

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
Fakulta chemicko-technologická

**Sledování mikrobiální stability proteinových přesnídávek**

Bc. Romana Nešporová

Diplomová práce

2019

**UNIVERSITY OF PARDUBICE**  
Faculty of Chemical Technology

**Monitoring microbial stability of protein snacks**

Bc. Romana Nešporová

Diploma thesis

2019

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Romana Nešporová**  
Osobní číslo: **C17486**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Název tématu: **Sledování mikrobiální stability proteinových předsnídávek**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

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

#### Teoretická část:

Zpracujte literární rešerši cílenou na problematiku zdravé výživy. Zaměřte se na suroviny využití v experimentální části. V odborných člancích nalezněte využití přírodních extraktů s antimikrobiálními účinky.

#### Experimentální část:

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.

Extrakt s největším antimikrobiálním účinkem přidejte do reálného vzorku a otestujte jeho účinnost.

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: **5. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2019**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

## **Prohlášení**

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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1.5.2019

Bc. Romana Nešporová

Ráda bych poděkovala Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. za odborné vedení této práce, cenné rady, trpělivost, vstřícnost a čas věnovaný této práci. Dále bych chtěla poděkovat konzultantovi doc. Ing. Liboru Červenkovvi, Ph.D., MUDr. Lucii Barekové, Ph.D., paní Drahomíře Hofmanové a paní Janě Halákové. V neposlední řadě děkuji rodině a přátelům na shovívavost a trpělivost po celou dobu studia.

## **ANOTACE**

Cílem této práce je zjistit mikrobiologickou kvalitu a údržnost proteinových přesnídávek a následně stanovit, zda látky, izolované z rostlin jsou schopné prodloužit trvanlivost těchto proteinových přesnídávek. V teoretické části jsou popsány základní složky výživy, ale i energetická hodnota potravin a alternativní směry ve výživě. V neposlední řadě tu jsou popsány vybrané druhy bakterií, byliny a fytochemikálie, které obsahují. V experimentální části je potom popsán přesný postup stanovení a identifikace mikroorganismů, výroby extraktů, stanovení antioxidační aktivity a rozsahu oxidace lipidů a ověření správnosti stanovení antimikrobiální aktivity přidávkem extraktů do reálných vzorků.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Bylinné extrakty, mikroorganismy, přesnídávký, vyvážená strava

## **ANNOTATION**

The aim of this work is to determine the microbiological quality and shelf life of protein snacks and subsequently determine whether substances isolated from plants are able to prolong the shelf life of these protein snacks. The theoretical part describes the basic components of nutrition, but also the energy value of foods and alternative trends in nutrition. Last but not least, selected types of bacteria, herbs and phytochemicals that they contain are described. In the experimental part is described the exact procedure of determination and identification of microorganisms, production of extracts, determination of antioxidant activity and extent of lipid oxidation and verification of correct determination of antimicrobial activity by adding extracts to real samples.

## **KEYWORDS**

Herbal extracts, microorganisms, snacks, balanced diet

## Obsah

Anotace .....	7
Klíčová slova.....	7
Annotation.....	7
Keywords .....	7
Seznam zkratk a jednotek.....	12
Seznam ilustrací .....	14
Seznam tabulek .....	15
Úvod.....	16
1 Teoretická část .....	17
1.1 Základní složky výživy .....	17
1.1.1 Sacharidy.....	17
1.1.1.1 Dělení sacharidů.....	18
1.1.1.2 Zdroje sacharidů v potravě.....	20
1.1.2 Proteiny .....	20
1.1.2.1 Dělení aminokyselin.....	20
1.1.2.2 Zdroje proteinů v potravě.....	21
1.1.3 Lipidy .....	22
1.1.3.1 Dělení mastných kyselin .....	22
1.1.3.2 Zdroje lipidů v potravě.....	23
1.1.4 Minerální a stopové prvky .....	24
1.1.4.1 Vápník .....	24
1.1.4.2 Sodík .....	24
1.1.4.3 Draslík.....	24
1.1.4.4 Hořčík.....	25
1.1.4.5 Chlor.....	25



1.1.4.6 Fosfor .....	25
1.1.4.7 Stopové prvky .....	25
1.1.5 Vitamíny.....	26
1.1.5.1 Hydrofilní vitamíny.....	26
1.1.5.2 Hydrofobní vitamíny .....	27
1.1.6 Antioxidanty.....	28
1.1.7 Energetická hodnota potravin .....	29
1.1.8 Alternativní strava.....	31
1.2 Bakterie .....	32
1.2.1 Gram pozitivní koky .....	33
1.2.1.1 Rod <i>Staphylococcus</i> .....	33
1.2.1.2 Rod <i>Enterococcus</i> .....	34
1.2.2 Gram pozitivní sporulující tyčinky .....	34
1.2.2.1 Rod <i>Bacillus</i> .....	34
1.2.3 Gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky .....	35
1.2.3.1 Rod <i>Pantoea</i> .....	36
1.3 Antimikrobiální účinky bylinných extraktů .....	36
1.3.1 Vybrané skupiny látek s antimikrobiálním účinkem .....	37
1.3.2 Charakteristika vybraných rostlin .....	37
1.3.2.1 Lékořice.....	37
1.3.2.2 Šalvěj.....	38
1.3.2.3 Tymián .....	39
1.3.2.4 Galgán .....	39
1.3.2.5 Zázvor .....	40
1.3.2.6 Máta.....	40
1.3.2.7 Rakytník .....	41

1.4 Stanovení antimikrobiální aktivity .....	41
1.4.1 Diskový difúzní test .....	41
1.5 Stanovení antioxidační aktivity .....	42
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	44
2.1 Pomůcky.....	44
2.2 Přístroje .....	44
2.3 Živná media a jejich příprava.....	45
2.4 Chemikálie a roztoky .....	48
2.5 Komerčně dodávané soupravy .....	48
2.6 Vzorky.....	49
2.7 Homogenizace.....	51
2.8 Mikrobiologická analýza.....	51
2.8.1 Počítání narostlých kolonií podle normy ČSN EN ISO 4833.....	51
2.8.2 Stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů (CPM kultivační metodou, ČSN EN ISO 4833).....	52
2.8.3 Stanovení koliformních mikroorganismů v potravinách (ČSN ISO 4832).....	52
2.8.4 Stanovení počtu enterokoků.....	52
2.8.5 Horizontální metoda stanovení počtu presumptivního <i>Bacillus cereus</i> .....	53
(ČSN EN ISO 7923).....	53
2.8.6 Metoda stanovení koaguláza-pozitivních stafylokoků (ČSN EN ISO 6888-1) .....	53
2.8.7 Stanovení celkového počtu kvasinek a plísní u výrobků s vodní aktivitou vyšší než 0,95 (ČSN EN ISO 21527-1) .....	54
2.9 Identifikace mikroorganismů .....	54
2.10 Výroba rostlinných extraktů.....	54
2.11 Stanovení antimikrobiální aktivity – disková difúzní metoda .....	55
2.12 Účinnost extraktů v reálných vzorcích.....	56
2.13 Stanovení antioxidační aktivity.....	56

2.13.1 Kalibrační řada .....	56
2.13.2 Měření vzorků .....	57
2.13.3 Vyhodnocení výsledků.....	57
2.14 Stanovení rozsahu oxidace lipidů s využitím thiobarbiturové kyseliny.....	58
3 Výsledky .....	59
3.1 Stanovení koliformních mikroorganismů v potravinách (ČSN ISO 4832).....	59
3.2 Stanovení počtu enterokoků.....	59
3.3 Horizontální metoda stanovení počtu presumptivního <i>Bacillus cereus</i> (ČSN EN ISO 7923) .....	59
3.4 Metoda stanovení počtu koaguláza-pozitivních stafylokoků (ČSN EN ISO 6888-1) ....	60
3.5 Stanovení celkového počtu kvasinek a plísní u výrobků s vodní aktivitou vyšší než 0,95 (ČSN EN ISO 21527-1) .....	61
3.6 Identifikace mikroorganismů .....	61
3.7 Stanovení antimikrobiální aktivity .....	62
3.8 Účinnost extraktů v reálných vzorcích.....	63
3.9 Stanovení antioxidační aktivity .....	65
3.10 Stanovení rozsahu oxidace lipidů.....	65
4 Diskuze.....	67
5 Závěr .....	72
6 Seznam odborné literatury .....	74
7 Příloha .....	85

## Seznam zkratek a jednotek

AMK	Aminokyseliny
ATP	Adenosintrifosfát
BHT	Butylhydroxytoluen
B-P	Baird – Parker agar
cal	Kalorie
CCM	Czech collection of microorganism – česká sbírka mikroorganismů
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
DRBC	Dichloran Rose – Bengal Chloramphenicol agar – Agar s dichloranem, bengálskou červení a chloramfenikolem
EtOH	Ethanol
EUCAST	European committee on antimicrobial susceptibility testing – Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti
FRAP	Feric reducing antioxidant potencial – antioxidační potenciál redukující železo
GTK	Agar s glukózou, tryptonem a kvasničným extraktem
HDL	High density lipoprotein – lipoprotein s vysokou hustotou
HPLC	High-performance liquid chromatography – vysokotlaká kapalinová chromatografie
J	Joule
KA	Krevní agar s 5 % beraní krve
kcal	Kilokalorie
kJ	Kilojoule
LDL	Low density lipoprotein – lipoprotein s nízkou hustotou

MALDI-TOF/MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry – Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem
MDA	Malondialdehyd
MDAeq.	Malodialdehyd ekvivalentu – vyjádření rozsahu oxidace lipidů
M-H	Müeller Hintonův agar
MK	Mastné kyseliny
MYP	Mannitol Egg York Polymyxin – Agar s mannitolem, žloutkovou emulzí a polymyxinem
P	Označení pasterovaného vzorku
ROS	Reactive oxygen species – reaktivní formy kyslíku
S-B	Slanetz – Bartley agar
SOD	Superoxid dismutáza
TTC	Trifenyltetrazolium chlorid
TAA	Total antioxidant aktivity – celková antioxidační aktivita
TBA	Thiobarbiturová kyselina
VČŽL	Krystalová violet, neutrální červen, žluč, laktóza agar

## Seznam ilustrací

Obrázek 1 – Znázornění struktury glukózy a frukózy .....	18
Obrázek 2 – Zobrazení struktury amylózy a amylopektinu v souvislosti se škrobem .....	19
Obrázek 3 – Výživová pyramida upravená pro ČR.....	31
Obrázek 4 – Diskový difúzní test .....	42
Obrázek 5 – Princip DPPH metody .....	43
Obrázek 6 – Pracovní postup přípravy extraktů .....	55
Obrázek 7 – Schéma přípravy extraktů z přesnídávek .....	56

## Seznam tabulek

Tabulka 1 – Zastoupení sacharidů v potravinách .....	20
Tabulka 2 – Biogenní aminokyseliny a jejich klasifikace .....	21
Tabulka 3 – Zastoupení MK ve 100 g zdrojového tuku (g).....	23
Tabulka 4 – Doporučená denní dávka živin .....	30
Tabulka 5 – Seznam použitých surovin a dochucujících látek .....	49
Tabulka 6 – Varianty přesnídávek .....	50
Tabulka 7 – Připravené extrakty a jejich koncentrace .....	55
Tabulka 8 – Celkové počty presumptivního <i>Bacillus cereus</i> .....	60
Tabulka 9 – Celkové počty koaguláza pozitivních stafylokoků .....	60
Tabulka 10 – Výsledky identifikace mikroorganismů.....	61
Tabulka 11 – Vyhodnocení antimikrobiální aktivity I.....	62
Tabulka 12 – Vyhodnocení antimikrobiální aktivity II. ....	63
Tabulka 13 – Počty mikroorganismů na jednotlivých půdách – první testování.....	64
Tabulka 14 – Počty mikroorganismů na jednotlivých půdách – testování po týdnu .....	64
Tabulka 15 – Výsledky měření antioxidační aktivity s využitím DPPH radikálu.....	65
Tabulka 16 – Výsledky rozsahu oxidace lipidů.....	66

## Úvod

V poslední době je veden stále větší tlak na kvalitu potravin a jejich složení. S tím je spojena i snaha dbát o své tělo a zajímat se o potraviny, které konzumujeme. Velkým hitem je i alternativní stravování, které i přes své nevýhody má mnoho zastánců. Neustále se hledají metody, jak odlehčit různá jídla a vykompenzovat jídelníčkem sedavý způsob života, který většina populace má. Během těchto změn však může docházet k nedostatečnému příjmu základních živin. K tomu dochází zejména díky nedostatečné informovanosti o dané dietě nebo o výživových hodnotách potravin. Z toho důvodu se na trh dostávají přípravky nahrazující tento příjem, ať už se jedná o proteiny, vitamíny, antioxidanty nebo minerály.

Dalším faktorem pro vývoj těchto doplňků je neustále se zrychlující způsob života. V dnešní době má málo kdo čas v klidu posedět u snídaně nebo oběda. I z tohoto důvodu se výrobci předhánají v praktičnosti balení, aby bylo možné kdykoliv daný doplněk zkonzumovat, jenže spolu s tím roste riziko kontaminace mikroorganismy nebo možnost sensorických změn potravin.

Cílem této práce, bylo ve spolupráci s výrobcí proteinových přesnídávek vyrobit kvalitní a zdravotně nezávadné proteinové přesnídávkové. Nejprve byla zjištěna mikrobiologická kvalita již vyráběných přesnídávek, mikroorganismy v přesnídávkách byly izolovány a identifikovány. Dále byly vyrobeny a testovány rostlinné extrakty, které měly růst mikroorganismů potlačit a zabezpečit mikrobiologickou kvalitu přesnídávek.



# 1 Teoretická část

## 1.1 Základní složky výživy

Lidský organismus má několik základních fyziologických potřeb, mezi které patří například potřeba dýchání, vody, spánku, vylučování, vyměšování a v neposlední řadě potřeba přijímání potravy. Díky poslední zmíněné pak tělo dokáže využít přijaté látky jako zdroj energie a materiál pro růst.

Při dodržování správné výživy je třeba kontrolovat vyváženost stravy ze stránky kvantitativní i kvalitativní. Kvantitativním hlediskem je myšleno, zda energie získaná z přijaté potravy, odpovídá jejímu výdeji. Jinak řečeno spotřeba energie u člověka se sedavým zaměstnáním nebude tak vysoká jako někoho, kdo má fyzicky těžší zaměstnání. Stejně tak jiné energetické nároky má dítě, adolescent nebo kojící žena. Všechny tyto faktory je proto třeba zohlednit při výběru potravy (Freeland-Graves a Nitzke, 2013).

Pokud bychom stravu posuzovali z kvalitativního hlediska, budeme se zaměřovat hlavně na obsah živin. Je třeba zajistit jejich vyvážený, ale hlavně dostatečný přísun, který je nezbytný pro správné fungování organismu. Jedná se hlavně o sacharidy, proteiny, lipidy, minerály, vitamíny a často opomíjenou vlákninu. V následujících kapitolách je popsáno, proč jsou výše zmíněné látky tolik důležité. Poslední kapitola se týká antioxidantů. Antioxidanty nepatří mezi základní výživové látky, ale jsou pro lidské tělo nezbytné, protože napomáhají udržovat rovnováhu v lidském těle a snižují aktivitu volných radikálů (Zlatohlávek, 2016).

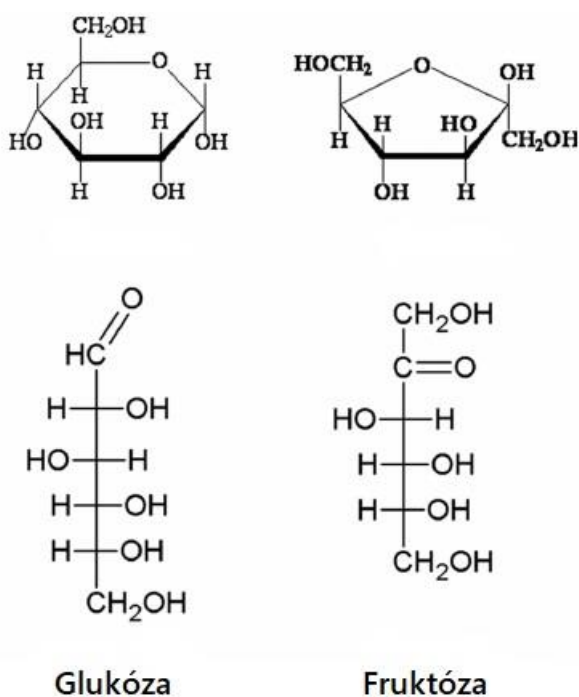
### 1.1.1 Sacharidy

Sacharidy, z latinského *saccharum* – cukr, jsou hlavním zdrojem energie. Můžeme je dělit podle funkce na rezervní a stavební. U živočichů jsou rezervní ukládány jako jaterní (z 1/3) a svalový glykogen (2/3), který v případě potřeby tělo využije jako okamžitý zdroj energie. U rostlin se můžeme s rezervními sacharidy setkat v podobě škrobů nebo rostlinných gum. Se stavebními sacharidy se můžeme setkat v podobě chitinu, ale i jako součástmi hormonů, koenzymů nebo glykosidů (Koolman a Röhm, 2012; Tomasik, 2004).

### 1.1.1.1 Dělení sacharidů

Z chemického hlediska je můžeme dělit podle počtu cukerných jednotek na mono-, oligo- a polysacharidy.

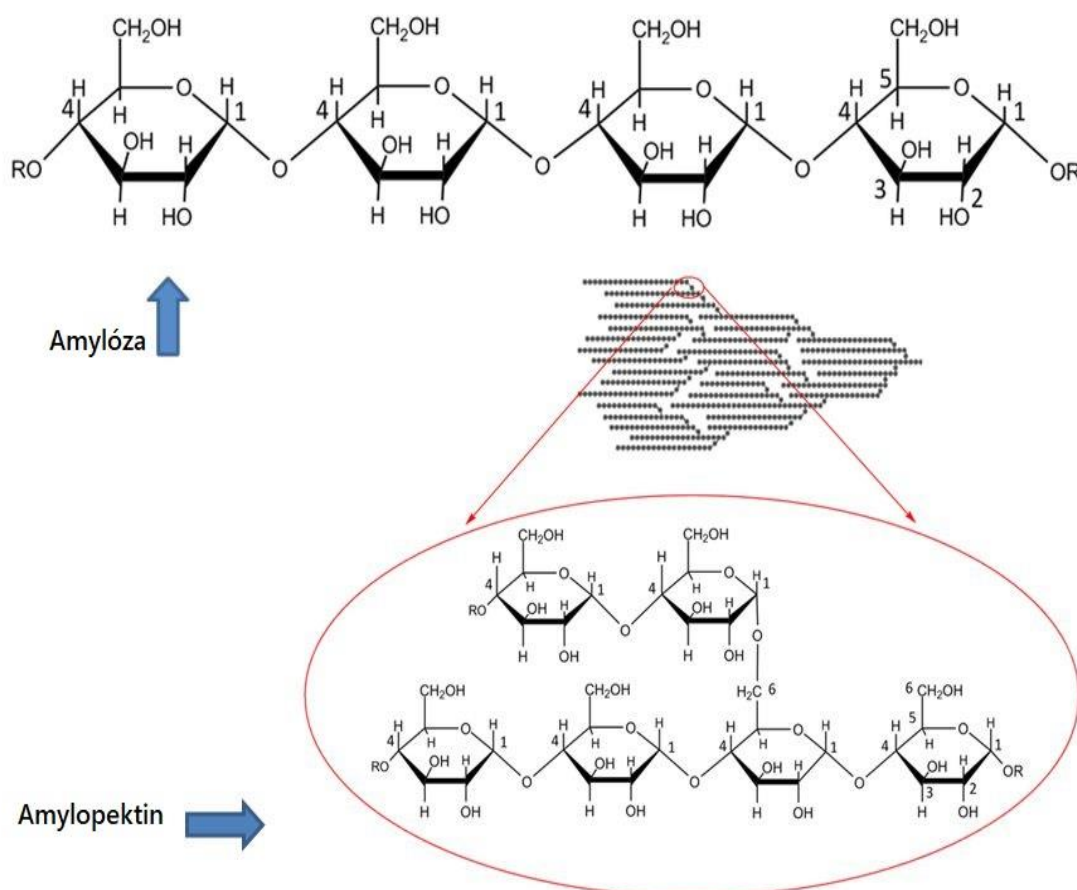
Monosacharidy jsou tvořeny právě jednou cukernou složkou a podle umístění hydroxylové skupiny je dělíme na aldózy (glukóza) a ketózy (fruktóza). Rozdíl, který je mezi těmito strukturami, můžeme vidět na obrázku 1. Dále můžeme monosacharidy dělit podle počtu uhlíků na triózy, tetřózy, pentózy, hexózy atd. A právě do poslední zmíněné skupiny patří pro člověka nejdůležitější sacharid – glukóza. Ta je totiž centrálním zdrojem energie pro všechny tkáně v těle, přičemž erytrocyty a mozek jsou na ní zcela závislé; spotřebují přibližně 150 g glukózy za 24 hodin. V případě nedostatku glukózy v plasmě, je tělo schopné ji získat z glykogenu, který je uložen právě v játrech (viz. rezervní sacharidy) nebo si ji vytvořit z nesacharidových zdrojů jako jsou aminokyseliny nebo mastné kyseliny procesem glukoneogeneze (Velíšek, 2002; Tomasik, 2004).



Obrázek 1: Znázornění struktury glukózy a fruktózy  
(převzato z <https://www.quora.com/What-is-the-difference-in-structure-between-glucose-and-fructose>, staženo dne 18.12.2018)

Oligosacharidy obsahují ve své molekule dvě až deset cukerných podjednotek. Nejrozšířenější jsou disacharidy, například maltóza, která je složena ze dvou molekul glukózy. Dalším zástupcem je laktóza, takzvaný mléčný cukr, který vzniká spojením glukózy a galaktózy. Sacharóza neboli řepný cukr je složen z glukózy a fruktózy. Tyto disacharidy jsou většinou štěpeny v tenkém střevě, kde jsou přítomny příslušné enzymy.

Poslední skupinou jsou polysacharidy. Ty se skládají z více než deseti cukerných jednotek. Pokud jsou v jednotkách desítek, označujeme je za nízkomolekulární. V případě, že se sacharid skládá ze stovek podjednotek, řadí se mezi vysokomolekulární. A právě tyto vysokomolekulární polysacharidy vyživá organismus převážně k dlouhodobému zdroji energie, příkladem takových je glykogen nebo škrob. Poslední zmíněný se skládá ze dvou oligosacharidů, kterými jsou amyulóza a amylopektin. Jejich strukturu můžeme vidět na obrázku 2 (Velíšek, 20 02; Tomasik, 2004).



Obrázek 2: Zobrazení struktury amyulózy a amylopektinu a souvislosti ve struktuře škrobu (převzato a upraveno z <https://www.biotechacademy.dk/undervisning/gymnasiale-projekter/biologiske-katalysatorer-forbedrer-broedet/teori/amylopektin/> dne 18.12.2018)

### 1.1.1.2 Zdroje sacharidů v potravě

Hlavním zdrojem sacharidů pro člověka je rostlinná strava. Zásahu na tom má i fakt, že již tolikrát zmiňovaná glukóza vzniká během procesu fotosyntézy. Sacharidy proto můžeme nalézt v ovoci, zelenině a obilovinách. V Evropě to je hlavně pšenice, v Jižní Americe kukuřice a v Asii rýže. U potravin živočišného původu se jako jediný zdroj sacharidů využívá mléko a výrobky z něj vyrobené. Je to z toho důvodu, že obsahuje oligosacharid laktózu. V tabulce číslo 1 můžeme vidět množství sacharidů v různých potravinách (Tomasik, 2004).

**Tabulka 1: Zastoupení sacharidů v potravinách (Klimešová, 2013)**

Potravina	Porce	Množství	Množství sacharidů
Vařené brambory	1 porce	200 g	34 g
Vařená rýže	1 porce	90 g (syrový stav)	62 g
Banán	1 ks	120 g	28 g
Pšeničný chléb	1 plátek	70 g	32 g
Sýr eidam (30%)	2 plátky	30 g	1,4 g

### 1.1.2 Proteiny

Název této skupiny pochází z řeckého *proteinós* neboli prvořadý nebo základní. Proteiny patří mezi hlavní živiny, které není možné nahradit. Díky jejich struktuře je tělo využívá na obnovu a výstavbu poškozených tkání, na tvorbu enzymů, hormonů a dalších látek obsahujících dusík jako jsou porfyriny (základní kámen pro hemoglobin), puriny a pyrimidiny (nukleové kyseliny) a v neposlední řadě kreatinin.

Proteiny jsou vysokomolekulární látky, jejichž relativní molekulová hmotnost je v řádech  $10^3$  až  $10^6$ , skládající se z aminokyselin (AMK). Z toho vyplývá, že proteiny obsahují skupiny amino ( $-NH_2$ ) a karboxy ( $-COOH$ ). Ty jsou mezi sebou svázány peptidickou vazbou, kdy vzniká amid ( $-NH-CO-$ ) (Koshland, 2018).

#### 1.1.2.1 Dělení aminokyselin

Ačkoliv bylo prokázáno přibližně 700 aminokyselin, v proteinech se objevuje pouze 20. Ty se označují jako biogenní aminokyseliny. Ty můžeme dělit na esenciální, které jsou nezbytné a organismus je musí přijmout v potravě. Další jsou semiesenciální (nezbytné pouze v určitých okamžicích života) a neesenciální, kam se řadí aminokyseliny, které si organismus

v případě potřeby umí vyrobit z esenciálních aminokyselin. V tabulce 2 je výčet biogenních aminokyselin a klasifikace (Koshland, 2018; Stránský, 2011).

**Tabulka 2: Biogenní aminokyseliny a jejich klasifikace (Trumbo *et al*, 2002)**

Esenciální	Semiesenciální	Neesenciální
Izoleucin	Arginin	Alanin
Leucin	Tyrozín	Asparagin
Valin	Cystein	Aspartát
Lyzin	Glutamin	Serin
Methionin	Glycin	Kyselina aparagová
Typtofan	Prolin	Kyselina glutamová
Fenylalanin	Cystein	
Treonin		
Histidin		

### 1.1.2.2 Zdroje proteinů v potravě

Proteiny v lidské stravě mohou být živočišného nebo rostlinného původu. Poměr mezi těmito bílkovinami by měl být u dospělého člověka 1:2. V případě dětí nebo fyzicky aktivních jedinců potom 1:1.

Živočišné bílkoviny, které jsou obsaženy ve vejcích, mléku nebo masu, jsou bohatší na esenciální aminokyseliny a považují se za plnohodnotné bílkoviny, avšak musíme i zde rozlišovat jejich původ. Toto tvrzení je pravdivé u mléčných a vaječných bílkovin nikoliv u masa. Tam totiž musíme rozlišit, zda je původ bílkovin ve svalovině nebo v pojivové tkáni. V tomto případě je totiž výživová hodnota nižší.

Rostlinné bílkoviny můžeme získat zejména ze sóji, luštěnin, obilnin, rýže nebo ořechů. Tyto bílkoviny však bývají méně hodnotné, to je způsobeno tím, že některé zdroje neobsahují všechny potřebné aminokyseliny. Těm, jejichž zastoupení je nedostatečné se říká limitní aminokyseliny. Nejčastěji to bývá lyzin, který se limitně vyskytuje v obilovinách a u luštěnin metionin. Proto je třeba kombinovat jednotlivé suroviny, aby docházelo ke kompenzaci. Limitní aminokyseliny však můžeme objevit i u živočišné stravy, příkladem je fenylalanin v hovězím masu nebo metionin v kravském mléce (Zayas, 1997).

### 1.1.3 Lipidy

Název pochází z řeckého *lipos* což v překladu znamená tučný. Lipidy můžeme podle jejich konzistence rozdělit na oleje a tuky. V těle fungují jako stavební látka ale hlavně jako zásobní látka v podkoží a kolem některých orgánů. Asi nejznámějším lipidem je cholesterol. Ačkoliv je v dnešní době velkým strašákem, tělo by se bez něj neobešlo. Je totiž schopné z něj syntetizovat steroidní hormony, žlučové kyseliny nebo vitamín D. Důkazem nepostradatelnosti tohoto tuku je i fakt, že v případě nedostatku, si ho tělo dokáže v játrech syntetizovat. Podle bílkoviny, která je na cholesterol navázána rozlišujeme dva typy a to LDL a HDL cholesterol. LDL je onen „zlý“, který při vyšším množství v krevním oběhu způsobuje aterosklerózu. Oproti tomu HDL je jeho „hodný“ přítel. Stará se totiž o to, aby LDL cholesterol doputoval do jater a odtud žlučí z těla pryč (Machová, 2015; Chalupová, 2008; Silvernagl a Despopoulos, 2004).

Ačkoliv tuky dodávají jídlu charakteristickou chuť a vůni, jsou nejhůře stravitelnou součástí potravy. A to i přesto, že mají dvojnásobnou energetickou hodnotu v porovnání se sacharidy nebo proteiny. Pro tělo je ale snazší pro získání energie zpracovat glukózu nebo alkohol. Tuky, které přijímáme ve stravě, označujeme jako triacylglyceroly (= triglyceridy). Důvodem je jejich chemická struktura, obsahují právě jednu molekulu glycerolu, který váže tři mastné kyseliny (MK). Obvykle mají sudý počet uhlíků a udržují lineární řetězec (Murray, 2002).

#### 1.1.3.1 Dělení mastných kyselin

Mastné kyseliny dělíme podle tří základních znaků, a to podle typu vazby mezi atomy uhlíku, podle délky uhlíkového řetězce (4-20 atomů uhlíku) anebo podle typu izomerie.

Podle typu vazby můžeme mít nasycené mastné kyseliny, které neobsahují násobnou vazbu, nebo nenasyčené, které naopak obsahují jednu nebo více násobných vazeb.

Délku potom rozdělujeme na mastné kyseliny s krátkým (4-8 uhlíků), středně dlouhým (8-12) nebo dlouhým řetězcem (více než 12).

Poslední možností je dle typu izomerie. Mastné kyseliny můžeme nalézt v konfiguraci *cis*, kdy jsou vodíky u uhlíků, mezi kterými je dvojná vazba na jedné straně řetězce, nebo naopak *trans* konfigurace dvojných vazeb, vodíky jsou na opačné straně řetězce.

Všechny tyto vlastnosti ovlivňují fyzikálně chemické vlastnosti mastných kyselin. Například s délkou řetězce stoupá bod tání tuku, oproti tomu klesá s vyšším počtem násobných vazeb u nenasyčených MK, ale *trans* izomery mají vyšší bod tání než *cis*.

Obecně platí, že nenasyčené mastné kyseliny mají na organismus příznivější dopad než nasycené. Výzkumy prokázaly, že strava bohatá na mononenasyčené mastné kyseliny snižuje

riziko vzniku aterosklerózy a napomáhá tkáním odolávat oxidačnímu stresu. Proto je třeba vybírat, které mastné kyseliny jsou pro tělo prospěšnější (Murray, 2002; Trumbo *et al.*, 2002).

### 1.1.3.2 Zdroje lipidů v potravě

Lipidy, stejně jako sacharidy a proteiny pochází z rostlinných i živočišných zdrojů. Mají stejnou chemickou skladbu, ale jiné fyzikální vlastnosti.

Zdrojem živočišných lipidů je mléčný tuk (kravský, buvolí), sádlo (vepřové, drůbeží), lůj nebo slanina. Všechny tyto potraviny však mají vysoký obsah nenasycených mastných kyselin a nízký obsah esenciálních MK. Obsahují také poměrně vysoký obsah cholesterolu, který je obsažen ve všech tucích živočišného původu. Jedinou výjimkou, která napravuje reputaci ostatním živočišným tukům je rybí olej. Ačkoliv se v potravinářství prakticky nevyužívá, ze zdravotního hlediska se jedná o velmi důležitý prvek. Oproti ostatním živočišným tukům, většina MK, které obsahuje, jsou esenciální nenasycené kyseliny, které si tělo neumí samo vyrobit a musí je přijímat v potravě, a naopak podíl nasycených mastných kyselin je velmi nízký (Pánek *et al.*, 2002; Svačina, 2008).

Mezi rostlinné tuky řadíme oleje, jako jsou olivový, slunečnicový, řepkový atd. a tuky z nich vyrobené. Díky tomu, že obsahují převážně nenasycené MK, jsou ze zdravotního hlediska příznivější než živočišné. I tady se však najdou výjimky. Takovým případem je kokosový tuk, který ačkoliv zvyšuje hladinu celkového cholesterolu, zvyšuje s tím i hladinu LDL. I přes to, je kokosový tuk považován za zdravější, než tuky živočišné (Mensink, 2003; Svačina, 2008).

Pro srovnání, v tabulce 3 je vidět zastoupení palmitové, stearové, olejové, linolové a linolenové kyseliny v různých potravinách.

**Tabulka 3: Zastoupení MK ve 100 g zdrojového tuku (g) (Svačina, 2008, převzato a upraveno)**

Jedlý tuk	k.palmitová	k. stearová	k. olejová	k. linolová	k.linolenová
<b>Kuřecí maso</b>	23	12	33	18	1
<b>Vepřové maso</b>	19	12	19	26	
<b>Avokádo</b>	20	1	60	18	
<b>Kravské mléko</b>	26	11	29	2	1

### **1.1.4 Minerální a stopové prvky**

Jedná se o anorganické látky, které se v těle účastní výstavby tkání, ale slouží také jako biokatalyzátory (esenciální stopové prvky atd.). Mezi minerální látky řadíme ty prvky, jejichž denní spotřeba je 100 mg a vyšší. Jako stopové označujeme prvky se spotřebou nižší než 100 mg. Koncentraci těchto látek v potravinách ovlivňuje složení půdy, ve které byly pěstovány nebo odkud pocházela krmiva pro dobytek.

Minerální látky nezbytné pro člověka jsou vápník, sodík, draslík, fosfor, chlor a hořčík. Stopové potom železo, síra, zinek, jód, fluor, selen, měď, mangan, chrom a hliník (Zlatohlávek, 2016).

#### **1.1.4.1 Vápník**

Vápník se podílí na stavbě kostí a zubů, je ale také důležitý pro přenos nervových vzruchů. Působí jako druhý posel u hormonálních a enzymových reakcích a důležitou roli má i při svalové kontrakci a srážení krve.

Hlavními zdroji je mléko, ryby, ořechy, semena a listová zelenina. Doporučená výživová dávka je 0,8-1,6 g. V případě nedostatku hrozí organismu svalová ochablost, zkřehnutí kostí a křeče (Olza *et al.* 2017; Stránský a Kohout, 2011).

#### **1.1.4.2 Sodík**

Sodík je důležitý pro dodržení osmotického tlaku tělních tekutin. Reguluje vodní rovnováhu v těle a napomáhá udržovat homeostázu krve. Je velmi důležitý i pro správné fungování myokardu.

Doporučená dávka je 1,5-2 g, do těla se dostává hlavně ve formě jedlé soli, dalším zdrojem jsou minerální vody a glutaman sodný. Při nedostatečném příjmu (vyskytuje se pouze vzácně) může docházet k dehydrataci, svalovým křečím a snížení krevního tlaku (Stránský a Kohout, 2011; Svačina, 2008).

#### **1.1.4.3 Draslík**

Bez draslíku by buňky, nervy ani svaly nemohly pořádně fungovat. Jedná se totiž o hlavní intracelulární iont, který je velmi důležitý pro funkci myokardu a svalovou aktivitu. Je také nezbytný pro šíření nervových vzruchů.

Většina potravin, hlavně rostlinného původu jako ovoce, zelenina, ale i mléko, draslík obsahuje. V případě dlouhodobého nedodržení doporučené dávky (2,5 g) může dojít ke slabosti,



pomatenosti, a nakonec až k srdečnímu selhání (Stránský a Kohout, 2011; Geissler a Powers, 2017).

#### **1.1.4.4 Hořčík**

Kosti, zuby a tělní tekutiny by se bez hořčíku neobešly. Působí také jako aktivátor některých enzymů a je nutný pro správné fungování nervové soustavy a svalů.

Vyskytuje se v celozrnných obilovinách, luštěninách, ořechách, listové zelenině a kakau. Jeho doporučená dávka je 0,3-0,5 g denně (Stránský a Kohout, 2011).

#### **1.1.4.5 Chlor**

Chlor jde ruku v ruce se sodíkem, navíc je nezbytný pro tvorbu kyseliny chlorovodíkové, která je součástí žaludečních šťáv.

Hlavním zdrojem je opět kuchyňská sůl, nedostatek se při běžném stravování nevyskytuje. Doporučená dávka je 2,5 g denně (Tortora a Derrickson, 2017; Stránský a Kohout, 2011).

#### **1.1.4.6 Fosfor**

Poslední ze zástupců je velmi důležitý pro kosti a zuby. Svou roli má i při trávení a látkové přeměně, která v organismu probíhá pro získání energie.

Dobrym zdrojem je mléko a mléčné výrobky, maso, ryby, vejce a luštěniny. Obiloviny také fosfor obsahují, ale ve formě fytátů, které tělo neumí využít (Uribarri a Calvo, 2017; Stránský a Kohout, 2011).

#### **1.1.4.7 Stopové prvky**

Stopové prvky můžeme nazvat mikroelementy. Ty jsou sice nezbytné pro správné fungování organismu, ale tělo jich nevyžaduje tolik, jako ostatních minerálních látek. Slouží jako biokatalyzátory například krevní barviva, nebo jako součásti enzymů. Ve větším množství mohou být pro tělo i toxické. Ve stravě, se na rozdíl od minerálních látek vyskytují převážně ve formě komplexů.

Jedním z příkladů mikroelementů je železo. To je součástí hemoglobinu a myoglobinu, kde zprostředkovává přenos kyslíku. Hlavní zásobárnou železa v těle jsou játra, kde je uloženo v podobě ferritinu. Železo se hojně vyskytuje v libovém masu, rybách, žlutku, listové zelenině nebo vnitřnostech. Při jeho nedostatku dochází k únavě, vyčerpanosti, chudokrevnosti a snížené imunitě celého organismu. Muži by měli přijmout přibližně 10 mg železa denně. Ženy potom

ještě o 5 mg více. Dalšími zástupci potom jsou selen, mangan, zinek, jód, fluór a další (Stránský a Kohout, 2011).

### 1.1.5 Vitamíny

Vitamíny jsou v jídelníčku často opomíjené látky. Ačkoliv se nepodílí na zisku energie jsou nezbytnou součástí potravy. Ačkoliv jsou z chemické stránky rozdílné, najdeme tu zástupce lipidů, steroidů ale i sacharidů, jsou nepostradatelné. Mohou být součástí enzymů, slouží jako biokatalyzátory chemických reakcí nebo antioxidanty. Každý vitamín, stejně jako ostatní složky potravy má svou doporučenou denní dávku, která by se neměla překračovat ani dlouhodobě nedodržovat. Mohlo by totiž dojít k hypovitaminóze, což je stav, kdy má tělo dlouhodobý nedostatek daného vitamínu. Ještě horší následky pro celý organismus má avitaminóza, kdy je vitamín zcela eliminován. Opakem je potom hypervitaminóza. Tělo si ovšem s tímto problémem umí částečně samo poradit, vitamíny se totiž řadí do dvou skupin a to rozpustné ve vodě a rozpustné v tucích. Rozpustné ve vodě neboli hydrofilní jsou vitamíny skupiny B a kyselina askorbová (vitamín C). U těchto vitamínů je hypervitaminóza nepravděpodobná, protože přebytečné množství je vyplaveno z těla ven. Do lipofilních (rozpustných v tucích) se řadí vitamíny A, D, E, K (Svačina, 2008; Nováková, 2012; Henderson, 2003).

#### 1.1.5.1 Hydrofilní vitamíny

Jak bylo řečeno, i vitamín C spadá do této skupiny. Jeho úplný nedostatek způsobuje kurděje neboli skorbut. Toto onemocnění se však v dnešní době téměř nevyskytuje, a to i díky tomu, že proto, aby se avitaminóze zabránilo, stačí méně než 10 mg denně. Při hypovitaminóze hlavně v období podzimu a konci zimy dochází ke snížení imunity a častějším únavám. Vitamín C je velmi významný antioxidant a je nezbytný pro tvorbu kolagenu. Vyskytuje se zejména v rostlinné stravě (ovoci, zelenině, paprice, šípku, rakytníku atd.) (Svačina, 2008).

Do komplexu vitamínu B se řadí vit. B<sub>1</sub> (tiamin), B<sub>2</sub> (riboflavin), B<sub>3</sub> (niacin), B<sub>5</sub> (kyselina pantotenová), B<sub>6</sub> (pyridoxin), B<sub>7</sub> (biotin), B<sub>9</sub> (kyselina listová) a B<sub>12</sub> (kyanokobalamin). Tiamin se vyskytuje hlavně v ořechách, luštěninách, sóje, vepřovém mase ale i játrech. Je nezbytný pro získávání energie ze sacharidů, tuků a alkoholů. V případě nedostatku dochází ke ztrátě chuti k jídlu, zmatenosti a nervovým poruchám. Jak napovídá název riboflavin vyskytuje se vitamín B<sub>2</sub> v rybách, ale i v kvasnicích, mořských řasách, mléce, játrech nebo obilninách. Je důležitý pro stav očí, kůže a funkci srdce. Stejně jako tiamin hraje roli v metabolismu sacharidů a lipidů. Při jeho nedostatku může docházet k popraskání koutků

úst, zánětům rtů, spojivek nebo světloplachosti. Ostatní zástupci B komplexu můžeme nalézt v játrech, zelenině, mase atd. Při avitaminóze B<sub>3</sub> může dojít ke vzniku onemocnění zvané pelagra. Označuje se také jako nemoc tří D – dermatitis, diarrhoea, demence. Přecitlivělost, ztráta chuti, průjemy a zmatenost jsou totiž základními projevy tohoto onemocnění. Nedostatek ostatních vitamínů z tohoto komplexu je vzácný a pozorován spíše u problémů se vstřebáváním, nikoliv u nedostatku v potravě (Nováková, 2012; Svačina, 2008; Geissler a Bowers, 2017).

#### 1.1.5.2 Hydrofobní vitamíny

Vitamíny z této skupiny se vstřebávají jen v přítomnosti tuků. Pokud je vstřebávání tuků porušeno, dochází k projevům nedostatku. Naopak při nadbytečném příjmu dochází k nadměrnému záchytu v tukové tkáni.

Vitamín A (retinol) je důležitý pro tvorbu očních pigmentů a podílí se na růstu epitelových buněk, je také silným antioxidantem. Jeho nedostatek způsobuje šeroslepost, změny na rohovce a spojivkách a nadměrné rohovatění kůže. Při dlouhodobém přebytku dochází k hematosklenomegalii (zvětšení jater a sleziny), anemii nebo vypadávání vlasů. Dobrymi zdroji jsou játra, mléko, žloutek a rybí tuk. Provitamíny potom můžeme nalézt v mrkvi, naťové a listové zelenině nebo meruňkách (Nováková, 2012; Svačina, 2008).

Karciferol je označení pro vitamín D. Ten se účastní resorpce vápníku a fosforu ve střevěch. Při nedostatku, zejména u dětí, vzniká křivice (rachitis), která způsobuje deformace dlouhých kostí a hrudníku. Může to vést až k poškození páteře. V opačném případě, při hypervitaminóze dochází ke snižování vápníku v krvi a usazování ve stěnách cév a orgánech. Díky tomu je zvýšené riziko vzniku osteoporózy, protože se vápník nedostane do kostí. V potravinách se vyskytuje zejména v rybách, vejcích, mléce a sýrech (Svačina, 2008; Henderson, 2003).

Dalším zástupcem je vitamín E neboli tokoferol. V těle působí jako antioxidant, předchází rozvoji aterosklerózy a má pozitivní účinek na tvorbu pohlavních buněk. Nedostatek je vzácný a spojený s poruchou distribuce nebo vstřebávání tuků. Pokud to však nastane, můžeme sledovat anemii, poruchy reprodukce a sníženou antioxidační obranu organismu. Zdrojem jsou rostlinné a živočišné tuky, obilná zrna, ořechy, kukuřice nebo třeba vejce (Svačina, 2008).

Posledním zástupcem je vitamín K, což je souhrnný název. Patří sem K<sub>1</sub> fylochinon a K<sub>2</sub> menachinon. Zatímco fylochinon stimuluje tvorbu faktorů pro kaskádu krevní srážlivosti a působí hlavně v játrech, menachinon podporuje syntézu bílkovin a buněčný růst a tmineralizaci kostí. Při nedostatku tak dochází k poruchám srážlivosti nebo zvýšenému riziku

zlomenin z důvodu osteoporózy. Vyskytuje se v listové zelenině, rostlinných olejích a tvorbě  $K_2$  částečně napomáhá střevní mikroflóra (Henderson, 2003; Nováková, 2012; Svačina, 2008).

### 1.1.6 Antioxidanty

V předchozích kapitolách bylo několikrát zmíněno, že daná látka je dobrý antioxidant. Tím je myšleno, že dokáže snižovat aktivitu volných radikálů. V těle totiž během aerobních metabolických procesů vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS). Zahrnují reaktivní kyslíkové ionty a peroxidy. Organismus se musí oxidačnímu působení těchto látek bránit. Oxidační stres, což je nerovnováha mezi vznikem volného radikálu (ROS) a schopností tyto radikály odbourávat a detoxikovat, se totiž podílí na rozvoji mnoha zánětlivých onemocnění a má vliv na fyziologické stárnutí (Pláteník, 2009).

Samotný termín antioxidant byl zaveden v potravinářské chemii ve 40. letech 20. století a byla jím myšlena látka, která je schopna zastavit řetězové radikálové reakce. Původně se využívaly v průmyslových procesech, aby se zabránilo korozi kovů. Později se antioxidanty začaly používat jako preventivní opatření, pro zamezení oxidace nenasycených tuků v potravinách. To mělo totiž za následek změny v nutričních hodnotách potravin. Až po několika desítkách let, vědci objevili jejich důležitost v biochemických procesech. Antioxidanty jsou totiž jednou z možností, kterými se lidský organismus chrání. (Cömert, 2017; Lorenzo *et al*, 2018).

V dnešní době víme, že antioxidační ochrana těla je komplexní a zahrnuje anatomické uspořádání, které ovlivňuje hladinu kyslíku v tkáních. Dále pak antioxidační enzymy a antioxidační substráty, kam se řadí i zmíněné vitamíny (Pláteník, 2009).

Mezi antioxidanty přijaté potravou patří polyfenoly, karotenoidy (vitamín A), tokoferoly (vitamín E), glutationy, kyselina askorbová (vitamín C), selen, zinek, mangan a koenzym Q10.

Zinek, selen a mangan se řadí mezi stopové prvky. Ačkoliv se zinek používal v průmyslových procesech k pokovování, ohledně jeho antioxidačních účinků v organismu byly dlouho vedeny debaty. Nakonec se zjistilo, že zinek v těle může působit dvojím způsobem, a to akutním a chronickým účinkem. Chronický účinek znamená, že zinek v organismu působí na enzym superoxid dismutáza (SOD), který přeměňuje superoxidový radikál na méně toxický peroxid vodíku. Ten je potom dále rozkládán jinými enzymy. Kromě zinku mohou na tento enzym působit i měď, mangan nebo selen. Akutní fáze se vyskytuje při krátkodobém zvýšení hladiny tohoto kovu v krvi a díky redukci tvorby hydroxidového radikálu z peroxidu vodíku a superoxidů (Formy, 2014; Saul, 2000; Powell, 2000).

Koenzym Q10, také zvaný jako ubiquinon, je funkčně podobný vitamínům a je součástí mitochondriálního respiračního řetězce, kde přispívá k přeměně energie z potravy na ATP. Respirační řetězec je zdrojem kyslíkových radikálů, následkem působení radikálů může docházet ke vzniku mutací mitochondriální DNA a tím následně narušení produkce energie.

V poslední době se objevily studie, které potvrzují, že antioxidanty napomáhají pacientům s rakovinou, a to dokonce dvojím způsobem. Jeden z nich je, že napomáhají organismu pacienta a zároveň inhibují růst rakovinných buněk (Goodman, 2011; Godic, 2014; Sarangarajan *et al.* 2017).

### 1.1.7 Energetická hodnota potravin

Jak bylo řečeno, tělo z přijaté potravy získává energii. Množství této energie se vztahuje vždy k určitému množství potravin. Standardně je to ke 100 g potravy a tuto hodnotu nazýváme energetickou denzitou neboli hustotou energie v potravě. Jednotkou energie jsou jouly (J), dříve se používalo spíše označení kalorie (cal). U potravin se však využívá přepočítání na kilojouly (kJ) nebo kilokalorie (kcal). Při přepočtu mezi těmito dvěma jednotkami platí, že 1 cal odpovídá 4,185 J. Základem pro výpočet energetické hodnoty složek potravy je čistá voda, která má 0 kJ/g nebo 0 kcal/g. Oproti tomu například sacharidy mají přibližně 4 kcal/g = 17 kJ/g a tuky dokonce 9 kcal/g = 38 kJ/g. Z toho vyplývá, že čím větší procento vody potravina obsahuje, tím nižší energetickou hodnotu má. Často mívá větší objem, který vyvolá rozšíření žaludku doprovázené dlouhodobějším pocitem nasycení. Oproti tomu strava s vysokou energetickou denzitou a malým objemem zasytí na kratší dobu (Drewnowski, 2018).

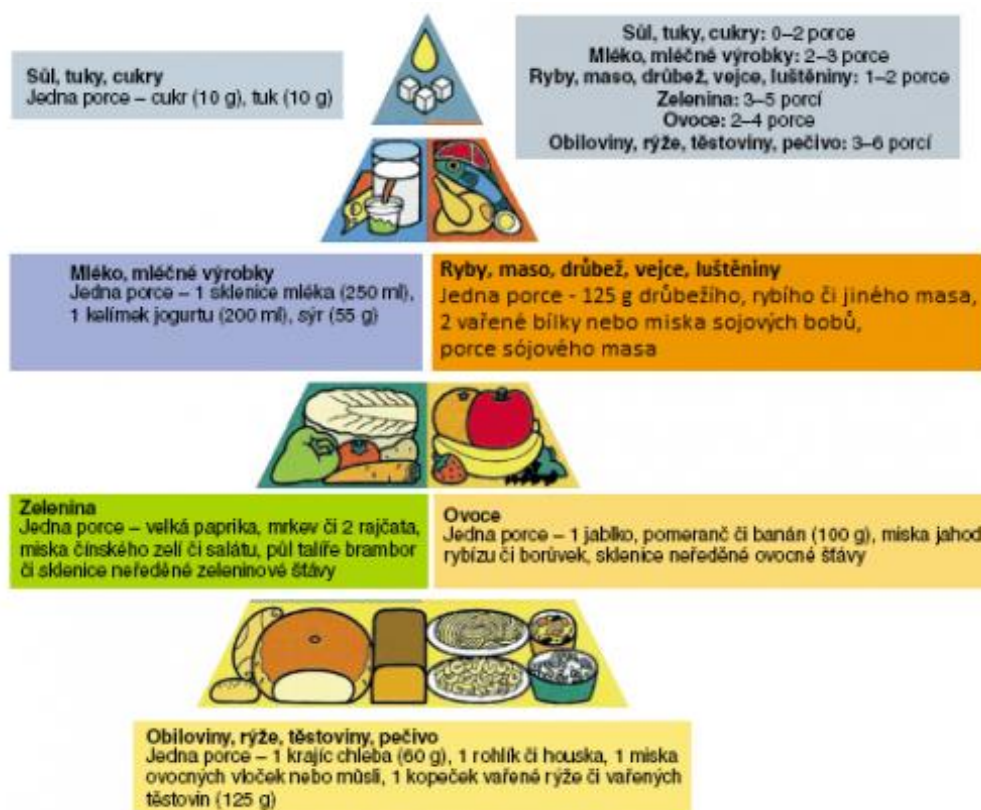
Pro charakteristiku potravin z hlediska výživové hodnoty byl zaveden pojem „nutrient density“, který určuje podíl živin v potravinách. Je vztažena ke 100 g dané potraviny a vyjadřuje kolik kJ nebo kcal dané výživové látky je v tomto množství obsaženo.

Odborníky doporučený energetický příjem je mezi 8000 až 12000 kJ denně. Samozřejmě, že je třeba přihlížet ke každému jedinci individuálně. Na základě fyziologických měření byl stanoven hmotnostní poměr, v jakém by se měly živiny přijímat, aby tělo prosperovalo (Drewnowski, 2008; 2018) (1 díl proteinů : 1 díl lipidů : 4 díly sacharidů). Pokud bychom to převedli na procenta přijaté energie, bylo by to 56 % sacharidů, 30 % lipidů a 14 % proteinů. V tabulce 4 vidíme doporučené denní dávky základních živin včetně energie s ohledem na věk (Drewnowski, 2018; Pánek, 2002).

**Tabulka 4: Doporučená denní dávka živin (převzato a upraveno Pánek, 2002, Stránský, 2001)**

<b>Živiny</b>	<b>Děti 3-6 let</b>	<b>Muž 19-69 let</b>	<b>Žena 19-59 let</b>	<b>Osoby nad 60 let</b>
Energie (kJ)	5800–13000	9240–11340	7560–9240	5267–7216
Bílkoviny (g)	30	70	65	70
Tuky (g)	50	70	65	60
Sacharidy (g)	200	300	230	250
Vápník (mg)	800	1000	1000	1200
Železo (mg)	11	10	15	8
Vitamin A (μg)	400	1000	800	800
Vitamin B1 (mg)	0,6	1,2	1	1,2
Vitamín B2 (mg)	0,6	1,4	1,2	1,2
Vitamín C (mg)	25	100	100	80
Vitamín E (mg)	7	14	12	15

Pro snazší orientaci v hodnotách denních dávek jednotlivých složek potravy, byl ustanoven pojem GDA. Ten se vyskytuje na obalu a poskytuje spotřebiteli tuto informaci v procentech na danou porci. Pro snazší orientaci ve výživových hodnotách potravin, byla sestavena tzv. potravinová pyramida, která standardně rozdělena do čtyř pater, kdy přiřazení potravin do patra napovídá, jak často by se měla daná potravina konzumovat. Čím výše v pyramidě, tím by měla být méně často v jídelníčku. Příklad pyramidy upravenou pro Českou republiku, kterou zveřejnilo Ministerstvo zdravotnictví v roce 2005 můžeme vidět na obrázku 3. Vzhledem k tomu, že platí, že bychom měli konzumovat primárně potraviny, které jsme schopni vypěstovat v našich podmínkách spočívala úprava výživové pyramidy právě v částečném nahrazení dovážených potravin. V prvním patře potravinové pyramidy můžeme vidět základní suroviny, a to hlavně obilniny, rýži, těstoviny a pečivo, především celozrnné. Denně, bychom měli zkonzumovat 3-6 porcí těchto potravin. Další patro obsadilo ovoce a zelenina. Přednost by měla mít hlavně syrová, přičemž zeleniny by mělo být alespoň o porci více než ovoce. To totiž obsahuje sacharidy, které by mohly příjem energie narušit. Tyto potraviny jsou důležité zejména pro příjem vitamínů a minerálů. Třetí patro je rozděleno na dvě části, mléčné výrobky a maso, ryby i drůbež. Právě v těchto potravinách je velký podíl bílkovin.



Obrázek 3: Výživová pyramida upravená pro ČR (převzato z [www.vimcojim.cz](http://www.vimcojim.cz), staženo dne 3.1.2019)

Mléčných výrobků by měly být 2-3 porce denně a masa 1-2 porce. V posledním, čtvrtém patře jsou látky, které jsou nejméně vhodné jako jsou sůl, cukry a živočišné tuky.

Strava by měla být pestrá, ale hlavně přiměřená věku, pohlaví a pohybové aktivitě každého jedince. Měla by co nejvíce vycházet ze základních potravin, například upřednostnit maso před uzeným nebo tvaroh před uměle doslazovanými a dobarvovanými dětskými výrobky (Bobík, atd.). Neměli bychom se vyhýbat potravinám jako jsou mléčné výrobky, obiloviny, maso, ryby, vejce, zelenina a ovoce, pokud to není ze zdravotního hlediska nezbytně nutné (Svačina, 2008).

### 1.1.8 Alternativní strava

V předchozích kapitolách se práce zabývala tím, jak má vypadat vyvážená strava. Existují ovšem i výjimky, kdy dochází k eliminaci některých potravin. K tomu dochází z mnoha důvodů, například z náboženského nebo filozofického přesvědčení. Někdy to však může být způsob protestu nebo módní trend.

Zřejmě nejrozšířenějším směrem je vegetariánství. Výhodou této stravy je zvýšený příjem vlákniny a nižší příjem MK a cholesterolu. Díky tomu i snížení rizika kardiovaskulárních

onemocnění. Problémem však může být nedostatek vitamínů a minerálů a nedostatečnost příjmu proteinů. Vegetariánství je rozděleno do čtyř základních typů. Nejpřísnější formou je veganství. Je vyloučen příjem jakýchkoliv živočišných výrobků včetně mléka, včelího medu, želatiny i vajec. To může způsobit problém například u vitamínu B12, který je přítomen jediné v živočišných produktech. Další formou je lakto-vegetariánství. Tato strava se skládá z rostlinných produktů a mléka a mléčných výrobků. Stejnou stravu, rozšířenou o vejce si mohou dopřát lakto-ovo-vegetariáni. Posledním typem jsou semivegetariáni, kteří však nebývají považováni za pravé vegetariány, protože z jídelníčku vyřadili pouze červené maso, ale ryby a drůbež konzumují i nadále. Existuje však mnoho variant. Můžeme se setkat i s frutariány, kteří mají v jídelníčku pouze tepelně neupravované ovoce a zeleninu, nebo vitariány (též zvané jako raw-strava), kteří konzumují pouze rostlinné potraviny, a to buď syrové nebo tepelně upravené ale zahřáté maximálně na 42 °C, tady ovšem narůstá riziko kontaminace a tím i znehodnocení potraviny. (Herrmann a Geisel, 2002; Kunová, 2011; Bevilacqua, 2016).

Dalším zástupcem je makrobiotika. Jedná se nejen o výživový styl, ale i životní filozofii. Základem je dělení potravin podle síly jin (odstředivá energie), jang (dostředivá energie) a harmonické potraviny. Mezi potraviny s odstředivou energií se tak řadí koření, cukr, alkohol, olej, ovoce, mléčné výrobky a některé druhy zeleniny. Oproti tomu mezi jang potraviny patří ryby, maso, vejce nebo sůl. Harmonické jsou potom luštěniny, rýže nebo obilniny. Cílem této diety je vytvořit v těle rovnováhu, která jak příznivci této metody věří, napomůže tomu, aby byli odolnější vůči nemocem (Strnadelová a Zerzán, 2011; Kunová, 2011).

Jednou z mnoha dalších možností je dělená strava, jejíž principem je zabránění společné konzumace potravin s vysokým obsahem proteinů a sacharidů. Poslední zmíněnou je dieta podle krevní skupiny, která vychází z předpokladu, že mezi krví a trávenými potravinami existuje imunologická reakce a z toho důvodu se ke každé krevní skupině hodí jiné potraviny.

## 1.2 Bakterie

Bakterie jsou nejjednodušší organismy, které lze z hlediska buněčné teorie považovat za živé. Řadí se do prokaryot, což pochází z řeckého *pro* před a *karyon* jádro. Bylo popsáno více než 2000 rodů mezi kterými nejsou po morfologické stránce až tak velké rozdíly. Nejčastější tvar je tyčinkovitý, méně časté potom kulovitý, ale můžeme vidět i vláknitý tvar.

Oproti tomu fyziologicky jsou bakterie velmi rozmanité, čehož se využívá při diagnostice bakterií. Jedním z hlavních znaků, je přiřazení ke gramnegativním nebo



grampozitivním bakteriím. K určení rodu se využívá mnoho biochemických testů, například kataláza, oxidáza, fermentace cukrů apod.

Veškeré bakterie byly na základě těchto vlastností rozděleny do 33 sekcí.

### 1.2.1 Gram pozitivní koky

Do této skupiny patří aerobní, fakultativně anaerobní i anaerobní rody, které pro svůj růst vyžadují řadu růstových látek. Tvar těchto bakterií je kulovitý a obvykle se shlukují do dvojic, tetrad, řetízků nebo hroznů. Už toto uskupení může být nápomocné při identifikaci rodu. Někteří ze zástupců patří mezi patogeny, které jsou rizikové pro lidi i zvířata. Jelikož se ale jedná o gram pozitivní bakterie, které mají jako hlavní složku buněčné stěny peptidoglykan, jsou tato onemocnění léčena penicilinovými antibiotiky, která inhibují právě syntézu peptidoglykanu (Facklam a Elliott, 1995; Courvalin, 2006).

#### 1.2.1.1 Rod *Staphylococcus*

Název pochází z řeckých slov *stafylé* neboli hrozen a *kokkos* neboli ovocné jádro nebo kulička. Jak je z názvu patrné, vyskytují se nejčastěji ve shlucích, které nápadně připomínají hrozen. Tyto bakterie jsou nepohyblivé, nesporulující a vykazují pozitivní test na katalázu. Až na výjimky jsou fakultativně anaerobní a dokáží růst v přítomnosti 10% NaCl (Strohl, 2001).

Základní dělení je poté na plasma koaguláza negativní a plasma koaguláza pozitivní, kdy druhy, které produkují koagulázu se řadí mezi primární, případně oportunní patogeny. Plasma koaguláza pozitivní stafylokoky dělíme na rezistentní a citlivé vůči antibiotiku novobiocinu (Becker *et al.*, 2015).

Mezi nejrizikovější koaguláza pozitivní stafylokoky patří *Staphylococcus aureus*. Jedná se o fakultativně anaerobní, mezofilní mikroorganismus, který má mnoho virulenčních faktorů a produkuje enterotoxiny. Ty mohou být přítomny v potravinách i v případě, že stafylokok nebyl kultivačně prokázán. Vyskytuje se na kůži, sliznicích, respiračním ústrojí i v intestinálním traktu teplokrevných zvířat. Mezi potravinami jsou rizikové lahůdkářské výrobky, sušená a zahuštěná mléka, mletá masa a sýry s vysokým obsahem soli (Tong *et al.*, 2015).

Ke kultivaci stafylokoků se využívá hlavně krevní agar s 5 % beraní krve, kdy po 24 h inkubaci při 37 °C dochází k nárůstu velkých, hladkých, smetanově zbarvených kolonií. Podle druhu můžeme vidět úplnou nebo částečnou hemolýzu. Pro průkaz v kontaminovaném vzorku se potom využívá selektivně-diagnostický Baird-Parkerův agar, který díky látkám, které obsahuje, inhibuje nárůst jiných bakterií a zároveň způsobuje zbarvení kolonií stafylokoků do černé lesklé barvy (ČSN EN ISO 6888-1).

### 1.2.1.2 Rod *Enterococcus*

Název pro tento rod pochází z řeckých slov *enteron* střevo a *kokkos* kulička. Vyskytuje se, jak z názvu vypovídá, v intestinálním traktu lidí i zvířat. Sekundárně se může vyskytovat v syrovém mléku, mléčných produktech, ale i potravinách s vyšším obsahem soli jako jsou sýry nebo uzeniny. Využívají se i jako indikátorové organismy pro sušené mléko, kdy jsou díky své odolnosti k vysokým teplotám indikátory špatné sanitace. Na druhou stranu tvoří významnou součást probiotických preparátů pro hospodářská zvířata, silážních kultur a můžeme se s nimi setkat i v sýrařství, kdy se používají některé kmeny *E. faecalis* jako doplňková kultura, díky které sýry získávají výraznější chuť (Giraffa, 1999).

Jedná se o kataláza negativní koky, velmi podobné streptokokům. Rozdílem ovšem je jejich rezistence vůči vysokému pH (snáší i hodnotu 8,5) a jejich schopnost růst v hypertonickém prostředí s 6,5% NaCl. Zároveň jsou schopné přežít zahřátí na 60 °C po dobu 30 minut, růst při teplotě 10 °C ale i 45 °C. Všechny tyto vlastnosti se využívá při identifikaci (Klaban, 2011).

Při kultivaci na neselektivním KA po 24 h při 37 °C můžeme vidět šedobílé kolonie se zónou viridace. Jako selektivně-diagnostická půda se využívá Slanetz-Bartley agar, na kterém díky redukci TTC na formazan, vyrůstají drobné, karmínově červené kolonie (Slanetz a Bartley, 1957).

## 1.2.2 Gram pozitivní sporulující tyčinky

Sporotvorné bakterie způsobují rozklad a kažení potravin, kdy dochází ke změnám na chuti, vůni a konzistenci. Díky sporám jsou rody patřící do této skupiny (*Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, atd.) velmi odolné vůči fyzikálním i chemickým vlivům. Z tohoto důvodu je třeba při stanovení těchto rodů provést inaktivaci vegetativních sporotvorných i nesporotvorných buněk ve vodní lázni a až poté dochází k vyočkování přežívajících spor (Andre, 2017).

### 1.2.2.1 Rod *Bacillus*

Příslušníci tohoto rodu se běžně vyskytují v přírodě, převážně v půdě, kde dlouhodobě přežívají díky odolným sporám. Většina ze zástupců není pro teplokrevné živočichy patogenní, ba naopak. Řada druhů (*B. subtilis*, *B. brevis*, *B. polymyxa* atd.) produkuje antibiotika polypeptidové povahy, čehož se využívá při jejich průmyslové výrobě. Příkladem takových antibiotik, je novobiocin (Stein, 2005; Fickers, 2012)

Výjimku ovšem tvoří *Bacillus anthracis*, produkující antraxový toxin, který má za následek onemocnění antrax neboli sněť slezinnou. Další výjimkou je *Bacillus cereus*. I tady byla zjištěna produkce toxinů, a to hlavně při růstu na polysacharidových substrátech. Právě tyto toxiny mohou být příčinou otrav (Griffiths a Schraft, 2017).

Až na výjimky (*B. anthracis*, *B. mycooides*) se jedná o pohyblivé sporulující tyčinky. Dle tvaru spor můžeme druhy tohoto rodu rozdělit do tři skupin. Do první skupiny se řadí kulaté nebo oválné, centrálně umístěné spory, které nedeformují sporangium (*Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*). Druhá skupina je charakteristická oválnými, centrálně nebo terminálně umístěnými spory deformujícími sporangium (*Bacillus stearothermophilus*). Zástupci poslední skupiny mají kulaté, centrálně nebo subterminálně umístěné spory, které deformují sporangium (*Bacillus globisporus*) (Griffiths a Schraft, 2017; Votava, 2003).

Ke kultivaci *Bacillus cereus* se stejně jako u stafylokoků, využívá krevní agar s 5 % beraní krve, kdy po 24hodinové inkubaci při 37 °C vyrůstají velké kolonie (2-7 mm) s nepravidelným okrajem, šedavou barvou a zónou úplně hemolýzy. Jako selektivně-diagnostická půda se využívá MYP agar, kde narůstá v růžových koloniích se zónou zakalení (ČSN EN ISO 7932).

### 1.2.3 Gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky

Nejčastěji se vyskytujícími mikroorganismy v potravinách jsou mikroorganismy z čeledi *Enterobacteriaceae*. Ta obsahuje více než čtyřicet rodů. Vyskytují se tu oportunně patogenní ale i obligátně patogenní bakterie, příkladem takových jsou rody *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Pantoea* atd. Řadí se sem i koliformní bakterie rodů *Escherchia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* a *Klebsiella* (Janda a Abbott, 2015; Hervert *et al.* 2017).

Do čeledi *Enterobacteriaceae* spadají gramnegativní, nesporulující fakultativně anaerobní střevní tyčinky. Díky přítomnosti peritrichálních bičíků (umístěných po celé buňce, nikoliv jen v jednom místě) je většina zástupců pohyblivá. Nepohyblivé jsou zástupci rodů *Shigella* a *Klebsiella*, dále také *Yersinia pestis* a *Salmonella* Galinarium-Pullorum. (Janda a Abbott, 2015).

V potravinářství se z této čeledi nejvíce sledují již zmiňované koliformní bakterie. Ty se přirozeně vyskytují v trávicím traktu teplokrevných zvířat, pokud se výkaly dostanou do vnějšího prostředí, dokáží se adaptovat a přežít.

Díky jejich vlastnostem se jich využívá jako takzvaných indikátorových mikroorganismů. Například díky jejich odolnosti k vyšším teplotám se využívají k zjištění

spolehlivosti pasterace. Využívají se ale i ke zjištění sekundárních kontaminací, a to díky jejich nenáročnosti na růst, nebo k zjištění čistoty vody. V neposlední řadě jsou indikátorem (ne)dostatečné sanitace a hygieny v potravinářských provozech (Hervert *et al.* 2017).

K identifikaci koliformních bakterií se využívá půda VČŽL, kdy díky zkvašování laktózy narůstají v drobných červeno-fialových koloniích, oproti tomu ostatní příslušníci této čeledi vyrůstají v bezbarvých drobných koloniích. Kultivace probíhá při 30°C, 24 h (ČSN ISO 4832).

### 1.2.3.1 Rod *Pantoea*

Zástupci rodu *Pantoea* jsou pohyblivé, nesporetvorné tyčinky, které se běžně vyskytují ve vodě, půdě, odpadních vodách, ale i zelenině. Jedná se o komenzály a podmíněné patogeny lidí i zvířat.

Asi nejrizikovějším zástupcem je *Pantoea agglomerans*, která byla původně označována za rostlinný patogen. Až v 60. letech 20. století se zjistilo, že se podílí na tvorbě nozokomiálních infekcí (onemocnění vznikající v souvislosti s hospitalizací). Postupně bylo zjištěno, že se podílí na pneumonii, infekci ran, močových cest, meningitidě a mnoha dalších onemocnění. Velmi rizikové je potom onemocnění novorozenců, s nímž je spojena kontaminace práškové kojenecké výživy (Mardaneh, 2013).

## 1.3 Antimikrobiální účinky bylinných extraktů

Postupem času se s vývojem potravinářského průmyslu začalo používat nových technik sušení, uzení, solení, sterilizace nebo kvašení. Do nedávna bylo nejčastěji používáno velké množství stabilizátorů, barviv a chemických konzervačních látek. V dnešní době však spotřebitel vyžaduje vyšší kvalitu potravin a co nejmenší množství těchto chemických látek. Z toho důvodu se výrobci stále častěji vrací k použití přírodních látek jako konzervantů a může se využít i jejich antimikrobiálních účinků. Tyto účinky mohou sloužit jako náhrada některých technologických procesů (pasterizace), které by mohly ovlivňovat senzorycké vlastnosti potravin (Davidson *et al.*, 2013).

Díky přítomnosti přírodních fytochemikálií jsou byliny ideální náhradou. Rostliny je nejčastěji využívají jako obranu proti mikroorganismům a jiným škůdcům. Účinné složky tak můžeme nalézt v celých rostlinách nebo pouze nadzemních (květ, listy, pupeny, lodyha, semena) nebo podzemních (kořen, oddenek, hlíza) částech (Moravcová, 2003).

### 1.3.1 Vybrané skupiny látek s antimikrobiálním účinkem

Z chemického hlediska spadají tyto látky mezi fenoly a polyfenoly, alkaloidy, glykosidy, terpeny a silice. Do skupiny fenolů a polyfenolů spadají ještě chinony a flavonoidy.

Fenoly jsou skupinou látek, která má na aromatickém jádře jednu substituci. Mezi zástupce této skupiny patří kyseliny skořicová, kávová a felurová. První dvě zmíněné můžeme nalézt v mateřídoušce nebo estragonu a mají antivirové, antibakteriální a antimykotické účinky. Kyselina felurová je součástí buněčné stěny obilovin a přírodní estery této kyseliny vykazují antimikrobiální účinky. Studie dokazují spojitost, mezi mírou hydroxylace a antimikrobiálním účinkem. Platí, že čím více hydroxylových skupin, tím větší je účinek (Cowan, 1999; Dorman a Deans, 2000).

Chinony jsou používány jako přírodní barviva. A patří mezi velmi reaktivní sloučeniny. To je způsobeno jejich chemickou strukturou, skládají se totiž z aromatického jádra, které je substituované dvěma karbonylovými skupinami. V mikrobiální buňce inaktivují proteiny pomocí tvorby komplexů s nukleofilními AMK. To má za následek ztrátu funkce proteinu (Ravindran *et al*, 2012).

Zřejmě nejlépe studovanější skupinou s antimikrobiální aktivitou jsou flavonoidy. Principem je zřejmě tvorba komplexů s extracelulárními proteiny v buněčné stěně mikroorganismu. Lipofilní flavonoidy mohou i narušovat cytoplazmatickou membránu. Mezi významné flavonoidy s antimikrobiálním účinkem patří kemferol, quercetin nebo morin. Někteří zástupci mají i silný antivirový efekt (Cowan 1999, Ravindran *et al*, 2012).

Alkaloidy jsou heterocyklické dusíkaté sloučeniny, které se v rostlinách vyskytují ve formě solí organických kyselin. Většina zástupců je pevná, špatně rozpustná ve vodě a bez zápachu. Jedním ze zástupců je berberin. Ten díky schopnosti zasáhnout do bakteriální DNA účinně bojuje i proti trypanozomám (Ettefagh *et al*, 2017; Imanshahidi a Hosseinzadeh, 2008).

### 1.3.2 Charakteristika vybraných rostlin

#### 1.3.2.1 Lékořice

Lékořice náleží do rodu bobovitých. Jedná se o 1 až 1,5 m vysokou trvalou rostlinu s malými červenými plody na konci rozvětvených stonků. Jedná se o významnou farmaceutickou surovinu používanou v tradiční ale i běžné medicíně a v potravinářství. Využívá se hlavně jejího kořene. Ten se sbírá na podzim a po vysušení se naseká a vaří se z něj extrakt. Uvařený extrakt má černou barvu výraznou vůni a lehce štiplavou chuť (Armanini, 2002).

Lékořicový kořen se používá pro léčbu gastritid, žaludečních vředů, malárie, tuberkulózy ale také jako lék proti kašli nebo proti rakovině. Extrakt napomáhá při léčbě vředů, hemoroidů nebo otrav jídlem. Přípravky napomáhají zklidňovat podrážděnou pokožku a některé kultury ji využívají jako afrodisiakum. Při dlouhodobém užívání však může působit jako projímadlo (Fukai, 2002; Armanini, 2002).

V lékořici nalezneme kromě amidů, D-glukózy a sacharózy také kyselinu glycyrrhizinovou. Ta je asi 50x sladší než sacharóza a v lékořici se vykytuje spíše ve formě soli. A právě glycyrrhizin má antibiotický a antiflogistický (protizánětlivý) účinek a inhibicí tvorby žaludečních šťáv napomáhá při léčbě žaludečních vředů. Dále se tu vyskytují flavonoidy, polysacharidy, kumariny a látky podobné steroidním hormonům (Tůmová, 2011; Armanini, 2002).

### 1.3.2.2 Šalvěj

Název rodu šalvěj, angl. *Salvia*, pochází z latinského *salvare* neboli léčit. Tento rod náleží do čeledi hluchavkovité. Jedná se o stálezelený keř, který dorůstá jednoho metru. Jeho stonky a listy jsou obvykle pokryty chlupy. Rostlina má fialové květy, které jsou také pokryty chloupky pro ochranu medových žláz před parazity. Nejčastěji se využívají listy a nať. U šalvěje hispánské se pak ještě používají její semínka, známé jako chia. Pomocí destilace potom z částečně nasušených listů získáváme bezbarvý až světle žlutý esenciální olej s nasládlou až hořkou chutí (Sharifi-Rad, 2018).

V dnešní době se šalvěj používá k léčbě gastrointestinálního traktu, nachlazení, kašle, bolesti zubů, pálení žáhy, nadýmání ale i při nadměrném pocení. Jako koření se využívá například v Itálii nebo Řecku. Dále má také protirakovinotvorné, antiflogistické, antibiotické a antioxidační účinky. Nesmí se také zapomenout na antimikrobiální aktivitu vůči bakteriím rodu *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Escherchia*, *Salmonella*, *Shigella* a kvasinkám rodu *Candida* (Sharifi-Rad, 2018; Bozin, 2007; Horiuchi, 2007).

Aktivními látkami jsou flavonoidy, karotenoidy a organické kyseliny. Z fenolických látek zde můžeme nalézt kyseliny rozmarýnovou, kávovou, karnosovou nebo samotný karnosol. Dále tu je vysoké zastoupení vitamínu A, C, E a vápníku. Můžeme zde také nalézt estrogen. Z toho důvodu se nedoporučuje konzumace těhotným ženám, protože by mohlo dojít k potratu plodu (Charles, 2013; Jaradat, 2013).

### 1.3.2.3 Tymián

Tymián, známý také jako mateřídouška, je vytrvalý, stálezelený, přibližně 30 cm vysoký keř. Má bílé, narůžovělé nebo modrofialové květy a čtyřhranné stonky, které odspodu dřevnatí. Jedná se o silně aromatickou bylinu s ostřejší, ale nasládlou chutí i vůní (Stahl-Biskup, 2012).

Asi nejdůležitější látkou získávanou z tymiánu jsou esenciální oleje. Dále se pro výrobu extraktů ale i samotné jako koření využívají sušené listy. Hlavními producenty sušených listů jsou Španělsko, Jamajka a Maroko. Na výrobu esenciálních olejů jsou pěstovány rostliny převážně ve Francii, Portugalsku nebo Kanadě. Tymián se využívá v potravinářském průmyslu nejen díky antimikrobiální aktivitě, ale i díky velkému množství antioxidantů a výrazné chuti a vůni. V kulinářství se využívá sušený, čerstvý ale i v podobě oleje. Ve farmacii se využívá na nachlazení, bolesti v krku, infekce horních dýchacích cest nebo při zažívacích problémech. Esenciální oleje potom napomáhají při dermatologických obtížích a mají antibakteriální a antifungální účinky. Tento olej prokázal antibakteriální účinky na gram pozitivní bakterie, dále na *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli* O157:H7 nebo *Listeria monocytogenes* vyskytující se stále častěji v syrovém mletém mase (Stahl-Biskup, 2012; Solomakos, 2008; Imelouane, 2009).

Mezi aktivní látky v tymiánu patří taniny, triterpeny, polysacharidy a již zmíněný esenciální olej. Ten obsahuje z 30-55% thymol, karvakrol (1-5%), cymen (15-20%),  $\gamma$ -terpin (5-10%) a další látky. Thymol způsobuje typický silný kořeněný zápach. V tymiánu můžeme nalézt i zástupce skupiny fenolů jako je kyselina kávová nebo rozmarýnová. Kromě nich tu jsou i flavonoidy jako například apigenin, luteolin, hesperidin nebo naringenin (Bozin, 2006; Stahl-Biskup, 2012).

### 1.3.2.4 Galgán

Galgán patří do čeledi zázvorovité. Podobá se zázvoru nejen vzhledem ale i chutí, i když je mnohem aromatictější. Můžeme jej potkat jako zahradní rostlinu s atraktivními bílými vonnými květy a výškou až 2 m. Avšak stejně jako u zázvoru se využívá hlavně oddenek, který je žlutošedý. Má důležitou roli v kuchyních jihovýchodní Asie a Indonésie, kde se využívá jako nasušené koření ale i čerstvě nastrohaný nebo krájený.

Stále častěji se galgán vyskytuje nejen v kuchyních, ale hlavně ve farmaceutickém odvětví. Má totiž antialergické účinky, kdy jeho extrakt dokázal účinně potlačit alergickou reakci. Proto se využívá při alergické rýmě, ale i astmatu. Galgán také prokázal protinádorovou aktivitu u rakoviny plic a prsu. V neposlední řadě také podporuje trávení, napomáhá při nevolnostech, snižuje horečku a při užití jako kloktadlo, může napomáhat při léčbě zánětu dásní, ale i u problémů s horními dýchacími cestami (Ravindran, 2012; Verma, 2011).

V této rostlině můžeme nalézt mnoho chemických látek, díky kterým napomáhá při výše zmíněných onemocněních. Jednou z nich je flavonoid galangin, díky kterému má galgán proti nádorový potenciál, ale který slouží i jako antioxidant. Dalším zástupcem flavonoidů je již zmiňovaný quercetin. Z fenolických látek můžeme v galgánu nalézt kyselinu felurovou, askorbovou a galovou. Antimikrobiální účinek této byliny byl dokázán vůči bakteriím rodu *Listeria*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Escherchia* a *Staphylococcus* (Ravindran, 2012; Weerakkody, 2011).

#### 1.3.2.5 Zázvor

Zázvor patří do čeledi zázvorovitých. Rostlina je přibližně metr vysoká a vyrůstá ze silného větveného oddenku. Má žluto-červené klasy, které vyrůstají v hustých klasech na prodloužených stoncích (Van Wyk *et al*, 2005).

Zázvor napomáhá při nachlazení, horečkách, trávicích problémech a jako stimulant chuti k jídlu. V předklinických studiích byla prokázána protinádorová aktivita, kdy indukované nádory ve střevě, prsu, na vaječnicích a pankreatu byly na zvířecích modelech úspěšně léčeny. (White *et al*, 2007; Semwal *et al*, 2015).

Mezi hlavní aktivní látky obsažené v esenciálním oleji zázvoru patří  $\alpha$ -zingiberin, citral A-geraniál, ar-curcumen a Z-citral. Ostatní látky jsou v různém zastoupení podle stáří rostlin, genetiky a místa růstu. Složení esenciálních olejů přímo ovlivňuje antimikrobiální aktivitu, protože každá ze sloučenin má specifickou schopnost průniku nebo narušení bakteriální buňky (Da Silva *et al*, 2018; Sasidharan a Menon, 2010).

#### 1.3.2.6 Máta

Tento rod patří do čeledi hluchavkovité a náleží mu asi třicet zástupců, mezi nimiž jsou například máta vodní, rolní atd. Kromě Antarktidy se vyskytuje na všech kontinentech. Jedná se o aromatické byliny s přisedlými nebo řapíkatými listy a drobnými květy (Celenk *et al*, 2008).

V lidové medicíně se máta využívá pro léčbu bronchitid, plynatosti, nechuti k jídlu, nevolnosti a při jaterních chorobách. Máta má protizánětlivé, analgetické, antiseptické a antimikrobiální účinky. Kombinace výtažku z máty a medu je lékem na bolest uší a žvýkání listů *M. spicata* snižuje bolest zubů a její extrakt zastavuje krvácení. Listy a stonky se používají na ochucení nápojů, potravinových doplňků, cukrovinek a žvýkaček. Květy se dají využít k aromatizaci omáček, zmrzlin, dresinků nebo salátů (Mahboubi, 2018).



Antimikrobiální aktivita byla prokázána u esenciálních olejů, které se skládají hlavně z piperitonu (38%), piperitenonu (33%) a terpineolu (4,7%). Zbylé složení se liší podle doby sběru esenciálního oleje, ale také podle oblasti, kde rostlina roste a hlavně podle druhu (Mahboubi a Haghi, 2008).

### 1.3.2.7 Rakytník

Rakytník náleží do čeledi hlošínovité. Jedná se o opadavý, trnitý až 3-4 m vysoký dvoudomý keř. Přirozeně se vyskytuje v celé Eurasii a vyžaduje slunná stanoviště. Má silný kořenový systém s uzlíky fixujícími dusík a je optimální rostlinou pro ochranu vody a půdy v oblastech postižených erozí (Suryakumar a Gupta, 2011).

Tato rostlina se dostala do podvědomí hlavně díky svým výživovým a léčivým vlastnostem. Plody a šťáva z nich pozitivně ovlivňuje funkci žaludku, sleziny, dvanáctníku ale také krevtvorbu. Díky vysokému obsahu vitamínu C, K a B komplexu napomáhá i imunitě a má protiradiační účinky (Suryakumar a Gupta, 2011; Valíček a Havelka, 2008).

Mezi hlavní fotochemikálie vyskytující se v rakytníku patří tokoferoly, karotenoidy, již zmíněné vitamíny C, K a B, fytoosteroly a mastné kyseliny (palmová, olejová, linolová, linolenová aj.). U extraktů z listů a semen byl zjištěn antimikrobiální účinek například pro *Listeria monocytogenes* a *Yersinia enterocolitica*. Zároveň bylo během analyzování listů rakytníku objeveno nové fytochemické léčivo hiporamin, u kterého byla prokázána antivirová a antimikrobiální aktivita. Ukázalo se, že má také inhibiční účinek na infekci HIV v buněčných kulturách (Suryakumar a Gupta, 2011).

## 1.4 Stanovení antimikrobiální aktivity

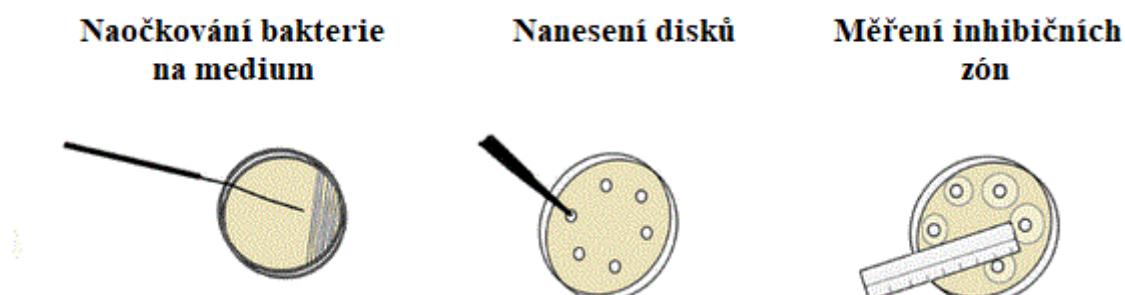
Díky neustále se zvyšující rezistenci bakterií na dlouho používaná antibiotika, je důležité objevovat nové možnosti, které by v budoucnu mohly být při boji s bakteriemi nápomocné. Příkladem takových látek jsou již zmiňované extrakty z bylin. Při testování těchto extraktů je třeba stanovit citlivost daných bakterií k antimikrobiálním látkám, které se v extraktech vyskytují.

### 1.4.1 Diskový difúzní test

Tento test řadíme spíše mezi kvalitativní, z toho důvodu, že nelze kvantifikovat množství, které difundovalo o agaru. Jedná se o rychlou, jednoduchou, a hlavně spolehlivou metodu, která se často rutinně využívá v řadě klinických mikrobiologických laboratořích.

Tato metoda je založena na difuzi testované látky z papírového disku do agaru. Na agaru je naočkována příslušná koncentrace daného mikroorganismu. Kolem disku poté během inkubace vzniká díky snižujícímu koncentračnímu gradientu tzv. zóna inhibice, kde nedochází k nárůstu mikroorganismu (Balouiri, 2016)

U bakterií se využívá Mueller-Hintonův agar, do kterého se pro náročnější bakterie může přidat 5 % defibrinované koňské nebo ovčí krev. Velmi důležitá je i koncentrace bakterií, která je pomocí vatového tamponu nanášena na agar. Je třeba, aby hustota inokula odpovídala 0,5 stupni zákalové stupnice dle McFarlanda. Inkubace probíhá 24-48 hodin při 37°C. Poté se měří zóna inhibice, ta by měla mít stejný kulovitý tvar, jako papírový disk. Vždy je nutno, kromě disku se stanovovanou látkou použít i kontrolní disk. Například pro ověření, že kultura nebyla poškozena a došlo k nárůstu (EUCAST, [http://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/disk\\_diffusion\\_methodology/](http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/))



Obrázek 4: Diskový difúzní test

(převzato z [https://media.springernature.com/lw785/springer-static/image/art%3A10.1007%2Fs11051-018-4152-3/MediaObjects/11051\\_2018\\_4152\\_Figa\\_HTML.gif](https://media.springernature.com/lw785/springer-static/image/art%3A10.1007%2Fs11051-018-4152-3/MediaObjects/11051_2018_4152_Figa_HTML.gif), upraveno, staženo 28.12.2018)

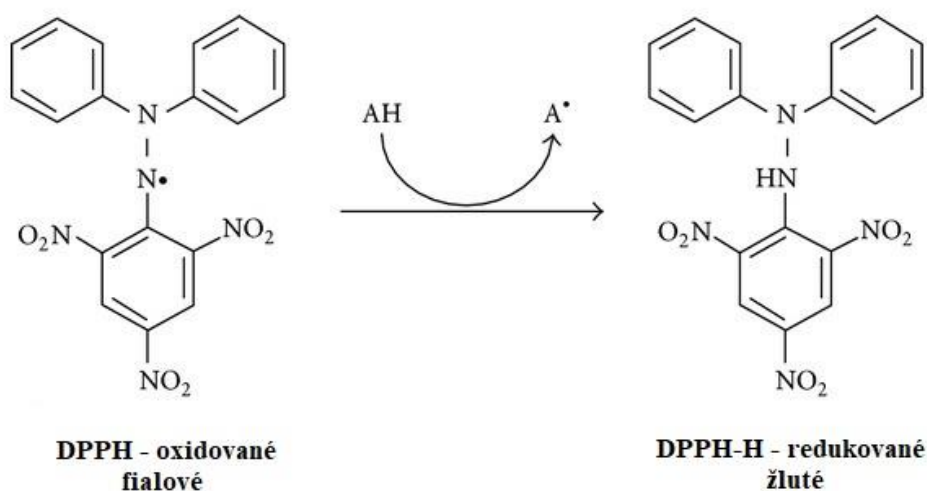
## 1.5 Stanovení antioxidační aktivity

Výrobci u mnoha potravin a látek deklarují antioxidační účinky. Aby bylo možné porovnávat antioxidační účinky, zejména u potravin, byl zaveden pojem celková antioxidační aktivita (TAA). Ta nám uvádí schopnost antioxidantů odbourávat radikály. Metod pro stanovení TAA je mnoho, je to způsobeno tím, že nízkomolekulární antioxidanty mohou reagovat různými způsoby. Obecně se postupy dělí do dvou skupin na metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a metody posuzující redoxní vlastnosti látek.

Mezi metody hodnotící schopnost eliminovat radikály patří i metoda používající DPPH neboli (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) a je považována za jednu ze základních metodik pro posuzování antiradikálové aktivity. Principem metody je reakce testované látky se stabilním DPPH radikálem, kdy dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin) za přechodu z fialového do žlutého zbarvení. Tato reakce je zobrazena

na obrázku 5. Průběh je sledován spektrofotometricky a po uplynutí konstantního času se měří úbytek absorbance. Výsledky se poté udávají v procentech inhibice radikálu DPPH nebo přepočtené na množství troloxu (Paulová a Bochořáková, 2003; Teixeira *et al*, 2013).

Při použití metod posuzujících redoxní vlastnosti se využívá reakce redukčních činidel s oxidanty, které redukují a tím je inaktivují. Díky tomu, je možné sledovat antioxidační aktivitu z pohledu redukční schopnosti. Měření míry redukce provádíme chemicky nebo elektrochemicky. Při stanovení chemickou metodou se využívá metoda FRAP (feric reducing antioxidant potencial), kdy antioxidanty ve vzorku redukují komplex  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ ( $\text{Fe}^{3+}$ -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin)). Nárůst absorbance odpovídající množství komplexu  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ je roven antioxidační aktivitě vzorku. Z elektrochemických metod se nejčastěji využívá cyklická voltametrie nebo HPLC metoda s elektrochemickou detekcí (Paulová a Bochořáková, 2003).



Obrázek 5: Princip metody DPPH (převzato z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23956973>, upraveno, staženo dne 5.1.2018)

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Pomůcky

Homogenizační sáčky s membránou

Kahan

Krycí sklíčka

Laboratorní sklo – odměrné válce

L-hokejky plastové

Petriho misky – plastové

Očkovací klíčky

Mikropipety automatické

Pipety plastové 1 ml, 10 ml

Podložní skla

Pomůcky k navažování

Stojan na zkumavky

Špičky plastové

Vatové tampóny

Papírové disky - blank

Zkumavky

### 2.2 Přístroje

Autokláv STERILAB, BMT Medical Technology, ČR

Autokláv PS 20A, BMT Medical Technology s.r.o., ČR

Horkovzdušný sterilizátor STERIMAT 51042, BMT Medical Technology s.r.o., ČR

Analytické váhy KERN 442-43, Kern, Německo

Biologický termostat Memert INE 500

Denzitometr McFarland DEN-1, BIOSAN, Lotyšsko

Vortex, Bio Vortex V1, BIOSCAN, Lotyšsko

Laboratorní mikroskop NIKON Eclipse H600L 80i, Japonsko

Termostat Lovibond, Velká Británie

Centrifuga Universal 320, Hettich, Německo

Vodní lázeň CERTOMAT WR, B.BRAUN, Německo

Homogenizátor Masticator IUL Basic, Španělsko

Počítadlo kolonií Start Count STC-1000, VWR International Švýcarsko

Ultrazvuková vana SONOREX RK 31 BANDELIN, Německo

Chladnička Liebherr, Německo

## 2.3 Živná media a jejich příprava

### **GTK agar: Plate Count Agar (HiMedia, Indie)**

Složení:	Enzymatický hydrolyzát kaseinu	5 g/l
	Kvasničný extrakt	2,5 g/l
	Glukóza	1 g/l
	Agar	15 g/l

Bylo naváženo 23,5 g směsi GTK do 1000 ml destilované vody. Následně byl roztok sterilizován v autoklávu při 121°C, 15 minut.

### **DRBC agar: Dichloran Medium Base w/Rose Bengal (HiMedia, Indie)**

Složení:	Masový pepton	5 g/l
	Dextrosa	10 g/l
	Dihydrogenfosforečnan draselný	1 g/l
	Síran hořečnatý	0,5 g/l
	Bengálská červeň	0,025 g/l
	Dichloran	0,002 g/l
	Agar	15 g/l

Bylo naváženo 15,79 g živného agaru DRBC do 500 ml destilované vody. Poté byl roztok sterilizován v autoklávu 15 minut při 120°C. Po zchladnutí na 50°C a byla sterilně přidána lahvička chloramfenikolu (FD 033 Chloramphenicol Selective Supplement), jejíž sypký obsah byl nejprve rozpuštěn ve 2 ml ethanolu.

### **B-P agar: Baird Parker Agar Base (HiMedia, Indie)**

Složení:	Enzymatický hydrolyzát kaseinu	10 g/l
	Hovězí extrakt	5 g/l
	Kvasničný extrakt	1 g/l
	Glycin	12 g/l
	Pyrohroznán sodný	10 g/l
	Chlorid lithný	5 g/l
	Agar	20 g/l

Bylo naváženo 33,2 g komerčně dodávané směsi B-P agaru. Následně bylo toho množství rozpuštěno v 475 ml destilované vody. Označená směs byla autoklávována 15 minut při 120°C. Po ochlazení směsi na 40–50 °C bylo sterilně přidáno 25 ml žloutkové směsi s telluričitanem draselným (FD 046 Egg York Tellurite Emulsion).

**MYP agar: Modified MYP Agar Base (HiMedia, Indie)**

Složení:	Masový pepton	10 g/l
	Masový extrakt	1 g/l
	D-mannitol	10 g/l
	Chlorid sodný	10 g/l
	Fenolová červeň	0,025 g/l
	Agar	12 g/l

Bylo naváženo 23,89 g MYP agaru do 500ml destilované vody. Sterilizace v autoklávu 15 minut při 120°C. Po zchladnutí na 50°C, byl přidán roztok Polymyxinu B (FD 003 Polymyxin B Sulphate) bylo sterilně přidáno 50 ml vaječného žloutku (FD045-1VL Egg York Emulsion).

**S-B agar: Slanetz and Barley medium (HiMedia, Indie)**

Složení:	Tryptoza	20 g/l
	Kvasničný extrakt	5 g/l
	Glukóza	2 g/l
	Hydrogenfosforečnan (di)sodný	4 g/l
	Azid sodný	0,4 g/l
	Trifenyltetrazolium chlorid	0,1 g/l
	Agar	15 g/l

Bylo naváženo 33,2 g sypké směsi S-B agaru do 500 ml destilované vody. Tento roztok byl ponořen na 20 minut do vodní páry udržované při 100°C.

**VČŽL agar: Violet Red Bile Agar (HiMedia, Indie)**

Složení:	Pankreatický hydrolyzát želatiny	7 g/l
	Kvasničný extrakt	3 g/l
	Žlučové soli	1,5 g/l
	Laktóza	10 g/l
	Chlorid sodný	5 g/l
	Neutrální červeň	0,03 g/l
	Krystalová violet	0,002 g/l
	Agar	15 g/l

Bylo rozpuštěno 19,26 g směsi VČŽL agaru v 500 ml. Roztok byl povařen 20 minut ve vodní páře udržované při 100°C. Tento agar nebyl rozlit do Petriho misek, protože byl použit k inokulaci zaléváním dle ČSN ISO 4832.

**KA: Blood Agar Base No. 2 (HiMedia, Indie)**

Složení:	Proteosový pepton	15 g/l
	Játrový extrakt	2,5 g/l
	Kvasničný extrakt	5 g/l
	Chlorid sodný	5 g/l
	Agar	15 g/l

Bylo naváženo 21,25 g směsi do 500 ml destilované vody. Sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po ochlazení na 40-50 °C bylo asepticky přidáno 7% sterilní defibrinované krve.

**M-H: Mueller Hinton Agar (HiMedia, Indie)**

Složení:	Hovězí masová infuze	2,0 g/l (300)
	Kyselý hydrolyzát kaseinu	17,5 g/l
	Škrob	1,5 g/l
	Agar	17 g/l

Bylo naváženo 15,2 g media do 400 ml destilované vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

### **Fyziologický roztok**

Složení: Chlorid sodný (Merck, Německo) 8,5 g/l

Bylo naváženo 8,5 g NaCl do 1000 ml destilované vody, sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

### **Fyziologický roztok s peptonem**

Složení: Chlorid sodný (Merck, Německo) 8,5 g/l

Pepton (HiMedia, Indie) 1 g/l

Bylo naváženo 8,5 g NaCl a 1 g peptonu do 1000 ml destilované vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C 15 minut.

## **2.4 Chemikálie a roztoky**

Imersní olej pro mikroskopování

Krystalová violet, Lugolův roztok, Karbolfuchsin

60% (v/v) ethanol, potravinářský, Lach-ner

95% (v/v) ethanol, potravinářský, Lach-ner

70% (v/v) methanol, potravinářský, Lach-ner

DPPH

Trolox - 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina

Thiobarbiturová kyselina

BHT

Kyselina trichloroctová

Bavlníková modř v laktofenolu (S 016)

Oxidázový test

Peroxid vodíku

## **2.5 Komerčně dodávané soupravy**

ENTERO test 24 (Erba Lachema, ČR)

STAPHY test 24 (Erba Lachema, ČR)

Činidlo pro test ACETOIN (Erba Lachema, ČR)

Činidlo pro test INDOL (Erba Lachema, ČR)



## 2.6 Vzorky

Pro tuto práci bylo k dispozici celkem 11 proteinových přesnídávek, z nichž sedm bylo po dobu jednoho roku skladováno při pokojové teplotě. Tyto vzorky byly označeny 1A, 2B, 3C, 4A, 5B, 6C, 7A. Ve dvou případech byla mikrobiologická kontaminace zjišťována hned po výrobě (OZ1, OZ2P) a dva vzorky označené OZ3 a OZ4P byly uchovávány 4 měsíce při pokojové teplotě, z důvodu sledování kontaminace při tomto skladování.

Tyto vzorky se lišily technologickou úpravou a použitými surovinami. Ty jsou uvedeny v tabulce 1, poměry jednotlivých surovin však výrobce nesdělil z důvodu ochrany vlastního výrobku, neboť se jedná o vývojový produkt. Vzorky OZ1, OZ2P, OZ3 a OZ4P obsahovaly navíc sukralózu a přírodní čokoládové aroma. V tabulce 2 jsou uvedeny rozdíly v úpravách a spojitost s označením vzorků.

Aby nedošlo ke kontaminaci přesnídávkou z vnějšího prostředí, bylo třeba otřít obal 60 % (v/v) ethanolem. Následně bylo třeba přesnídávkou promíchat promnutím v rukou alespoň jednu minutu. U dvou z nově doručených vzorků následovalo senzorické hodnocení a homogenizace.

**Tabulka 5: Seznam použitých surovin a dochucujících látek vzorky 1-A až 7-A**

Suroviny	
Rýžová mouka	Voda
Čiroková mouka	Mleté lískové ořechy
Jáhlová mouka	Mletý kokos
Pohanková mouka	Mleté vlašské ořechy
Kukuřičná mouka	Micelární kasein
Mandlové máslo	Mléčný proteinový koncentrát
Arašídové máslo	Hydrolyzovaný hovězí kolagen
Řepkový olej	Inulin
Lněný olej	Kyselina mléčná
Chia olej	Citrusová vláknina
Kokosový olej	Syrovátkový proteinový koncentrát
Dochucení	
Nízkotučné kakao	Limetková šťáva
Mletá sušená jablka	100% jablečný koncentrát
Mleté sušené hrušky	100% jablečno-hruškový koncentrát
Rýžový sirup	

**Tabulka 6: Varianty přesnídávek**

	<b>Varianta přesnídávk</b>	<b>Způsob sterilizace</b>	<b>Nejvyšší teplota během pasterace</b>	<b>Čas pasterace</b>
<b>1-A</b>	Dospělá 120 g + xylitol	1x pasterace	80,7 °C	20 min
<b>2-B</b>	Dospělá 120 g	1x pasterace	80,7 °C	20 min
<b>3-C</b>	Dětská 100 g	1x pasterace	80,7 °C	20 min
<b>4-A</b>	Dospělá 120 g + xylitol	2x pasterace	80,9 °C 80,6 °C	2x 20 min
<b>5-B</b>	Dospělá 120 g	2x pasterace	80,9 °C 80,6 °C	2x 20 min
<b>6-C</b>	Dětská 100 g	2x pasterace	80,9 °C 80,6 °C	2x 20 min
<b>7-A</b>	Dospělá 120 g + xylitol	1x pasterace + sorban (1mg)	80,7 °C	20 min
<b>OZ1</b>	Dospělá 120 g	1x pasterace	80,7 °C	20 min
<b>OZ2P</b>	Dospělá 120 g	1x pasterace	80,7 °C	20 min
<b>OZ3</b>	Dospělá 120 g	1x pasterace	80,7 °C	20 min
<b>OZ4P</b>	Dospělá 120 g	1x pasterace	80,7 °C	20 min

## 2.7 Homogenizace

Aby bylo možné provést stanovení kontaminace vzorku, byla provedena homogenizace. Nejprve bylo třeba očistit obal, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku. Poté bylo do homogenizačního sáčku s membránou sterilně naváženo 10 g vzorku a přidáno 90 ml fyziologického roztoku s peptonem. Následně byla tato směs 2 minuty homogenizována v peristaltickém homogenizátoru. Po tomto procesu byl vzorek připraven k další analýze.

## 2.8 Mikrobiologická analýza

### 2.8.1 Počítání narostlých kolonií podle normy ČSN EN ISO 4833

Při stanovení počtu kolonií se užívá metoda zálivu, kdy se 1 ml suspenze zalije živným médiem, nebo metoda roztěru L-hokejkou, kdy se napipetuje 100  $\mu$ l suspenze na agar v Petriho misce.

Při počítání je třeba zohlednit počet kolonií. Pokud misky obsahují 15-300 kolonií využívá se rovnice, kdy zjistíme počet cfu/g vzorku (Rovnice 1).  $\Sigma C$  je celkový součet typických kolonií na vybraných miskách.  $V$  značí pipetovaný objem inokula,  $n_1$  je počet misek z prvního použitého ředění,  $n_2$  je počet misek z druhého použitého ředění a  $d$  je faktor prvního použitého ředění. Výsledek se zaokrouhluje tak, aby obsahoval dvě číslice různé od nuly.

Rovnice 1: Rovnice pro výpočet počtu kolonií (cfu) na gram potravin

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

V případě, že na misce naroste méně než 15 kolonií, využívá se vztahu pro odhad nízkých počtů (Rovnice 2). K výpočtu se využívají misky naočkované výchozí suspenzí, tedy nultým ředěním. Hodnota  $m$  odpovídá aritmetickému průměru počtu kolonií z obou misek,  $d$  je potom faktor ředění výchozí suspenze.

Rovnice 2: Rovnice pro odhad nízkých počtů

$$N = m \cdot d^{-1}$$

### **2.8.2 Stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů (CPM kultivační metodou, ČSN EN ISO 4833)**

Stanovení celkového počtu mikroorganismů patří mezi základní vyšetření potravin, slouží ke sledování mikrobiologické čistoty a tím i kvality potravin a surovin, ze kterých se potraviny skládají. Podle normy se používá agar GTK (glukóza, trypton, kvasničný extrakt). Po kultivaci se počítají vyrostlé kolonie a vypočítá se počet cfu/g.

Celkové počty byly stanoveny u vzorků, které byly dodány již s extrakty bylin. Některé vzorky nebyly pasterovány a bylo třeba zjistit, zda extrakty inhibují nárůst bakterií. Po homogenizaci, která je popsána v bodě 2.7 byl napipetován 1 ml z homogenizačního sáčku do Petriho misky. Následně byl tento homogenát zalit roztavenou půdou GTK. Poté bylo desítkovým ředěním připraveno ředění  $10^{-2}$ . To bylo zaočkováno stejným způsobem, tedy 1 ml byl zalit agarem GTK. Dále bylo toto stejné ředění použito pro roztěr L-hokejkou na půdu GTK, pipetováno tedy bylo 100  $\mu$ l. Byly tedy získány, tři po sobě jdoucí ředění. Každé ředění bylo naočkováno na dvě Petriho misky. Po kultivaci při 30 °C, 24h byly spočítány kolonie a vyjádřeny v počtu cfu/g.

### **2.8.3 Stanovení koliformních mikroorganismů v potravinách (ČSN ISO 4832)**

Touto metodou stanovujeme rody *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* a *Escherchia*. Arbitrážní půdou je VČŽL, skládající se z krystalové violeti pro inhibici gram pozitivních mikroorganismů, neutrální červeně, která slouží jako indikátor zkvašování laktózy, žluči pro inhibici doprovodných mikroorganismů a laktózy jako živiny. Koliformní bakterie narůstají v drobných červenofialových koloniích.

Po homogenizaci, která je popsána v bodě 2.7, byl do prázdné Petriho misky napipetován 1 ml suspenze přímo z homogenizačního sáčku (ředění  $10^{-1}$ ) a byl zalit roztavenou půdou VČŽL a dokonale promíchán. Stejným způsobem bylo provedeno naočkování i v případě následujícího ředění ( $10^{-2}$ ). Každé ředění bylo naočkováno na dvě Petriho misky. Po utužení byl ještě agar přelit téže půdou pro zajištění prostředí, kultivace probíhala 72 h při 30 °C aerobně. Poté byly počítány typické kolonie a vyjádřeny v cfu/g.

### **2.8.4 Stanovení počtu enterokoků**

Stanovení enterokoků není obsaženo v normách. Je to z toho důvodu, že některé druhy mohou být součástí tzv. startovacích kultur. Stanovení proto probíhá ve chvíli, kdy je podezření, že by znehodnocení potravin mohlo být způsobeno právě enterokoky. Jedná se o bakterie, které

jsou velmi odolné a dobře snáší i vyšší teploty, pH nebo zvýšený obsah solí. Při stanovení rodu *Enterococcus* proto využíváme půdu podle Slanetz-Barleyové. V ní je obsažen azid sodný, který inhibuje nárůst doprovodné mikroflóry a trifenylnitrotetrazolium chlorid (TTC), který je enterokoky redukován na červený formazan. Enterokoky narůstají v karmínově červených koloniích.

Po homogenizaci, která je popsána v bodě 2.7, bylo na půdu S-B naočkováno 100 $\mu$ l suspenze přímo z homogenizačního sáčku, tedy ředění  $10^{-1}$ , a rozetřeno L-hokejkou. Stejně tak bylo provedeno naočkování i v případě ředění  $10^{-2}$ , kdy byl 1 ml původního zhomogenizovaného vzorku smíchán s 9 ml fyziologického roztoku. Každé ředění bylo naočkováno na dvě Petriho misky. Následně byly misky uloženy do termostatu při 37 °C a inkubovány 72 h aerobně. Poté byly počítány typické kolonie.

### **2.8.5 Horizontální metoda stanovení počtu presumptivního *Bacillus cereus***

**(ČSN EN ISO 7923)**

Pomocí této metody je stanovován počet presumptivních neboli předpokládaných příslušníků druhu *Bacillus cereus*. Pomocí konfirmačních testů totiž není možné odlišit *B. cereus* od ostatních, byť řídce se vyskytujících, zástupců tohoto druhu. Arbitrážní půdou je MYP agar (mannitol, yolk, polymixin B). Využívá se tu proteolytických vlastností bakterie *B. cereus*, ten totiž nezksvašuje manitol a díky indikátoru fenolové červeně tak narůstá v růžových koloniích. Žloutek se využívá pro zjištění aktivity lecitinázy a polymixin B sulfát inhibuje doprovodnou mikroflóru.

Po homogenizaci, která je popsána v bodě 2.7, bylo na Petriho misku s MYP agarem napiperováno 100  $\mu$ l příslušného ředění ( $10^{-1}$  a  $10^{-2}$ ) a rozetřeno L-hokejkou. Každé ředění bylo naočkováno na dvě Petriho misky. Následovala inkubace při 30 °C, 72 hodin aerobně a počítání typických kolonií.

### **2.8.6 Metoda stanovení koaguláza-pozitivních stafylokoků (ČSN EN ISO 6888-1)**

Stanovení koaguláza pozitivních stafylokoků je založeno na složení půdy, kdy se využívá vaječný žloutek pro zjištění aktivity lecitinázy, telluricitan draselný, který je koaguláza pozitivními stafylokoky redukován na černý telurid, a chloridu lithném, který inhibuje doprovodnou mikroflóru. Arbitrážní půdou je proto půda podle Baird-Parkera s vaječnou emulzí. Díky teluridu zde stafylokoky narůstají v drobných černých koloniích.

Po homogenizaci, která je popsána v bodě 2.7, bylo na Petriho misku s B-P agarem napipetováno 100 µl suspenze v ředění  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$  a řádně rozetřeno L-hokejkou. Pro každé ředění byly naočkovány dvě Petriho misky. Inkubace probíhala při 37 °C po dobu 72 hodin aerobně. Po inkubaci byly spočítány typické kolonie.

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

Stanovení počtu kvasinek a plísni probíhá na jedné živné půdě, avšak při vyhodnocování se počty uvádí zvlášť. Využívá se k tomu půda DRBC, která se skládá z dichloranu, bengálské červeně a chloramfenikolu. Bengálská červeň napomáhá při identifikaci plísni a kvasinek kdy kvasinky rostou růžově. Zároveň spolu s vyšším pH půdy a dichloranem napomáhá inhibovat rozrůstání plísni se vzdušným myceliem. Chloramfenikol pak napomáhá inhibici růstu bakterií.

Po homogenizaci, která je popsána v bodě 2.7, bylo na Petriho misku metodou roztěru L-hokejkou zaočkováno 100 µl ředění  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$  vždy ve dvou opakováních. Následovala inkubace při 25 °C po dobu 5 dní a počítání narostlých kolonií.

## **2.9 Identifikace mikroorganismů**

Jedním z cílů této práce bylo vyizolovat mikroorganismy, kontaminující tyto přesnídávky a identifikovat je. Z toho důvodu byly mikroorganismy, které narostly na selektivně diagnostických půdách, přeočkovány na neselektivní medium KA a Müeller-Hintonův agar (kultivace 24 h, 37 °C) a byly podrobeny dalšímu testování jako je barvení dle Grama, tvorba katalázy a oxidázy.

Vybrané kolonie byly definitivně identifikovány pomocí metody MALDI-TOF v Pardubické nemocnici, Krajské nemocnici Pardubického kraje, oddělení mikrobiologie MUDr. Lucíí Barekovou, Ph.D. a byly použity při sledování antimikrobiální aktivity rostlinných extraktů. Po dobu experimentu byly kultury uchovávány na půdě KA a M-H při chladničkové teplotě.

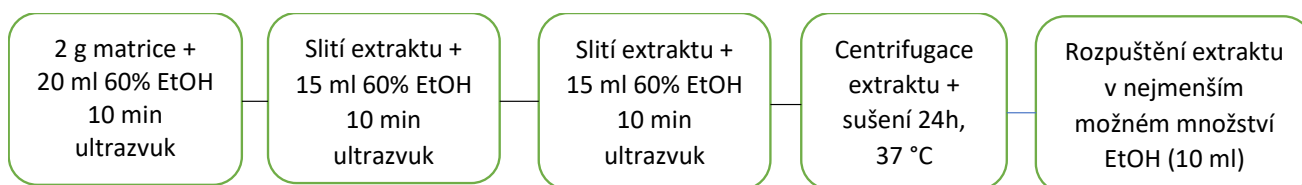
## **2.10 Výroba rostlinných extraktů**

Rostlinné extrakty byly připravovány na Katedře analytické chemie, z koření a bylin běžně dostupných na českém trhu. Jednalo se o extrakty galgánu, lékořice, tymiánu, šalvěje, majoránky, máty, rakytníku a zázvoru. V tabulce 7 je soupis použitých extraktů a jejich koncentrace.

**Tabulka 7: Připravené extrakty a jejich výsledná koncentrace**

Bylina	Koncentrace (mg/ml)
Galgán – Galgán oddenek, F-Dental Hodonín	35,60
Lékořice – Lékořice kořen, F-Dental Hodonín	34,18
Tymián – Tymián list, F-Dental Hodonín	45,54
Šalvěj – Šalvěj list, F-Dental Hodonín	29,59
Máta – zdroj vlastní	37,62
Rakytník – Plody, Fruwe, s.r.o., Kladno	45,54
Zázvor – Zázvor mletý, Kotányi	48,81

Pracovní postup je zobrazen na obrázku 6. K navážce bylin byl přidán ethanol a následně umístěn do ultrazvuku. Následně byl odpipetován co největší objem ethanolu. Následovalo doplnění ethanolu. Tento postup byl opakován dvakrát. Poté byl extrakt centrifugován 15 minut při 5000 otáčkách za minutu. Následně byly extrakty zváženy a umístěny do sušárny. Vysušené extrakty byly rozpuštěny zváženy a rozpuštěny v takovém množství 60 % (v/v) EtOH, aby došlo k dokonalému vymytí a rozpuštění celého extraktu. Z těchto hodnot byla dopočítána koncentrace extraktu. Po rozpuštění byl roztok kvalitativně převeden do sterilní plastové zkumavky a po celou dobu byl uchovávan v chladničce.



Obrázek 6: Pracovní postup přípravy extraktů

## 2.11 Stanovení antimikrobiální aktivity – disková difúzní metoda

Po identifikaci mikroorganismů a přípravě extraktů, následovalo stanovení antimikrobiální aktivity pomocí difúzní diskové metody. Metoda byla provedena dle mezinárodního postupu sledování citlivosti na antibiotika EUCAST disková difúzní metoda, verze 7.0 z ledna 2019

Jednalo se o test antimikrobiální aktivity u bakterií, které byly stanoveny a identifikovány v dodaných vzorcích. Na test byla třeba 24h kultura, kultivovaná na neselektivním diagnostickém mediu. V tomto případě se jednalo o M-H agar. Následně byla z kultury pomocí fyziologického roztoku připravena suspenze o hustotě 0,5 stupně dle McFarlanda. Tato suspenze byla pomocí sterilního vatového tampónu nanášena na celou plochu

Petriho misky s M-H agarem. Následně byly na takto inokulovanou půdy sterilně naneseny prázdné disky o velikosti 6 mm, na které bylo napipetováno 12  $\mu$ l extraktu (při pipetování většího objemu nedošlo k nasátí celého objemu do disku a extrakt se vyplavil i mimo něj). Na jednu Petriho misku bylo umístěno maximálně šest papírových disků, a to z toho důvodu, že při vyšším počtu, by mohlo docházet ke splývání inhibičních zón. Kromě extraktů byl na jeden disk nanesen i slepý pokus v podobě 60 % (v/v) EtOH. Inkubace byla 24 h při 37 °C a následovalo odečtení inhibičních zón. Veškerá stanovení byla provedena v dubletu.

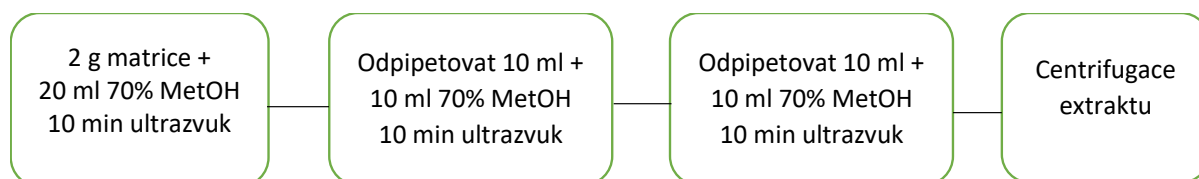
## 2.12 Účinnost extraktů v reálných vzorcích

Vybrané nejúčinnější extrakty byly předány výrobci, který připravil sérii pasterovaných a nepasterovaných přesnídávek s přidavkem těchto extraktů. Následně byl proveden mikrobiologický rozbor ihned po vyrobení přesnídávký a dále pak po týdnu. Vzorky byly uchovávány při pokojové teplotě.

Vzorky byly označeny galgán, lékořice, šalvěj, galgán – P, lékořice – P, šalvěj – P. Označení P znamenalo, že se jedná o pasterovaný vzorek. Po homogenizaci, která je popsána v bodě 2.7, bylo připraveno druhé ředění pomocí desítkového ředění. Následovalo rozočkování na příslušná media. Postup je popsán v kapitolách 2.8.1 až 2.8.7. Následovala inkubace 48 h, při teplotách, které jsou uvedeny u postupů. Po inkubaci byly spočítány typické kolonie.

## 2.13 Stanovení antioxidační aktivity

Pro stanovení antioxidační aktivity bylo třeba připravit extrakty ze samotných přesnídávek. Ty byly po mikrobiálním stanovení uschovány rozprostřené mezi dva pečící papíry v mrazícím boxu. Schéma přípravy je zobrazeno na obrázku 7.



Obrázek 7: Schéma přípravy extraktu z přesnídávek

### 2.13.1 Kalibrační řada

Kalibrační řada se připravovala z látky Troloxu, připravil se zásobní roztok o koncentraci 250  $\mu$ g/ml v 95% (v/v) EtOH. Z tohoto roztoku byla následně připravena kalibrační řada o koncentracích 1, 2, 5, 10, 15 a 20  $\mu$ g/ml do 10 ml odměrných baněk. Z takto



připravených roztoků bylo do zkumavky odpipetováno 500 µl a přidáno 5 ml methanolického roztoku DPPH radikálu o koncentraci 25 µg/ml. Po protřepání se nechaly obsah zkumavek 20 minut (fixní čas) reagovat v temnu. Přesně po uplynutí 20 minut byla změřena absorbance při 517 nm. Doba, po kterou reakce probíhala byla vybrána, protože v tomto čase již nedocházelo ke snižování absorbance. To dokazuje obrázek 11 v příloze. Spolu s kalibrační křivkou byl proměřen i slepý vzorek, kde bylo do zkumavky napipetováno 500 µl 70% (v/v) MetOH a 5 ml roztoku DPPH. Zbýlý postup byl totožný jako pro kalibrační řadu. Graf pro kalibrační řadu je na obrázku 12 v přílohách.

### 2.13.2 Měření vzorků

Získaný extrakt z přesnídávky byl upraven stejně jako kalibrační roztoky. Do zkumavky bylo odpipetováno 500 µl daného vzorku a bylo přidáno 500 µl roztoku DPPH o koncentraci 25 µg/ml. Po promíchání se zkumavky umístily do temna, aby mohla proběhnout reakce. Po uplynutí 20 minut byla měřena absorbance při 517 nm. Všechny vzorky byly stanovovány vždy dvakrát a to tak, že z každé přesnídávky byly připraveny dva extrakty a každý extrakt byl zpracován a změřen dvakrát.

### 2.13.3 Vyhodnocení výsledků

Naměřené hodnoty absorbance vzorků, byly pomocí vzorce (Rovnice 3) převedeny na procenta inhibice. Po dosažení této hodnoty do rovnice grafu, kterou jsme získali po vytvoření grafu kalibrační řady závislosti inhibice na koncentraci, jsme dostali koncentraci v µg/ml. Následně bylo třeba zohlednit objem, do jakého byl původní vzorek extrahován a původní množství vzorku. Po těchto přepočtech jsme zjistili, jakému množství Troloxu (µg) odpovídá antioxidační aktivita v jednom gramu vzorku. Následně došlo ke statistickému srovnání metodou Tukey – metoda pro párové porovnání v programu OriginPro9. Hodnocení bylo formou označení písmenem, kdy označení stejným písmenem značilo statisticky stejné hodnoty.

Rovnice 3: Přepočet absorbance – koncentrace

$$\% \text{ inhibice} = 100 - \frac{100 \cdot abs_{vzorku}}{abs_{blank}}$$

## 2.14 Stanovení rozsahu oxidace lipidů s využitím thiobarbiturové kyseliny

Oxidace lipidů neboli žluknutí je problémem u potravin obsahující velké množství lipidů. Dochází tu k reakci hydroperoxidů s kyslíkem za vzniku malondialdehydu (MDA). Tento aldehyd vytváří komplex s kyselinou thiobarbiturovou za vzniku růžového komplexu, který je možné spektrofotometricky změřit při vlnové délce 532 nm. Vzorek je měřen i při 600 nm, tato vlnová délka napomáhá korekci červených látek, které mohou být ve vzorku přítomny.

Využily se extrakty přesnídávek, které byly připravovány pro zkoušky antioxidační aktivity. Do zkumavky s víčkem byly napipetovány 2 ml vzorku a 2 ml předem připravené směsi skládající se z 20% (v/v) kyseliny trichloroctové, 0,01% (v/v) BHT a 0,65% (v/v) TBA. Zkumavky se uzavřely a po dobu 30 minut byly zahřívány na 70°C. Po uplynutí času a ochlazení byla měřena absorbance při 532 a 600 nm. Měření probíhalo vždy v dubletu. Rozsah oxidace lipidů byl vypočítán na základě tzv. malodialdehyd ekvivalentu (MDAeq.) v nmol/l. Tento vztah dokazuje rovnice 4.

Rovnice 4: Výpočet MDAeq.

$$MDAeq. \left( \frac{nmol}{l} \right) = \left[ \frac{A_{532} - A_{600}}{155000} \right] \cdot 10^6$$

## 3 Výsledky

### 3.1 Stanovení koliformních mikroorganismů v potravinách (ČSN ISO 4832)

Stanovení koliformních mikroorganismů proběhlo pro ověření sanitace provozu a kvality použitých surovin. Protože nedošlo k nárůstu vyššímu než 15 kolonií, byl použit vztah pro odhad nízkých počtů (Rovnice 2).

U vzorků 1-A, 2-B, 3-C, 4-A, 5-B, 6-C a 7-A, OZ1, OZ3 a OZ4P k nárůstu na médiu VČŽL nedošlo, můžeme tedy říci, že ve vzorcích se nachází méně než  $1,0 \cdot 10^1$  cfu/g přesnídky. To značí dobrou sanitaci provozu. U vzorku OZ2P došlo k nárůstu jedné kolonie, která prorůstala do média. Z toho důvodu byla bakterie vyizolována izolací čárkováním na neselektivní medium a pomocí metody MALDI-TOF určena jako *Pantoea gaviniae*. Nejednalo se tedy o koliformní mikroorganismus.

### 3.2 Stanovení počtu enterokoků

Enterokoky byly testovány z důvodu jejich schopnosti přežít při vyšších teplotách a celkově odolávat nepříznivým podmínkám pro růst. U žádného ze vzorků nedošlo k nárůstu, počet enterokoků je tedy nižší než  $1,0 \cdot 10^2$  cfu/g přesnídky.

### 3.3 Horizontální metoda stanovení počtu presumptivního *Bacillus cereus* (ČSN EN ISO 7923)

U vzorků 1-A, 6-C, 7-A a OZ2P nedošlo na půdě MYP k nárůstu žádných typických kolonií. Počet presumptivního *Bacillus cereus* je tedy menší než  $1 \cdot 10^2$  cfu/g vzorku. U vzorků OZ3 vybrány kolonie pro identifikaci. Pomocí MALDI-TOF bylo zjištěno, že se jedná o *Bacillus subtilis*. Výsledky ostatních vzorků jsou v tabulce 8.

**Tabulka 8: Celkové počty presumpčního *Bacillus cereus***

Vzorek	cfu/g
1-A	$<1,0 \cdot 10^2$
2-B	$1,0 \cdot 10^2$
3-C	$2,0 \cdot 10^2$
4-A	$4,0 \cdot 10^3$
5-B	$2,0 \cdot 10^2$
6-C	$<1,0 \cdot 10^2$
7-A	$<1,0 \cdot 10^2$
OZ1	$2,0 \cdot 10^2$
OZ2P	$<1,0 \cdot 10^2$
OZ3	$4,0 \cdot 10^2$
OZ4P	$7,0 \cdot 10^2$

### 3.4 Metoda stanovení počtu koaguláza-pozitivních stafylokoků (ČSN EN ISO 6888-1)

Počítány byly typické černé drobné kolonie, které narostly na B-P agaru. Souhrn je v tabulce 9. Bez nárůstu byly půdy 1-A, 4-A a 7-A. Právě tyto vzorky spojuje přidání xylitolu do přesnídávky. Je tedy možné, a některé studie (Tapiainen, 2001) to potvrzují, že tato látka

**Tabulka 9: Celkové počty koaguláza pozitivních stafylokoků**

Vzorek	cfu/g
1-A	$<1,0 \cdot 10^2$
2-B	$1,0 \cdot 10^3$
3-C	$4,0 \cdot 10^2$
4-A	$<1,0 \cdot 10^2$
5-B	$1,0 \cdot 10^2$
6-C	$3,1 \cdot 10^2$
7-A	$<1,0 \cdot 10^2$
OZ1	$2,1 \cdot 10^2$
OZ2P	$7,0 \cdot 10^2$
OZ3	$7,0 \cdot 10^2$
OZ4P	$2,0 \cdot 10^2$

napomáhá inhibici růstu přítomných stafylokoků. U těchto vzorků byl počet stanoven jako nižší než  $1,0 \cdot 10^2$  cfu/g.

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

Pouze u jednoho vzorku byla na půdě DRBC objevena plíseň. Jelikož se jednalo o ojedinělý výskyt, jedná se o vzdušnou kontaminaci. Tato plíseň byla obarvena bavlníkovou modří a bylo určeno, že se jedná o plíseň rodu *Cladosporium*. Můžeme tedy říci, že množství kvasinek i plísní bylo nižší než  $1,0 \cdot 10^2$  cfu/g přesnídávky.

### 3.6 Identifikace mikroorganismů

Bylo vybráno 7 kolonií z různých agarů a vzorků, které byly identifikovány. Jejich přehled a výsledky testů jsou uvedeny v tabulce 10.

Všechny tyto kolonie byly obarveny dle Grama a byl proveden test na katalázu a oxidázu. U kolonie z VČŽL agaru byl po prokázání negativní oxidázy proveden ENTEROtest. Podle výsledků Enterotestu se s 81,5 % shodou jednalo o *Enterobacter pyrinus*.

**Tabulka 10: Výsledky identifikace mikroorganismů**

Číslo kultury	Označení vzorku	Původní agar	Gramovo barvení	Kataláza	Oxidáza	Identifikace
1	3-C	B-P	+, koky	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>
2	OZ2P	VČŽL	-, tyčinky	+	-	<i>Pantoea gaviniae</i>
3	OZ1	MYP	+, tyčinky	-	-	<i>Enterococcus caseliflavus</i>
4	OZ3	B-P	+, tyčinky	+	-	<i>Bacillus licheniformis</i>
5	OZ4P	MYP	+, koky	+	-	<i>Staphylococcus warneri</i>
6	OZ3	MYP	+, tyčinky	+	+	<i>Bacillus subtilis</i>

Tato shoda však nebyla dostačující a z toho důvodu byla kultura spolu s ostatními odeslána na vyšetření metodou MALDI-TOF do Pardubické nemocnice. Vybraná kultura z agaru dle B-P po přeočkování byla po provedených testech zaočkována na STAPHYtest, který z 93% potvrzoval *Staphylococcus chromogenes*. Ani toto identifikační skóre nebylo dostatečné a proto byl vzorek odeslán na identifikaci na MALDI-TOF/MS.

### 3.7 Stanovení antimikrobiální aktivity

Identifikované bakterie byly zaočkovány na M-H agar. Byly použity i kultury ze sbírky *Staphylococcus aureus* (CCM 3953), *Bacillus cereus* (CCM 2010) a *E.coli* (CCM 4717). Připravené extrakty byly napipetovány na papírové disky a po kultivaci se sledovala inhibiční zóna. Přehled inhibičních zón pro jednotlivé extrakty a pro bakterie je v tabulkách 11 a 12. Nejlepší antimikrobiální účinky byly prokázány u šalvěje (u většiny bakterií měla inhibiční zóna průměr větší než 12 mm), lékořice (průměrně měly inhibiční zóny 9 mm) galgánu, kde byl průměr více než 8 mm. Právě tyto tři extrakty byly vybrány pro testování v reálných vzorcích.

**Tabulka 11: Vyhodnocení antimikrobiální aktivity část I.**

Extrakt	Inhibiční zóny (mm) - průměr				
	<i>S. aureus</i> CCM 3953	<i>B. cereus</i> CCM 2010	<i>P. gaviniae</i>	<i>S. aureus 3-C</i>	<i>E.coli</i> CCM 4717
<b>Lékořice</b>	11	10	11	10,5	6
<b>Šalvěj</b>	11,5	12	8	12	10
<b>Tymián</b>	6	9,5	6,5	8	6
<b>Galgán</b>	11	8	8	8,5	6
<b>Zázvor</b>	9	8	6	9	6
<b>Máta</b>	6	6	6	6	6
<b>Rakytník</b>	7	6	8	9	6
<b>EtOH</b>	6	8	8	6	6

Průměr disku 6 mm

**Tabulka 12: Vyhodnocení antimikrobiální aktivity část II.**

<b>Extrakt</b>	<b>Inhibiční zóny (mm) - průměr</b>			
	<i>S. warneri</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>E. casseliflavum</i>	<i>B. subtilis</i>
<b>Lékořice</b>	13	10	11	12
<b>Šalvěj</b>	12	13	13,5	14
<b>Tymián</b>	6	6	6	7,5
<b>Galgán</b>	12	10	11	10
<b>Zázvor</b>	6	6	6	6
<b>Máta</b>	6	6	6	6
<b>Rakytník</b>	10	6	6	8
<b>EtOH</b>	6	6	9	6

Průměr disku 6 mm

### 3.8 Účinnost extraktů v reálných vzorcích

Po kultivaci byly počítány typické kolonie. Testování bylo provedeno v den výroby a po týdnu. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 13 a 14. Při homogenizaci 7 dní po výrobě nepasterované vzorky v sáčku jevíly bombáž. Při obou těchto testování byly vybrány podezřelé kolonie, které přerostly MYP agar. Byly obarveny podle Gramma a otestovány na katalázu a oxidázu. Jednalo se o gram pozitivní, kataláza, oxidáza pozitivní koky. V dalším případě se jednalo o drobné kolonie, které opět narostly na MYP agar. Jednalo se také o gram pozitivní, kataláza a oxidáza pozitivní koky. Další případ byly kontrolní testy pro potvrzení enterokoků, protože barvení dle Gramma prokázalo gram pozitivní koky a bakterie na SB agaru. Následně byla provedena izolace čárkováním na MPA a poté test na katalázu a oxidázu. Byl proveden také preparát z kolonií plísní a kvasinek, které narostly na DRBC. Ten potvrdil přítomnost kvasinek a plíseň byla určena jako zástupce rodu *Mucor*.

**Tabulka 13: Počty mikroorganismů na jednotlivých půdách – první testování**

	Šalvěj	Šalvěj – P	Lékořice	Lékořice – P	Galgán	Galgán – P
	cfu/g					
<b>DRBC</b>	<1,0.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>	Přerostlé rod <i>Mucor</i>	<1,0.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>
<b>GTK</b>	Přerostlé zástupcem rodu <i>Bacillus</i>					
<b>VČŽL</b>	<1,0.10 <sup>1</sup>	<1,0.10 <sup>1</sup>	1,0.10 <sup>1</sup>	<1,0.10 <sup>1</sup>	1,0.10 <sup>1</sup>	<1,0.10 <sup>1</sup>
<b>B-P</b>	6,0.10 <sup>2</sup>	1,0.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>	2,5.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>
<b>S-B</b>	<1,0.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>
<b>MYP</b>	1,5.10 <sup>2</sup>	1,0.10 <sup>2</sup>	2,5.10 <sup>2</sup>	1,0.10 <sup>2</sup>	4,5.10 <sup>2</sup>	5,0.10 <sup>2</sup>

**Tabulka 14: Počty mikroorganismů na jednotlivých půdách – testování po týdnu**

	Šalvěj	Šalvěj – P	Lékořice	Lékořice – P	Galgán	Galgán – P
	cfu/g					
<b>DRBC</b>	Přerostlé rod <i>Mucor</i>	<1,0.10 <sup>2</sup>	3,4.10 <sup>4</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>	Přerostlé rod <i>Mucor</i>	<1,0.10 <sup>2</sup>
<b>GTK</b>	> 3,0.10 <sup>5</sup>	Přerostlé rod <i>Mucor</i>	> 3,0.10 <sup>5</sup>	Přerostlé rod <i>Mucor</i>	> 3,0.10 <sup>5</sup>	Přerostlé rod <i>Mucor</i>
<b>VČŽL</b>	<1,0.10 <sup>1</sup>	<1,0.10 <sup>1</sup>	<1,0.10 <sup>1</sup>	<1,0.10 <sup>1</sup>	<1,0.10 <sup>1</sup>	<1,0.10 <sup>1</sup>
<b>B-P</b>	2,0.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>	4,5.10 <sup>2</sup>	2,0.10 <sup>2</sup>	2,0.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>
<b>S-B</b>	1,2.10 <sup>5</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>	1,0.10 <sup>5</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>	> 3,0.10 <sup>5</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>
<b>MYP</b>	1,5.10 <sup>2</sup>	<1,0.10 <sup>2</sup>	1,9.10 <sup>5</sup>	Přerostlé rod <i>Mucor</i>	1,0.10 <sup>2</sup>	Přerostlé rod <i>Mucor</i>



### 3.9 Stanovení antioxidační aktivity

Výsledky měření jsou v tabulce 13. Vždy byly připraveny dvě navážky vzorku a každá navážka byla změřena dvakrát. Ze statistického hlediska jsou hodnoty s označením *c* nejvyšší.

Vzorky OZ3 a OZ4P mají výsledky oproti ostatním vzorkům velmi rozdílné. Při srovnání se vzorky OZ1 a OZ2P je třeba zohlednit, že první dva zmíněné byly stanovovány po 4měsíčním skladování při pokojové teplotě. Z toho důvodu mohlo dojít k poklesu antioxidační aktivity vzorků.

Tabulka 15: Výsledky měření antioxidační aktivity s využitím DPPH radikálu

Vzorek	Průměr (μg/g Troloxu)	Směrodatná odchylka
1-A	20,69 <sup>c</sup>	1,75
2-B	22,57 <sup>c</sup>	6,53
3-C	34,16 <sup>c</sup>	6,97
4-A	15,78 <sup>b</sup>	3,12
5-B	33,29 <sup>c</sup>	4,84
6-C	22,01 <sup>c</sup>	1,85
7-A	16,71 <sup>b</sup>	5,37
OZ1	35,18 <sup>c</sup>	7,39
OZ2P	29,26 <sup>b, c</sup>	6,45
OZ3	2,20 <sup>a</sup>	1,46
OZ4P	5,54 <sup>a</sup>	3,34

Aritmetický průměr ± směrodatná odchylka, různá písmena ve sloupci značí statisticky významný rozdíl (n = 4), p < 0,05

### 3.10 Stanovení rozsahu oxidace lipidů

Pro posouzení rozsahu oxidace lipidů bylo opět provedeno statistické srovnání programem OriginPro. Označení písmenem *a* značí nejnižší MDAeq, tedy nejmenší rozsah oxidace lipidů. Tyto hodnoty jsou v tabulce 14. Pokud to porovnáme s výsledky antioxidační aktivity, je tu vidět souvislost. Právě u vzorků 1-A, 2-B a OZ1 je i vyšší hodnota antioxidantů. Ty totiž oxidaci lipidů brání. Oproti tomu vzorky 4-A a OZ4P vykazují vyšší hodnotu MDAeq. a nižší antioxidační aktivitu.

Tabulka 16: Výsledky rozsahu oxidace lipidů

Vzorek	MDAeq. (nmol/ml)	Průměr (nmol/ml)	Směrodatná odchylka
<b>1-A</b>	0,103	0,100 <sup>a</sup>	0,003
	0,097		
<b>2-B</b>	0,090	0,087 <sup>a</sup>	0,003
	0,084		
<b>3-C</b>	0,142	0,139 <sup>c</sup>	0,003
	0,135		
<b>4-A</b>	0,200	0,197 <sup>f</sup>	0,003
	0,194		
<b>5-B</b>	0,116	0,123 <sup>b,c</sup>	0,006
	0,129		
<b>6-C</b>	0,116	0,123 <sup>b,c</sup>	0,006
	0,129		
<b>7-A</b>	0,142	0,139 <sup>c</sup>	0,003
	0,135		
<b>OZ1</b>	0,090	0,094 <sup>a</sup>	0,003
	0,097		
<b>OZ2P</b>	0,123	0,126 <sup>c</sup>	0,003
	0,129		
<b>OZ3</b>	0,129	0,129 <sup>d</sup>	0
	0,129		
<b>OZ4P</b>	0,148	0,145 <sup>e</sup>	0,003
	0,142		

Aritmetický průměr ± směrodatná odchylka, různá písmena ve sloupci značí statisticky významný rozdíl (n = 2), p < 0,05

## 4 Diskuze

Vzorek OZ1 byl senzorycky srovnatelný se starou sušenkou, která byla nevhodně skladována. Suroviny, které výrobce uvedl, v chuti nijak výrazně cítit nebyly. Z mého hlediska byl vzorek OZ2P chuťově velmi nevýrazný až mdlý a ani hrudkovitá konzistence nebyla příjemná. U ostatních vzorků nebylo senzorycké a chuťové hodnocení uskutečněno z důvodu možné kontaminace vzorku při dlouhodobém skladování při pokojové teplotě. Reálné vzorky doplněné o extrakty, které nebyly pasterované, byly velmi tekuté a při testování po týdnu byla balení velmi nafouklá. Oproti tomu vzorky, které pasterací prošly měly stejnou koncentraci jako vzorky původní a změna ani po týdnu uchovávání v pokojové teplotě nebyla patrná.

Z mikrobiologického hlediska je kvalita přesnídávek původně dodaných vzorků OZ1, OZ2P, OZ3, OZ4P, ale i vzorků, které byly rok uchovávány při pokojové teplotě (1-A až 7-A) dobrá, a to i přesto, že byly nalezeny již zmíněné bakterie. Hlavním ukazatelem jsou počty těchto bakterií. Je to z toho důvodu, že některé bakterie jsou schopné tvořit toxiny, které mohou způsobit selhání organismu. Tyto toxiny mohou tvořit zástupci rodu *Bacillus* i *Staphylococcus*. Do roku 2006 byla v platnosti vyhláška č. 132/2004, která stanovovala maximální počet bakterií, které se v potravinách mohou vyskytovat tak, aby byla potravinu ještě nezávadná. Pro dětské přesnídávky je počet u zmíněných rodů stanoven na maximálně  $10^2$  cfu/g. U potravin určených k přímé spotřebě je to potom  $10^4$  cfu/g. Vzhledem k výsledkům lze tedy říci, že přesnídávky jsou i po ročním skladování při pokojové teplotě vhodné k běžné konzumaci i podle starších a přísnějších pravidel. V dnešní době se kvalita potravin řídí Nařízením komise Evropského společenství č. 2073/2005 a novelizace nařízení č.1441/2007. Toto nařízení stanovuje u potravin určených k přímé spotřebě přítomnost bakterií *Listeria monocytogenes* a dále, že nesmí obsahovat bakterie ani toxiny v koncentraci, která by mohla vyvolat poškození lidského zdraví. Z toho vyplývá, že i podle tohoto nařízení je vzorek v pořádku.

Během stanovení počtu jednotlivých druhů mikroorganismů, se několikrát stalo, že na diagnostickém mediu pro určitý druh, narostly jiné bakterie, než byly očekávány. To se stalo u vzorku OZ2P, kdy se podařilo na MYP agaru vykultivovat kolonie, jež byly později pomocí MALDI-TOF/MS určeny jako *Enterococcus casseliflavus*.

Během testování antimikrobiální aktivity se používal i disk napuštěný rozpouštědlem, do kterého byly extrahovány byliny. Důvodem bylo zohlednění ethanolu jako látky, která přirozeně inhibuje nárůst bakterií. Očekávalo se, že inhibiční zóna ethanolu se poté odečte od hodnot u extraktu. Jak ale dokazují výše uvedené tabulky, k inhibici u disku s ethanolom nedošlo. Test byl několikrát opakován, protože v jiných případech 60% (v/v) ethanol inhiboval

velmi dobře. Jednou z možností, proč k inhibici nedochází, bylo, že se nestihne 60% ethanol dostatečně vsáknout do disku a při umístění do termostatu se část odpaří. Z toho důvodu byly naočkované Petriho misky 5 minut ponechány mimo termostat a až po uplynutí času do něj byly uloženy. Ani tento způsob ale neprokázal inhibici. Při jiném opakování byl i těsně před očkováním připraven nový roztok 60% ethanolu (v/v). Inhibice byla nakonec prokázána pouze u *Enterococcus casseliflavum*, *Pantoea ganiviae* a *Bacillus cereus*.

Extrakt z máty jako jediný neinhiboval ani jednu z testovaných bakterií. Tento výsledek neodpovídá výsledkům studie Bayoub *et al.* (2002), která prokázala inhibici ethanolovým extraktem z listů u *Staphylococcus aureus* i *Escherchia coli*. Inhibici u *Bacillus cereus* prokázala studie Shan *et al.* (2007). Neshodu s ostatními studiemi mohl způsobit rozdílný postup při přípravě extraktů a s tím spojená nižší koncentrace výsledného extraktu.

Tymián inhiboval pouze *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* (CCM 2010), *Pantoea ganiviae* a *Staphylococcus aureus* izolovány ze vzorku 3-C. Ačkoliv inhibici těmito zástupci potvrzuje i studie Benbelaïd *et al.* (2013), inhibice v mém případě nedosahovala takových průměrů jako v případě zmíněné studie. Důvodem je, že v této studii byl pipetován na disk 1 mg extraktu (10 $\mu$ l o koncentraci 100 mg/ml). V mém případě se pipetovalo 12  $\mu$ l o koncentraci 45,54 mg/ml, tedy 0,54 mg extraktu, tedy téměř poloviční koncentrace. Například u *Bacillus subtilis* studie uvádí průměr 18 mm, v mém případě se jednalo o 7,5 mm. Již zmíněná studie však dokládá, že *Escherchia coli* by měla být inhibována také, jelikož minimální inhibiční koncentrace je 0,500 $\pm$ 0,000. Oproti tomu studie Mostafa *et al.* z roku 2018 uvádí, že *E.coli* není ani při koncentraci 10 mg/ml tymiánem inhibována. Toto zjištění potvrzuje mé zjištění, neboť *E.coli* nebyla inhibována. Inhibován nebyl ani *Staphylococcus aureus* (CCM 3953), *Staphylococcus warneri*, *Enterococcus casseliflavim* a *Bacillus licheniformis*.

Druhým zástupcem, který inhiboval pouze čtyři z devíti testovaných mikroorganismů je zázvor. Inhibice se projevila u *Staphylococcus aureus* (CCM 3953), ale i *Staphylococcus aureus* izolovaného ze vzorku 3-C, *Bacillus cereus* a u *Enterococcus casseliflavum*. Inhibici prvních tří zmíněných potvrzuje i studie Mostafa *et al.* (2018), která zároveň potvrzuje nulovou inhibici u *Escherchia coli*. Inhibici enterokoků extraktem ze zázvoru potom dokazuje Revati *et al.* (2015), kteří testovali různé zástupce rodu *Enterococcus*.

Extrakt rakytníku nejlépe inhiboval zástupce rodu *Staphylococcus* a to 7 mm (*S. aureus* CCM 3953), 9 mm (*S.aureus* ze vzorku 3-C) a 10 mm (*S. warneri*). Inhibován byl i *Bacillus subtilis* a *Pantoea ganiviae*. Studie autorů Upadhyay *et al.* (2010) potvrzuje inhibici těchto rodů, ačkoliv v jejich testech vycházely inhibiční zóny větší. Zároveň říká, že *Escherchia coli* je inhibována extraktem koncentrovanějším než 500  $\mu$ g/ml. Je však nutno říci, že ve studii byl test

prováděn difúzí do agaru, nikoliv pomocí disků. Citlivost rodu *Staphylococcus* i na nízkou dávku extraktu z rakytníku potvrzuje i Tian *et al.* ve své práci z roku 2018.

První ze tří neúčinnějších extraktů, které byly vybrány pro výsledné testování v reálných vzorcích, je galgán. Ten stejně jako lékořice inhiboval všechny testované rody kromě *Escherchia coli*. Absenci inhibiční zóny potvrzuje i studie Oonmetta-Aree *et al.* (2006), kde *E.coli* také nebyla ethanolovým extraktem galgánu inhibována. Ostatní mikroorganismy byly inhibovány v rozpětí 8-12 mm. Inhibice u *Staphylococcus aureus* je také potvrzena v již zmíněné studii, stejně tak *Bacillus cereus*. Nejsilnější inhibice byla u zástupců rodu *Staphylococcus*, kde se jednalo o inhibici 12 mm, a to v případě *Staphylococcus warneri*. Jedná se zřejmě o citlivějšího zástupce, než je *Staphylococcus aureus* (CCM 3953), který inhiboval 11 mm. U rodu *Bacillus* se jednalo o inhibici 10 mm u *B. subtilis* a 8 mm u *B. cereus*. Další studii, která tyto teze potvrzuje, je od autora Norajit *et al.* z roku 2007, která dokonce uvádí, že je vyšší účinnost esenciálních olejů než extraktů.

Jak bylo řečeno, lékořice neinhibovala pouze *Escherchia coli*. V tomto bodě to bohužel neodpovídá studii Al-Turki z roku 2008, kde byla *E.coli* inhibována velmi dobře. Důvodem, proč se výsledky neshodují, je rozdílná koncentrace použitých extraktů. Oproti tomu, výsledky u druhého testovaného, kterým byl *Bacillus subtilis* potvrdily, že tato bakterie je extraktem z lékořice inhibována velmi dobře. Tato studie také říká, že lékořicové extrakty lépe inhibují gram pozitivní bakterie, jako je právě rod *Bacillus*. Oproti tomu studie Irani *et al.* (2010), dokazuje, že při koncentraci 4 mg extraktu na disku, nedochází u *Escherchia coli* k inhibici. Další testované byly *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*. Inhibiční zóny odpovídají hodnotám, které byly prokázány během této práce.

Poslední a neúčinnější byl ethanolový extrakt šalvěže. Ta jako jediná inhibovala všechny testované zástupce včetně *Escherchia coli* (10 mm) a to i přesto, že se jednalo o nejméně koncentrovaný extrakt. Antimikrobiální aktivita prokázaná ve studii Kivrak *et al.* (2009) odpovídá výsledkům této práce. Nejcitlivější z testovaných bakterií je *Bacillus subtilis*, který inhiboval 14 mm, hned za ním je *Enterococcus casseliflavum* (13,5 mm) a *Bacillus licheniformis* (13 mm). Stafylokoky byly inhibovány mezi 11,5-12 mm. Nejmenší inhibiční zóna byla prokázána u *Pantoea ganiviae* (8 mm) a *Escherchia coli* (10 mm). Potvrzuje to teorii, která byla zmíněna ve výše uvedených studiích a to, že gram negativní bakterie, nejsou vůči ethanolovým extraktům citlivé tolik, jako gram pozitivní bakterie.

Během testování extraktů v reálných vzorcích se očekávalo, že alespoň jeden z doporučených extraktů, bude vykazovat inhibiční vlastnosti. Bohužel se tak nestalo. Ačkoliv po prvním testování byl maximální počet baterií na selektivně diagnostických půdách

6.10<sup>2</sup> cfu/g, jinak byla většina mikroorganismů stanovena na počet menší než 1,0.10<sup>2</sup> cfu/g, půda GTK byla přerostlá zástupcem rodu *Bacillus*. Půda DRBC, na které byl naočkován vzorek extraktu z lékořice, byla dokonce přerostlá plísní rodu *Mucor* (obrázek číslo 13 v přílohách). K této kontaminaci došlo zřejmě z původních použitých surovin. Při stanovení po týdnu, byly počty mikroorganismů ještě horší. Půda GTK byla v případě nepasterovaných vzorků nepočítatelná a u pasterovaných vzorků přerostlá rodem *Mucor*. Tato plíseň narostla i u nepasterovaných vzorků s použitím šalvěje a galgánu na půdě DRBC. Na této půdě v případě nepasterované lékořice narostly dokonce kvasinky, a to v počtu 3,4.10<sup>4</sup> cfu/g. Po týdenním skladování při pokojových teplotách byly vidět změny i u půdy SB, kdy vzorek nepasterovaného galgánu byl nepočítatelný (> 3,0.10<sup>5</sup> cfu/g). Půda MYP byla u pasterované lékořice a galgánu přerostlá plísní rodu *Mucor*. Ačkoliv to po prvním testování vypadalo nadějně, stále platí, že pasterace je lepším způsobem pro zajištění mikrobiální čistoty přesnídávek, a to i přestože ve vzorcích testovaných po týdnu byla objevena plíseň. Výrobce by se tedy měl zaměřit na zpracovávání kvalitnějších surovin, případně na vyšší teploty při pasteraci nebo změnu pH u přesnídávek. Další možností, je zajistit koncentrovanější bylinný extrakt, jelikož i výše zmíněné studie používaly koncentrovanější extrakty.

Je nutno dodat, že pro další práci je třeba připravit koncentrovanější extrakty, neboť většina studií pracovala s extrakty o koncentraci 100 mg/ml, kdežto extrakty použité během této práce, byly v rozmezí 29,59 - 48,81 mg/ml.

Hodnocení výsledků antioxidační aktivity není úplně jednoznačné. Je to způsobeno tím, že není jasně stanovena hranice, odkud by se dalo říci, že potravina má nebo nemá dobré antioxidační účinky. Z toho důvodu je třeba zohlednit složení a výrobní proces. Z definice stanovení metodou DPPH by se dalo říci, že čím větší množství na g Troloxu, tím lepší antioxidační vlastnosti. Z tohoto pohledu by na tom byly nejlépe vzorky 1-A, 2-B, 3-C, 5-B, 6-C, OZ1 a OZ2P. Oproti tomu vzorky, které byly po dobu 4 měsíců při pokojové teplotě, mají hodnoty výrazně nižší. Výsledky těchto přesnídávek byly lepší než ty, které jsou dokázány ve studii Wani a Kumar z roku 2018. Ačkoliv se nejednalo o shodné vzorky, jednalo se o svačtinový produkt, jež se používá jako dobrý zdroj bílkovin. Je však třeba zohlednit proces pasterace, při kterém by mohlo docházet k úbytku antioxidační aktivity. Studie Oliveira *et al.* (2012) zaměřená na broskve a studie Galcel *et al* z roku 2011, která zkoumala vliv pasterace na antioxidační aktivitu v ostružinách, potvrzuje, že vlivem pasterace dochází k minimálnímu úbytku antioxidační aktivity.

Nejnižší rozsah oxidace lipidů byl stanoven u vzorků 1-A, 2-B a OZ1, tyto vzorky vykazují i vyšší hodnoty antioxidační aktivity. Studie Farvin a Surendrajar z roku 2019 a Zou

a Akoh (2015) potvrzují použití antioxidantů jako prevenci proti oxidaci lipidů. Studie autorů Zou a Akoh z roku 2015, se zabývala oxidační stabilitou kojenecké výživy, kdy zjišťovali, jaký antioxidant bude mít nejlepší výsledky. Při celkovém porovnání výsledků antioxidační aktivity a rozsahu oxidace lipidů, je viditelná shoda s těmito studiemi. Například vzorek OZ4P, má velmi nízkou antioxidační aktivitu a zároveň jednu z nejvyšších hodnot MDAeq. I na tyto vzorky bylo nahlíženo z pohledu ovlivnění pasterací. Studie Elisia *et al.* (2011) potvrzuje, že pasterace neovlivňuje hodnoty rozsahu oxidace lipidů.

## 5 Závěr

V posledních letech je stále vyšší důraz kladen na kvalitu potravin, které přijímáme a její senzoričké vlastnosti. Při hodnocení senzoričkých vlastností se dokázalo, že díky pasteraci dochází ke změnám konzistence a chuti přesnídávek. Z toho důvodu bylo cílem mé práce zjistit, zda jsou rostlinné extrakty schopny nahradit pasteraci z hlediska inhibice mikroorganismů.

Nejprve bylo třeba přesně zjistit, jaká mikroflóra se v přesnídávkách vyskytuje, aby se dala specifikovat účinnost extraktů. Následovaly extrakce bylin do ethanolu a samotné testování diskovou difúzní metodou. Bylo třeba stanovit, který z extraktů vykazuje nejlepší inhibiční vlastnosti. V konečné fázi bylo testováno 7 extraktů, které inhibovaly alespoň jednu z bakterií. Jednalo se o rakytník, zázvor, lékořici, šalvěj, galgán, tymián a mátu. Z těchto extraktů byly vybrány tři nejlepší (galgán, šalvěj a lékořice), které byly dodány výrobcí pro výrobu přesnídávek s přídavkem těchto extraktů pro ověření, zda jsou schopny inhibovat přítomné mikroorganismy. Během laboratorního testování byl nejúčinnější extrakt z šalvěje, který inhiboval všechny testované mikroorganismy, ačkoliv se jednalo o nejméně koncentrovaný extrakt. Výrobce připravil dvě sady vzorků, kdy každý extrakt byl připraven i v pasterované verzi.

Tyto vzorky byly testovány v den výroby a následně po týdnu, aby bylo možné sledovat, jestli se kontaminace v čase mění. Během prvního testování nebyly rozdíly tak radikální jako po týdnu, kdy pasterované vzorky byly prokazatelně kontaminovány pouze plísní, což mohlo být způsobeno špatnou kvalitou základních surovin, ale ostatní mikroorganismy se zde prakticky nevyskytovaly. Oproti tomu nepasterované vzorky byly v mnoha případech nepočítatelné nebo v koncentracích, které jsou u tohoto typu potravin nevyhovující. Z toho se dá usoudit, že koncentrace extraktů nebyla dostatečná, aby fytochemikálie v nich obsažené byly schopny dlouhodobě inhibovat kontaminanty, které se zde vyskytují.

V rámci práce byla ještě testována antioxidační aktivita a rozsah oxidace lipidů neboli žluknutí u původních vzorků skladovaných 1 rok při pokojové teplotě. Antioxidační vlastnosti mohou být přínosem nejen pro konzumenta, ale i pro udržení kvality přesnídávek, žluknutí je totiž problémem při dlouhodobém skladování, a to nejen při nevhodných podmínkách. Při porovnání výsledků je tato spojitost mezi množstvím antioxidantů a rozsahem oxidace viditelná a platí zde nepřímá úměra neboli čím více antioxidantů, tím menší degradace potraviny žluknutím. Zároveň se potvrdil úbytek antioxidační aktivity při skladování při pokojové teplotě (porovnání vzorků OZ1 s OZ3 nebo OZ2P s OZ4P).



Během dalších prací by bylo třeba zaměřit se na přípravu koncentrovanějších extraktů, které by už mohly být schopny dostatečně inhibovat případné kontaminanty. Je však třeba si stále dávat pozor na kvalitu původních surovin, jelikož v případě reálných vzorků byly zřejmě použity suroviny kontaminované mikroorganismy a přidané extrakty, ale ani pasterace nebyly schopny zabránit kontaminaci celého vzorku. Z toho důvodu by bylo dobré vyzkoušet i jiné metody, které by mohly zabránit rozvoji patogenů, jako například úprava pH nebo již zmíněné použití koncentrovanějších extraktů.

## 6 Seznam odborné literatury

**AL-TURKI, Ahmad I.; EL-ZINEY, Mohamed G.; ABDEL-SALAM, Ahmed M.** Chemical and anti-bacterial characterization of aqueous extracts of oregano, marjoram, sage and licorice and their application in milk and labneh. *JOURNAL OF FOOD AGRICULTURE AND ENVIRONMENT*, 2008, 6.1: 39.

**ARMANINI, Decio; FIORE, Cristina; MATTARELLO, Mee J.; BIELENBERG, Jens.** History of the endocrine effects of licorice. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*, 2002, 110.06: 257-261.

**BALOUIRI, Mounyr; SADIKI, Moulay; IBNSOUDA, Saad Koraichi.** Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 2016, 6.2: 71-79.

**BAYOUB, Kaoutar; BAIBAI, Tarik; MOUNTASSIF, Driss; RETMANE, Abdelaziz; SOUKRI, Abdelaziz.** Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9.27: 4251-4258.

**BECKER, Karsten; SKOV, Robert L.; VON EIFF, Christof.** *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. In: *Manual of Clinical Microbiology*, Eleventh Edition. American Society of Microbiology, 2015. p. 354-382.

**BENBELAÏD, Fethi; KHADIR, Abdelmounaïm; ABDOUNE Mohamed A.; BENDAHOU, Mourad.** Phytochemical screening and in vitro antimicrobial activity of *Thymus lanceolatus* Desf. from Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2013, 3.6: 454-459

**BEVILACQUA, Antonio; CORBO, Maria Rosaria; SINIGAGLIA, Milena (ed.).** *The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers*. Woodhead Publishing, 2016.

**BOZIN, Biljana; MIMICA-DUKIC, Neda; SAMOJLIK, Isidora; JOVIN, Emilija.** Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2007, 55.19: 7879-7885.

**CELENK, Sevcan; TARIMCILAR, Gul; BICAKCI, Adem; KAYNAK, Gonul; MALYER, Hulusi.** A palynological study of the genus *Mentha L. (Lamiaceae)*. Botanical journal of the Linnean Society, 2008, 157.1: 141-154.

**COURVALIN, Patrice.** Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases*, 2006, 42.Supplement\_1: S25-S34.

**COWAN, Marjorie M.** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 1999, 12.4: 564-582.

**CÖMERT, Ezgi D.; GÖKMEN, Vural.** Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. *Food Research International*, 2017.

**ČSN ISO 4832**, Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu koliformních bakterií – Technika počítání kolonií. 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 EN ISO 6888-1:1999**, Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu koaguláza pozitivních stafylokoků (*Staphylococcus aureus* a další druhy) – Část 1: Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera. Praha: Český normalizační institut.

**DA SILVA, Francine T.; DA CUNHA, Kamila F.; FONSECA, Laura Martins; ANTUNES, Mariana Dias; EL HALAL, Shanise L. ; FIORENTINI, Angela M.; ZAVAREZE, Elessandra da Rosa; GUERRA DIAS, Alvaro R..** Action of ginger essential oil (*Zingiber officinale*) encapsulated in proteins ultrafine fibers on the antimicrobial control in situ. *International journal of biological macromolecules*, 2018, 118: 107-115.

**DAVIDSON, Michael P.; TAYLOR, Matthew T.; SCHMIDT, Shannon E.** Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: *Food microbiology*. American Society of Microbiology, 2013. p. 765-801.

**DORMAN, H. J. D.; DEANS, Stanley G.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 2000, 88.2: 308-316.

**DREWNOWSKI, Adam.** Nutrient density: Addressing the challenge of obesity. *British Journal of Nutrition*, 2018, 120.s1: S8-S14.

**DREWNOWSKI, Adam.** Defining nutrient density: development and validation of the nutrient rich foods index. *Journal of the American College of Nutrition*, 2009, 28.4: 421S-426S.

**DREWNOWSKI, Adam; FULGONI III, Victor L.** Nutrient density: principles and evaluation tools-. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2014, 99.5: 1223S-1228S.

**ELISIA, Ingrid; KITTS, David D.** Quantification of hexanal as an index of lipid oxidation in human milk and association with antioxidant components. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 2011, 1109010106-1109010106.

**ETTEFAGH, Keivan A.; BURNS, Johnna T.; JUNIO, Hiyans A.** Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) extracts synergistically enhance the antibacterial activity of berberine via efflux pump inhibition. *Planta medica*, 2011, 77.8: 835.

**FORMY, S. O. D.** Antioxidační enzymy-biochemické markery oxidačního stresu. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*, 2014, 3: 53-56.

**FACKLAM, Richard; ELLIOTT, J. A.** Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clinical microbiology reviews*, 1995, 8.4: 479-495.

**FARVIN, KH Sabeena; SURENDRARAJ, A.** Plant Antioxidant Extracts: Effect on Lipid or Protein Oxidation in Seafood Products. 2019.

**FICKERS, Patrick.** Antibiotic compounds from *Bacillus*: why are they so amazing. *American Journal of Biochemistry & Biotechnology*, 2012, 8: 38-43.

**FREELAND-GRAVES, Jeanne H.; NITZKE, Susan.** Position of the academy of nutrition and dietetics: total diet approach to healthy eating. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 2013, 113.2: 307-317.

**FUKAI, Toshio; MARUMO, Ai; KAITOU, Kiyoshi; KANDA, Toshihisa.**

Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*, 2002, 73.6: 536-539.

**GANCEL, Anne-Laure; FENEUIL, Aurélien; ACOSTA, Oscar; PÉREZ, Ana M.; VAILLANT, Fabrice.** Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*). *Food Research International*, 2011, 44.7: 2243-2251.

**GEISSLER, Catherine; POWERS, Hilary (ed.).** Human nutrition. Oxford University Press, 2017.

**GIRAFFA, Allison F. a John J. IANDOLO.** *Staphylococcus*. *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*. San Diego State University: Academic Press, 2009, s. 293-303. ISBN 978-0-12-373944-5.

**GIRAFFA, Giorgio.** *Enterococcus*. *Encyclopedia of Food Microbiology*. University of Reading, Whitenights: Academic Press, 1999, s. 617-624. ISBN 978-0-12-227070-3.

**GODIC, Aleksandar; POLJŠAK, Borut; ADAMIC, Metka; DAHMANE, Raja G.** The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 2014

**GOODMAN, Michael; BOSTICK, Roberd M; KUCUK, Omer; JONES, Dean.** Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: past, present, and future. *Free radical biology and medicine*, 2011, 51.5: 1068-1084.

**GRIFFITHS, M. W.; SCHRAFT, H.** *Bacillus cereus* food poisoning. In: Foodborne diseases. Academic Press, 2017. p. 395-405.

**HENDERSON, Lynne.** The National Diet and Nutrition Survey: adults aged 19 to 64 years. *Vitamin and mineral intake and urinary analytes*. The Stationery Office, London, UK, 2003.

**HERRMANN, Wolfgang; GEISEL, Jürgen.** Vegetarian lifestyle and monitoring of vitamin B-12 status. *Clinica Chimica Acta*, 2002, 326.1-2: 47-59.

**HERVERT, C. J.; MARTIN, Nicole H.; BOOR, Kathryn J.; WIELDMANN, Martin.** Survival and detection of coliforms, *Enterobacteriaceae*, and gram-negative bacteria in Greek yogurt. *Journal of dairy science*, 2017, 100.2: 950-960.

**HORIUCHI, Kumiko; SHIOTA, Sumiko; KURODA, Teruo; HATANO, Tsutomu.** Potentiation of antimicrobial activity of aminoglycosides by carnosol from *Salvia officinalis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2007, 30.2: 287-290.

**CHALUPOVÁ, Zuzana; MASTEIKOVÁ, Ruta; RAMANAUSKIENÉ, Kristina; KALVENIENE, Zenona.** Lipidy v technologii léčivých a kosmetických přípravků. *Praktické lékařství*, 2008, 4: 26-29.

**CHARLES, Denys J.** *Antioxidant properties of spices, herbs and other sources*. Springer Science & Business Media, 2012.

**IMANSHAHIDI, Mohsen; HOSSEINZADEH, Hossein.** Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine. *Phytotherapy research*, 2008, 22.8: 999-1012.

**IMELOUANE, B.; HASSAN, Amhamdi.** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *Int. J. Agric. Biol.*, 2009, 11.2: 205-208.

**IRANI, Mahboubeh; Sarmadi, Marziyeh; Bernard, Françoise; Ebrahimi, Gholam H.; Bazarnov, Hossein S.** Leaves antimicrobial activity of *Glycyrrhiza glabra L.* *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 2010, 9.4: 425.

**JANDA, J. Michael; ABBOTT, Sharon L.** The Family *Enterobacteriaceae*. *Practical handbook of microbiology*, 2015, 307.

**JARADAT, Nidal; RAMAHI, Rowa; ADAWI, Deema.** Use of herbal medicines during pregnancy in a group of Palestinian women. *Journal of ethnopharmacology*, 2013, 150.1: 79-84.

**KOOLMAN, Jan; Klaus-Heinrich RÖHM.** *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.

**KIVRAK, İbrahim; DURU, Mehmet E.; ÖZTÜRK, Mehmet; MERCAN, Nazime; HARMANDAR, Mansur; TOPÇU, Gülaçtı.** Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. *Food Chemistry*, 2009, 116.2: 470-479.

**KLABAN, Vladimír.** *Ekologie mikroorganismů: ilustrovaný lexikon biologie, ekologie a patogenity mikroorganismů*. Praha: Galén, c2011. ISBN 978-80-7262-770-7.

**KLIMEŠOVÁ, Iva; STELZER, Jiří.** *Fyziologie výživy*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2013. ISBN 978-80-244-3280-9.

**KOSHLAND, Daniel E. a Felix HAROWITZ.** Protein. *Encyclopædia Britannica* [online]. Encyclopædia Britannica, 23.7.2018 [cit. 2019-02-01]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/protein>

**KUNOVÁ, Václava.** *Zdravá výživa. 2.*, přeprac. vyd. Praha: Grada, 2011. Zdraví & životní styl. ISBN 978-80-247-3433-0.

**LORENZO, Jose M.; MUNEKATA, Paulo E.; GÓMEZ, Belen; BARBA, Francisco J.** Bioactive peptides as natural antioxidants in food products—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 2018.

**MARDANEH, Jalal; DALLAL, Mohammad M. S.** Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Pantoea* (Enterobacter) agglomerans isolated from consumed powdered infant formula milk (PIF) in NICU ward: First report from Iran. *Iranian journal of microbiology*, 2013, 5.3: 263.

**MAHBOUBI, Mohaddese; HAGHI, Ghasem.** Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of ethnopharmacology*, 2008, 119.2: 325-327.

**MAHBOUBI, Mohaddese.** *Mentha spicata* L. essential oil, phytochemistry and its effectiveness in flatulence. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2018.

**MACHOVÁ, Jitka; KUBÁTOVÁ, Dagmar.** *Výchova ke zdraví. 2.*, aktualizované vydání. Praha: Grada, 2015. ISBN 978-80-247-5351-5.

**MENSINK, Ronald P.; ZOCK, Peter L; KESTER, Arnold D; KATAN, Martijn B.** Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *The American journal of clinical nutrition*, 2003, 77.5: 1146-1155.

**MORAVCOVÁ, Jitka.** Biologicky aktivní přírodní látky. *Vysoká škola chemicko-technologická, Praha*, 2006.

**MOSTAFA, Ashraf A.; Al-Askara, Abdulaziz A.; Almaary, Khalid S.; Dawoud, Turki M.; Sholkamy, Essam N.; Bakric, Marwah M.** Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi journal of biological sciences*, 2018, 25.2: 361-366.

**MURRAY, Robert K.** Harperova biochemie. 23. vyd., 4. české vyd. Jinočany: H & H, 2002. A Lange medical book. ISBN 80-7319-013-3.

**NORAJIT, Krittika; LAOHAKUNJIT, Natta; KERDCHOECHUEN, Orapin.** Antibacterial effect of five Zingiberaceae essential oils. *Molecules*, 2007, 12.8: 2047-2060.

**NOVÁKOVÁ, Iva.** Zdravotní nauka: učebnice pro obor sociální činnost. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3709-6.

**OLIVEIRA, Ana; PINTADO, Manuela; ALMEIDA, Domingos PF.** Phytochemical composition and antioxidant activity of peach as affected by pasteurization and storage duration. *LWT-Food Science and Technology*, 2012, 49.2: 202-207.

**OONMETTA-AREE, Jirawan; SUZUKI, Tomoko; GASALUCK, Piyawan; EUMKEB, Griangsak.** Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT-Food Science and Technology*, 2006, 39.10: 1214-1220.

**OLZA, Josune; ARANCETA-BARTRINA, Javier; GONZÁLEZ-GROSS, Marcela; ORTEGA, Rosa M.; SERRA-MAJEM Lluís.** Reported dietary intake, disparity between the reported consumption and the level needed for adequacy and food sources of calcium, phosphorus, magnesium and vitamin D in the Spanish population: Findings from the ANIBES study. *Nutrients*, 2017, 9.2: 168.



**PAULOVÁ, Hana; BOCHOŘÁKOVÁ, Hana.** Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chem. listy*, 2004, 98: 174-179.

**PÁNEK, Jan a kol.** *Základy výživy*. Praha: Svoboda Servis, 2002. 207 s. ISBN 80-86320-23-5.

**PLÁTENÍK, Jan.** Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. *Interní medicína pro praxi*, 2009, 11.1: 30-33.

**POWELL, Saul R.** The antioxidant properties of zinc. *The Journal of nutrition*, 2000, 130.5: 1447S-1454S.

**RAVINDRAN, P. N.** Galangal. In: *Handbook of Herbs and Spices (Second Edition)*, Volume 2. 2012. p. 303-318.

**REVATI, Sharma; BIPIN, Chapagain; CHITRA, Pai B.; MINAKSHI, Bhattacharjee.** In vitro antibacterial activity of seven Indian spices against high level gentamicin resistant strains of enterococci. *Archives of medical science: AMS*, 2015, 11.4: 863.

**SARANGARAJAN, Ramabadran; MEERA, S; RUKKIMANI, Rajagopalan; SANKAR, Paraniradje; ANURADHA, G** Antioxidants: Friend or foe?. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 2017.

**SASIDHARAN, Indu; MENON, A. Nirmala.** Comparative chemical composition and antimicrobial activity fresh & dry ginger oils (*Zingiber officinale* Roscoe). *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 2010, 2.4: 40-43.

**SEMWAL, Ruchi Badoni; SEMWAL, Deepak Kumar; COMBRINCK, Sandra; VILJOEN, Alvaro.** Gingerols and shogaols: Important nutraceutical principles from ginger. *Phytochemistry*, 2015, 117: 554-568.

**SHAN, Bin; Cai, Yi-Zhong; Brooks, John D.; Corke, Harold.** The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of food microbiology*, 2007, 117.1: 112-119.

**SHARIFI-RAD, Mehdi; OZCELIK, Beraat; ALTIN, Gokce; DIKMEN Ceren D.** Salvia spp. Plants-from farm to food applications and phytopharmacotherapy. *Trends in Food Science & Technology*, 2018.

**SLANETZ, L. W.; BARTLEY, Clara H.** Numbers of enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *Journal of bacteriology*, 1957, 74.5: 591.

**SOLOMAKOS, Nikolaos; GOVARIS, Alexandros I.; KOIDIS, Pavlos A.; BOTSOGLOU, Nikolaos A.** The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food microbiology*, 2008, 25.1: 120-127.

**SOLOMAKOS, Nikolaos; GOVARIS, Alexandros I.; KOIDIS, Pavlos A.; BOTSOGLOU, Nikolaos A.** The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157: H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science*, 2008, 80.2: 159-166.

**STAHL-BISKUP, Elisabeth; VENSKUTONIS, R. P. Thyme.** In: *Handbook of Herbs and Spices (Second Edition), Volume 1*. 2012. p. 499-525.

**STEIN, Torsten.** Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular microbiology*, 2005, 56.4: 845-857.

**STRÁNSKÝ, Miroslav; KOHOUT, Pavel.** Referenční hodnoty pro příjem živin. *Výživa servis sro: Prague, Czech Republic*, 2011.

**STRNADELOVÁ, Vladimíra; ZERZÁN, Jan.** *Radost z jídla–Nejen makrobiotika očima lékaře a pacienta*. 6. vydání. Nakladatelství ANAG, 2011. ISBN 987-80-7263-704-1.

**STROHL, William A; ROUSE, Harriet; FISHER, Bruce D.** *Microbiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, c2001. ISBN 0-397-51568-5.

**SURYAKUMAR, Geetha; GUPTA, Asheesh.** Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 138.2: 268-278.

**SVAČINA, Štěpán.** *Klinická dietologie*. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-2256-6.

**TAPIAINEN, Terhi; KONTIOKARI, Téo; SAMMALKIVI, Laura; IKÄHEIMO, Irma; KOSTELA, Markku; UHARI, Matti.** Effect of xylitol on growth of *Streptococcus pneumoniae* in the presence of fructose and sorbitol. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2001, 45.1: 166-169.

**TIAN, Ye; PUGANEN, Anna; ALAKOMI, Hanna-Leena; UUSITUPA, Aleks; SAARELA, Maria; YANG, Baoru.** Antioxidative and antibacterial activities of aqueous ethanol extracts of berries, leaves, and branches of berry plants. *Food research international*, 2018, 106: 291-303.

**TOMASIK, Piotr.** Chemical and functional properties of food saccharides. Boca Raton: CRC Press, c2004. ISBN 0-8493-1486-0.

**TONG, Steven YC; DAVIS, Joshua S; EICHENBERGER, Emily; HOLLAND Thomas L.; FOWLER, Vance G.** *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*, 2015, 28.3: 603-661.

**TORTORA, Gerard J.; DERRICKSON, Bryan H.** Introduction to the human body. John Wiley & Sons, Incorporated, 2017.

**TRUMBO, Paula; SCHLICKER, Sandra; YATES, Alison A; POOS, Mary.** Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 2002, 102.11: 1621.

**TŮMOVÁ, Lenka.** Lékořice–terapeutické účinky a možné interakce. *Praktické lékárenství*, 2011, 7: 6.

**UPADHYAY, Nitin K.; KUMAR, MS Yogendra; GUPTA, Asheesh.** Antioxidant, cytoprotective and antibacterial effects of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48.12: 3443-3448.

**URIBARRI, Jaime; CALVO, Mona S.** Phosphorus Intake and Whole-Body Phosphorus Homeostasis. In: *Dietary Phosphorus*. CRC Press, 2017. p. 79-86.

**VALÍČEK, Pavel; HAVELKA, Emil V.** Rakytník řešetlákový rostlina budoucnosti. 1. vyd. Benešov: Start, 2008. 86 s. ISBN 9788086231440

**VELÍŠEK, Jan.** Chemie potravin 1. díl, 2. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 350s. ISBN 80-86659-00-3.

**VERMA, Ramesh K.; MISHRA, Gamira; SINGH, Pradeep.** Alpinia galanga-an important medicinal plant: a review. *Der Pharmacia Sinica*, 2011, 2.1: 142-154.

**VOTAVA, Miroslav.** *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.

**WANG, Xiaoying; ZHANG, Han; CHEN, Lili; SHAN, Lihua.** Liquorice, a unique “guide drug” of traditional Chinese medicine: a review of its role in drug interactions. *Journal of ethnopharmacology*, 2013, 150.3: 781-790.

**WANI, Sajad Ahmad; KUMAR, Pradyuman.** Influence on the antioxidant, structural and pasting properties of snacks with fenugreek, oats and green pea. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 2018.

**WEERAKKODY, Nimsha S.; CAFFIN, Nola; LAMBERT, Lynette K.; TURNER, Mark S.** 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*, 2011, 91.3: 461-468.

**WHITE, Brett.** Ginger: an overview. *Am Fam Physician*, 2007, 75.11: 1689-91.

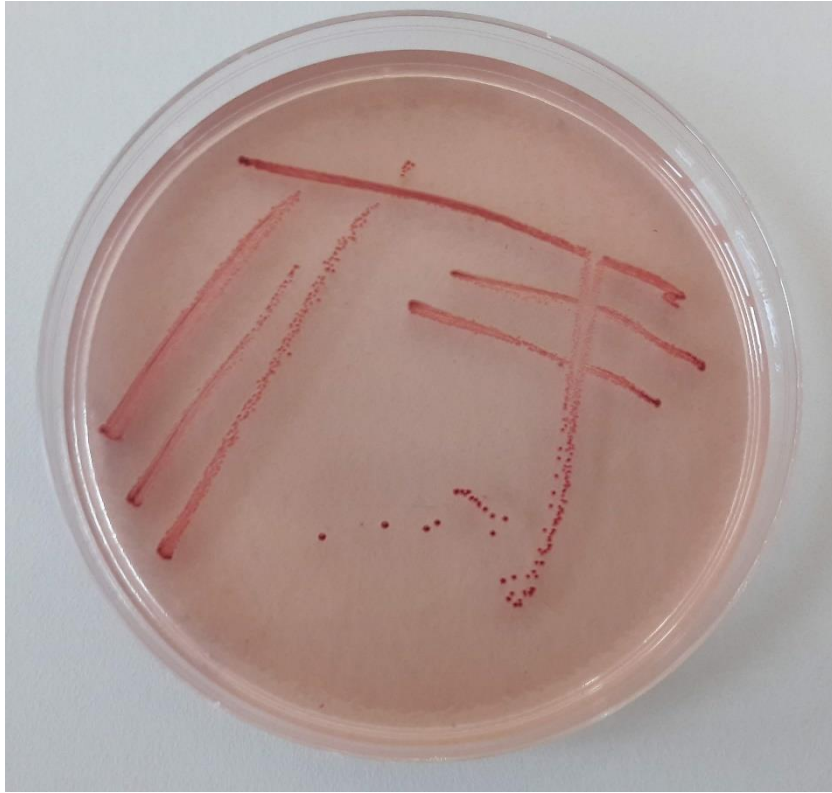
**WYK, Ben-Erik, WINK, Michael.** Medicinal plants of the world. Timber Press, Portland, Oregon, USA 2005. 480 p.

**ZAYAS, Joseph F.** *Functionality of Proteins in Food*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1997. ISBN 978-3-642-59116-7.

**ZLATOHLÁVEK, Lukáš.** *Klinická dietologie a výživa*. 1. vydání. Praha: Current Media, 2016. 422 stran. Medicus. ISBN 9788088129035.

**ZOU, Long; AKOH, Casimir C.** Oxidative stability of structured lipid-based infant formula emulsion: Effect of antioxidants. *Food chemistry*, 2015, 178: 1-9.

## 7 Příloha



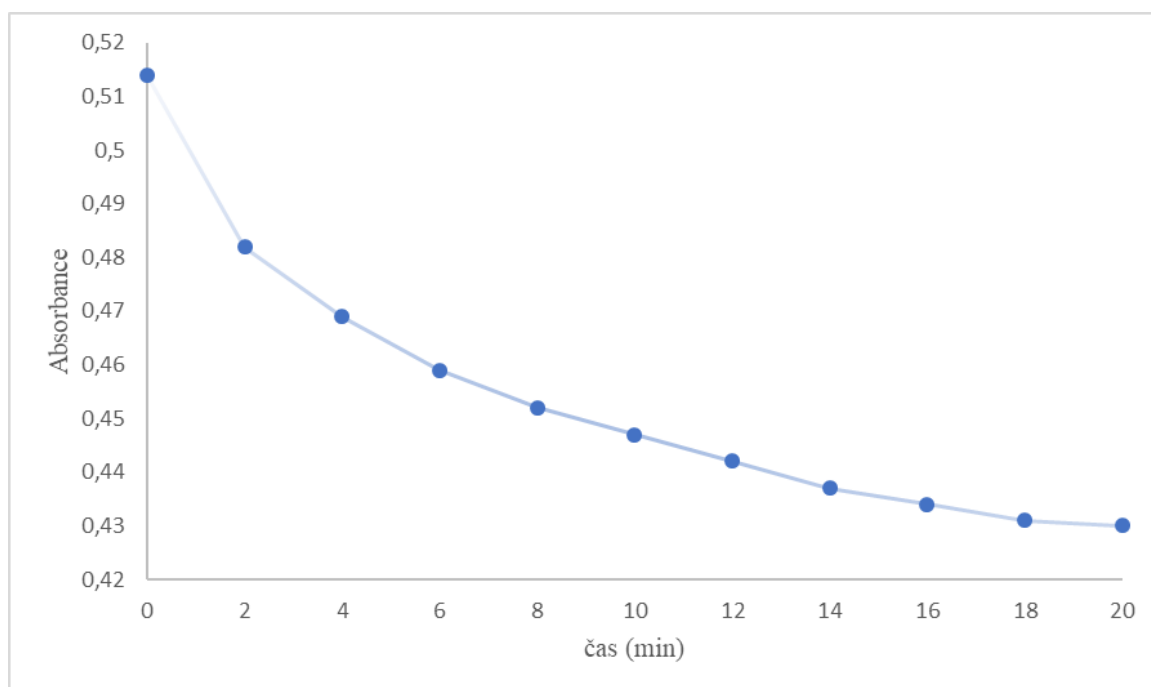
Obrázek 8: Izolace čárkováním – *Enterococcus faecalis* na půdě S-B, inkubace 24h, 37°C (foto autor)



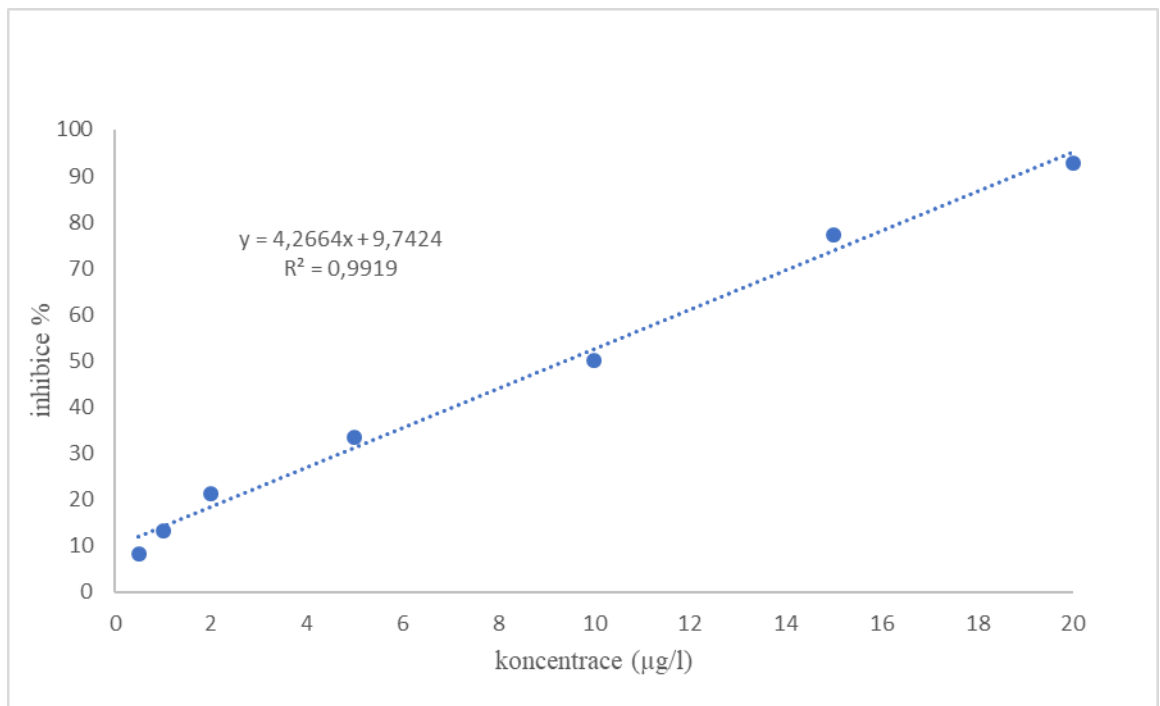
Obrázek 9: Izolace čárkováním - *S.aureus* na půdě B-P, inkubace 24h, 37°C (foto autor)



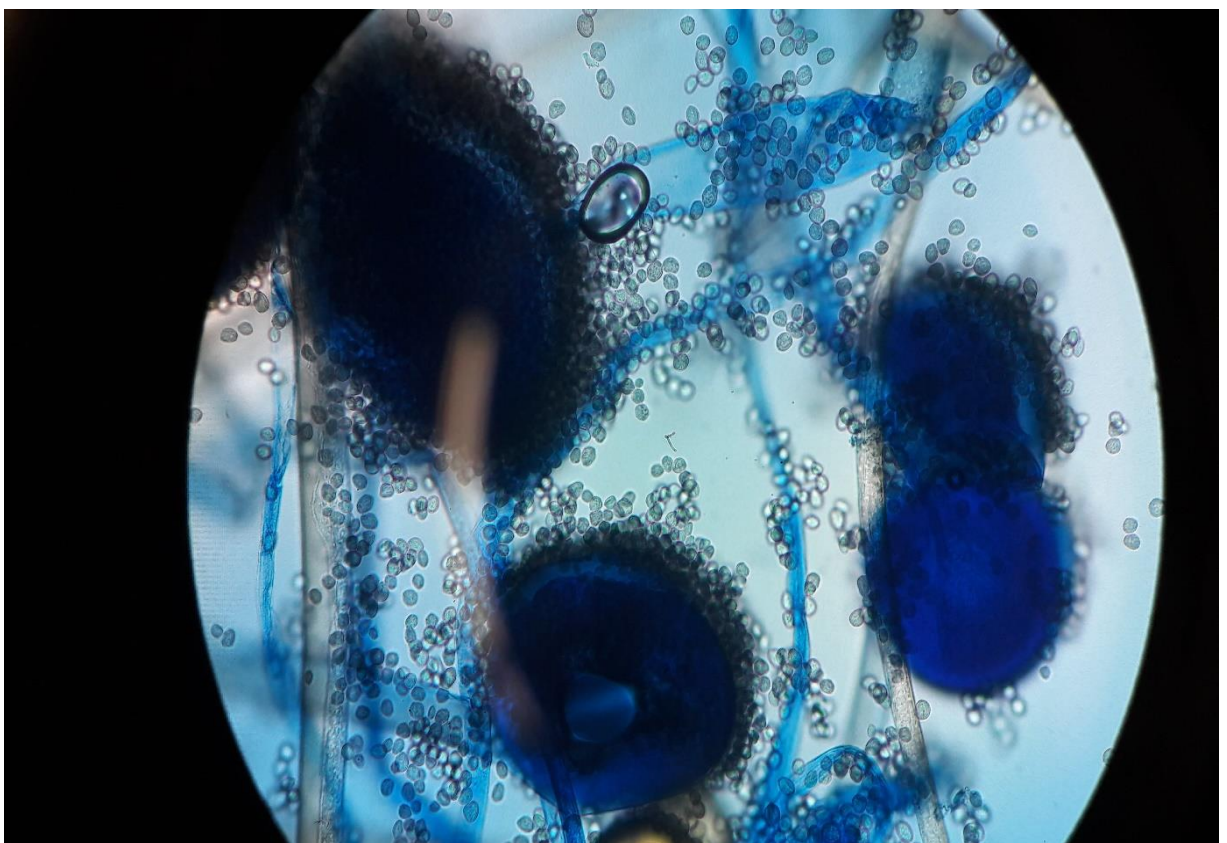
Obrázek 10: Testování antimikrobiální aktivity, bakterie *Bacillus subtilis*, půda M-H, 30 °C, 24 h (foto autor)  
 1 – Hřebíček, 2 - Limeta, 3 - Ethanol, 4 - Šalvěj, 5 - Galgán, 6 - Lékořice



Obrázek 11: Závislost absorbance roztoku DPPH (517nm) na čase pro vzorek 1-A



Obrázek 12: Kalibrační řada roztoku Troloxu



Obrázek 13: Mikroskopický preparát plísně rodu *Mucor*, zvětšení 400x (foto autor)