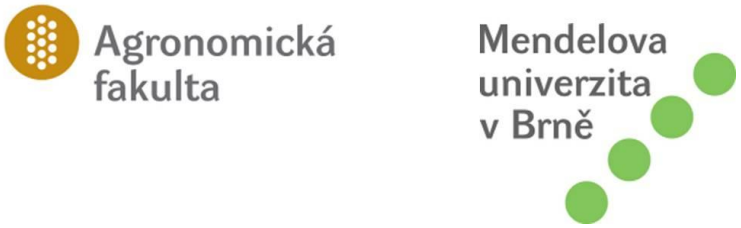
**Mendelova univerzita v Brně**

**Agronomická fakulta**

**Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin**




# Testování antimikrobiální aktivity obalových materiálů s rostlinnými extrakty proti bakteriím rodu *Enterococcus*

Diplomová práce

*Vedoucí:*
Ing. Libor Kalhotka, Ph. D.

*Vypracovala:*
Bc. Simona Maňáková

Brno 2017

ZADÁNÍ PRÁCE

**Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem práci:

……..…….....

……..……..……..…….....

vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna 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 v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:……..

……

podpis

## PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat mému vedoucímu diplomové práce panu Ing. Liboru Kalhotkovi, Ph.D. za odborné vedení při zpracování této práce. Dále také za velkou trpělivost, ochotu, poskytnuté konzultace, připomínky a čas, který mi věnoval při psaní této práce. Mé poděkování patří také projektu TA03010799 - Využití nanomateriálů a přírodních extraktů jako funkčních látek ve vývoji aktivních obalových materiálů s bariérovým efektem, antimikrobiálním, protektivním a kyslík pohlcujícím efektem - který podpořil tuto diplomovou práci. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za velkou podporu při studiu na Mendelově univerzitě.

# ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá problematikou testování antimikrobiální aktivity rostlinných extraktů, jako součástí obalových materiálů potravin, proti bakteriím rodu *Enterococcus*.

Literární část této práce se zaměřuje na charakteristiku rodu *Enterococcus*, na jeho výskyt nejen v potravinách a v neposlední části se zabývá negativním vlivem na organismus člověka. Dalším zpracovaným tématem je použití aromatických rostlin jako producenty silic a jejich využití v potravinářství jako aktivních látek s antimikrobiálními a antifugálními účinky. Popsána je i charakteristika aromatických rostlin rostoucích i v našich zeměpisných podmínkách. Poslední částí literární sekce je úvod do charakteristiky obalových materiálů a jejich velký význam v potravinářství.

Praktická část této práce se zabývá testováním antimikrobiální aktivity vybraných silic aplikovaných na obalových materiálech proti *E. faecalis*. Další částí je testování těchto antimikrobiálních obalových materiálů se silicemi při použití na masném výrobku, s následným mikrobiologickým rozborem růstu sledované bakterie.



**Klíčová slova:** rostlinné silice, antimikrobiální účinek, *Enterococcus*, *E. faecalis*, obalové materiály

## ABSTRACT

This thesis deals with testing of antimicrobial activity of plant essential oils as part of packaging systems for foodpackaging against bacteria genus *Enterococcus*.

The first literature part is focused on characteristic of genus *Enterococcus* and his possible apperace in food and his negative effect on human health. Next topic of literature section is targeted on using plants as producers of essential oils and their use in food industry as active compounds with antimicrobial and atifugal activity. This includes also characteristic of selected aromatic plants growing in our geographical conditions. Last part of literature section is introduction of characteristic of packaging materials and theirs big importance in food industry.

Practical part of this thesis is dealing with testing of packaging materials containg essential oils on theirs surface against *E. faecalis*. Another part of this experiment is testing these antimicrobial packaging materials on selected foods in this case meat product following with microbiological analysis of selected bacteria.



**Key words:** essential oils, antimicrobial effect, Enterococcus, E. faecalis, packaging materials

# OBSAH


**1 ÚVOD ..... 8**

**2 CÍL PRÁCE ..... 9**

**3 LITERÁRNÍ PŘEHLED ..... 10**

3.1 BAKTERIE RODU ENTEROCOCCUS ..... 10

*3.1.1 Charakteristika rodu Enterococcus ..... 11*
*3.1.2 Nejvýznamnější druhy ..... 11*
*3.1.3 Výskyt ..... 14*
*3.1.4 Využití ..... 15*
*3.1.5 Negativní vliv rodu Enterococcus na lidské zdraví ..... 16*

3.2 ROD *ENTEROCOCCUS* JAKO PRODUCENT BIOGENNÍCH AMINŮ ..... 20

*3.2.1 Vznik biogenních aminů ..... 21*
*3.2.2 Výskyt ..... 21*
*3.2.3 Vliv biogenních aminů na lidské zdraví ..... 22*
*3.2.4 Hygienický význam ..... 23*
*3.2.5 Tyramin a histamin ..... 23*

3.3 SILICE ..... 25

*3.3.1 Složení silic ..... 26*
*3.3.2 Získávání silic ..... 26*
*3.3.3 Účinky silic ..... 27*
*3.3.4 Antimikrobiální účinky silic ..... 28*
*3.3.5 Výskyt silic a příklady rostlin ..... 29*

3.4 OBALOVÉ MATERIÁLY V POTRAVINÁŘSTVÍ ..... 32

*3.4.1 Obalové prostředky ..... 33*
*3.4.2 Bariérové účinky ..... 37*

**4 MATERIÁL A METODIKA ..... 39**

4.1 MATERIÁL ..... 39

4.2 METODIKA ..... 41

*4.2.1 Použitá média ..... 41*
*4.2.2 Vlastní experiment ..... 43*

**5 VÝSLEDKY A DISKUZE ..... 46**

5.1 EXPERIMENT Č.1 - TESTOVÁNÍ FÓLIÍ SE SUCHÝM NÁTĚREM OBSAHUJÍCÍM SILICE ..... 46

5.2 EXPERIMENT Č. 2- TESTOVÁNÍ FÓLIÍ S ANTIMIKROBIÁLNÍM ÚČINKEM SILIC U MASNÉHO VÝROBKU ..53

**6 ZÁVĚR ..... 64**

**7 PŘEHLED POUŽITÉ LTERATURY ..... 66**

**8 SEZNAM OBRÁZKŮ ..... 79**

**9 SEZNAM TABULEK ..... 80**

**10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK ..... 82**

# 1 ÚVOD

V posledních letech dochází k velkému zaměření na využití aromatických rostlin pro jejich účinné látky - silice. Silice jsou těkavé látky aromatických rostlin, které vykazují antibakteriální, antifugální a antioxidační účinky. Tyto rostliny se již v minulosti využívali k dochucování potravin, ale největší význam měli v medicíně. Mnoho studií se zabývá jejich využitím v potravinách, pro jejich antimikrobiální a antifugální aktivitu. Nabízí se tak široké pole působnosti, jak těchto látek využít nejen v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Díky svým aktivním složkám mohou silice zabraňovat růstu mikroorganismů a mohou tak být využity při balení potravin jako součást aktivního obalu. Hlavní funkcí obalu je chránit potravinu v něm zabalenou, zabránit tak její kontaminaci okolním prostředím a uchovat potravinu zdravotně nezávadnou do data spotřeby potraviny. Kombinací obalových prostředků a silic může vzniknout vhodný obal pro použití u potravin, kde silice mohou ovlivnit růst mikroorganismů v potravině a prodloužit tak uchovatelnost potraviny. V současné době se již víc projektů věnuje vývoji a testování podobných obalových materiálů.

Tato práce se v praktické části zaměřuje na použití obalových fólií s nátěrem silic, které byly vyrobeny firmou SYNPO a jejich testování proti vybraným mikroorganismům. Jedním z vybraných mikroorganismů pro tento experiment byla bakterie rodu *Enterococcus*. Takto bakterie je významná pro svou antibiotickou rezistenci a její ubikvitární výskyt, jak v těle člověka, tak ve fermentovaných potravinách. V lékařské praxi se jedná o mikroorganismus způsobující nozokomiální infekce, které mohou způsobit vážné onemocnění, končící až smrtí pacienta. Ve fermentovaných potravinách může tato bakterie vytvářet biogenní aminy, které mohou při vyšších koncentracích značně ovlivnit zdraví člověka. Druhou částí této práce bylo testování vybraných obalových materiálů s rostlinnými extrakty na masném výrobku a sledování jejich účinnosti na růst bakterií *E. faecalis*.

# 2 CÍL PRÁCE

- Zpracovat literární rešerši, v níž budou shrnuty poznatky na zadané téma.
- Zaměřit se na významné druhy bakterií rodu *Enterococcus*.
- Charakterizovat tyto mikroorganismy a produkty jejich metabolismu, negativně ovlivňující lidské zdraví.
- Charakterizovat opatření v boji proti nežádoucím mikroorganismům.
- Provést příslušné testování vybraných materiálů na modelových organismech popř. na potravinách.
- Získaná data zpracovat, porovnat s údaji v dostupné literatuře a výsledky uvést v závěru práce.

Cílem praktické části této diplomové práce bylo testování antimikrobiální aktivity silic aromatických rostlin proti mikroorganismu *Enterococcus faecalis*. Testované silice byly speciální technikou naneseny na obalový materiál, ze kterého se později uvolňovaly a mohly tak ovlivnit růst mikroorganismů v uzavřeném prostoru obalu. Prvním krokem bylo zjištění vhodné účinné koncentrace silice a její kombinace proti dané bakterii. Na základě výsledků zjištěných v předchozím testování, došlo k výrobě speciálního prototypu účinné antibakteriální fólie, která byla testována na potravině masného původu.

# 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 3.1 Bakterie rodu Enterococcus

Bakterie rodu *Enterococcus* patří do řádu *Lactobacillales* a do čeledi *Enterobacteriaceae* (Franz et al., 2003).

Dříve byly enterokoky řazeny do rodu *Streptococcus*, později za přispění Lancefieldové (1933), která klasifikovala tuto skupinu bakterií do sérologické skupiny D, a za přispění Shermena (1937) došlo v roce 1984 Kiepper-Balzem a Schleiferem k vytvoření samostatného rodu Enterococcus (Klein, 2003).

Jedná se o grampozitivní, fakultativně anaerobní koky, které jsou uspořádány do párů nebo krátkých řetízků. Tyto bakterie se v některých zemích považují za indikátor fekálního znečištění, neboť jejich původním stanovištěm je intestinální trakt lidí a zvířat. Můžeme je také nalézt na rostlinách bez předchozí fekální kontaminace a mohou být součástí mikroflóry v potravinách (Franz et al., 2003; Klein, 2003). Dále se mohou sekundárně nacházet v mléce a v mléčných výrobcích. Pro jejich odolnost vůči teplotám se používají také jako indikátor sanitace při výrobě sušeného mléka (Görner a Valík, 2004). Využívají se při výrobě mléčných produktů, zejména sýrů. Enterokokové bakterie přispívají ke zrání a k aroma sýrů. Díky těmto vlastnostem mohou být zahrnuty do startovacích kultur pro výrobu některých sýrů (Oiger et al., 2008). Bakterie rodu *Enterococcus* se mohou využívat jako probiotika při výrobě fermentovaných potravin, nikoliv samostatně, ale ve spolupráci s jinými bakteriemi mléčného kvašení. Probiotika příznivě ovlivňují střevní mikroflóru a lidské zdraví (Burdychová, 2007).

Enterokoky se řadí mezi bakterie, které jsou schopny tvořit biogenní animy histamin a tyramin. Produkce těchto látek probíhá zejména ve fermentovaných potravinách (Silla Santos, 1996). Dále mají enterokoky schopnost tvořit bakteriociny - enterociny. Jedná se o malé peptidy, které vykazují antimikrobiální aktivitu u grampozitivních bakterií a to včetně patogenních bakterií jako např. u listérií (Moreno et al., 2006).

Enterokoky byly původně izolovány z klinického materiálu. Prokázalo se, že tyto bakterie způsobují infekce, zejména nozokomiální. Tyto infekce se vyskytují u hospitalizovaných pacientů, jež jsou upoutaní delší dobu na lůžko, u pacientů po operaci nebo například při používání katétrů (Kayser, 2003).

### 3.1.1 Charakteristika rodu *Enterococcus*

Tento rod byl spolu s dalšími 4 rody bakterií mléčného kvašení vyčleněn, z důvodu sekvencování genu 16S rRNA, ze skupiny grampozitivních bakterií s nízkým procentuálním obsahem G + C (guanino-cytosinového komplementárního páru). Tento rod zahrnuje druhy, které se vyskytují v prostředí přirozeně, i druhy které jsou podmíněně patogenní (Sedláček, 2007).

Enterokoky jsou sférického nebo ovoidního tvaru, tvoří diplokoky, mohou se vyskytovat ve shlucích a nebo v krátkých řetízcích (Sedláček, 2007). Jsou to grampozitivní bakterie, které netvoří spory.

Jejich hlavním produktem fermentace je L(+)-kyselina mléčná, jsou kataláza-negativní a viridující (Sedláček, 2007; Byappanahalli et al., 2012).

Enterokoky mají schopnost růst při teplotě 10 °C a 45 °C, při hodnotě pH 4,6 - 9,6, rostou i v přítomnosti 6,5 % NaCl nebo 40 % žluči v médiu. Snášejí teploty až 60 °C po dobu 30 minut (Sedláček, 2007; Kayser, 2003).

Bakterie rodu *Enterococcus* jsou vybaveny silnou buněčnou stěnou, která obsahuje C-polysacharid a proto je řadíme do serotypu s antigenními vlastnostmi skupiny D (De Vos, 2009; Lancefield, 1933).

Jednou z důležitých vlastností je rezistence enterokoků vůči antibiotikům. Je prokázáno, že glykopeptidy jako vankomycin nebo teikoplanin na tyto bakterie neúčinkují. Tato antibiotika se používají při neúčinnosti penicilinu u nozokomiálních infekcích. (Klein, 2003). Tato rezistence je způsobena transpozomy a plasmidy. Varianta transpozomu Tn1546, patřící do skupiny Tn3, propůjčuje bakteriím odolnost vůči vankomycinu (VanA) a gen Tn917 proti makrolidům a linkosamidům (De Vos, 2009).

### 3.1.2 Nejvýznamnější druhy

Nejvýznamnějšími druhy enterokoků jsou *E. faecalis* a *E. faecium*, mohou se účastnit infekcí v lidském těle nebo mohou působit jako probiotika při výrobě potravin (Franz et al., 2011).

Rod *Enterococcus* obsahuje široké množství a varianty plasmidů a transpozomů, které jsou zapojeny do přenášení antibiotické rezistence a virulentních faktorů.

Dále mohou enterokoky produkovat bakteriociny "enterociny" (A, B, P, L50 Q a 1071), které jsou účinné proti jiným druhům bakterií, například proti List*erii monocytogenes*,

*Clostridium tyrobutiricum* a *Staphylococcus aureus*. Gen, který kóduje jejich produkci, se nachází na chromozomech i v plasmidech (De Vos, 2009; Hugas et al., 2003).

#### *3.1.2.1 Enterococcus faecalis*

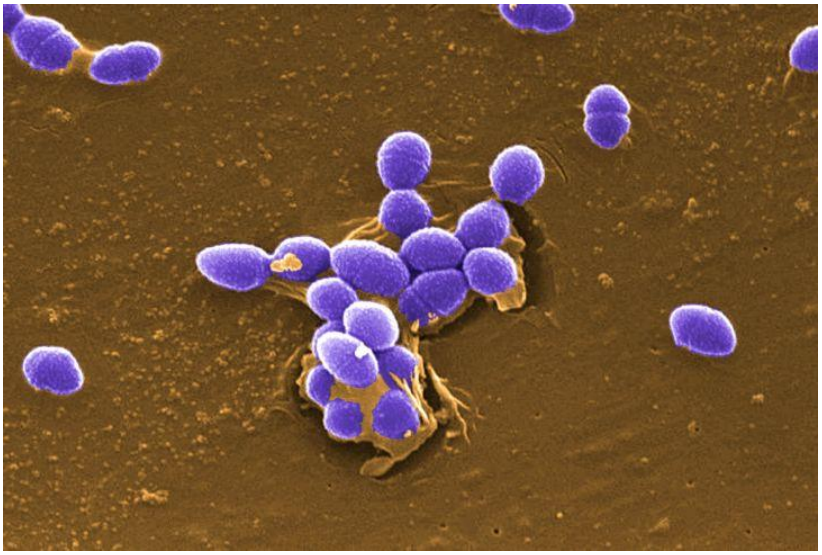
Bakterie druhu *E. faecalis* jsou tvořeny buňkami o velikosti 0,6 - 2,5 μm, jsou kokovitého tvaru a tvoří páry nebo krátké řetízky z pravidla nepohyblivé. Mají sérologickou skupinu D a optimální teplota tohoto druhu je 37 °C (Görner a Valík, 2004).

Chromozomy tohoto rodu tvoří jeden kruh DNA a pro *E. faecalis* je to velikost v rozsahu 3000 - 3250 kb. Celá sekvence genomu byla popsána u *E. faecalis* V583. Kmeny mohou přežít teplotu až 60 °C po dobu 30 minut. Buněčná peptidoglykanová stěna je tvořena Lys-$Ala_{2-3}$ typem. Plasmidy (pAD1, pAM322, pCF10 nebo pPD1) "pheromone-responding plasmids" jsou typické pro tento druh a regulují přenášení genů vykazující antibiotickou a UV rezistenci (De Vos, 2009). V obsahu masných kyselin převládá hexadekanová, oktadekanová a cis-11,12-methylenooktadekanová. Tyrosin je dekarboxylován na tyramin (De Vos, 2009).

Tyto bakterie tvoří na polotuhých živných půdách smetanové až bílé kolonie hladkého povrchu. Na půdě typu Slanetz-Bartley tvoří okrouhlé 1 - 2 mm velké kolonie s hladkým a lesklým povrchem, barva kolonie je hnědočervená až růžová. Bakterie fermentují glukózu za tvorby kyseliny mléčné (Baker, 2006; Görner a Valík, 2004). Přenos druhu *E. faecalis* je možný inhalací kontaminovaných kapének nebo kontaminovanou vodou či potravinou (Baker, 2006).

Tento druh byl izolován z lidského klinického materiálu, z potravin a okolního prostředí. Nachází se v zažívacím traktu lidí a zvířat (Franz et al., 2003). Může být nalezen i na rostlinách, hmyzu a může se vyskytovat v potravinách, které neprošli sterilací a to aniž by jeho přítomnost souvisela s fekálním znečištěním (Görner a Valík, 2004). Může se využívat v sýrařství jako doplňková kultura při výrobě sýrů typu Chedar, kterým dodává výraznější chuť. *E. faecalis* tvoří v mléčných potravinách i biogenní aminy a to zejména tyramin (Klaban, 2001; Ladero et al., 2012).

V medicíně může být jednou z bakterií podílejících se na nozokomiálních infekcích, do kterých se zařazují např. močové infekce, endokarditida a ranné infekce. *E. faecalis* je jednou z hlavních bakterií způsobující tyto infekce a to v 80 - 90 % (Görner a Valík, 2004; Bednář, 1996; Morandi et al., 2006).



Obr. č. 1 *Enterococcus faecalis*

(Zdroj: http://www.pixnio.com/science/microscopy-images/large-numbers-of-gram-positive-enterococcus-faecalis-sp-bacteria)

#### *3.1.2.2 Enterococcus faecium*

Buňky tohoto druhu mohou mít kulovitý nebo vejčitý tvar. Buňky tvoří dvojice nebo krátké řetízky. Tento druh má mnoho vlastností podobných druhu *E. faecalis*.

Chromozomy tohoto rodu tvoří jeden kruh DNA a pro *E. faecium* je to velikost v rozsahu 2550 - 3995 kb. *E. faecium* roste při hodnotě pH 9,6, přežívá teploty 60 °C až 30 minut. Hlavní obsaženou mastnou kyselinou je hexadekanová, oktadekanová a cis-11,12-methylenooktadekanová. Peptidoglykan obsažen v buněčné stěně je typu Lys-D-Asp (De Vos, 2009).

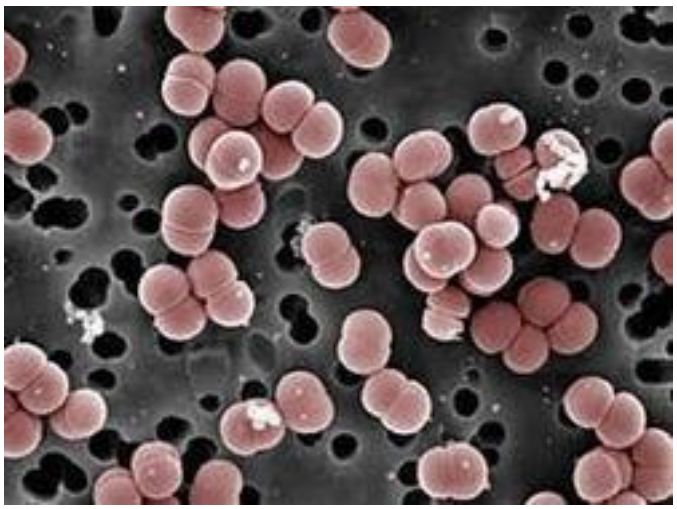
Dále může *Enterococcus faecium* oxidovat glycerol na octovou kyselinu, $CO^2$ a malé množství peroxidu vodíku. Energie tak může být získána degradací některých aminokyselin (arginin, tyrosin, serin, aj.) (Klaban, 2001).

Glukózový bujón okyseluje na hodnotu pH 4,4 až 4,0. Na médiu dle Slanetz-Bartley vytváří bleděrůžové až bílé kolonie (Görner a Valík, 2004).

Lze jej využít v zemědělské výrobě jako součást silážních kultur nebo v potravinářství při výrobě sýrů pro získání výraznější chuti (Klaban, 2001). V potravinářství se používá jako probitoikum nebo je součástí startovacích kultur.

*E. faecium* je také díky své dekarboxylázové aktivitě chopen tvořit tyramin. Tyramin je biogenní anim, který se vyskytuje v potravinách a při vyšších koncentracích může způsobit zdravotní potíže konzumenta (Ladero et al., 2012).

*E. faecium* SF68 se používal pro léčbu průjmů a byl zvažován jako alternativní léčba k léčbě antibiotiky. Dále se tento kmen testoval při léčbě enteritidy u dospělých a dětí, kdy došlo k snížení doby trvání příznaků průjmů (Franz et al., 2003).



Obr. č. 2 *Enterococcus faecium*

(Zdroj: https://m.indiamart.com/proddetail.php?i=4758151362)

### 3.1.3 Výskyt

Tyto bakterie jsou ubikvitární, proto je můžeme najít běžně v okolním prostředí. Svůj původ mají, ale ve střevní mikroflóře zvířat a lidí. (Franz et al., 2003). Lze je najít i v trusu ptáků, plazů a divokých zvířat.

Nejvíce zastoupenými druhy jsou právě *E. faecalis* a *E. faecium* (De Vos, 2009). Právě díky jejich původu v gastrointestinálním traku se v některých zemích využívají jako indikátor nedávného fekálního znečištění vody. Problémem je, že enterokoky rychle ve vodě odumírají a proto nejsou tak specifické jako *Escherichia coli* (Görner a Valík, 2004; Byappanahalli et al., 2012). V půdě jako takové se přirozeně nevyskytují, ale dostávají se do ní s výkaly zvířat. Na rostlinách naopak můžeme najít druhy, které nemají žádnou spojitost s fekálním znečištěním. Nejvíce se nacházejí na květech, odkud usuzujeme, že enterokoky

jsou přenášeny hmyzem na další rostliny (De Vos, 2009; Švec, 2012; Burdychová et al., 2007).

### 3.1.4 Využití

Bakterie rodu *Enterococcus* se využívají při produkci fermentovaných potravin a mohou se využít jako probiotika. Užívají se, jak pro výrobu mléčných, tak i pro výrobu masných potravin (Franz et al. 2011; Hugas et al., 2003).

Probiotika se skládají z více kultur mikroorganismů a po požití působí příznivě na střevní mikroflóru člověka. Inhibují patogenní mikroorganismy, působí příznivě na stěnu trávícího traktu, působí proti rakovině a stimulují imunitní systém. Do probiotických kultur se zahrnují rody *Bifidobacterium, Lactobacillus* a občas i bakterie rodu *Enterococcus* (Franz et al., 2003).

Enterokoky lze nalézt i ve fermentovaných masných výrobcích. Jejich vytrvalost během fermentace je přisuzována jejich vlastnostem snášet vysoké teploty a vyšší koncentrace soli v prostředí. Mohou tak přispět k rozvinutí aroma fermentované potraviny díky jejich lipolytické a proteolytické aktivitě (Hugas et al., 2003).

V mlékárenském průmyslu se využívají při výrobě sýrů jako součást startovací kultury společně s bakteriemi mléčného kvašení. (Giraffa, 2003). Nejčastěji je můžeme nalézt ve zrajících sýrech, kde mohou dosáhnout počtu $10^4$ - $10^7$ cfu $g^{-1}$ v závislosti na kyselosti a slanosti daného druhu sýra. V sýrech tyto bakterie zlepšují strukturu a aroma (Morandi et al., 2006).

Enterokoky (sérologické skupiny D) se v některých státech využívají jako indikátory fekálního znečištění, z důvodu, že tyto bakterie ve vodě rychle odumírají. To poukazuje zejména na nedávnou kontaminaci fekálním znečištěním. Dále se využívají jako indikátory správné sanitace (Görner a Valík, 2004; Giraffa, 2002). I když se nacházejí zejména v trávícím traktu, nemusí jejich výskyt v potravinách ihned souviset s fekálním znečištěním. Enterokoky se mohou vyskytovat na dojících strojích a do nich se mohou dostávat ze siláží, kde se enterokoky často vyskytují. To dokazuje nedostatečnou sanitaci dojících strojů. Díky jejich termorezistentním vlastnostem se sleduje jejich obsah i v sušeném mléku (Görner a Valík, 2004).

### 3.1.5 Negativní vliv rodu *Enterococcus* na lidské zdraví

Enterokoky jsou považovány za jedny z hlavních nozokomiálních patogenů, cca 10 % nozokomiálních infekcích je vyvoláno enterokoky. Nozokomiální infekce se vyskytují u hospitalizovaných pacientů v nemocnicích. Za tyto infekce považujeme ty, které u pacienta při příjmu do nemocnice nebyly přítomny, ale po 48 hodinách po hospitalizaci nebo během 30 dnů po propuštění pacienta byla infekce detekována (Breathnach, 2013; Hobstová et al., 2012).

Enterokoky způsobují infekční endokarditidy, účastí se infekce močových cest, ranných infekcí, vzácněji způsobují novorozenecké sepse a infekce centrální nervové soustavy (Lobovská, 2001; Franz et al., 2003). Enterokokové bakterie neprodukují toxin, tak jako *S. aureus*, ale mají povrchové molekuly, které umožňující přichytit se k buňkám sliznice a tak vytvářet biofilm. (Beneš, 2009). Enterokoky způsobují i bakterémii, kdy se mohou přes krevní oběh přichytit na srdeční chlopně a způsobovat tak infekční endokarditidu. Zdrojem bakterémie mohou být cévní a močové katétry, nitrobřišní sepse, popáleniny nebo jejich přítomnost v močovém traktu (Beneš, 2009; Hobstová et al., 2012). Nozokomiální infekce dělíme na endogenní a exogenní. Endogenní infekce jsou zapříčiněny mikroorganismy, které se přirozeně vyskytují v těle pacienta (kůže, gastrointestinální trakt) a jsou zavlečeny do jiného systému organismu pacienta. Nebezpečné jsou, pokud dojde k oslabení imunity nebo k chirurgickému zásahu do těla, poté může dojít k proniknutí MO do krevního oběhu a vzniku sepse. Prevencí endogenních infekcí je správné použití antibiotik. U exogenních infekcí dochází k zavlečení infekčního agens ze vnějšku (např. od jiného pacienta, pomocí rukou zaměstnanců) do tkání a orgánů pacienta. Důležitá je proto prevence dodržování hygieny, zejména mytí rukou personálu a důkladné proškolení zaměstnanců (Maďar et al., 2006; Ševčík, 2003).

Rozvoji enterokoků napomohl rozvoj anesteziologicko-resuscitační péče, jako např. katétrizace, kanylace, mechanická ventilace pomocí přístrojů, aj. Jedná se i o jakékoliv invazivní metody porušující bariéry lidského těla. Nejnáchylnější jsou pacienti s poruchami imunity, popáleninami, nedonošené děti, diabetici a pacienti vyššího věku. Nejčastěji se do těchto infekcí řadí močové infekce (39 %), pneumonie (18 %), chirurgické ranné infekce (17 %), infekční endokarditidy (IE) a další. (Lobovská, 2001; Votava et al., 2007).

Nozokomiální infekce jsou běžné a mohou mít vážné až fatální následky. Pokud bakterémie přesáhne u pacienta 50 %, tak se riziko zvyšuje a tím i mortalita. Proto je

důležitá prevence a to aby personál nemocnice udržoval důslednou hygienu přístrojů, nástrojů, pacientů a zejména aby se předešlo jejich infikování. Dále k prevenci patří i omezení použití nadměrného množství antibiotik, tak aby nedošlo k rozvinutí rezistence mikroorganismů. (Majumdar et al., 2012; Breathnach, 2013). Důležité je zavést taková opatření, která zabrání šíření těchto infekcí. Jedná se o řádnou hygienu pracovníků, tak aby neroznášeli mikroby z jednoho pacienta na druhého.

Mnoho studií prokázalo výskyt rezistentních mikroorganismů, do kterých řadíme methicillin rezistentní *Staphylococcus aureus*, vankomycin rezistentní bakterie rodu *Enterococcus* a multirezistentní gramnegativní bakterie. Hlavním důvodem k obavám je rezistence enterokoků na široké spektrum antibiotik, které je zprostředkováno geny, které tuto odolnost kódují (Franz et al., 2003). Tyto bakterie jsou přirozeně rezistentní k cefalosporinům, co-trimoxazolu a linkosamidům. Tetracykliny a makrolidy jsou málo účinné. Nižší citlivost mají k penicilinovým antibiotikům (Franz et al., 2003; Beneš, 2009). V posledních letech si získaly rezistenci vůči vankomycinu (Majumdar et al., 2012). V USA během 4 let došlo na jednotkách intenzivní péče ke zvýšení rezistence enterokokových bakterií z 0,4 % na 13,6 % a jejich rezistence stále stoupá (Bednář, 1996).

#### *3.1.5.1 Infekce močových cest*

Nejčastěji se tyto bakterie účastní infekcí močových cest, které bývají povětšinou chronické a souvisí se zavedením močového katétru. Po 5 dnech riziko infekce narůstá o 5 % za každý den (Ševčík, 2003). Jako infekci močových cest označujeme přítomnost bakterií v moči pacienta (Beneš, 2009; Havlík, 2002).

Nejčastějšími původci jsou gramnegativní bakterie (*E. coli, P. aeruginosa, Proteus spp*., aj.) a enterokokové bakterie (Ševčík, 2003). Močové cesty a močový měchýř jsou za normálních podmínek sterilní a to díky odtoku moči, pH a uromukoidu, který zabraňuje ulpívání bakterií na stěnách (Rozsypal, 1981; Schindler, 2010). Mezi normální mikroflóru přední části močové trubice patří *Staphylococcus epidermidis, Enterococcus faecalis* a koryneformní tyčinky (Bednář, 1996). Infekce je ascendentní a bakterie tak mohou způsobit zánět močového měchýře (cystitidu), dalším šířením mohou napadnout ledviny (pyelonefritida) a infekce ledvin může být zdrojem urosepse (Rozsypal, 1981; Schindler, 2010).

Příznaky jsou bolestivé pocity při močení, časté močení, močení malých objemů

tekutiny, horečka, zápach moči (Rozsypal, 1981). Za infekční se považuje pozitivní nález bakterií v moči, se symptomy nebo bez symptomů. Hodnota více než 100 000 mikroorganismů na 1 ml v moči se již považuje za močovou infekci, dále i obsah leukocytů infekci potvrzuje. (Hobstová et al., 2012; Schindler, 2010).

Léčba vhodnými antibiotiky se volí na základě nálezu bakterií v moči, tak aby byla zajištěna jejich dobrá účinnost. Pokud je u pacienta třeba mít zavedený katétr po delší dobu a nelze jej vyměnit, je třeba původní katétr vyjmout a zahájit léčbu antibiotiky (Hobstová et al., 2012).

Často se bakterie rodu *Enterococcus* také vyskytují i u prostatidy a pyelonefritidy a to v 10 - 15 % (Beneš, 2009). Pyelonefritidu způsobuje nejčastěji, kromě *E. coli*, i *Enterococcus faecalis*, jedná se o akutní ložiskovou pyogenní infekci ledvinového parenchymu. Potvrzujeme ji laboratorními nálezy, biochemickými a kultivačními vyšetřeními moči. Příznaky jsou horečka, bolest v boku, zimnice, třesavky a celkově špatný stav. Nedostatečné léčení může přejít na chronickou pyelonefritidu a to oboustrannou pyogenní infekci ledvin, která může vést k atrofii postižené ledviny (Rozsypal, 1981; Havlík, 2002).

Mortalita těchto infekcí není vyšší než u jiných nozokomiálních infekcí, ale může vést k bakteriémii a k úmrtí pacienta. Prevencí pro předcházení této infekci je důsledná hygiena, používání sterilních nástrojů. Důležitá je celková doba zavedeného katétru a rozhodnutí, zda pacient katétr potřebuje (Hobstová et al., 2012; Ševčík, 2003).

#### *3.1.5.2 Ranné infekce*

Spolu s jinými bakteriemi se podílejí enterokoky na ranných a nitrobřišních infekcích (Beneš, 2009). Mnoho chirurgických ranných infekcí je zapříčiněno zavlečením mikroorganismů do rány během chirurgické operace (Ševčík, 2003). K těmto infekcím dochází po těchto zákrocích cca v 10 %. K infekcím dochází při porušení kůže a podkoží (povrchová incize), při porušení svaloviny (hluboká incize) a nebo při porušení orgánů a dutin (incize orgánů) (Schindler, 2010). Kontaminace endogenní je způsobena povrchovou mikroflórou kůže a sliznic a exogenní kontaminace je způsobena nemocničním personálem, ze vzduchu, nemocničním vybavením a návštěvníky (Schindler, 2010; Hobstová et al., 2012).

K léčbě se využívají nejčastěji vhodně zvolené antibiotika, která se podávají zpravidla 20 - 30 minut před zákrokem. Podávání antibiotik po zákroku zvyšuje rezistenci

mikroorganismů (Ševčík, 2003). Pacient by měl být před zákrokem osprchován, pokud je potřeba odstranit vlasy je vhodnější použít depilátor než hlavu oholit. Operační sál musí být umytý a ošetřený antimikrobiálními prostředky (Hobstová et al., 2012).

#### *3.1.5.3 Infekce z intravaskulárních katétrů*

Infekce z intravaskulárních katétrů se často vyskytuje v nemocnících, dochází k ní při jejich zavádění a používání. Infekce krevního řečiště je často v souvislosti s centrálními žilními katétry a mortalita u těchto infekcí je poměrně vysoká, až o 20 %. Riziko stoupá od 7. dne zavedení katétru. Nejčastjšími bakteriemi které způsobují tuto infekci jsou *Staphylococcus emidermis, S. aureus, Enterococcus spp*. (s rostoucí vankomycin rezistentních kmenů) a *Candida spp*. (Ševčík, 2003).

#### *3.1.5.4 Infekční endokarditida*

Infekční Endokarditida (IE) může být způsobena bakteriemi, mikromycetami i enterokokovými bakteriemi (z 5-18 %). Onemocnění probíhá jako sepse s ložiskem, které tyto bakterie vytváří na chlopních a chlopenních protézách (Beneš, 2009; Rozsypal, 1981; Hobstová et al., 2012). Endokarditidu rozlišujeme akutní a subakutní.

Polovinu případů IE postihuje normální srdeční chlopně, kdy je příčinou bakteriémie při provádění urologických, stomatologických a katétrizačních ošetřeních. V tomto případě IE probíhá akutně během několika dní. Nejčastěji ji způsobuje *Staphylococcus aureus*, streptokoky a pneumokoky. Druhá polovina IE tvoří poškozené nebo postižené chlopně, jedná se o subakutní IE, kterou způsobují zejména streptokoky (*Enterococcus faecalis*). Rozvíjí se až 6 týdnů, i déle a týká se i umělých chlopní a náhrad. Bakteriémie je způsobena zánětem dásní nebo pochází z gastrointestinálního nebo urogenitálního traktu (Pojak et al., 2000; Lobovská, 2001; Hobstová et al., 2012).

Důležité je toto onemocnění včas diagnostikovat, neboť toto onemocnění je závažné a bez vhodné léčby může končit úmrtím pacienta, v případě neléčené IE končí vždy smrtí. (Havlík, 2002; Rozsypal, 1981).

Původci nemoci jsou nejčastěji streptokoky 50 - 70 %, stafylokoky 28 % a enterokoky 10 % (Lobovská, 2001). Endokarditida se vyskytuje zejména u pacientů se srdeční vadou, s degenerativními změnami srdečních chlopní nebo s náhradami srdečních chlopní. U těchto pacientů může dojít k bakteriémii při například chirurgickém zákroku nebo při zubním ošetřením. Proto je vhodné podat těmto pacientům před těmito výkony vhodné antibiotika

(Havlík, 2002; Rozsypal, 1981).

Příznaků IE je mnoho, z 90 % jsou u pacientů horečky, v 85 % se objevuje šelest na srdci a projevují se zánětlivé reakce. Může docházet k embolizačním projevům na kůži a nehtech, dále pak ke kombinaci např. třesavky, zimnice, celkové slabosti, nauzei, zvracení, bolesti kloubů, k otokům dolních končetin a bolesti na hrudníku (Havlík, 2002; Rozsypal, 1981; poljak; Lobovská, 2001). Laboratorně se zjišťuje např. leukocytóza, sedimentace erytrocytů, mikroskopická hematurie. Terapie je zejména chirurgická (nahrazení chlopně mechanickou nebo bio protézou), antibiotická (použití kombinací penicilinu, cefalosporinů, aminoglykosidů, ampicilinu, gentamicinu, aj.) a symptomatická (podání pacientovi diuretik, antipyretikkardiotonik, aj.) (Pojak et al., 2000; Schindler, 2010). Následky IE jsou pro pacienta buď dočasné a nebo trvalé. Trvalé postižení chlopní vede k následné operaci a dočasnému poškození orgánů v důsledku embolizace (Havlík, 2002; Rozsypal, 1981).

U mužů se IE vyskytuje dvakrát častěji než u žen. Mortalita je 50% u pacientů s umělou chlopní a 30% u pacientů s predispozicí k IE. Příčinou smrti bývá nejčastěji srdeční selhání, embolizace, ruptura aneuryzmatu. Velký vliv na mortalitu má i věk pacienta a komorbiditida tj. současný výskyt více nemocí u jednoho pacienta (Havlík, 2002; Hobstová et al., 2012).

## 3.2 Rod *Enterococcus* jako producent biogenních aminů

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární dusíkaté látky vznikající dekarboxylací aminokyselin nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů. Mohou být produkovány metabolismem zvířat, rostlin a mikroorganismů. Můžeme je nalézt jak v běžných potravinách, tak i v syrových potravinách a surovinách (Rejchrtová et al., 2011; Silla Santos, 1996; Lazaro et al., 2015). BA mají důležitou roli ve fyziologických funkcích organismu, ale jejich vysoké koncentrace působí toxicky. BA jsou zdrojem dusíku a jsou prekurzory pro syntézu alkaloidů, hormonů, nukleových kyselin a proteinů (Nuñez et al., 2015).

Biogenní aminy rozdělujeme do několika skupin: monoaminy - tyramin, fenylethylamin; diaminy - histamin, serotonin, tryptamin, putrescin, kadaverin; polyaminy - spermin, spermidin, agmatin. Dále je můžeme rozdělit i na: aromatické - tyramin, fenylethylamin; alifatické - putrescin, kadaverin, spermin, spermidin; heterocyklické - histamin, tryptamin (Lazaro et al., 2017; Karovičová et al., 2003).

Bakterie rodu *Enterococcus* se řadí mezi tyto producenty biogenních aminů, obsahují gen, který kóduje tvorbu tyrosindekarboxylázy a histidindekarboxylázy. Tyto geny jsou v některých případech umístěny na plasmidech (Silla Santos, 1996; Burdychová et al., 2007; Ladero et al., 2012). Kmeny druhu *E. faecium*, izolované ze sýra, byly identifikovány jako producenti tyraminu a to z 90 %. Podobné výsledky dosahovaly i druhy *E. faecalis* a *E. durans*. Mnoho kmenů těchto druhů bylo identifikováno jako producenti tyraminu, histaminu a i putrescinu zejména v mléčných výrobcích (Ladero et al., 2012).

### 3.2.1 Vznik biogenních aminů

V potravinách vznikají díky některým mikroorganismům, které se vyznačují dekarboxylázovou aktivitou. Pro vznik biogenních aminů je zapotřebí vhodné prostředí pro množení bakterií s dekarboxylázovou aktivitou, přítomnost těchto bakterií a výskyt volných aminokyselin (Rejchrtová et al., 2011; Silla Santos, 1996). Volné aminokyseliny se mohou objevit, jak v potravinách, tak mohou být uvolněny z bílkovin v důsledku proteolytické aktivity nebo tepelné degradace (Lazaro et al., 2017). I mikroorganismy s vysokou aktivitou proteolytických enzymů mohou zapříčinit vznik BA u potravin. Dekarboxylace aminokyselin je největší v kyselém prostředí, optimální hodnota pH se pohybuje od 4,0 do 5,5. V takovémto prostředí bakterie více produkují tyto enzymy, kterými se brání vůči kyselému prostředí.

Tvorba BA je ovlivněna také teplotou. Optimální teplotou pro růst bakterií s dekarboxylázovou aktivitou je cca 20 - 37 °C, pokles teploty zastaví jejich růst a produkci. Přítomnost chloridu sodného aktivuje aktivitu tyrosindekarboxylázy a inhibuje aktivitu histidindekarboxylázy, a dusitan sodný aktivuje tyrosindekarboxylázu (Karovičová et al., 2003).

### 3.2.2 Výskyt

Většina potravin, které obsahují bílkoviny nebo volné aminokyseliny jsou vhodným prostředím pro mikrobiální nebo biochemickou tvorbu biogenních aminů (Silla Santos, 1996). Biogenní aminy jsou zastoupeny v řadě potravin jako například v rybách, masných produktech, mléčných produktech, pivě, víně, zelenině, v ovoci. U některých nefermentovaných potravin lze přítomnost biogenních aminů považovat za indikátor mikrobiálního kažení (Silla Santos, 1996; Shalaby, 1996; Bodmer et al., 1999). BA můžeme využít jako možný indikátor kvality potravin nebo pomocí hladiny BA monitorovat průběh

fermentace (Lazaro et al., 2017).

U fermentovaných potravin se předpokládá velké množství mikroorganismů v potravině díky přídavku mikrobiálních kultur. Ve většině produktů, kde využíváme bakterie mléčného kvašení, dochází k tvorbě biogenních aminů a to zejména tyraminu, histaminu, putrescinu a kadaverinu (Silla santos, 1996; Shalaby, 1996).

Bakterie mléčného kvašení jsou jedny z mikroorganismů, které se používají pro výrobu fermentovaných potravin. Při jejich výrobě se často využívají i probiotické kultury, které mohou fungovat jako startovací kultury nebo se k nim přidávají jako doplněk pro dosažení pozitivního účinku na lidské zdraví (Burdychová et al., 2007). Některé z těchto druhů bakterií jsou popsány jako producenti BA, které mohou mít vliv na zdraví konzumenta (Ladero et al., 2012).

### 3.2.3 Vliv biogenních aminů na lidské zdraví

BA působí v organismu člověka jako lokální hormony, neurotransmitery ovlivňující kontrakci hladké svaloviny, mohou působit vasodilatačně, zvyšují vaskulární permeabilitu a zvyšují sekreci hlenu. Dále ovlivňují krevní tlak, arytmii, sekreci žaludečních kyselin a mohou způsobit tachykardii (Tofalo et al., 2015). Pokud nedojde k detoxikaci histaminu, může způsobit uvolňování adrenalinu a noradrenalinu a zvýšit sekreci žaludečních šťáv.

Biogenní aminy mohou v určitých koncentracích způsobit intoleranci a ve vysokých koncentracích v potravinách působit až toxicky. Složení BA v potravinách může být různé. Lidé konzumují BA obsažené v potravinách v malém množství, kdy je organismus schopen BA detoxikovat. Toto malé množství může trávící ústrojí člověka metabolizovat pomocí enzymů diaminooxidázy (DAO) a monoaminooxidázy (MAO), na méně aktivní produkty. Pokud dojde k požití velkého množství BA, není tento detoxikační systém schopen dostatečně BA degradovat. Schopnost tohoto systému závisí i na dalších faktorech, jako např. požití alkoholu, užívání některých léčivých látek, geneticky způsobená alergie může účinek tohoto systému podstatně snížit a vést tak k nebezpečným hodnotám BA v organismu. (Bodmer et al., 1999; Lazaro et al., 2017).

Pokud některé z BA (spermidin, tyramin, putrescin, spermin, kadaverin) jsou vystaveny teplu, může dojít ke vzniku sekundárních aminů a za současné přítomnosti nitrilů v prostředí může dojít k vytvoření nitrosaminů, které působí karcinogenně (Tofalo et al., 2015).

### 3.2.4 Hygienický význam

Biogenní aminy se používají jako indikátor kvality a indikátory nežádoucí mikrobiální aktivity v masných výrobcích. Zvýšená koncentrace putrescinu a kadaverinu u čerstvého masa souvisí pomnožením mikroorganismů způsobujících kažení masa a produkci těchto BA. Množství tyraminu, putrescinu a kadaverinu stoupá i při zpracování a skladování masa a proto se poměry BA využívají pro zjištění hygienických podmínek při výrobě. Využití BA jako indikátorů kvality závisí na složení potraviny, ale také na způsobu zacházení s potravinou během výroby (Lazaro et al., 2017).

Mnoho bakterií mléčného kvašení se využívá jako startovací kultury při výrobě fermentovaných potravin. Pro snížení BA v potravinách by mělo být důležité vhodně vybrat startovací kulturu a to takovou, která neobsahuje bakterie produkující BA (Spano et al., 2010).

### 3.2.5 Tyramin a histamin

Nejvýznamnějšími BA, které mohou mít velký vliv na lidské zdraví, jsou tyramin a histamin, jejichž prekurzory jsou histidin a tyrozin. Jedná se zejména o "otravu histaminem" a "cheese reaction", která je způsobena tyraminem. Intoxikace se může projevit několik minut po požití potraviny s vysokým obsahem BA a nebo i po několika hodinách. Symptomy mohou být gastrointestinálního nebo kožního charakteru (alergické reakce, bolesti hlavy, bolesti břicha) (Lazaro et al., 2017).

Tyramin a histamin jsou v organismu rozkládány pomocí mechanismu enzymů MAO a DAO. Tento detoxikační mechanismus může být narušen vysokým příjmem BA, příjmem drog a léků a závisí na tom, zda má pacient alergii (Silla Santos, 1996; Komprda et al., 2009; Dabrowski et al., 2005). MAO a DAO se nachází ve střevním epitelu, některé BA (putrescin, kadaverin) mohou inhibovat detoxikaci histaminu tím, že reagují s MAO a DAO, tím dochází ke zvýšení hodnoty histaminu v krvi (Karovičová et al., 2003).

Určit s přesností, při jakém množství mají BA toxický účinek na lidské zdraví, není jednoznačné. Závisí to na charakteru BA a na jejich složení v dané potravině nebo nápoji. Proto byla určena hodnota 1000 mg BA na 1 kg potraviny, která se považuje za zdraví nebezpečnou (Silla Santos, 1996).

#### *3.2.5.1 Tyramin*

Tyramin působí vazokonstrikčně, a pokud je jeho koncentrace v těle vysoká může způsobit zvýšení krevního tlaku, slzení, slinění, bolesti hlavy, respirační problémy, selhání srdce nebo krvácení do mozku (Komprda, 2000; Shalaby, 1996). Tyramin reaguje s léky, které inhibují MAO, a tím dochází ke zvýšení krevního tlaku díky tomu, že tyramin působí nepřímo na uvolňování noradrenalinu z nervového systému. Sám o sobě je tyramin mírně toxický, ale větší účinek má v kombinaci s inhibitory MAO (Shalaby, 1996). Tyramin se nejvíce vyskytuje v mléčných produktech, proto vznikl pojem "cheese reaction", který je spojován se symptomy, které se mohou vyskytnout po požití sýra, proto tedy sýrová reakce (Ladero et al., 2012). Nejčastěji se projevuje migrénou, bolestmi hlavy a zvýšeným krevním tlakem (Linares et al., 2016). Hodnota nad 100 - 800 mg/kg tyraminu v potravinách se již považuje za toxickou dávku, záleží na daném organismu člověka a vedlejších okolnostech (Silla Santos, 1996).

#### *3.2.5.2 Histamin*

Histamin také působí, jako tyramin, vazokonstrikčně a i v nízké koncentraci způsobuje hypotenzi, návaly horka, kopřivku a křeče v břiše. Ve vysoké koncentraci může způsobit život ohrožující intoxikaci, která se projevuje kardiovaskulárními problémy (Bodmer et al., 1999; Komprda et al., 2009; Püssa, 2008). Hlavním enzymem, který je zodpovědný za rozklad požitého histaminu je diamonioxidáza DAO. Aktivita DAO může být blokována velkým příjem potravin obsahujících histamin, požíváním alkoholických nápojů, drog nebo některých léků (Maintz et al., 2007).

Histamin účinkuje na receptory buněčných membrán v kardiovaskulárním a gastrointestinálním systému. Způsobuje dilataci periferních krevních cév, tepen a kapilár což vede ke snížení krevního tlaku. Dále ovlivňuje kontrakce hladké svaloviny, arytmii a stimuluje sekreci žaludečních kyselin. Histamin je důležitou součástí imunomodulace, hojení poranění a neurotransmise (Maintz et al., 2007; Karovičová et al., 2003).

Limitní hodnota histaminu v potravinách by měla být 100 mg/kg, u alkoholických nápojů jsou to 2 mg/l, ale již při 70 mg/kg může docházet k reakci organismu (Silla Santos, 1996). Hodnota 500 - 1000 mg/kg histaminu je nebezpečná pro lidské zdraví a hodnota nad 1500 mg/kg histaminu má vážné následky (Dabrowski et al., 2005). Prozatím neexistuje

nařízení, které by kontrolovalo hodnoty histaminu v potravinách, pouze Evropská Unie stanovila maximální hodnotu (200 mg/kg) histaminu u ryb, kde je riziko největší (Linares et al., 2016). Doporučuje se nepřekročit hodnotu 100 - 200 mg/kg histaminu v potravinách (Karovičová et al., 2003).

Histamin se často vyskytuje u potravin z ryb a účastní i "scombroid fish poisoning". Jedná se o otravu při požití zkažené nebo bakteriálně kontaminované ryby, nejčastěji pocházející z čeledi *Scombridae* (Püssa, 2008). Histamin jako takový se nepovažuje za látku, která příznivě ovlivňuje potravinu, ale naopak její kvalitu spíše snižuje. Tato látka nemá efekt na organoleptické vlastnosti potravin, ale může vyvolat u konzumenta zdravotní potíže. Proto by měl být obsah histaminu v potravinách co nejnižší (Bodmer et al., 1999).

## 3.3 Silice

Jedná se o sekundární metabolity aromatických rostlin, zvláště o těkavé látky, které jsou velmi aromatické a skládají se z velkého množství chemických sloučenin (Bacíková et al., 2012). Toto složení se liší v závislosti na tom, ze které části rostliny tyto extrakty získáváme. Každá rostlina má jiné rozdělení, složení a hustotu žláz, které obsahují silice. Důležité je také z jaké oblasti a z jakého kontinentu daná rostlina pochází. To vše má vliv na složení silic (Başer et al., 2010).

Tyto aromatické rostliny naši předci přidávali do potravy již v dávné minulosti, ne jen jako ochucující přísady, ale také pro uchování potravin (Škrinjar et al., 2009; Zaouali et al., 2010). Silice mají mnoho příznivých účinků a široké využití v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu a v potravinářství, kde se využívají pro své antibakteriální a antifugální účinky (Bacíková et al., 2012). Každá aromatická rostlina má jiné složení silic a proto každá působí jinak, některé rostliny tak disponují i protizánětlivými, antioxidačními, uklidňujícími účinky a mohou mít vliv na nervovou soustavu (Laborda et al., 2013; Pahani et al., 2012).

V posledních letech se mnoho studií zaměřilo na využití aromatických rostlin, které mohou poskytovat účinné silice. Zejména se jedná o jejich použití v potravinářství a o jejich příznivém působení při uchovávání potravin (Calo et al., 2015). Konzumenti se více než dříve zajímají o to, co denně konzumují a z čeho jsou potraviny složeny. Syntetická aditiva, která bývají používána v potravinách, mohou mít negativní účinek na lidské zdraví, proto dávají konzumenti přednost nahrazování syntetických aditiv těmi přírodními, netoxickými.

Nejčastěji se využívají právě silice. Aromatické rostliny získávají své antimikrobiální vlastnosti díky přítomnosti alkaloidů, fenolů, glykosidů, silic (Škrinjar et al., 2009).

### 3.3.1 Složení silic

Silice jsou těkavé látky obsažené v přírodních rostlinných materiálech a skládají se z mnoha stovek dalších sloučenin. Bylo identifikováno až 500 látek, přičemž v jedné silici jich může být přítomno až 50 (Bacíková et al., 2012; Calo et al., 2015). Mezi tyto látky řadíme monoterpenové a seskviterpenové uhlovodíky, které tvoří největší podíl silic. Díky jejich vysokému obsahu mají omezenou trvanlivost, neboť rychleji oxidují (Velíšek, 2002; Germann, 2013). Dále jsou to kyslíkaté látky, které poskytují chuť a vůni silicím. Mezi kyslíkaté látky řadíme alkoholy, aldehydy, ketony, estery aj. (Velíšek, 2002).

Z uhlovodíků je to např. limonen, myrcen, ocimen; aldehydy - citral, vanilin; alkoholy - mentol, borneol, linalool, citronellol; ketony - piperiton, karvol, thujon; fenoly - eugenol, thymol, karvakrol; oxidy; estery (Calo et al., 2015; Bacíková et al., 2012; Velíšek, 2002).

Množství a kvalita těchto látek závisí na druhu aromatické rostliny nebo koření. Důležité je stanoviště rostliny, klimatické podmínky, roční období, složení půdy a závisí na části použité rostliny, ze které získáváme silice. Všechny tyto faktory ovlivňují složení silic v rostlině (Başer et al., 2010; Radaelli et al., 2015). Důležitým faktorem je i stáří rostliny. Čím je rostlina starší, tím silice mění vůni a hustotu. Změnám napomáhá i vlhkost, teplo, světlo a kyslík. Díky těmto faktorům dochází k autooxidaci, polymeraci a hydrolýze esterů. Nejrychleji podléhají změnám silice obsahující vysoký podíl terpenických uhlovodíků, protože snadněji oxidují (Bacíková et al., 2012).

### 3.3.2 Získávání silic

Silice získáváme z rostlin, a to z listů, květů, stonků, plodů, semen, oplodí, dřeva, cibulí, oddenků nebo kořenů (Velíšek, 2002; Başer et al., 2010).

Nejčastěji se provádí destilace vodní parou a oddělením vrstvy silice z destilátu. Metoda destilace vodní parou se používá pro sušený materiál, kde var nezpůsobí nežádoucí změny silic. Vodní pára se přehání přes zvlhčený materiál a tak těkavé látky přecházejí i s vodní parou do chladiče a v kondenzátu se oddělují od vodné fáze (Velíšek, 2002; Bacíková et al., 2012; Germann, 2013).

Extrakce nepolárními rozpouštědly (benzinem a petroletherem) se využívá při výrobě parfémů. Získáme tak silici, která obsahuje velké množství balastních látek a vosků. Proto je

potřeba tyto látky odstranit za tepla rozpuštěním v ethanolu a poté následným vymražením vosků. Dále se oddělí vosky filtrací a ethanol se odpaří. Získáme tak absolutní silici. Jedná se o nákladnou extrakci, která se používá jen když je nutno získat vonné látky v nezměněném stavu nebo z materiálu, který obsahuje malé množství silice (Velíšek, 2002; Bacíková et al., 2012; Aleksic et al., 2013).

Lisováním za studena získáme silice, které nejsou čisté, ale obsahují mnoho jiných látek a vodu. Využívá se u rostlin, na jejichž povrchu jsou siličné buňky a kanálky a u takových rostlin, u kterých by při použití destilace mohlo dojít k rozkladu silic. Tato metoda se nejvíce využívá u citrusových plodů (Velíšek, 2002; Germann, 2013; Bacíková et al., 2012).

Velmi starou metodou je tzv. enfleuráž. Jedná se o metodu, která se používala dříve a dnes se téměř nevyužívá. Je založena na extrakci silic z tuků. Květy se kladou na desku, která je potažená tenkou vrstvou tuku nebo oleje. Pak se takto uložené květy skladují přes 24 hodin v chladném místě. Silice přejdou do tenké vrstvy tuku a pak se uvolní pomocí alkoholu. Tato metoda je vhodná pro získání výjimečných vůní, protože je k silicím velmi šetrná (Germann, 2013, Bacíková et al., 2012).

### 3.3.3 Účinky silic

Silice působí u člověka na čichové a chuťové smyslové receptory. Díky své silné vůni a chuti se využívají jako aromatické látky v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Tyto látky vykazují i antimikrobiální účinky, a proto se často využívají i v tradiční medicíně a jsou předmětem mnoha studií (Bacíková et al., 2012; Aumeeruddy-elalfi et al., 2016). Silice propůjčují rostlinám protizánětlivé, močopudné, antioxidační, antibakteriální účinky, proto se rostliny často využívají pro nálevy, čaje a nebo obklady z těchto rostlin. Na druhou stranu mohou tyto látky dráždit pokožku, sliznice nebo mohou obsahovat jedovaté látky jako thujon, který je obsažený v šalvěji (Bacíková et alv., 2012; Lemos et al., 2016). V současnosti se zvyšuje zájem o přírodní antioxidanty, zejména fenoly, které mohou zabránit předpokládaným nepříznivým účinkům volných radikálů v lidském těle, ale mohou také způsobovat kažení tuků a dalších složek potravin (Zaouali et al., 2010).

V přírodě jsou silice součástí mechanismů ochrany rostliny, působí antimikrobiálně, antifugálně, jako pesticid, insekticid a také jsou součástí ochranných faktorů proti některým

býložravcům. Na druhou stranu mohou silice v rostlině přitahovat některý hmyz za účelem rozšíření pylu a semen (Laborda et al., 2013; Siewertová, 2015).

### 3.3.4 Antimikrobiální účinky silic

Aromatické rostliny se používají v tradiční medicíně a díky jejich přírodním antimikrobiálním složkám přitahují stále více pozornosti. Mnoho studií se zabývá jejich účinkem na různé druhy mikroorganismů a na jejich využití v medicíně pro léčbu různých onemocnění (Aumeeruddy-elalfi et al., 2016).

Antimikrobiální efekt silic byl prokázán v mnoha studiích proti velké škále mikroorganismů, avšak mechanismus tohoto účinku nebyl zcela popsán (Calo et al., 2015). Několik těchto mechanizmů nabízelo vysvětlení v obsažených chemických sloučeninách a jejich účincích. Silice se skládají z mnoha látek a nezle potvrdit antimikrobiální aktivitu všech chemických látek, jen díky jedné chemické látce, která tuto aktivitu vykazuje (Calo et al., 2015). Několik výzkumů potvrdilo, že antimikrobiální aktivitu způsobuje jejich proniknutí přes bakteriální membrány buňky a vykazují tak inhibiční aktivitu na funkčních vlastnostech buňky (Calo et al., 2015). Fenolové složky silic působí antimikrobiálně a to proti bakteriím způsobujícím alimentární onemocnění. Tyto složky narušují membránu buňky a způsobují propouštění látek z buňky, což vede ke ztrátě jejích intracelulárních komponentů (Kirsh et al., 2011).

Bassanetti et al. (2016) taktéž prokázal, že silice, které vykazují největší antimikrobiální účinky, obsahují velký podíl fenolových sloučenin thymolu a karvakrolu, které zvyšují permeabilitu buněčné membrány. Mikroorganismy, které byly použity jsou *Clostridium perfrigens, Salmonella thyphimurium, Salmonella enteritidis* a *Escherichia coli*.

Dle studie Škrinjara ae al. (2009), kde předmětem studie byla právě antimikrobiální aktivita silic, prokázali, že z 27 zkoumaných silic vykazovalo 13 z nich aktivitu proti nejméně jednomu kmenu bakterií. Největší účinek měla silice z křenu selského neboli *Armoracia rusticana*, ten účinkoval, jak proti grampozitivním, tak i proti gramnegativním bateriím a to v minimální inhibiční koncentraci (MIC) 0,0083 μl/cm$^3$. MIC byla vyjádřena jako mikrolitry silice na jednotku objemu atmosféry nad organismem rostoucím na agarové živné půdě.

Benbelaïd et al. (2014) testoval ve své studii působení silic proti bakteriím druhu *Enterococcus faecalis*. Tyto bakterie způsobují mnoho onemocnění a jsou rezistentní vůči

široké škále antibiotik. Použity byly aromatické rostliny z čeledi *Laminaceae (Lavandula dentata L., Mentha piperita L., Rosmarinus eriocalyx*, aj.), *Asteraceae* (*Artemisia arborescens*) a *Apiaceae* (*Ammi visnaga*) z oblasti Alžírska. Silice pocházející z rostlin čeledi Lamiaceae a Apiaceae obsahovaly zejména thymol, karvakrol a linalool, které účinně působili proti těmto bakteriím.

Obecně jsou gramnegativní kmeny bakterií méně inhibovány než grampozitivní kmeny. Může to být díky jejich dvojité buněčné membráně, která zajišťuje jejich ochranu (Calo et al., 2015). Nicméně antimikrobiální aktivita silic není způsobena specifickou složkou, ale společným působením všech obsažených složek v silici (Radaelli et al., 2015). Avšak výsledky těchto studií, zabývajících se antimikrobiální aktivitou silic, se mohou lišit v závislosti na použité metodě a druhu testovaného mikroorganismu (Bacíková et al., 2012).

### 3.3.5 Výskyt silic a příklady rostlin

Všechny rostliny mají schopnost tvořit těkavé látky ve stopovém množství, avšak aromatické rostliny je vytváří ve větším množství. Silice jsou produkovány aromatickými rostlinami a to buď celou rostlinou nebo jejími částmi (Başer et al., 2010). Silice se tvoří v protoplazmě, hydrolýzou některých glykosidů nebo rozpadem buněčných blan. Každá čeleď rostlin má odlišný systém tvorby silic. U čeledi *Apiaceae* se tvoří siličné kanálky, *Lamiaceae* vytváří povrchové žlázy trichomy a *Piperaeceae* vytváří siličné buňky (Bacíková et al., 2012). Kvalita a kvantita silic se liší, jak u každé rostliny, tak u podmínek ve kterých rostlina roste (Calo et al., 2015). Silice se mohou vyskytovat v listech, kořenech, květech nebo mohou prostupovat všechna pletiva rostliny (Bacíková et al., 2012; Başer et al., 2010).

#### *3.3.5.1 Šalvěj - Salvia officinalis*

Šalvěj se řadí do čeledi *Lamiaceae* - hluchavkovité a má mnoho různých druhů rozšířených po celém světě. Je to největší rod v této čeledi, který zahrnuje až 900 druhů (Delamare et al., 2005). Tato rostlina se používala hojně v minulosti jako léčivá bylina a používá se dodnes (Laborda et al., 2013). Antimikrobiální aktivita šalvěje byla rozpoznána již v minulosti a byla přičítána obsahu právě silicím (Delamare et al., 2005).

Šalvěj je rostlina užívaná nejen ke kulinářským účelům, ale také jako léčivá a aromatická bylina v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Má mnoho příznivých účinků, působí protizánětlivě, antisepticky, uklidňuje a slouží k léčení nervových

onemocnění. Může být použita k léčení tuberkulózy, proti krvácení a menstruačním potížím (Farhat et al., 2015; Ghaedi et al., 2015). Šalvěj také vykazuje silné antioxidační účinky mezi aromatickými rostlinami a kořením. Tyto účinky způsobuje zejména obsah karnisicové kyseliny, karosolu a rozmarýnové kyseliny (Peter et al.).

Dle studie Farhat et al. (2015) šalvěj pěstovaná ve Španělsku obsahuje poměrně hodně jedovatého α-thujonu (42,3%), cineolu (10,3%), kamphoru, β-thujonu (6,6%) (Laborda et al., 2013; Delamare et al., 2005). Některé studie prokázaly, že nejvíce silic se v šalvěji nachází při květu, zatímco jiné studie prokazují vyšší obsah silic u rostlin ve vegetativní fázi. Obsah silic se tedy mění podle stádia růstu rostliny a velmi významné je, v jakém podnebí daná rostlina roste a jaké má podmínky k růstu (Farhat et al., 2015).

#### *3.3.5.2 Tymián - Thymus vulgaris*

Tato rostlina patří do čeledi *Lamiaceae*, má až 350 druhů a vyskytuje se zejména v středozemní oblasti (Pesavento et al., 2015). Tymián je rostlina, která roste v mnoha částech světa, ale původem je ze Středomoří (Wenzel, 2014). Je to rostlina hojně používaná v minulosti v tradiční medicíně. V dnešní době se využívá proti kašli, dále proti křečím, proti nadýmání a jako diuretikum (Al-asmari et al., 2016). Působí i antibioticky, antivirově a prokázány byly i antimykotické účinky, proto se hojně využívá při zánětech dýchacích cest, bronchitidě a dávivém kašli (Wenzel, 2014). Nejvýznamnější antibakteriální složky silic tymiánu jsou karvakrol a thymol. Jejich zastoupení se pohybuje v rozmezí 2 - 11 % u karvakrolu a u 10 - 64 % u thymolu (Pesavento et al., 2015). Tyto látky mohou i v malém množství mít účinek proti bakterii *Staphylococcus aureus*. Antimikrobiální účinek tymiánu je o to větší právě díky společnému působení thymolu a karvakrolu. Jejich obsah se mění v závislosti na stanovišti rostliny a na tom z jaké oblasti pochází (Lemos et al., 2016).

#### *3.3.5.3 Levandule - Lavandula angustifolia*

Přirozené místo výskytu je pro levanduli oblast od jižního středozemní po tropickou Afriku a až po jihovýchodní oblasti Indie. Levandule se řadí do čeledi *Lamiaceae* a její rod zahrnuje jak letničky, byliny, tak i malé keře (Hanamanthagouda et al., 2009). Levandulová silice je velmi používaná v kosmetickém průmyslu a v medicíně. Stále je předmětem mnoha studií a výzkumů, které prokazují účinnost těchto silic. Je prokázáno, že levandulové silice uklidňují, působí jako antioxidant, lokální anestetikum a mají mikrobiální a protizánětlivé účinky. Levandule se používá při aromaterapiích a masážích (Panahi et al., 2012;

Hanamanthagouda et al., 2009). Obsahuje linalool, je to jedena z aktivních složek silic, které jsou alespoň z části zodpovědné za antimikrobiální a antimykotické účinky. Každý druh levandule se liší svým obsahem silic, Hanamanthgouda et al. (2009) testovali silice v druhu *Lavandula bipinnata* pocházející z Indie. Silice v tomto druhu byly tvořeny terpeny (34,44 %) a alkoholy (28,03 %). Z toho terpeny tvořily kafr (7,09 %), pulegon (8,45 %) a alkoholy byly zastoupeny mentholem (5,89 %) a transkarveolem (18,93 %). Tento druh levandule se velmi lišil svým složením silic od jiných druhů levandule (Hanamanthagouda et al., 2009).

#### *3.3.5.4* Rozmarýn -*Rosmarinus officinalis*

Rozmarýn roste ve středomořské oblasti, jedná se o keř, který se po staletí používal jako ochucovadlo do jídel, ale byl také významnou součástí tradiční medicíny (Vilela et al., 2016). Mnoho druhů rozmarýnu disponuje takovým složením silic, které vykazují vysokou antimikrobiální a antioxidační aktivitu. Působí i protizánětlivě a díky svému silnému aroma se využívá v kosmetickém průmyslu a při aromaterapii (Zaouali et al., 2010; Laborda et al., 2013). Rozmarýn má účinky na nervový systém díky sloučeninám karnosolu, karnosicové kyseliny, rosmadialu, rosmanolu a rosmadiferolu. Karnosicová kyselina má i protirakovinné účinky (Vilela et al., 2016). Dle studie Laborda et al. (2013) při stanovení složek silic u rozmarýnu pěstovaného ve Španělsku byly hlavní složky 1,8 cineol (26,7 %), kafr (17,4 %), bornyl acetate (4,0 %) a z uhlovodíkových terpenů to byly α-pinen (18,6 %), camphene (11,8 %) a myrcen (9,0 %). Za to studie Zaouali et al. (2010) probíhající v Tunisku, dokazuje, jak je důležité, kde daná rostlina roste. V této studii taktéž testovali složení silic u *Rosmarinus officinalis*, došli k jiným výsledkům. Identifikovali 25 složek, které představují až 97 % z celkového složení silic. 1,8-cineol byl zastoupen ve větší míře (40,0 %), kafr byl na podobně hodnotě (17,9 %), α-pinen (10,3%) a camphene (6,3 %) (Zaouali et al., 2010). Zde lze pozorovat, jak je důležité stanoviště rostliny a její podmínky pro růst (Vilela et al., 2016).

## 3.4 Obalové materiály v potravinářství

Obalové materiály a jejich použití se neustále mění a to v závislosti na požadavcích spotřebitele (Hui et al., 2006). Za posledních 200 let se obal potravin změnil a vyvinul z původní funkce pouhého uložení potravin, až po obal, kde je důležitý design a vzhled (Moskowitz et al., 2009; Coles et al., 2003).

Největší poptávka po balených potravinách byla za 2. světové války, tehdy se rozšířila oblast materiálů používaných pro balení potravin. Od 19. století máme díky postupnému rozvoji balící technologie, potravinové chemie a technologie k dispozici velkou škálu různých potravin, nápojů a také obalových materiálů, které lze použít k jejich uchování (Coles et al., 2003).

Dnešní obaly neposkytují pouze základní funkce, ale nabízejí usnadnění, pohodlí a komunikaci se spotřebitelem (Hui et al., 2006). Balení potravin je nezbytné, neboť bez obalu by u některých potravin byla porušena a zpochybněna kvalita a zdravotní nezávadnost (Robertson et al., 2010).

Balení potravin je proces zabalení potraviny vhodným obalem, takovýto obal poskytuje vhodné podmínky pro uchování potraviny od produkce až ke spotřebiteli. Obalový materiál může být tvořen jedním materiálem nebo jeho kombinacemi (Hui et al., 2006). Proces balení se skládá z více operací a většinou přímo navazují na výrobní proces, ale může probíhat i samostatně a to nezávisle na výrobním procesu (Ružbarský a kol., 2005). Ve výrobním procesu se balení považuje za poslední článek technologické operace (Kačeňák, 2001).

Kvalita potravinářských výrobků je závislá na kvalitním obalu, který uchovává vlastnosti výrobku (Kačeňák, 2001).

Těmi nejzákladnějšími funkcemi obalu jsou tři a to funkce ochranná, manipulační a komunikační (Ružbarský et al., 2005).

Potravina je velmi citlivá vůči vnějšímu prostředí a její vlastnosti se vlivem chemických, biochemických a mikrobiologických vlivů zhoršují. Tyto vlivy jsou urychleny např. kyslíkem, vodou, světlem a nebo teplotou. S vhodným obalem se může těmto změnám předcházet nebo je i zpomalit (Hui et al., 2006). Obaly tedy poskytují ochranu proti vnějším vlivům působícím na balený výrobek, dále vytváří jednotku vhodnou k přepravě, ke skladování a k manipulaci. Obal jako takový rozhoduje o prodeji výrobku a zejména

poskytuje spotřebiteli informace o daném výrobku (Kačeňák, 2001; Ružbarský et al., 2005; Robertson et al., 2010).

Spotřebitelským obalem je takový obal, který je v přímém kontaktu s potravinou, jako například plechovky, konzervy, kartonová krabice, skleněné lahve a plastové balíčky. Skupinovým obalem je obal pro několik spotřebitelských obalů (Robertson et al., 2010). Největší význam mají ty materiály, které se vyznačují voděodolností, nepropouštějí plyny (Ružbarský et al., 2005). Jednou z funkcí obalu je také zaujetí zákazníka svým vzhledem, grafickou úpravou a celkovou prezentací výrobku (Moskowitz et al., 2009). Při výrobě a designu balení je třeba pochopit, jak pracovat s plochou na obale, jak učinit obal jedinečný, atraktivní, funkční a zejména zapamatovatelný. Obal je nezbytnou součástí potraviny a obal jako takový prodává potravinu, kterou obsahuje (Moskowitz et al., 2009).

### 3.4.1 Obalové prostředky

Obal je tvořen obalovými prostředky, do kterých se zařazují vlastní obaly, obalové materiály a pomocné prostředky. Obaly dále dělíme na spotřebitelské, skupinové a přepravní (Štencl, 2013). Při balení potravin se používají různé obalové materiály, rozdělují se dle jejich funkce na základní a pomocné, dále na tuhé, polotuhé a měkké. Měkké obaly se využívají k přímému balení potravin, jedná se např. o papír, kovové či plastové fólie. Polotuhé obaly jsou např. kartóny, lepenky a některé fólie z plastů nebo kovů. Tyto polotuhé obaly nacházejí uplatnění zejména při výrobě misek a kelímků apod. Do tuhých obalů se řadí sklo, dřevo, kov a plast (Štencl, 2013; Kačeňák, 2001).

Nejvíce používané obalové materiály jsou papír, lepenka, tkaniny, dřevo, plasty, kovy, sklo a poživatelné látky (Ružbarský et al., 2005). Důležitou funkcí obalu je vytvořit bariéru, která chrání obsah obalu před vnějším prostředím, přičemž požadavek na ochranu bude záviset na vlastnostech výrobku. Aby se zvýšila trvanlivost výrobku a byly zajištěny vhodné podmínky v tomto prostředí mezi potravinou a obalem, je třeba, aby byl obal v těsné blízkosti s potravinou (Eskin et al., 2012). Obal musí chránit to, co prodává a prodat to, co chrání. Při vybírání vhodného obalového materiálu pro danou potravinu se zohledňují především vlastnosti potravin a vhodnost materiálu k dané potravině (Robertson et al., 2010).

#### *3.4.1.1 Dřevo*

Dřevo je jeden z nejstarších používaných materiálů. Je tvořeno zejména celulózou, ligninem, hemicelulózou, pryskyřicemi, škroby, třísloviny a dalšími látkami. Díky jeho dostupnosti a zpracovatelnosti bylo v minulosti hodně využíváno. Dnes se dřevo jako obalový materiál používá pro výrobu přepravních obalů, jako jsou bedny a sudy. Důležité je omezit jeho používání, neboť se projevuje nedostatek některých druhů dřeva. Výhoda dřeva je v jeho fyzikálních a chemických vlastnostech, dále odolává kyselinám, tlumí vibrace, má dobré tepelně-izolační vlastnosti.

Nevýhodou je nasákavost a náchylnost k mikrobiální kontaminaci. Různé druhy dřeva mají své charakteristické aroma, které se využívá např. u použití sudů při zrání alkoholických nápojů (Kačeňák, 2001; Štencl, 2013).

#### *3.4.1.2 Plasty*

Podíl plastů, jako obalových materiálů se celosvětově zvyšuje a stále roste, zejména v posledních letech (Hui et al., 2006). Plasty jsou molekuly zformované do řetězců díky procesu polymerace. Plasty lze v procesu výroby tvarovat za pomoci tlaku a teploty. Většina plastových obalů se řadí do skupiny termoplastů, které mohou být opakovaně měkčeny teplem a tvrzeny chlazením. Druhou skupinou jsou reaktoplasty (termosety). Ty se vyznačují svou pevností, jakmile jsou zahřány a tvarovány, nelze je opět zahřátím, ani tlakem vytvarovat (Hui et al., 2006; Štencl, 2013).

Polyethylenterefltalát (PET) je jeden z nejvíce využívaných polymerů, který byl jako první úspěšně recyklován. Jeho pole působnosti je široké a používá se buď jako obal u potravin, také však jako obal pro nepotravinové výrobky (Hui et al., 2006).

Nejvíce se používají polyetylen, polyvinylchlorid, polystyren a polypropylen, ať už jako povlaky, fólie nebo kontejnery (Eskin et al., 2012). Plasty jako obalové materiály mají mnoho výhod nad ostatními obalovými materiály a to zejména v jejich tvárnosti, plasticitě, lehkosti, pevnosti a poměrně nižší ceně.

Nejvíce limitujícím faktorem při použití u potravin je propustnost plynů, par a světla. U většiny plastových obalů dochází k difůzi molekul plynu a mohou tak vstupovat nebo se uvolňovat z uzavřeného obalu (Eskin et al., 2012; Kačeňák, 2001). V konečném důsledku je důležitá chemická odolnost, částečná propustnost pro plyny a možnost použití při vysokofrekvenčním dielektrickém ohřevu.

Negativem je vznik statické elektřiny, může docházet ke znečištění obalu. Největším nedostatkem je produkce plastového odpadu a jeho následná likvidace (Kačeňák, 2001). Plasty se také často kombinují s papírem a občas s hliníkovou fólií (Hui et al., 2006).

#### *3.4.1.3 Sklo*

Sklo se používá jako potravinářský obal, i když se jeho spotřeba postupně snižuje. Sklo má vysokou chemickou odolnost a velmi významná je možnost sterilizace těchto obalů. Dále se za pozitivum považuje vícenásobné použití obalů ze skla a jeho recyklace. Skleněné obaly nám dovolují díky své průhlednosti, spatřit balený obsah. Tyto obaly jsou účinnou bariérou pro vodní páry a plyny.

Kvalitu skla mohou ovlivňovat chyby při výrobě skleněných obalů a to bubliny, praskliny, kamínky aj. Důsledkem může být rozbití obalu při plnění na plničkách nebo při sterilaci. Sklo je těžký materiál v porovnání s ostatními obalovými materiály. Má nízkou pevnost v tahu a to cca 35 MPa, ale za to má vysokou pevnost v tlaku. Důležité je také, aby byly skleněné výrobky používané pro pasteraci dimenzovány na vnitřní přetlak a to na 1,2 MPa, ostatní výrobky musí mít minimální hodnotu přetlaku 0,8 MPa (Štencl, 2013).

Některým potravinám může přítomnost světla škodit, proto se v tomto případě může využít barevného skla, které tlumí světlo. Tyto obaly jsou určeny zejména pro tekuté, kašovité výrobky nebo výrobky v nálevu.

Sklo proto rozdělujeme na nápojové a konzervové sklo (Ružbarský et al., 2005; Eskin et al., 2012; Kačeňák, 2001). Objem nápojového skla neklesá pod 0,1 l a nepřesahuje 2,0 l. Nejrozšířenějším nápojovým sklem je Euro láhev na pivo. Konzervové sklo má větší objem a to 0,1 l až do 5,0 l a je nejčastěji ve tvaru válce (Štencl, 2013).

#### *3.4.1.4 Kovy*

Své místo mezi používanými obaly mají i kovy, zejména ve formě jemných plechových obalů, kovových tub, kontejnerů a fólií (Štencl, 2013; Ružbarský et al., 2005). Kovy mají široké pole využití, jsou pevné a vyznačují se nízkou toxicitou (Eskin et al., 2012). Z dostupných kovů se pro balení potravin používají zejména ocel a hliník, oba tyto kovy se také povrchově upravují cínem, zinkem nebo i chromem (Štencl, 2013). Kovové obaly vynikají nejvíce v jejich neprodyšnosti, tepelné vodivosti a pevnosti.

Nevýhodou je jejich omezené tvarování a náchylnost ke korozi vlivem baleného obsahu.

Mezi velmi agresivní látky se zařazuje např. chlorid sodný a kyselina octová (Štencl, 2013). Tyto obaly nelze použít při ohřevu potravin pomocí mikrovlnného záření a nelze je znovu použít, pouze je recyklovat.

Jako nejvýznamnější a nejdůležitější potravinářský obal považujme kovové konzervy a plechovky. Jelikož se plechovky a konzervy skládají z několika částí, je potřeba, aby bylo zajištěno dokonalé uzavření a zejména pevnost, jejich spoj. K tomu se využívá metody lepení a takovéto kovové plechovky a obaly musí odolat vnitřnímu přetlaku 0,3 MPa při skladování a až 0,6 MPa při pasteraci (Štencl, 2013; Kačeňák, 2001; Eskin et al., 2012).

#### *3.4.1.5 Papír*

Papír a lepenka se vyrábějí z přírodních, obnovitelných vláken ze dřeva nebo z rostlinných vláken. Díky své relativně nízké ceně, recyklovatelnosti, ekologičnosti, poddajnosti a možnosti vytvářet různé tvary, jsou vhodným obalovým materiálem (Hui et al., 2006). Papírové výrobky jsou jedny z nejpoužívanějších a v celosvětové spotřebě zaujímají cca 50 %.

Rozlišujeme je jako papír, lepenku nebo kartony, které se dále upravují, tak aby se více vylepšily jejich vlastnosti (Kačeňák, 2001). Papír a lepenka mohou být během výroby impregnovány, laminovány, raženy do potřebných tvarů, tak aby splnili svůj účel. Nejvíce se papírové obaly kombinují s hliníkovou fólií, s plastovými nebo s metalizovanými obalovými materiály (Hui et al., 2006).

Lepenka má dobré mechanické vlastnosti, je pevná a nejvíce se uplatňuje jako skládací krabice, kdy často bývá doplněna potažením nebo laminováním plasty. Avšak papírové výrobky mají i svá negativa, jedním z nich je vysoká propustnost pro vodu, vodní páry a plyny (Eskin et al., 2012). Dále také propouští oleje a tuky, pokud je papír navlhlý, tak se jeho mechanické vlastnosti snižují.

Proto se papírové obalové prostředky povrchově zušlechťují, laminují. Takto upravené plasty, jsou vhodné pro balení většího sortimentu potravinářských výrobků (Kačeňák, 2001). Díky laminaci se bariérový účinek zvýší, materiál je tak odolnější vůči vlhkosti, kyslíku, pachům, chutím a světlu (Hui et al., 2006).

Papírové výrobky dělíme v Evropské unii dle plošné hmotnosti a to na papír (150 $g.m^{-2}$), kartón (150 - 250 $g.m^{-2}$) a lepenku (nad 250 $g.m^{-2}$). Papírové výrobky lze impregnovat a

tím tak vylepšit jejich vlastnosti o odolnost vůči vodě, odolnost proti pronikání par a proti chemickým vlivům (Štencl, 2013).

#### *3.4.1.6 Poživatelé obaly*

Jedná se o obaly, které mohou být zkonzumovány spolu s potravinou nebo se odstraňují z potraviny, ačkoliv by po jejich požití neměli mít vliv na lidské zdraví. Tyto obaly jsou většinou v přímém styku s potravinou a nejčastěji jsou ve formě povlaků a fólií. Jejich výhodou je jejich nízká hmotnost a lepší ochranné účinky (Štencl, 2013).

Takovéto obaly jsou různorodé látky, jejichž základem bývají bílkoviny, sacharidy, lipidy a v některých případech i syntetické látky. Nejrozšířenější jsou obaly na bázi škrobu nebo amylózy, dále fólie na bázi kolagenu používané v masném průmyslu. Pektiny, algináty a cutisinová střívka. V rámci lipidů se jedná o vosky používané např. u ovoce. Jako poživatelný obal můžeme použít i vrstvu ledu pro mražené potraviny, kdy tak zabráníme jejich oxidaci a vysychání (Štencl, 2013; Kačeňák, 2001).

### 3.4.2 Bariérové účinky

Postupný vývoj obalů se zaměřuje na materiály s vhodným bariérovým účinkem, který může zlepšit kvalitu balené potraviny a prodloužit její trvanlivost.

Bariérový efekt může být definován mnoha způsoby, avšak záleží na požadované úrovni ochrany potraviny, tak aby byla zachována její zdravotní nezávadnost a kvalita. Tento systém byl navrhnut a vyvinut pro flexibilní i pevné plastové kontejnery. Plastové obaly jsou v poslední době používané nejčastěji a z hlediska bariérového efektu jsou koncipovány tak, aby řídili permeaci plynů a par přes obal. Tento systém byl navržen a vyvinut, jak pro plastické, tak pro pevné potravinové kontejnery.

Požadovaná úroveň bariérového efektu může být dosažena jedním nebo více materiály s bariérovým účinkem. Další možností je začlenění tohoto materiálu do jiných obalových materiálů a to například laminováním, potahováním nebo vytvořením vícevrstvé struktury (Hui et al., 2006).

Plastové obaly jako jsou např. PET, polypropylen, polyvinylchlorid, polyethylen s vysokou hustotou a polyethylen s nízkou hustotou jsou často využívány při balení potravin, avšak jejich bariérové účinky jsou nedostačující. Novější materiály jako polyvinylidenchlorid, kopolymer ethylenvinylalkoholu, polyamis jsou více žádoucí. Tyto

materiály jsou vysoce ceněné, a proto jsou užívány v malých množstvích, ale tak aby poskytly obalu jejich bariérové vlastnosti. Tento materiál může být začleněn do levnějších materiálů pomocí již zmiňované laminace nebo vícevrstvením (Hui et al., 2006).

# 4 MATERIÁL A METODIKA

Experimentální část této diplomové práce zaměřuje na testování antibakteriálního působení fólií s aplikací nátěru silic v různé koncentraci proti *Enterococcus faecalis*.

## 4.1 Materiál

Pro testování antibakteriálního působení silic byla použita bakteriální kultura *Enterococcus faecalis* CCM 4224. V rámci experimentu bylo zkoumáno antibakteriální působení silic ze skořice *(Cinnamomum ceylanicum*), tymiánu (*Thymus vulgaris*), hřebíčku (*Syzygium aromaticum*) a jejich vzájemné kombinace. Dále byly použity čisté obsahové látky eugenol, thymol, cinamaldehyd a jejich kombinace.

V Tab. 1 jsou uvedeny účinné látky, které byly použity k tomuto experimetu. Vzorky 6 - 27 byly silice z aromatických rostlin *Syzygium aromaticum, Thymus vulgaris a Cinnamomum ceylanicum* v různých koncentracích. Dalšími vzorky 30 - 37 byly čisté obsahové látky, které se v těchto uvedených aromatických rostlinách vyskytují.

Tab. č. 1 Použité silice a jejich koncentrace

| Označení vzorku | Množství extraktu v nátěru (%) | Použitá silice v nátěru |
|---|---|---|
| 6 | 4,3 % | hřebíček |
| 7 | 8,6 % | hřebíček |
| 12 | 4,3 % | tymián |
| 13 | 8,9 % | tymián |
| 14 | 4,3 % | skořice |
| 15 | 8,6 % | skořice |
| 20 | 4,2 % | hřebíček + skořice |
| 21 | 8,4 % | hřebíček + skořice |
| 24 | 4,2 % | hřebíček + skořice + tymián |
| 25 | 8,2 % | hřebíček + skořice + tymián |
| 26 | 7,0 % | hřebíček |
| 27 | 11,0 % | hřebíček |
| 30 | 0,21 % | thymol |
| 31 | 0,29 % | thymol |
| 32 | 0,24 % | eugenol |
| 33 | 0,29 % | eugenol |
| 34 | 0,24 % | cinamaldehyd |
| 35 | 0,32 % | cinamaldehyd |
| 36 | 0,21 % | thymol + eugenol + cinamaldehyd |
| 37 | 0,21% | thymol + eugenol + cinamaldehyd |

K tomuto experimentu byla použita speciální fólie s nátěrem výše uvedených silic, která byla vyrobena firmou SYNPO. Tato polymerní fólie je potažena lakem, který obsahuje porézní plnivo dispergované ve vodném roztoku nosného laku. Silice se nacházejí v mikropórech tohoto plniva a jsou obalené nosným lakem. Pomocí vlhkosti uvolňované z balených potravin poté dochází k uvolňování silic z laku. Tyto vzorky fólií byly upraveny

na velikost 2 x 2 cm, a abychom zabránili kontaminaci, byly fólie před použitím ozářeny UV zářením po dobu cca 40 minut.

## 4.2 Metodika

### 4.2.1 Použitá média

Pro pomnožení kultury bakterie *Entorococcus faecalis* byl použit tryptózo-sójový bujón - TBS (Biokar Diagnostic,Francie).

Složení:

- Trypton 17,0 g
- Produkt štěpení sojové moučky papainem 3,0 g
- Glukóza 2,5 g
- Hydrogenfosforečnan draselný 2,5 g
- Chlorid sodný 5,0 g

Postup přípravy média:

V 1 l destilované nebo demineralizované vody rozpustíme 30 g této živné půdy. Směs mícháme do úplného rozpuštění. Dávkujeme do zkumavek nebo vialek a sterilizujeme v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Pro růst enterokoků byl použit Slanetz-Bartley agar (Biokar Diagnostic, Francie). Tato živná půda je selektivní pro kultivaci bakterií rodu *Enterococcus*. Obsahuje azid sodný, který inhibuje růst grampozitivních bakterií.

Složení:

- Tryptóza 20 g
- Kvasničný extrakt 5 g
- Glukóza 2 g
- Hydrogenfosforečnan draselný 4 g
- Azid sodný 0,4 g
- 2,3,5 trifenyltetrazolium chlorid 0,1g
- Bakteriologický agar 10 g

Příprava média:

V 1 litru destilované vody rozpustíme 41,5 g tohoto dehydrovaného média. Za stálého míchání přivedeme k varu, mícháme, dokud se médium zcela nerozpustí. Je nutné se vyhnout přebytečnému ohřívání média. Výsledná živná půda se nesterilizuje v autoklávu, pouze se nechá vychladnout na cca 44 - 47 °C.

Pro růst a sledování celkového počtu mikroorganismů (CPM) bylo použito živné médium PCA (Biokar Diagnostic, Francie) se složením:

- Trypton 5,0 g
- Kvasničný extrakt 2,5 g
- Glukóza 1,0 g
- Bakteriologický agar 12,0 g

Postup přípravy média:

V 1000 ml destilované nebo demineralizované vody rozpustíme 20,5 g tohoto média. Směs přivedeme k varu a za stálého míchání necháme rozpustit. Sterilizujeme při 121 °C v autoklávu po dobu 15 minut.

### 4.2.2 Vlastní experiment

#### *4.2.2.1 Experiment č. 1 - Testování fólií se suchým nátěrem obsahujícím silice*

***Příprava mikrobiálního inokula***

Kultura *Enterococcus faecalis* byla pěstována 24 hodin v TBS bujónu při teplotě 37 °C. Dále ji bylo nutné centrifugovat po dobu 20 minut při 2000 rpm. Kultura byla promyta fyziologickým roztokem a znovu zcentrifugována. Poté byl připraven roztok o denzitě 1 McF, který se dále ředil na denzitu $10^{-3}$ McF. Takto připravený roztok byl připraven k aplikaci.

***Postup***

Po přípravě živné půdy a jejího ztuhnutí na Petriho miskách, bylo na jejich povrch aplikováno 0,1 ml dané mikrobiální kultury o denzitě 1 a $10^{-3}$ McF a rozetřeno po povrchu. Poté byly vzorky testovaných fólií upraveny na velikost 2 x 2 cm a připevněny pomocí oboustranné lepící pásky na vnitřní stranu víček jednorázových Petriho misek, tak aby nedošly do přímého styku s živnou půdou a inokulovanou bakterií. Poté byly Petriho misky po svém obvodu oblepeny parafilmem a inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 48 h. U druhé skupiny Petriho misek byly vzorky fólie umístěny přímo na živnou půdu, která již byla naočkována danou bakterií. Vzorky fólií byly umístěny do středu Petriho misky a uzavřeny. Stejně tak jako v předchozím případě byly misky kultivovány 48 hodin při 37 °C.

***Analýza vzorků***

Po uplynutí 48 hodin, byly misky podrobeny kontrole a došlo ke změření vytvořených inhibičních zón a k porovnání intenzity růstu bakterií u jednotlivých vzorků fólií. Pro porovnání získaných výsledků byla intenzita růstu bakterií značena znakem:

\+ silný účinek látky

\++ slabý účinek látky

\+++ neúčinná látka

Kontrolní Petriho misce byla přidělena hodnota +++.

#### *4.2.2.2 Experiment č. 2 - Testování fólií s antimikrobiálním účinkem silic u masného výrobku*

Na základě výsledků námi prováděných i dalších experimentů byl vyroben prototyp obalového materiálu s naneseným lakem a antimikrobiálním a antioxidačním účinkem. Tento obalový materiál byl použit pro následující experiment.

***Postup***

Vzorky masného výrobku byly uloženy po čtyřech kusech do čistých polystyrenových misek a byly uzavřeny pomocí tavné pistole příslušnou fólií. Jednu část tvořily misky uzavřené fólií bez aktivní látky, které sloužili jako kontrola. Druhá část misek byla uzavřena prototypem fólií s nástřikem aktivní látky. Takto uzavřené vzorky byly skladovány při teplotě 4 - 6 °C. Vždy ve dnech 0, 2, 5, 7, 9, 15 od uzavření misek byly odebrány vzorky ze středu a z kraje párků pro stanovení celkového počtu mikroorganismů a stanovení *Enterococcus faecalis*.

Jako doplňující měření byly 3 kusy debrecínských párků samostatně zabaleny do prototypu účinné fólie a skladovány při 4 - 6 °C. Stanovení CPM a *E. faecalis* probíhalo 5., 9. a 15. den skladování.

***Analýza vzorků***

Z každé misky zabalené prototypem fólie i z kontroly, byly odebrány vždy ze 3 debrecínských párků vzorky z okraje a ze středu párku. U párků samostatně zabalených v prototypu fólie s antibakteriálním účinkem byly také odebrány vzorky z okraje a středu párků. Stejným způsobem se odebíraly vzorky i z párku pocházejícího z originálního balení. Jednotlivě odebrané vzorky bylo potřeba zhomogenizovat po dobu 3 minut v homogenizátoru typu STOMACHER spolu s 90 ml fyziologického roztoku.

Po upravení tuhých vzorků bylo potřeba připravit desetinné ředění, z každého ředění byl odebrán 1 ml a napipetován do Petriho misek. Takto připravené misky byly ihned zality příslušnou živnou půdou. CPM byly kultivovány na PCA při 30 °C po dobu 72 hodin a enterokoky na živné půdě Slanetz-Bartley při teplotě 37 °C po dobu 72 hodin. Po kultivaci byly na Petriho miskách sečteny kolonie a vyjádřeny jako KTJ/g.

***Označení vzorků***

- Prototyp antimikrobiální fólie okraj párku: O a
- Prototyp antimikrobiální fólie střed párku: S a
- Kontrola okraj párku: O k
- Kontrola střed párku: S k

# 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

## 5.1 Experiment č. 1 - Testování fólií se suchým nátěrem obsahujícím silice

Po uplynutí doby kultivace nedošlo u většiny vzorků k vytvoření zřetelných inhibičních zón na živné půdě. U jednotlivých vzorků byla porovnávána intenzita celkového růstu bakterií proti kontrolní Pertiho misce a jiné vybarvení kolonií u některých vzorků. Vzorky byly rozděleny do 4 skupin, dle množství použitého inokula a dle umístění fólie s nátěrem silic.

V tabulce 2a je zahrnuta první skupina vzorků kultivovaná po dobu 48 hodin při 37 °C, pro kterou bylo použito 0,1 ml inokula o denzitě 1 McF. V těchto Petriho miskách byly umístěny vzorky fólií na živné půdě v přímém kontaktu s mikrobem. Po kultivaci byly porovnány vzorky Petriho misek s kontrolou. Jelikož nešlo přesně rozeznat inhibiční zóny na živné půdě, bylo hodnocení omezeno na posouzení růstu kolonií na celkové ploše Petriho misky. V tabulce 2a jsou uvedeny výsledky testovaných vzorků fólií a velikost vytvořených inhibičních zón v milimetrech. V tabulce můžeme vidět, že u vzorků fólií 6 - 25 nedošlo k vytvoření zřetelných inhibičních zón. U těchto vzorků jsme pozorovali intenzitu nárůstu kolonií popsanou v tabulce 6 na straně 49. U vzorků fólií se silicí hřebíčku č. 26, 27 a vzorků čistých obsahových látek 30 až 36 došlo k vytvoření zřetelných inhibičních zón, které bylo možné změřit. Inhibiční zóny se u těchto vzorků pohybovaly od 20 mm do 25 mm. Největší rozdíl byl mezi vzorky 30 - thymol o koncentraci 0,21 % a 31 - thymol 0,29 %. Největší inhibiční zónu vytvářel vzorek 31, vytvořená inhibiční zóna měla průměr 25 mm, zatímco u vzorku 30 měla průměr 21 mm. Výsledné hodnoty použité silice hřebíčku ve vzorcích 26 a 27, kde koncentrace vzorku 27 byla o 4 % vyšší, se také lišily. Ačkoliv u vzorku 27 byla použita vyšší koncentrace silice, výsledná inhibiční zóna byla menší. Nejmenší naměřená inhibiční zóna byla zaznamenána u vzorku hřebíčku 27 a u vzorku eugenolu 32, kdy tyto zóny dosahovaly velikosti 20 mm.

Silva et al. (2016) testovali použití a účinnost silic z více aromatických rostlin (česnek, citron, kmín, zázvor, skořice, koriandr, majoránka, aj.) proti skupině mikroorganismů, mezi které byl zařazen i *E. faecalis*. Testování probíhalo diskovou metodou (6 mm) na Brain heart infusion agaru. Největší inhibiční zóny (>20 mm) dosahovaly silice skořice a citronu

proti všem testovaným bakteriím. *E. faecalis* se spolu s *E. coli* a *S. enterica* se řadili do skupiny na které působily tyto silice méně (18.0 mm; 17,67 mm; 18, 00 mm).

Tab. č. 2a Rozměry inhibičních zón vytvořených vzorky testovaných fólií v přímém kontaktu s inokulovaným mikroorganismem (kultivace: 48 hodin, 37 °C; inokulum: 0,1 ml 1 McF)

| Označení vzorku | a | b | c | Průměr inhibiční zóny v mm |
|---|---|---|---|---|
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 26 | 22 | 22 | - | 22 |
| 27 | 20 | 20 | - | 20 |
| 30 | 20 | 22 | - | 21 |
| 31 | 25 | 25 | - | 25 |
| 32 | 20 | 20 | - | 20 |
| 33 | 25 | 20 | - | 22,5 |
| 34 | 22 | 22 | - | 22 |
| 35 | 22 | 21 | - | 21,5 |
| 36 | 23 | 22 | - | 22,5 |
| 37 | 23 | 22 | - | 21 |

Vysvětlivky: a, b, c ... opakování měření - ... měření neproběhlo

Druhá skupina těchto vzorků se lišila od skupiny první v umístění fólie s nátěrem silic, která v tomto případě byla umístěna na spodní straně víčka Pertiho misky pomocí lepící pásky. Fólie nebyla v kontaktu s živnou půdou a mikrobem. Doba kultivace byla 48 hodin a denzita inokula byla 1 McF. V tabulce 2b jsou uvedeny zjištěné výsledky. V tomto případě nebyly inhibiční zóny rozeznatelné, a proto je nešlo změřit. Na miskách jsme proto

pozorovali a porovnávali intenzitu růstu bakterií *Enterococcus faecalis* oproti kontrole. Všechny výsledky hodnocení intenzity růstu kolonií jsou shrnuty v Tab. 4 na straně 49.

Tab. č. 2b Rozměry inhibičních zón vytvořených vzorky testovaných fólií bez kontaktu s inokulovaným mikroorganismem (kultivace: 48 hodin, 37 °C; inokulum: 0,1 ml 1 McF)

| Označení vzorku | a | b | c | Průměr inhibiční zóny v mm |
|---|---|---|---|---|
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 26 | 0 | 0 | - | 0 |
| 27 | 0 | 0 | - | 0 |
| 30 | 0 | 0 | - | 0 |
| 31 | 0 | 0 | - | 0 |
| 32 | 0 | 0 | - | 0 |
| 33 | 0 | 0 | - | 0 |
| 34 | 0 | 0 | - | 0 |
| 35 | 0 | 0 | - | 0 |
| 36 | 0 | 0 | - | 0 |
| 37 | 0 | 0 | - | 0 |

Vysvětlivky viz Tab. 2a

Pro další testování vzorků, jež výsledky jsou shrnuty v Tab. 3a, byla použita nižší denzita inokula a to $10^{-3}$ McF. Testovaná fólie byla umístěna na živné půdě Petriho misky, byla tedy opět v kontaktu s inokulovaným mikroorganismem. Pro inhibiční zóny u vzorků fólií 6 - 25 nebyly zřetelné, pouze intenzita růstu bakterií se lišila oproti kontrole. U vzorků 26 - 37 byly inhibiční zóny měřitelné a naměřené hodnoty se pohybovaly v rozmezí 11,75 mm - 30 mm. Největší inhibiční zónu 30 mm vykazoval vzorek fólie 26 se silicí hřebíčku v koncentraci 7 % a kombinace čistých obsahových látek eugenolu, thymolu a cinamaldehydu s číslem 36. V obou případech se jednalo o vzorky, které měly v dané dvojici nižší

koncentraci. Velký rozdíl v rozměrech inhibičních zón, mezi dvojicí vzorků fólií lišící se v použité koncentraci, byl také zjištěn u vzorků s cinamaldehydem 34 (11,75 mm) a 35 (23,75 mm). U vzorku 34 b nedošlo k vytvoření měřitelné inhibiční zóny, proto je tento rozdíl tak velký.

Pecarski et al. (2016) testovali těkavé látky rostlinných silic z čeledi *Lamiaceae,* zejména tymiánu a oregana. Použitím jamkové difúzní metody, byla měřena inhibiční zóna od vytvořených jamek (průměr 6 mm) naplněných 20 μg měřené silice. *E. faecalis* vykazoval nejmenší inhibiční zónu (0,8 mm) oproti *S. aureus, E. coli* a *C, albicans*. Ve srovnání se silicí oregána zjistili, že tymiánová silice je účinnější díky vyššímu obsahu karvakrolu a díky synergickým vztahům mezi určitými složkami v silici.

Tab. č. 3a Rozměry inhibičních zón vytvořených vzorky testovaných fólií v přímém kontaktu s inokulovaným mikroorganismem (kultivace: 48 hodin, 37 °C; inokulum: 0,1 ml $10^{-3}$ McF)

| Označení vzorku | a | b | c | Průměr inhibiční zóny v mm |
|---|---|---|---|---|
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 26 | 30 | 30 | - | 30 |
| 27 | 20 | 24 | - | 22 |
| 30 | 25 | 30 | - | 27,5 |
| 31 | 26 | 25 | - | 25,5 |
| 32 | 25 | 30 | - | 27,5 |
| 33 | 25 | 27 | - | 26 |
| 34 | 23,5 | 0 | - | 11,75 |
| 35 | 24 | 23,5 | - | 23,75 |
| 36 | 30 | 30 | - | 30 |
| 37 | 28 | 25 | - | 26,5 |

Vysvětlivky viz Tab. 2a

V Tab. 3b jsou uvedeny výsledky testování vzorků fólií při použití 0,1 ml bakteriálního inokula o denzitě $10^{-3}$ McF při kultivaci 48 hodin. V tomto případě byla fólie s účinnou látkou umístěna na víčku Pertiho misky, tudíž nebyla v kontaktu s živnou půdou a s bakteriemi. Tak jako v tab. 2b, i v tomto případě nedošlo k vytvoření zřetelných inhibičních zón na Pertiho miskách. Proto jsme u této skupiny získali pouze srovnání intenzity růstu bakterií na Petriho miskách oproti kontrole.

Tab. č. 3b Rozměry inhibičních zón vytvořených vzorky testovaných fólií bez kontaktu s inokulovaným mikroorganismem (kultivace: 48 hodin, 37 °C; inokulum: 0,1 ml $10^{-3}$ McF)

| Označení vzorku | a | b | c | Průměr inhibiční zóny v mm |
|---|---|---|---|---|
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 26 | 0 | 0 | - | 0 |
| 27 | 0 | 0 | - | 0 |
| 30 | 0 | 0 | - | 0 |
| 31 | 0 | 0 | - | 0 |
| 32 | 0 | 0 | - | 0 |
| 33 | 0 | 0 | - | 0 |
| 34 | 0 | 0 | - | 0 |
| 35 | 0 | 0 | - | 0 |
| 36 | 0 | 0 | - | 0 |
| 37 | 0 | 0 | - | 0 |

Vysvětlivky viz Tab. 2a

V Tab. 4 jsou shrnuty výsledky porovnávání intenzity růstu bakterií *Enterococcus faecalis* proti kontrolní Pertiho misce. Kontrole byla přidělena hodnota +++. V tomto shrnutí můžeme pozorovat všechny vzorky fólií při dané použité denzitě a jejich pozici v Petriho miskách.

V případě porovnání výsledků u celkové intenzity růstu bakterie *Enterococcus faecalis* na Petriho misce a celkového působení silic, došlo k pozitivnímu omezení růstu této bakterie u některých vzorků. Za vzorky, jež pozitivně inhibičně účinkovaly na intenzitu růstu, považujeme vzorky fólií 6, 7, 12 a 13, které byly v přímém kontaktu s živnou půdou a bakterií. V porovnání s kontrolní Petriho miskou vykazovaly největší účinek silic a rozdíl v intenzitě růstu kolonií. U vzorků fólie bez kontaktu s bakterií měly největší účinek, v porovnání s kontrolou vzorky 6, 7. Tyto výsledky však nejsou způsobeny pouze použitými silicemi nebo čistými účinnými látkami, ale svůj podíl na výsledcích mají také použité koncentrace bakterií. Použitím nižší koncentrace bakteriálního inokula mohlo dojít k lepšímu působení antibakteriálního účinku silic na foliích na tyto bakterie. Dle výsledků z Tab. 4 se jako vhodné k dalšímu testování jeví fólie s nátěrem silic tymiánu, skořice a hřebíčku. Z čistých obsahových látek se jako nejúčinnější jeví fólie s nátěrem eugenolu, thymolu, cinamaldehydu a jejich směsi thymol/eugenol/cinamaldehyd.

Pesavento et al. (2015) prováděli studii na podobném principu, kde testovali účinek silic tymiánu, oregana a rozmarýnu proti bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes*. V této studii prokázali antibakteriální účinnost silice tymiánu, kterou tvořili monoterpenové uhlovodíky 53,7 % (p-cymen 47,9 %) a kyslíkaté monotrpeny zastoupeny v 45,6 % (thymol 43,1 %). Silice tymiánu byla dle výsledků nejvíce efektivní a vykazovala největší inhibiční zóny (>20 mm) ze všech testovaných silic.

Tab. č. 4 Porovnání všech výsledných hodnot intenzity inhibičního účinku na růst *E. faecalis*

| Č. vz. | Extrakt / čistá silice | Umístění fólie a použitá denzita inokula v McF | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Bez kontaktu | | S kontaktem | |
| | | 1 McF | $10^{-3}$ McF | 1 McF | $10^{-3}$ McF |
| 6 | 4,3 % hřebíček | + | + | + | + |
| 7 | 8,6 % hřebíček | + | + | + | + |
| 12 | 4,3 % tymián | + | ++ | + | + |
| 13 | 8,9 % tymián | + | ++ | + | + |
| 14 | 4,3 % skořice | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 15 | 8,6 % skořice | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 20 | 4,2 % hřebíček + skořice | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 21 | 8,4 % hřebíček + skořice | +++ | ++ | +++ | ++ |
| 24 | 4,2 % hřebíček + skořice + tymián | ++++ | ++++ | ++++ | +++ |
| 25 | 8,2 % hřebíček + skořice + tymián | ++ | +++ | ++ | ++ |
| 26 | 7,0 % hřebíček | +++ | +++ | +++ | ++ |
| 27 | 11,0 % hřebíček | ++ | ++ | +++ | +++ |
| 30 | 0,21 % thymol | ++ | +++ | +++ | ++ |
| 31 | 0,29 % thymol | +++ | ++ | ++ | +++ |
| 32 | 0,24 % eugenol | ++ | ++ | +++ | +++ |
| 33 | 0,29 % eugenol | ++ | ++ | ++ | +++ |
| 34 | 0,24 % cinamaldehyd | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 35 | 0,32 % cinamaldehyd | +++ | ++ | +++ | +++ |
| 36 | 0,21 % thymol + eugenol + cinamaldehyd | ++ | ++ | +++ | ++ |
| 37 | 0,21 % thymol + eugenol + cinamaldehyd | ++ | ++ | +++ | ++ |
| | kontrola | +++ | +++ | +++ | +++ |

Vysvětlivky: + ... silný účinek látky

++ ... slabý účinek látky

+++ ... neúčinná látka

## 5.2 Experiment č. 2- Testování fólií s antimikrobiálním účinkem silic u masného výrobku

V tomto experimentu byl testován prototyp obalového materiálu s antimikrobiálním a antioxidačním účinkem vyrobený na základě předchozího testování. Fólie byla použita na zabalení masného výrobku (debrecínské párky) umístěného v polystyrenové misce. Párky nepřišly do přímého kontaktu s prototypem fólie. V rámci tohoto experimentu ale byla připravena také varianta, kdy byly párky zabaleny pouze do prototypu folie a byly tedy v přímém kontaktu s obalem. Z debrecínských párků byl vždy odebrán vzorek z okraje a středu párku. Ve vzorcích byl stanovován celkový počet mikroorganismů (CPM) a *Enterococcus faecalis*. V Tab. 5 jsou shrnuty výsledky mikrobiologické analýzy v době založení experimentu (den 0). Tyto výsledky nám poskytují pohled na počáteční zastoupení CPM ve vzorcích párků. CPM se pohybovaly od $1{,}1.10^3$ do $3{,}1.10^3$. Přítomnost *Enterococcus faecalis* v době založení pokusu nebyla detekována.

Počet a množství mikroorganismů nalezených na mase se odvíjí jak od prostředí ve, kterém byly zvířata chovány a poráženy, tak od balení a uchovávání masa. V dnešní době není možné vyprodukovat čisté sterilní maso, které by neobsahovalo žádné mikroorganismy. Ke snížení počtu mikroorganismů v syrovém mase napomáhá správný chov, ale především sanitace provozu a dodržování hygienických požadavků během jeho zpracování. (Hui et al., 2001)

Tab. č. 5 Počty mikroorganismů ve vzorcích debrecínských párků v době při založení pokusu (0. den) v KTJ/g

| 0. den | | | |
|---|---|---|---|
| Pořadí vzorků | identifikace | CPM | *E. faecalis* |
| 1 | 1 Okraj | $1{,}2.10^3$ | 0 |
| 2 | 1 Střed | $1{,}4.10^3$ | 0 |
| 3 | 2 Okraj | $2{,}2.10^3$ | 0 |
| 4 | 2 Střed | $3{,}2.10^3$ | 0 |
| 5 | 3 Okraj | $2{,}4.10^3$ | 0 |
| 6 | 3 Střed | $2{,}9.10^3$ | 0 |

Vysvětlivky: CPM ... celkový počet mikroorganismů

V Tab. 6 je uvedeno celkové průměrné zastoupení mikroorganismů v každé stanovované části párků a průměrné zastoupení CPM. V den zakládání experimentu byly vyšší CPM zjištěny ve střední části párků.

Tab. č. 6 Průměrný počet mikroorganismů (CPM) ve všech vzorcích při založení pokusu (0. den) v KTJ/g

| | Okraj | Střed | Průměr |
|---|---|---|---|
| Celkový průměr | $1{,}9.10^3$ | $2{,}5.10^3$ | $2{,}2.10^3$ |
| SD | $5{,}4.10^2$ | $7{,}6.10^2$ | $7{,}2.10^2$ |

Vysvětlivky: SD ... Směrodatná odchylka

V Tab. 7, druhý den od založení pokusu, nebyl u kontrolních vzorků zaznamenám větší nárůst CPM. U misek s prototypem fólie došlo v některých případech k mírnému nárůstu CPM, který mohl být způsoben kontaminací vzorku při balení párků do misek. *Enterococcus faecalis* nebyl zaznamenán.

Tab. č. 7 Počty mikroorganismů ve vzorcích debrecínských párků 2. den od založení experimentu v KTJ/g

| 2. den | | | |
|---|---|---|---|
| Pořadí měření vzorků | Identifikace | CPM | *E. faecalis* |
| 1 | 1 O a | $1{,}8.10^3$ | 0 |
| 2 | 1 O k | $2{,}7.10^3$ | 0 |
| | Průměr | $2{,}2.10^3$ | 0 |
| | SD | $4{,}0.10^2$ | |
| 3 | 1 S a | $5{,}8.10^3$ | 0 |
| 4 | 1 S k | $2{,}3.10^3$ | 0 |
| | Průměr | $4{,}1.10^3$ | 0 |
| | SD | $1{,}7.10^3$ | |
| 5 | 2 O a | $1{,}5.10^3$ | 0 |
| 6 | 2 O k | $3{,}1.10^3$ | 0 |
| | Průměr | $2{,}3.10^3$ | 0 |
| | SD | $8{,}1.10^2$ | |
| 7 | 2 S a | $9{,}6.10^2$ | 0 |
| 8 | 2 S k | $4{,}7.10^3$ | 0 |
| | Průměr | $2{,}8.10^3$ | 0 |
| | SD | $1{,}9.10^3$ | |
| 9 | 3 O a | $2{,}3.10^3$ | 0 |
| 10 | 3 O k | $2{,}8.10^3$ | 0 |
| | Průměr | $2{,}5.10^3$ | 0 |
| | SD | $2{,}2.10^2$ | |
| 11 | 3 S a | $2{,}3.10^3$ | 0 |
| 12 | 3 S k | $2{,}1.10^3$ | 0 |
| | Průměr | $2{,}2.10^3$ | 0 |
| | SD | $7{,}8.10^1$ | |

Vysvětlivky: viz Tab. č. 6

V Tab. 8, Pátý den od založení experimentu, můžeme sledovat postupný nárůst CPM u jednotlivých kontrolních vzorků. Vzorky zabalené v miskách s prototypem fólie s antimikrobiálními vlastnostmi dosahují v některých případech nižších hodnot CPM než u vzorků s fólií z Tab 7. *Enterococcus faecalis* nebyl detekován, usuzujeme tedy, že fólie s antibakteriálními vlastnostmi může mít vliv na růst bakterie.

Tab. č. 8 Počty mikroorganismů ve vzorcích debrecínských párků 5. den od založení experimentu v KTJ/g

| 5. den | | | |
|---|---|---|---|
| Pořadí měření vzorků | Identifikace | CPM | *E. faecalis* |
| 13 | 1 O a | $1{,}4.10^3$ | 0 |
| 14 | 1 O k | $2{,}7.10^3$ | 0 |
| | Průměr | $2{,}0.10^3$ | 0 |
| | SD | $6{,}8.10^2$ | |
| 15 | 1 S a | $1{,}7.10^3$ | 0 |
| 16 | 1 S k | $3{,}7.10^3$ | 0 |
| | Průměr | $2{,}7.10^3$ | 0 |
| | SD | $1{,}0.10^3$ | |
| 17 | 2 O a | $1{,}2.10^3$ | 0 |
| 18 | 2 O k | $1{,}9.10^3$ | 0 |
| | Průměr | $1{,}5.10^3$ | 0 |
| | SD | $3{,}4.10^2$ | |
| 19 | 2 S a | $1{,}8.10^3$ | 0 |
| 20 | 2 S k | $3{,}5.10^3$ | 0 |
| | Průměr | $2{,}6.10^3$ | 0 |
| | SD | $8{,}6.10^2$ | |
| 21 | 3 O a | $1{,}2.10^3$ | 0 |
| 22 | 3 O k | $2{,}3.10^3$ | 0 |
| | Průměr | $1{,}7.10^3$ | 0 |
| | SD | $5{,}5.10^2$ | |
| 23 | 3 S a | $8{,}5.10^2$ | 0 |
| 24 | 3 S k | $1{,}4.10^3$ | 0 |
| | Průměr | $1{,}1.10^3$ | 0 |
| | SD | $2{,}6.10^2$ | |

Vysvětlivky: viz Tab. č. 6

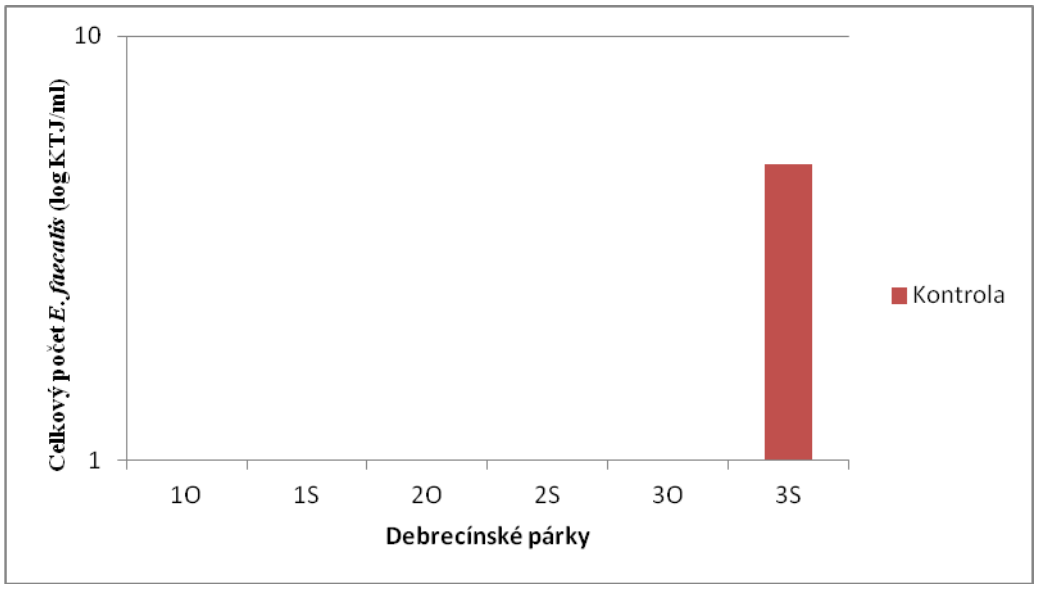
V Tab. 9 můžeme pozorovat první výskyt *E. faecalis* k 7. dni u kontrolního vzorku 36. V tomto případě jsme mohli sledovat účinný vliv prototypu fólie v porovnání s kontrolním vzorkem. U vzorků s prototypem fólií byl zaznamenám nulový nárůst *E. faecalis*, můžeme se tak domnívat, že zde zapůsobil antimikrobiální účinek silic. Výsledky počtu CPM se pohybují u kontrolních vzorků od $2{,}4.10^3$ do $1{,}4.10^4$. U párků balených v prototypech fólií se hodnoty pohybovaly od $2{,}2.10^2$ do $6{,}2.10^3$ CPM. Dle výsledků k 7. dnu od založení pokusu jsme mohli sledovat značné rozdíly v nárůstu CPM, hodnoty vzorků zabalených v prototypech fólií jsou nižší. Pouze u vzorku 31 došlo k zvýšenému nárůstu CPM oproti kontrole. Nárůst CPM může být způsoben kontaminací při manipulaci se vzorkem během

balení do polystyrenových misek. Zvýšený nárůst CPM může být způsoben i díky použitému koření v debrecínských párcích. Ačkoliv koření prochází sterilací a čistícím procesem, může snadno dojít k jeho kontaminaci. Některé směsi koření jsou vhodným prostředím pro mikroorganismy, které se spolu s kořením mohou dostat do masného výrobku a tam se pomnožit. V kombinaci s nedostatečným tepelným opracováním může dojít k jejich pomnožení (Hui et al., 2001).

Tab. č. 9 Počty mikroorganismů ve vzorcích debrecínských párků 7. den od založení experimentu v KTJ/g

| 7. den | | | |
|---|---|---|---|
| Pořadí měření vzorků | Identifikace | CPM | *E. faecalis* |
| 25 | 1 O a | $5{,}5.10^2$ | 0 |
| 26 | 1 O k | $2{,}4.10^3$ | 0 |
| | Průměr | $1{,}5.10^3$ | 0 |
| | SD | $9{,}3.10^2$ | |
| 27 | 1 S a | $2{,}4.10^3$ | 0 |
| 28 | 1 S k | $1{,}4.10^4$ | 0 |
| | Průměr | $8{,}0.10^3$ | 0 |
| | SD | $5{,}5.10^3$ | |
| 29 | 2 O a | $4{,}0.10^3$ | 0 |
| 30 | 2 O k | $4{,}5.10^3$ | 0 |
| | Průměr | $4{,}3.10^3$ | 0 |
| | SD | $2{,}5.10^2$ | |
| 31 | 2 S a | $6{,}2.10^3$ | 0 |
| 32 | 2 S k | $4{,}2.10^3$ | 0 |
| | Průměr | $5{,}2.10^3$ | 0 |
| | SD | $9{,}8.10^2$ | |
| 33 | 3 O a | $2{,}3.10^3$ | 0 |
| 34 | 3 O k | $3{,}0.10^3$ | 0 |
| | Průměr | $2{,}7.10^3$ | 0 |
| | SD | $3{,}9.10^2$ | |
| 35 | 3 S a | $2{,}2.10^2$ | 0 |
| 36 | 3 S k | $5{,}4.10^3$ | 5 |
| | Průměr | $2{,}8.10^3$ | 2,5 |
| | SD | $2{,}6.10^3$ | 2,5 |

Vysvětlivky: viz Tab. č. 6




Obr. č. 3 Počet *E. faecalis* v - log KTJ/g u vzorků debrecínských párků, skladovaných 7 dní při 4 - 6 °C.

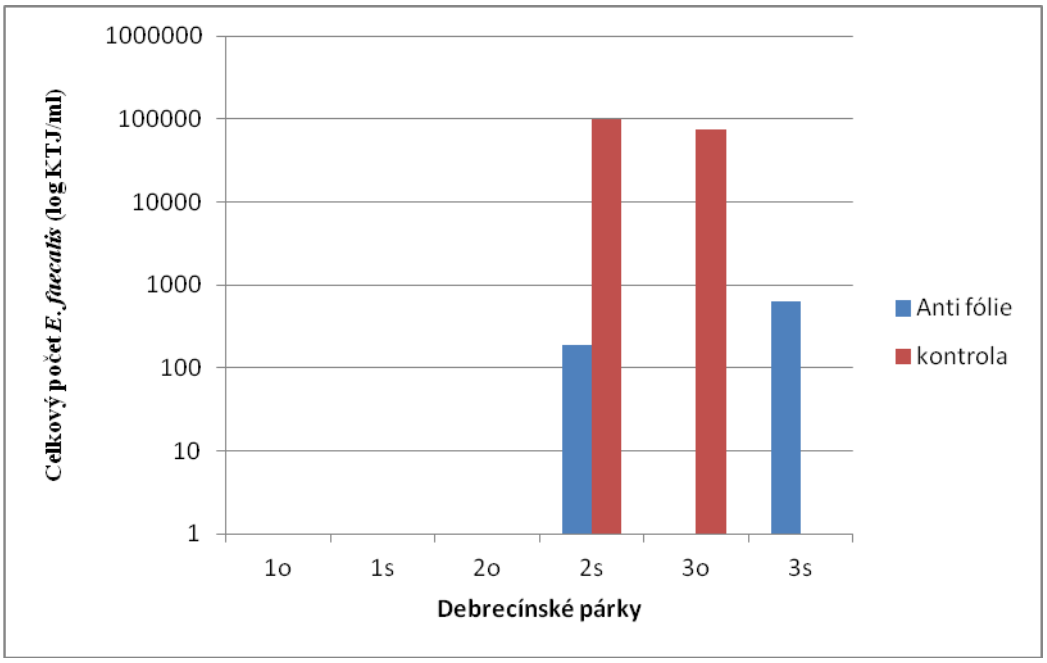
V 9. dni měření docházelo k větším nesrovnalostem mezi počtem CPM u kontrolních vzorků a vzorků s prototypem fólii s antibakteriálním účinkem. V Tab. 10 pozorujeme u vzorků 37 a 41 s prototypem fólií značné zvýšení CPM oproti kontrolnímu vzorku. Důvodem většího nárůstu CPM může být špatná manipulace a kontaminace vzorků při balení v době zakládání experimentu nebo kontaminace výrobu již při výrobě. Zvýšený počet CPM může být i způsoben i nedostatečným tepelným opracováním při výrobě párků. Nejnáchylnějším místem jsou okraje párků v místě jejich zavěšení při uzení, v těchto místech nemusí dojít k řádnému tepelnému opracování párků a může tak dojít k přežití některých mikroorganismů a k jejich pomnožení. Pro zabránění mikrobiálnímu kažení výrobků je důležité používat vhodné obaly prosté mikroorganismů, dodržovat hygienické požadavky při manipulaci se surovinami a dodržovat teploty a čas tepelného opracování (Görner a Valík, 2004).

Ostatní vzorky s antibakteriální fólií dosahovaly nižších hodnot nejméně o jeden řád. Dle tabulky můžeme pozorovat větší nárůst počtů *E. faecalis* u vzorků 43 - 48. U vzorku 43 a 45 s prototypem fólií byl zaznamenán nárůst bakterie nižší nejméně o tři řády. U kontrolního vzorku 48 nedošlo k nárůstu kolonií bakterií, zatímco u vzorku s prototypem fólie ano. Usuzujeme tedy, že nastala situace, kdy v kontrolním vzorku nebyly vhodné podmínky pro růst těchto bakterií, a proto nebyly detekovány.

Tab. č. 10 Počty mikroorganismů ve vzorcích debrecínských párků 9. den od založení experimentu v KTJ/g

| 9. den | | | |
|---|---|---|---|
| Pořadí měření vzorků | Identifikace | CPM | *E. faecalis* |
| 37 | 1 O a | $2{,}6.10^{5}$ | 0 |
| 38 | 1 O k | $9{,}6.10^{2}$ | 0 |
| | Průměr | $1{,}3.10^{5}$ | 0 |
| | SD | $1{,}3.10^{5}$ | - |
| 39 | 1 S a | $6{,}9.10^{3}$ | 0 |
| 40 | 1 S k | $1{,}1.10^{5}$ | 0 |
| | Průměr | $6{,}0.10^{4}$ | 0 |
| | SD | 53363 | - |
| 41 | 2 O a | $1{,}6.10^{5}$ | 0 |
| 42 | 2 O k | $4{,}2.10^{4}$ | 0 |
| | Průměr | $1{,}0.10^{5}$ | 0 |
| | SD | $5{,}9.10^{4}$ | - |
| 43 | 2 S a | $2{,}0.10^{5}$ | $1{,}9.10^{2}$ |
| 44 | 2 S k | $1{,}2.10^{6}$ | $1{,}0.10^{5}$ |
| | Průměr | $6{,}8.10^{5}$ | $5{,}0.10^{4}$ |
| | SD | $4{,}7.10^{5}$ | $5{,}0.10^{4}$ |
| 45 | 3 O a | $3{,}7.10^{4}$ | 0 |
| 46 | 3 O k | $2{,}7.10^{5}$ | $7{,}5.10^{4}$ |
| | Průměr | $1{,}5.10^{5}$ | $3{,}7.10^{4}$ |
| | SD | $1{,}1.10^{5}$ | $3{,}7.10^{4}$ |
| 47 | 3 S a | $1{,}3.10^{4}$ | $6{,}4.10^{2}$ |
| 48 | 3 S k | $7{,}9.10^{4}$ | 0 |
| | Průměr | $4{,}6.10^{4}$ | $3{,}2.10^{2}$ |
| | SD | $3{,}3.10^{4}$ | $3{,}2.10^{2}$ |

Vysvětlivky: viz Tab. č. 6




Obr. č. 4 Počet *E. faecalis* v - log KTJ/g u vzorků debrecínských párků, skladovaných 9 dní při 4 - 6 °C.

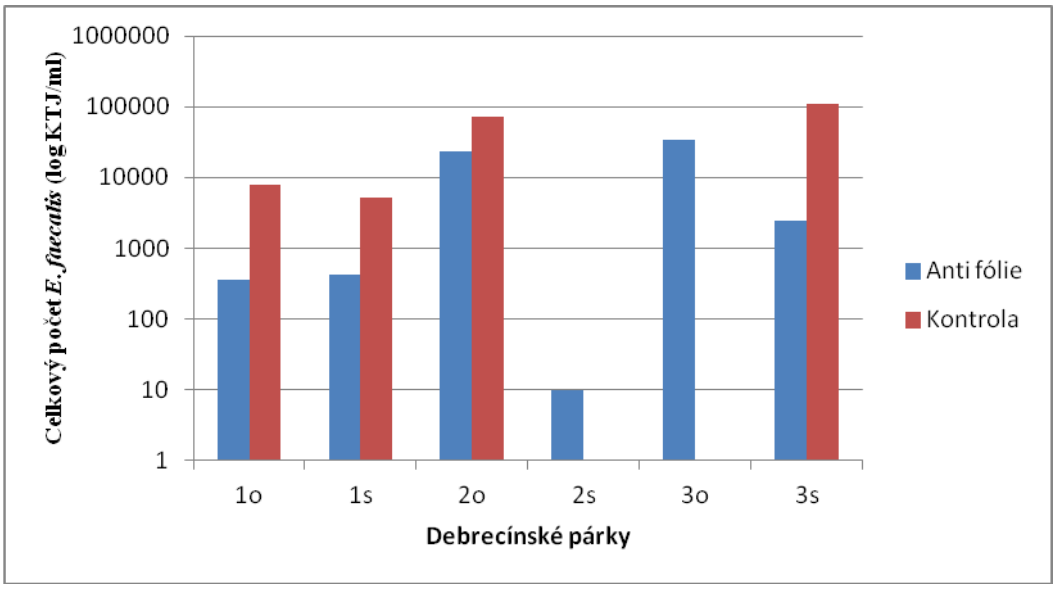
V Tab. 11 jsou shrnuty výsledky k 15. dni experimentu, trvanlivost párků udaná na obale vypršela k 10. dni. Získané výsledky dokazují značný nárůst CPM u kontrolních vzorků ve 4 případech ze 6. U kontrolních vzorků 58 a 60 došlo k nižšímu nárůstu CPM než u vzorků balených v prototypu fólie. Nárůst *E. faecalis* byl v 15. dni zaznamenám u většiny testovaných vzorků. Pouze u vzorků kontroly 56 a 58 nebyly detekovány žádné kolonie.

Selim (2011) prováděl studii, ve které testoval účinek silic z aromatických rostlin s antimikrobiálními účinky na růst bakterií Enterococcus, zejména na vankomycin-rezistentní enterokoky (VRE). Z jedenácti silic identifikovali v MIC jako nejúčinnější silici tymiánu (MIC 90) proti VRE. Jako další testovali účinek této silice v mletém mase. Mleté maso bylo inokulované VRE ($10^3$ cfu/g), dále bylo smícháno s určitými koncentracemi této silice a skladováno 14 dní při 7 °C. Tymiánová silice vykazovala největší účinek v koncentraci 0,5 % a 1 % proti VRE.

Tab. č. 11 Tab. č. 8 Počty mikroorganismů ve vzorcích debrecínských párků 15. den od založení experimentu v KTJ/g

| 15. den | | | |
|---|---|---|---|
| Pořadí měření vzorků | Identifikace | CPM | *E. faecalis* |
| 49 | 1 O a | $1{,}5.10^{3}$ | $3{,}6.10^{2}$ |
| 50 | 1 O k | $2{,}8.10^{5}$ | $8{,}0.10^{3}$ |
| | Průměr | $1{,}4.10^{5}$ | $4{,}2.10^{3}$ |
| | SD | $1{,}4.10^{5}$ | $3{,}8.10^{3}$ |
| 51 | 1 S a | $2{,}7.10^{3}$ | $4{,}2.10^{2}$ |
| 52 | 1 S k | $1{,}5.10^{6}$ | $5{,}1.10^{3}$ |
| | Průměr | $7{,}3.10^{5}$ | $2{,}8.10^{3}$ |
| | SD | $7{,}3.10^{5}$ | $2{,}4.10^{3}$ |
| 53 | 2 O a | $4{,}0.10^{4}$ | $2{,}4.10^{4}$ |
| 54 | 2 O k | $6{,}0.10^{5}$ | $7{,}2.10^{4}$ |
| | Průměr | $3{,}2.10^{5}$ | $4{,}8.10^{4}$ |
| | SD | $2{,}8.10^{5}$ | $2{,}4.10^{4}$ |
| 55 | 2 S a | $3{,}0.10^{3}$ | $1{,}0.10^{1}$ |
| 56 | 2 S k | $1{,}0.10^{6}$ | 0 |
| | Průměr | $5{,}3.10^{5}$ | 5 |
| | SD | $5{,}2.10^{5}$ | 5 |
| 57 | 3 O a | $1{,}8.10^{6}$ | $3{,}5.10^{4}$ |
| 58 | 3 O k | $2{,}9.10^{4}$ | 0 |
| | Průměr | $9{,}1.10^{5}$ | $1{,}7.10^{4}$ |
| | SD | $8{,}9.10^{5}$ | $1{,}7.10^{4}$ |
| 59 | 3 S a | $4{,}0.10^{5}$ | $2{,}4.10^{3}$ |
| 60 | 3 S k | $2{,}7.10^{5}$ | $1{,}1.10^{5}$ |
| | Průměr | $3{,}4.10^{5}$ | $5{,}6.10^{4}$ |
| | SD | $6{,}2.10^{4}$ | $5{,}4.10^{4}$ |

Vysvětlivky: viz Tab. č. 6




Obr. č. 5 Počet *E. faecalis* v - log KTJ/g u vzorků debrecínských párků, skladovaných 15 dní při 4 - 6 °C.

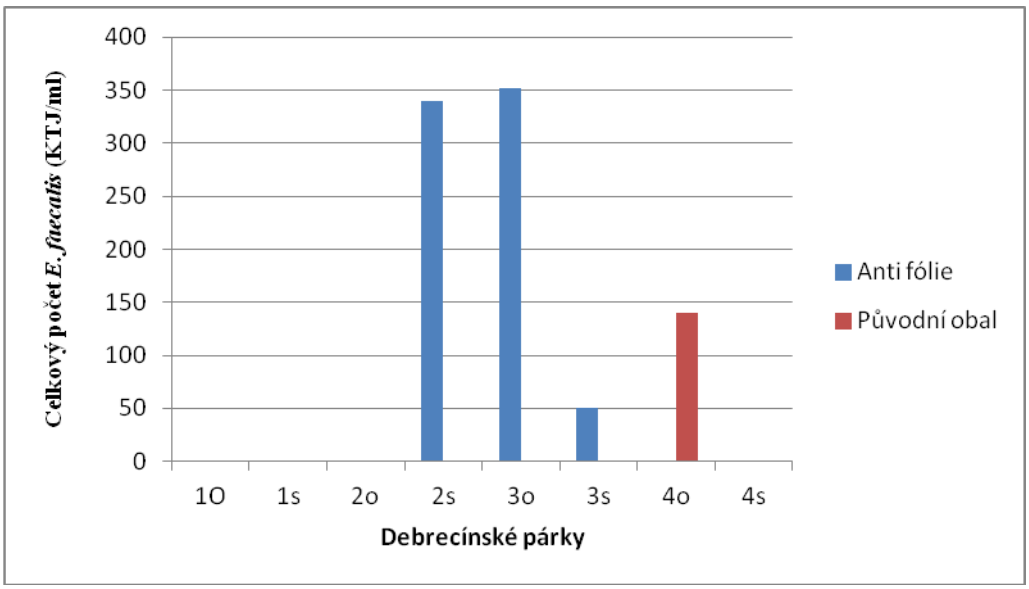
V rámci měření antibakteriálního účinku prototypu fólie u debrecínských párků balených v miskách, bylo provedeno měření CPM a *E. faecalis* u vzorků přímo zabalených v prototypu fólie s antibakteriálním účinkem. V Tab. 12 jsou shrnuty výsledky tohoto měření. Počty CPM odpovídají svým rozsahem výsledkům vzorků balených v polystyrenových miskách. Růst *E. faecalis* byl značně omezen. Součástí experimentu bylo i stanovení CPM a počtu *E. faecalis* u vzorků debrecínských párků zabalených v originálním vakuovaném balení. Z Obr. 3 můžeme pozorovat účinnost prototypu fólie v přímém kontaktu se vzorkem oproti originálně zabalenému vzorku debrecínského párku.

Chouliara et al. (2013) prováděli studii, kde testovali účinek kombinace silic aplikovaných na drůbežím mase (kuřecích prsech), proti bakterii *Listeria monocytogenes*. Drůbeží maso inokulovali *L. monocytogenes* $10^6$ cfu/g a po 20 minutách přidali silice tymiánu a oregana. Maso poté zabalili a skladovali při 4 °C 10 dní. Během měření (den 0, 2, 4, 6, 8, 10) došlo k výraznému snížení počtu *L. monocytogenes* a především nedocházelo k jejímu růstu.

Tab. č. 12 Výsledky měření počtu mikroorganismů balených jiným způsobem v KTJ/g.

| | | 5. den | | 9. den | | 15. den | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Pořadí měření vzorků | Identifikace | CPM | *E. faecalis* | CPM | *E. faecalis* | CPM | *E. faecalis* |
| 1 | 1 O | $4{,}0.10^{3}$ | 0 | - | - | - | - |
| 2 | 1 S | $2{,}4.10^{3}$ | 0 | - | - | - | - |
| 3 | 2 O | - | - | $7{,}1.10^{5}$ | 0 | - | - |
| 4 | 2 S | - | - | $1{,}0.10^{4}$ | $3{,}4.10^{2}$ | - | - |
| 5 | 3 O | - | - | - | - | $1{,}2.10^{5}$ | $3{,}5.10^{2}$ |
| 6 | 3 S | - | - | - | - | $3{,}0.10^{3}$ | $5{,}0.10^{1}$ |
| 7 | 4 OP | - | - | - | - | $3{,}2.10^{3}$ | $1{,}4.10^{2}$ |
| 8 | 4 SP | - | - | - | - | $7{,}5.10^{3}$ | 0 |

Vysvětlivky: CPM ... celkový počet mikroorganismů
OP ... okraj původního balení výrobku
SP ... střed původního balení výrobku




Obr. č. 6 Počet *E. faecalis* v KTJ/g u vzorků debrecínských párků, skladovaných 7, 9, 15 dní při 4 - 6 °C.

# 6 ZÁVĚR

Cílem experimentů v této diplomové práci bylo testování účinnosti silic aplikovaných na obalových materiálech (fóliích) proti mikroorganismu *E. faecalis*. V experimentální části jsou zahrnuty výsledky tohoto testování.

V první části testování byla testována skupina silic z několika aromatických rostlin proti bakterii *E. faecalis*. Z poměrně velkého množství použitých vzorků silic, čistých účinných látek a jejich kombinací jsme mohli, dle výsledků velikosti inhibičních zón, určit nejúčinnější vzorek. Důležitým faktorem pro vytvoření inhibičních zón bylo umístění fólie s nátěrem v Petriho misce. Při kontaktu antibakteriální fólie s živným médiem a bakteriemi docházelo k vytvoření viditelných inhibičních zón. U ostatních vzorků nebyla tato zóna zřetelná a nebylo možné ji změřit. To může být zapříčiněno použitím nižších koncentrací silic. Dále se lze domnívat, že důvodem pro nevytvoření inhibiční zóny může být způsobeno i špatným uvolňováním silic z nátěru fólie.

V případě porovnávání výsledků intenzity růstu bakterií *E. faecalis*, můžeme pozorovat účinnost vybraných silic, které vykazovali nejlepší inhibici růstu bakterií. Na výsledcích se významně podílí použité koncentrace bakterií.

V druhé části experimentu byl použit speciální prototyp fólie s nátěrem silic jako obalový materiál při balení Debrecínských párů. Zabalené vzorky párků byly skladovány při 4 - 6 °C a poté testovány na přítomnost bakterie *E. faecalis*.

Již 5. den od založení experimentu došlo k nízkému výskytu enterokoků, významnější nárůst byl zaznamenán až 9. den, 15. den došlo k nárůstu bakterií u všech vzorků s použitým prototypem fólie. Z grafů je patrný průběh nárůstu bakterií u kontrolních vzorků a účinnost použitého prototypu antimikrobiální fólie. Dle výsledků docházelo ve většině případů vzorků párků, balených v miskách s prototypem fólie, k nižšímu nárůstu CPM i *E. faecalis*, než u kontrolních vzorků. Lze tak usuzovat, že prototyp fólie může působit proti růstu bakterie *E. faecalis*. V několika případech dosahovaly výsledky u vybraných vzorků párků, balených v prototypu fólie, vyšších počtů než kontrolní vzorky. Nesrovnalosti ve výsledcích mohly být způsobeny špatnou manipulací a kontaminací testovaných párků při jejich balení do misek s prototypem fólie.

Při použití antibakteriální fólie přímo na sledovaný vzorek debrecínských párků, dosahovaly hodnoty počtu bakterií *E. faecalis* nízkých hodnot. Pro srovnání bylo zahrnuto

měření i originálně zabalených, vakuovaných párků, ze kterého vyplívá, že antibakteriální fólie poskytuje vyšší účinnost proti růstu bakterií v přímém kontaktu s potravinou.

Testování antimikrobiální aktivity silic, jako součástí obalových materiálů, je velmi obsáhlé téma. Vzhledem k různým použitelným kombinacím silic a jejich účinkům, je zde velké pole působnosti a možností jejich využití. Mnoho studií se zabývá podobným tématem jejich použití jako součástí obalových materiálů. Účinek silic se však liší v závislosti na použité části aromatické rostliny a velmi významným faktorem je také stanoviště rostliny a období sběru částí rostlin. Tyto faktory velmi ovlivňují chemické složení silic v aromatických rostlinách.

Využití obalových materiálů s antimikrobiálním účinekm silic může být využito v potravinářství zejména díky tomu, že spotřebitelé posledních pár let kladou důraz na složení potravin a dávají větší přednost použitým přírodním látkám v potravinách, než těm chemickým. Díky aplikaci antimikrobálních silic na obalový materiál by byla uspokojena poptávka zákazníků a současně by byl zabalený produkt lépe chráněn před rozmnožením nežádoucích mikroorganismů. Nevýhodou těchto obalových materiálů může být ovlivnění senzorických vlastností balených výrobků, zejména ovlivnění vůně a chuti použitými silicemi.

Vzhledem k účinkům silic na růst mikroorganismů je bezesporu vhodné se více věnovat tomuto tématu a provést další testování antimikrobiálního účinku silic v obalových materiálech na potraviny.

# 7 PŘEHLED POUŽITÉ LTERATURY

AL-ASMARI A., K., ATHAR M., T., AL-FARAIDY A., A., ALMUHAIZA M., S., 2017: *Chemical composition of essential oil of Thymus vulgaris collected from Saudi Arabian market.* Asian Pac Journal of Tropical Biomedicine; volume7, issue 2, pages 147–150. Databáze online [cit. 2017-02-29]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169116301551

ALEKSIC V., KNEZEVIC P., 2014: *Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of Myrtus communis L.* Microbiological Research, Volume 169, Issue 4, pages 240-254. Databáze online [cit. 2017-02-22]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501313001766

AUMEERUDDY-ELALFIA Z., GURIB-FAKIMB A., MAHOMOODALLY M., F., 2016: *Chemical composition, antimicrobial and antibiotic potentiating activity of essential oils from 10 tropical medicinal plants from Mauritius*. Journal of Herbal Medicine, volume 6, pages 88–95. Databáze online [cit. 2017-02-25]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210803316300057

BACÍLKOVÁ B., PAULUSOVÁ H., 2012: *Vliv silic a jejich hlavních účinných látek na mikroorganismy a na archivní materiál*. Oddělení péče o fyzický stav archiválií, Národní archiv, Praha. Databáze online [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: www: http://www.nacr.cz/Z-files/silice/silice.pdf

BAKER S., 2006: *Microbiology*. 3rd ed. New York: Taylor & Francis Group, 427 s. ISBN 0-4153-9088-5.

BAŞER, K. H. C. a Gerhard. BUCHBAUER, ed. *Handbook of essential oils*: science, technology, and applications. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis, 2010. ISBN 978-1-4200-6316-5.

BASSANETTI I., CARCELLI M., BUSCHINI A., MONTALBANO S., LEONARDI G., PELAGATTI P., TOSI G., MASSI P., FIORENTINI L., ROGOLINO D., 2017: *Investigation of antibacterial activity of new classes of essential oils derivatives*; Food

Control Volume 73, Part B, March 2017, Pages 606-612. Databáze online [cit. 2017-02-28]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516305023

BEDNÁŘ M., 1996: *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 558 s.

BENBELAÏD F., KHADIR A., ABDOUNE M., A., BENDAHOU M., MUSELLI A., COSTA J., 2014: *Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrugresistant Enterococcus faecalis in both planktonic and biofilm state*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. Volume 4, issue 6, pages 463-472. Databáze online [cit. 2017-02-28]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169115302240

BENEŠ J., 2009: *Infekční lékařství*. 1. vyd. Praha: Galén, xxv, 651 s. ISBN 978-80-7262-644-1.

BODMER S., C. IMARK AND M. KNEUBÜHL, 1999; *Biogenic amines in foods: Histamine and food processing*; Inflamm. res. 48 (1999) 296–300. Databáze online [cit. 2016-12-17]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/12856297_Biogenic_amines_in_foods_Histamine_and_food_processing

BREATHNACH, A., S., 2013: *Nosocomial infections and infection kontrol*. Medicine volume 41, Pages 649-653

BURDYCHOVÁ R., 2007: *Identifikace a charakterizace bakterií rodu Enterococcus určených pro výrobu funkčních potravin*. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. sv. LV, č. 2, s. 9--14. ISSN 1211-8516.

BURDYCHOVÁ R., DOHNAL V., 2008: *Skríning probiotických kultur určených pro výrobu fermentovaných potravin na schopnost tvorby biogenních aminů*. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. sv. LVI, č. 1, s. 25--30. ISSN 1211-8516.

BURDYCHOVÁ R., SLÁDKOVÁ P., 2007: *Mikrobiologická analýza potravin*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 208 s. ISBN 978-80-7375-116-6.

BYAPPANAHALLI, M., N., NEVERS, M., B., KORAJKIC, A., STALEY, Z., R., HARWOOD, V., J., 2012: *Enterococci in the Environment.* Microbiology and Molecular Biology Reviews, Volume 76, Number 4, pages 685–706. Databáze online [cit. 2016-12-14]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Valerie_Harwood2/publication/233830291_Enterococci_in_the_environment_Microbiol_Mol_Biol_Rev/links/0912f50cf515a2bc00000000.pdf

CALO J., R., CRANDALL P., G., O'BRYAN C., C., RICKE S., C., 2015: *Essential oils as antimicrobials in food systems - A review*. Food control, volume 54, pages 111-119. Databáze online [cit. 2017-02-21]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515000456

DĄBROWSKI W., SIKORSKI Z., E., 2005: *Toxins in food*. Boca Raton, FL: CRC Press, 355 s. ISBN 0-8493-1904-8.

DELAMARE A., P., L., MOSCHEN-PISTORELLO I., T., ARTICO L., ATTI-SERAFINI L., ECHEVERRIGARAY S., 2007: *Antibacterial activity of the essential oils of Salvia officinalis L. and Salvia triloba L. cultivated in South Brazil*. Food Chemistry, volume 100, issue 2, pages 603–608. Databáze online [cit. 2017-02-28]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605009076

ESKIN, N. A. M. a D., S., ROBINSON, ed. *Food shelf life stability*: chemical, biochemical, and microbiological changes. Boca Raton, FL: CRC Press, 2001. ISBN 978-1-4200-3665-7.

FARHAT M., B., JORDÁNB M., J., CHAOUCH-HAMADAA R., LANDOULSIA A., SOTOMAYOR S., A., 2016: *Phenophase effects on sage (Salvia officinalis L.) yield and compositionof essential oil.* Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, volume 3, issue 3, 87–93. Databáze online [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214786116300067

FRANZ CH., M., A., P., STILES, M., E., SCHLEIFER, K., H., HOLZAPFEL, W., H., 2003: *Enterococci in fous-a conundum for food safety*. International of Food Microbiology 88, 105-122. Databáze online [cit. 2016-12-10]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503001740

FRANZ, CH., M., A., P., HUCH, M., ABRIOUEL, H., HOLZAPFEL, W., GÁLVEZ, A., 2011: *Enterococci as probiotics and their implications in food safety*. International Journal of Food Microbiology 151, 125–140. Databáze online [cit. 2016-12-10]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160511004879

GERMANN, Gudrun a Peter GERMANN. Rostliny pro aromaterapii: 90 vonných rostlin, jejich znaky a způsob využití. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4672-2.

GHAEDI M., NAGHIHA R., JANNESAR R., DEHGHANIAN N., MIRTAMIZDOUST B., PEZESHKPOUR V., 2015: *Antibacterial and antifungal activity of flower extracts of Urtica dioica, Chamaemelum nobile and Salvia officinalis: Effects of Zn[OH]2 nanoparticles and Hp-2-minh on their property*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, volume 32, pages 353–359. Databáze online [cit. 2017-02-28]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1226086X15004165

GIRAFFA, G., 2002: *Enterococci from foods*. FEMS Microbiology Reviews 26, 163-171. Databáze online [cit. 2016-12-16]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168644502000943

GIRAFFA, G., 2003: *Functionality of enterococci in dairy products*. International Journal of Food Microbiology 88, 215– 222. Databáze online [cit. 2016-12-16]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503001831

GÖRNER F., VALÍK L., 2004: *Aplikovaná mikrobiológia požívatín: principy mikrobiológie požívatín, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálného pôvodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami*. Vyd. 1. Bratislava: Malé Centrum, 528 s. ISBN 80-967064-9-7

HANAMANTHAGOUDA M. H., KAKKALAMELI S., B., NAIK P., M., NAGELLA P., SEETHARAMAREDDY H., R., MURTHY H., N., 2009: *Essential oils of Lavandula bipinnata and their antimicrobial activities*, Food Chemistry 118 (2010) 836–839. Databáze online [cit. 2017-02-28]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609006566

HAVLÍK J., 2002: *Infekční nemoci*. 2., rozš. vyd. Praha: Galén, xii, 186 s. ISBN 80-7262-173-4.

HOBSTOVÁ J., AMBROŽOVÁ H., 2012: *Infectious diseases*. 2nd rev. ed. Prague: Karolinum, 246 s. ISBN 978-80-246-2111-1.

HUGAS M., GARRIGA M., AYMERICH M.T., 2003: *Functionalty of enterococci in meat products,* International Journal of Food Microbiology, volume 88, issue 2-32, pages 223–233. Databáze online [cit. 2016-12-20]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503001843

HUI, Y. H., ed. *Handbook of food science,* technology, and engineering. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis, 2006. ISBN 978-1-4665-0787-6.

HUI, Y. H., ed. *Meat science and applications*. New York: Marcel Dekker, 2001. ISBN 978-0-203-90808-2.

CHOULIARA E., KONTOMINAS M., G., 2013: *Combined Effect of Essential Oils and Nisin on the Survival of Listeria monocytogenes in Chicken Meat Packaged Aerobically at 4 °C*, s. 129 - 139. In: KONTOMINAS, Michael G., ed. *Food analysis and preservation: current research topics*. Oakville: Apple Academic Press, c2013. ISBN 978-1-926895-07-9.

KAČEŇÁK, Igor. *Základy balenia potravín*. Bratislava: ARM 333, 2001. ISBN 80-967945-6-6.

KAROVIČOVÁ A., KOHAJDOVA Z., 2003; *Biogenic Amines in Food*; Received 8 August 2003. Databáze online [cit. 2016-12-16]. Dostupné z: https://www.chempap.org/file_access.php?file=591a70.pdf

KAYSER F., H., 2003: *Safety aspects of enterococci from the medical point of view*. International Journal of Food Microbiology, volume 88, issues 2-3, pages 255– 262. Databáze online [cit. 2016-12-18]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503001880

KIRWAN M., J., COLES R., MCDOWELL D., 2003: *Food Packaging Technology*, Blackwell: Oxford, UK. ISBN 1-84127-221-3. 346 pages. Databáze online [cit. 2017-03-04]. Dostupné z: http://study.syau.edu.cn/upload/54/attach/_2003500026_2011101209131912.pdf

KLABAN V., 2001: *Svět mikrobů: ilustrovaný lexikon mikrobiologie životního prostředí*. 2., rozš. a přeprac. vyd. Hradec Králové: Gaudeamus, 416 s. ISBN 80-7041-687-4.

KLEIN G., 2003: *Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract*. International Journal of Food Microbiology. Vol. 88, 123-131. Databáze online [cit. 2016-12-11]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503001752

KOMPRDA T., 2000: *Hygiena potravin*. dotisk 2000. Brno: MZLU, 171 s. ISBN 80-7157-276-4.

KOMPRDA T., SLÁDKOVÁ P., DOHNAL V., 2009: *Biogenic amine content in dry fermented sausages as influenced by a producer, spice mix, starter culture, sausage diameter and time of ripening*. Meat Science. 534-542. Databáze online [cit. 2016-12-16]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174009002058

KRISCH J., TSERENNADMID R., VÁGVÖLGYI C., 2011: *Essential oils against yeasts and moulds causing food spoilage.* Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, A. Méndez-Vilas (Ed.). Databáze online [cit. 2017-02-22]. Dostupné z: http://www.formatex.info/microbiology3/book/1135-1142.pdf

LABORDAA R., MANZANOA I., GAMONB M., GAVIDIAC I.,PEREZ-BERMUDEZC P., BOLUDA R., 2013: *Effects of Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis essential oils on Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae).* Industrial Crops and Products 48, pages 106– 110. Databáze online [cit. 2017-02-23]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669013001714

LADERO, V., FERNÁNDEZ, M., CALLES-ENRÍQUEZ, M., SÁNCHEZ-LLANA, E., CAÑEDOE, MARTÍN, M., C., ALVAREZ, M., A., 2012: *Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci*?. Food Microbiology 30, 132-138. Databáze online [cit. 2016-12-16]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002011002991

LANCEFIELD, R., C., 1933: *A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci*. The Journal of experimental medicine. Volume 57, Issue 4, Pages 571–595. Databáze online [cit. 2016-12-10]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2132252/pdf/571.pdf

LAZARO C., A., CONTE-JUNIO C., A., 2017: *Application of Chromatograpic Methods for Identification of Biogenic Amines in Foods of Animal Origin.* Innovative Analytical Tools for Safety Assessment. Databáze online [cit. 2016-12-18]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/312350125_Application_of_Chromatograpic_Methods_for_Identification_of_Biogenic_Amines_in_Foods_of_Animal_Origin_Innovative_Analytical_Tools_for_Safety_Assessment

LAZARO C., A., CONTE-JÚNIOR C., A., CANTO A., C., MONTEIRO M., L., G., COSTA-LIMA B., DA CRUZ A., G., MARSICO E., T., FRANCO R., M., 2015: *Biogenic amines as bacterial quality indicators in different poultry meat species*. Databáze online [cit. 2016-12-18]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/266395836_Biogenic_amines_as_bacterial_quality_indicators_in_different_poultry_meat_species

LEMOS M., F., LEMOS M., F., PACHECO H., P., GUIMARÃES A.,C., FRONZA M., ENDRINGER D., C., SCHERER R., 2017: *Seasonal variation affects the composition and antibacterial andantioxidant activities of Thymus vulgaris*. Industrial Crops and Products, Volume 95, Pages 543-548. Databáze online [cit. 2017-02-18]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092666901630752X

LINARES D., M., BEATRIZ DEL RIO', REDRUELLO B., LADERO V., MARTIN M., C., FERNANDEZ M., RUAS-MADIEDO P., ALVAREZ M., A., 2016: *Comparative analysis of the in vitro cytotoxicity of the dietary biogenic amines tyramine and histamine.* Food Chemistry, Volume 197, Part A, 15, Pages 658–663. Databáze online [cit. 2016-12-19]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615301588

LOBOVSKÁ A., 2001: *Infekční nemoci*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 263 s.,[16 s. obr. příl. ISBN 80-246-0116-8.

MAĎAR, Rastislav, Renata PODSTATOVÁ a Jarmila ŘEHOŘOVÁ. Prevence nozokomiálních nákaz v klinické praxi. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1673-9.

MAITZ L., Novak N., 2007; *Histamine and histamine intolerance*; 85:1185–96. Printed in USA. © 2007 American Society for Nutrition. Databáze online [cit. 2016-12-18]. Dostupné z: http://ajcn.nutrition.org/content/85/5/1185.long

MAJUMDAR, S., S., PADIGLIONE, A., A., 2012: *Nosocomial infections in the intensive care unit*. Anaesthesia & Intensive Care Medicine, Volume 13, Pages 204–208. Databáze online [cit. 2017-02-15]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472029912000355

MORANDI, S., BRASCA, M., ANDRIGHETTO, DH., LOMBARDI, A., LODI, R., 2006: *Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from north–west Italian dairy products*. International Dairy Journal 16, 867–875. Databáze online [cit. 2016-12-14]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694605001780

MORENO M., R., F., SARANTINOPOULOS P., TSAKALIDOU E., DE VUYST L., 2006: *The role and application of enterococci in food and health*. International Journal of Food Microbiology, volume 106, issue 1, pages 1 – 24. Databáze online [cit. 2016-12-14]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816050500406X

MOSKOWITZ, Howard R a Michele REISNER. *Packaging research in food production design and development*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2009. ISBN 978-0-8138-1222-9.

NUÑEZ M., A. DEL OLMO, CALZADA J., 2016: *Biogenic Amines. Reference Module in Food Science, Encyclopedia of Food and Health*, Pages 416–423. Databáze online [cit. 2016-12-17]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472000702

OGIER, J., SERROR, P., 2008: *Safety assessment of dairy microorganisms: The Enterococcus genus*. International Journal of Food Microbiology, Volume 126, Issue 3, Pages 291–301. Databáze online [cit. 2016-12-13]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160507004473

PANAHI Y., AKHAVAN A., SAHEBKAR A., HOSSEINI S., M., TAGHIZADEH M.,AKBARI H., SHARIF M. R., IMANI S., 2014: *Investigation of the effectiveness of Syzygium aromaticum, Lavandula angustifolia and Geranium robertianum essential oils in the treatment of acute external otitis: A comparative trial with ciprofloxacin.* Journal of Microbiology, Immunology and Infection, volume 47, 211-216. Databáze online [cit. 2017-02-23]. Dostupné z: www.ejmii.com/article_pdf.php?code=PDT539aa8ffc0635

PECARSKI D., KETIN S., OMEROVIC I., MIRKOVIC M., JUGOVICZ., BIOCANIN R., 2016: *Chemical compositions and antimicrobial activities of oregano and thyme essential oils*. *Bulgarian Chemical Communications, Volume 48, Number 4 (pp. 678 – 683).* Databáze online [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/312054579_Chemical_compositions_and_antimicrobial_activities_of_oregano_and_thyme_essential_oils

PESAVENTO G., CALONICO C., BILIA A., R., BARNABEI M., CALESINI F., ADDONA R., MENCARELLI L., CARMAGNINI L., DI MARTINO M.C., LO NOSTRO A., 2015: *Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes in beef meatballs*. Food Control, volume 54, peges 188e199. Databáze online [cit. 2017-02-28]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095671351500078X

PESAVENTO G., CALONICO C., BILIA A.R., BARNABEI M., CALESINI F., ADDONA R., MENCARELLI L., CARMAGNINI L., DI MARTINO M.C., LO NOSTRO A., 2015: *Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes in beef meatballs*. Food Control, volume 54, pages 188-199. Databáze online [cit. 2017-04-15]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095671351500078X

POLJAK V., KRČ I., EHRMANN J., 2000: *Manuál infekčních nemocí*. 1. vyd. Březsko: SOLEN, 256 s., 38 s. barev. obr. příl. ISBN 80-238-5834-3.

PÜSSA T., 2008: *Principles of food toxicology*. Boca Raton: CRC Press, 321 s. ISBN 978-0-8493-8090-7.

RADAELLI A., M., PARRAGA DA SILVAA B., WEIDLICHA L., HOEHNEB L., FLACHC A., ALVES DA COSTAC L., A., M., ETHUR E. M., 2016: *Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against Clostridium perfringens*. Brazilian Journal of Microbiology, volume 47, issue 2, pages 424–430. Databáze online [cit. 2017-02-22]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838216000617

REJCHRTOVÁ E., SLÁDKOVÁ P., KOMPRDA T., ZORNÍKOVÁ G., 2011; *Determination of dekarboxylase activity the selected bacteria hazarrdous*, Mendel net. Databáze online [cit. 2016-12-16]. Dostupné z: https://mnet.mendelu.cz/mendelnet2011/articles/26_rejchrtova_482.pdf

ROBERTSON, Gordon L., ed. *Food packaging and shelf life: a practical guide*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2010. ISBN 9781420078459.

ROZSYPAL S., 1981: *Obecná bakteriologie*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 749 s.

RUŽBARSKÝ, Juraj a Bořivoj GRODA. *Potravinárska technika*. Prešov: Fakulta výrobných technológií so sídlom v Prešove, 2005. ISBN 80-8073-410-0.

SEDLÁČEK, I., 2007? *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd., Brno: Masarykova univerzita, 270 s. ISBN 978-80-210-4207-0.

SELIM S., 2011: *Antimicrobial activity of essential oils against vankomycin-resistant Enterococci (VRE) and Escherichia coli O157:H7 feta soft cheese and minced beef meat*. Brazilian jaournal of microbiology, Volume 42, Issue 1, pages 187-196. Databáze online [cit. 2017-04-14]. Dostupné z: http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=S2D8SmJ2HsFidyZaMmp&page=1&doc=8

SHALABY, R., A., 1996: *Significance of biogenic amines to food safety and human health*. Food Research International 29, 675-690. Databáze online [cit. 2016-12-06]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399699600066X

SCHINDLER, J., 2010: *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 223 s. ISBN 978-80-247-3170-4.

SIEWERT, Aruna M. Rostlinná antibiotika: tajné zbraně přírody. Přeložil Jana PECHAROVÁ. V Bratislavě: Noxi, 2015. ISBN 978-80-8111-305-5.

SILLA SANTOS, H., M., 1996: *Biogenic amines: thein importace in food.* International Journal of Food Microbiology 29, 213-231. Databáze online [cit. 2016-12-11]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168160595000321

SILVA N., SANTOS T., MARINHO C., SOUSA M., TEIXEIRA J., GONZALEZ D., CORREIA E., IGREJAS G., POETA P., 2016: *Effect of Mediterranean Oils and Spices against Food-Related Pathogenic Bacteria*. Research & Reviews: Journal of Food and Dairy Technology, Volume 4 | Issue 3. Databáze online [cit. 2017-04-14]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/308971266_Effect_of_Mediterranean_Oils_and_Spices_against_Food-Related_Pathogenic_Bacteria

SPANO G., RUSSO P., LONVAUD-FUNEL A., LUCAS P., ALEXANDRE H., GRANDVALET ., COTON E., COTON M., BARNAVON L., BACH B., RATTRAY F., BUNTE A., MAGNI C., LADERO V., ALVAREZ M., FERNÁNDEZ M., LOPEZ P., DE PALENCIA P.,F., CORBI A., TRIP H. AND LOLKEMA J., S., 2010: *Biogenic amine in fermented foods*. Databáze online [cit. 2016-12-18]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/47661748_Biogenic_amine_in_fermented_foods

ŠEVČÍK P., ČERNÝ V., VÍTOVEC J., 2003: *Intenzívní medicína*. 2., rozš. vyd. Praha: Galén, 422 s. ISBN 80-7262-203-x.

ŠKRINJAR M., M., NEMET N., T., 2009: *Antimicrobial effects of spices and herbs essential oils*. APTEFF, 40, 1-220. Databáze online [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/1450-7188/2009/1450-71880940195S.pdf

ŠTENCL j., 2013: *Balení potravin*, KA2340/3-1, Databáze online [cit. 2017-03-08]. Dostupné z: www: http://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/13-bp_e-opora2.pdf

ŠVEC P., 2012: *Taxonomie a ekologie rodu Enterococcus*. In Mikrobiológia vody a životného prostredia 2012. Banská Bystrica: Československá spoločnosť mikrobiologická. s. 167-170, 4 s. ISBN 978-80-971197-2-0. Databáze online [cit. 2016-12-19]. Dostupné z: http://www.sci.muni.cz/ccm/downl/public/Poster_Enterococccus_Smokovec2012.pdf

TOFALO R. , PERPETUINI G., SCHIRONE M., SUZZI G., 2015: *Biogenic Amines: Toxicology and Health Effect*:, Current as of 18 September 2015, Databáze online [cit. 2016-12-18]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/301702273_Biogenic_Amines_Toxicology_and_Health_Effect

VELÍŠEK, J., *Chemie potravin*. 2. Vyd. 2., upr. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-86659-01-1.

VILELA J., MARTINSA D., MONTEIRO-SILVAB F., GONZÁLEZ-AGUILARB G., ALMEIDAB J., SARAIVA C., 2016: *Antimicrobial effect of essential oils of Laurus nobilis L. and Rosmarinus officinallis L. on shelf-life of minced "Maronesa" beef stored under different packaging conditions*. Food Packaging and Shelf Life 8, pages 71–80. Databáze online [cit. 2017-02-28]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214289416300291

VOS, Paul De., 2009: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York: Springer, 1450 s. ISBN 978-0-387-95041-9.

VOTAVA M., BROUKAL Z., VANĚK J., 2007: *Lékařská mikrobiologie pro zubní lékaře*. Brno: Neptun, 567 s. ISBN 978-80-86850-03-0.

WENZEL, Melanie. Léčivé rostliny: nejlepší využití pro zdraví celé rodiny. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-5155-9.

ZAOUALI Y., BOUZAINE T., BOUSSAID M., 2010: *Essential oils composition in two Rosmarinus officinalis L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities,* Food and Chemical Toxicology 48, pages 3144–3152. Databáze online [cit. 2017-02-21]. Dostupné z: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S027869151000520X

# 8 SEZNAM OBRÁZKŮ


- Obr. č. 1 *Enterococcus faecalis* (Zdroj: http://www.pixnio.com/science/microscopy-images/large-numbers-of-gram-positive-enterococcus-faecalis-sp-bacteria)
- Obr. č. 2 *Enterococcus faecium* (Zdroj: https://m.indiamart.com/proddetail.php?i=4758151362)
- Obr. č. 3 Počet *E. faecalis* v - log KTJ/g u vzorků debrecínských párků, skladovaných 7 dní při 4 - 6 °C
- Obr. č. 4 Počet *E. faecalis* v - log KTJ/g u vzorků debrecínských párků, skladovaných 9 dní při 4 - 6 °C
- Obr. č. 5 Počet *E. faecalis* v - log KTJ/g u vzorků debrecínských párků, skladovaných 15 dní při 4 - 6 °C
- Obr. č. 6 Počet *E. faecalis* v KTJ/g u vzorků debrecínských párků, skladovaných 7, 9, 15 dní při 4 - 6 °C

# 9 SEZNAM TABULEK


- Tab. č. 1 Použité silice a jejich koncentrace
- Tab. č. 2a Rozměry inhibičních zón vytvořených vzorky testovaných fólií v přímém kontaktu s inokulovaným mikroorganismem (kultivace: 48 hodin, 37 °C; inokulum: 0,1 ml 1 McF)
- Tab. č. 2b Rozměry inhibičních zón vytvořených vzorky testovaných fólií bez kontaktu s inokulovaným mikroorganismem (kultivace: 48 hodin, 37 °C; inokulum: 0,1 ml 1 McF)
- Tab. č. 3a Rozměry inhibičních zón vytvořených vzorky testovaných fólií v přímém kontaktu s inokulovaným mikroorganismem (kultivace: 48 hodin, 37 °C; inokulum: 0,1 ml $10^{-3}$ McF)
- Tab. č. 3b Rozměry inhibičních zón vytvořených vzorky testovaných fólií bez kontaktu s inokulovaným mikroorganismem (kultivace: 48 hodin, 37 °C; inokulum: 0,1 ml $10^{-3}$ McF)
- Tab. č. 4 Porovnání všech výsledných hodnot intenzity inhibičního účinku na růst *E. faecalis*.
- Tab. č. 5 Počty mikroorganismů ve vzorcích debrecínských párků v době při založení pokusu (0. den) v KTJ/g
- Tab. č. 6 Průměrný počet mikroorganismů (CPM) ve všech vzorcích při založení pokusu (0. den) v KTJ/g
- Tab. č. 7 Počty mikroorganismů ve vzorcích debrecínských párků 2. den od založení experimentu v KTJ/g
- Tab. č. 8 Počty mikroorganismů ve vzorcích debrecínských párků 5. den od založení experimentu v KTJ/g
- Tab. č. 9 Tab. č. 8 Počty mikroorganismů ve vzorcích debrecínských párků 7. den od založení experimentu v KTJ/g
- Tab. č. 10 Tab. č. 8 Počty mikroorganismů ve vzorcích debrecínských párků 9. den od založení experimentu v KTJ/g
- Tab. č. 11 Tab. č. 8 Počty mikroorganismů ve vzorcích debrecínských párků 15. den od založení experimentu v KTJ/g

- Tab. č. 12 Výsledky měření počtu mikroorganismů balených jiným způsobem v KTJ/g.

# 10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- BA ... Biogenní aminy
- CPM ... Celkové množství mikroogranismů
- EI ... Infekční endokarditida
- kb ... Kilobáze
- KTJ; cfu ... kolonii tvořící jednotka
- McF ... McFarland
- MIC ... Minimální inhibiční koncentrace
- MO ... Mikroorganismus
- PCA ... Plate count agar
- PET ... Polyethylenterefltalát
- SD ... Směrodatná odchylka
- TBS ... Tryptózo-sójový bujón
- UV ... Ultrafialové záření
- VRE ... Vankomycin-rezistentní enterokoky