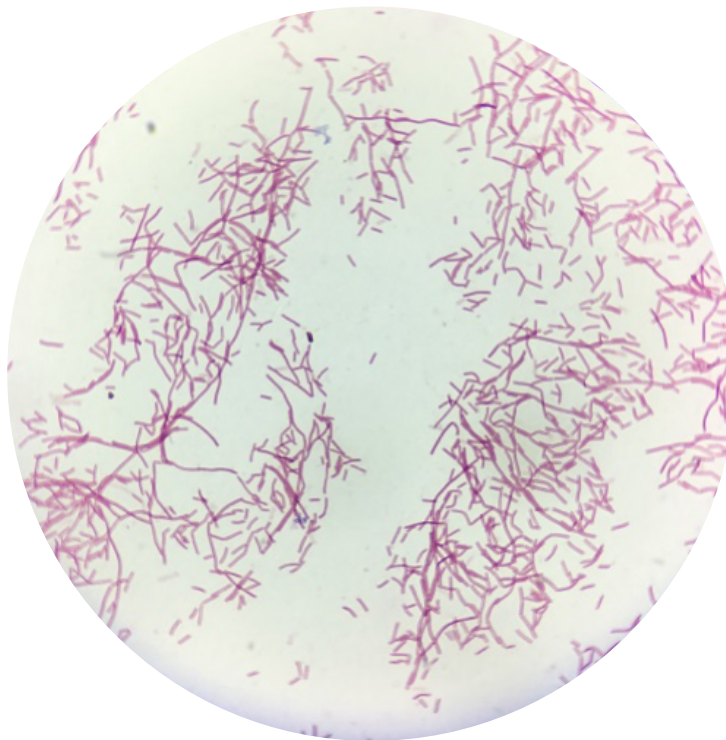
Obrázek 11: G+ tyčinky izolované z proteinových přesnídávek na půdách MYP a KA z testování provedeném po 1 měsíci, 30 °C, 24 hodin (foto autor)



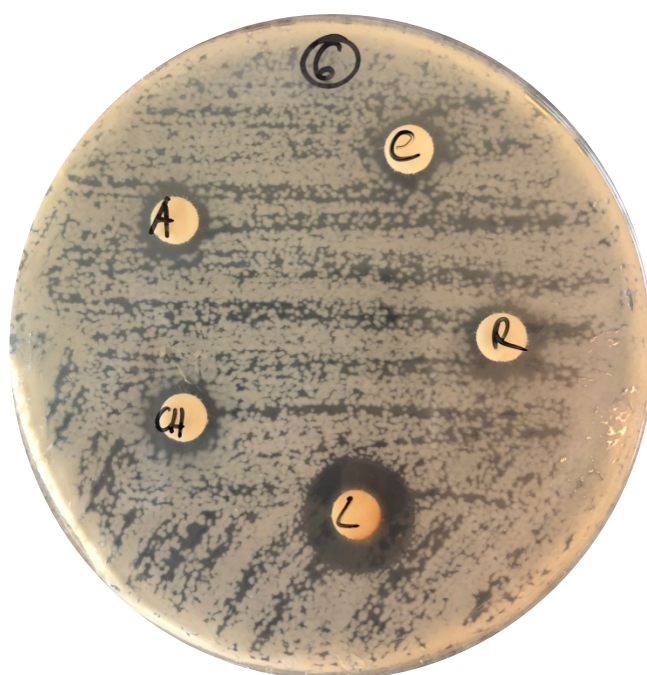
Obrázek 12: Plíseň *Penicillium*, půda DRBC, 25 °C, 3-5 dní, vzorek 1-A, série č. 1, II. ředění (foto autor)



Obrázek 13: Mikroskopický preparát plísně *Penicillium*, vzorek 1-A, série č. 1, zvětšeno 400x (foto autor)



Obrázek 14: Mikroskopický preparát barvení dle Grama bakterie *Bacillus cereus*, zvětšeno 1000x (foto autor)



Obrázek 15: Testování antimikrobiální aktivity difúzní diskovou metodou, půda M-H, 30 °C, 24 hodin (foto autor)

*E – blank (60% etanol); A – Anýz ; L – Lékořice 2; Ch – Chillí 3, R – Rakytník 2

Tabulka 17: Počty *Bacillus cereus* CFU/g v reálných vzorcích proteinových přesnídávek

Vzorek	První testování	Testování po 24 hodinách	Testování po 48 hodinách
	CFU/g	CFU/g	CFU/g
1-A	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
2-B	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
3-C	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
4-A	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
5-B	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
6-C	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²
7-A	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²	<1,0.10 ²

*Vzorek – označení vzorku od výrobce (Tabulka 2)