

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Identifikace a kvantifikace vybraných skupin bakterií  
v medu s různým geografickým původem**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Karolína Konopásková**

**Obor studia: Výživa a potraviny**

**Vedoucí práce: Ing. Zuzana Hroncová, Ph.D.**

© 2017 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Identifikace a kvantifikace vybraných skupin bakterií v medu s různým geografickým původem" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10. 4. 2017\_\_\_\_\_

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Zuzaně Hroncové, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí pomoci, mnoha cenných rad a času, který mi věnovala. Díky patří také mé rodině za podporu při mém studiu.

# Identifikace a kvantifikace vybraných skupin bakterií v medu s různým geografickým původem

## Souhrn

Med je vzácný přírodní produkt, jehož léčivé účinky jsou známy již po tisíciletí. Vyznačuje se antioxidačním, protizánětlivým a antibakteriálním působením, zvyšuje přilnavost kožních štěpů, podporuje proces hojení ran a slouží jako prevence proti kašli. Dietetický význam medu ovlivňuje široké spektrum biologicky aktivních látek. Kromě sacharidů, vody, dusíkatých látek, vitaminů, minerálních látek a fenolických sloučenin, obsahuje med také množství bakterií. Bakteriální společenstva do medu přecházejí především z trávicího traktu včel a z květů rostlin. Mají rozsáhlé uplatnění a zahrnují také probiotické druhy, laktobacily a bifidobakterie, které jsou důležité z pohledu lidské výživy. Hlavním cílem této diplomové práce bylo porovnat mikrobiotu převážně českých medů pocházejících z různých stanovišť na základě identifikace bakteriálního spektra a kvantifikace vybraných skupin bakterií, jelikož byl předpokládán vliv stanoviště na bakteriální složení medu.

V rámci naší studie bylo sledováno 40 vzorků medu z České republiky a 7 vzorků medu ze zahraničí (Řecka, Slovinska, Ukrajiny a Slovenska). Vybrané bakteriální skupiny (Actinobacteria, Firmicutes a Gammaproteobacteria) byly kvantifikovány pomocí qRT-PCR s použitím specifických primerů. Pro zjištění rozdílů mezi medy z různých úlů a následnou identifikaci vybraných druhů bakterií byl použit denaturační gradient gelové elektroforézy (DGGE). Výsledné gely byly srovnány pomocí programu BioNumerics 6.6. Následně byla data statisticky vyhodnocena a graficky zobrazena pomocí IBM SPSS Statistics 24.

Mikrobiota medu se nejvíce lišila v počtu aktinobakterií. Nejmenší výkyvy byly zaznamenány u gammaproteobakterií. Ve vzorcích byly identifikovány 3 probiotické druhy (*L. acidophilus*, *L. plantarum* a *B. asteroides*), které jsou svou ochranou a nutriční funkcí významné pro člověka. Med díky obsahu biologicky aktivních struktur, tvoří důležitou a tradiční složku našeho jídelníčku. Hypotéza této diplomové práce, že se mikrobiota medu mění v závislosti na lokalitě úlu, byla potvrzena.

**Klíčová slova:** med, mikrobiota, DGGE, qPCR

# Identification and quantification of selected bacterial groups in honeys from different localities

## Summary

Honey is a unique natural product, which has been known for its medicinal properties for a thousand years. Honey has antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial effect. Honey also increases the adhesion of skin grafts, supports wound healing process and helps to prevent cough. The dietetic importance of honey affects a broad spectrum of biological active components such as carbohydrates, water, proteins, vitamins, minerals, phenolic compounds and amount of bacteria. Bacterial communities in honey are primarily from the digestive tract of honeybees and nectar sources. These bacteria have an extensive application and include probiotic species (lactobacilli and bifidobacteria) which have a potentially beneficial effect on human health. The main aim of this thesis was compare the microbiota of Czech honeys from different habitats by identification of the bacterial spectrum and quantification selected groups of bacteria, as it is believed that habitat have affect on bacterial composition of honey.

Within this study, we analysed forty samples of honey from the Czech Republic and seven samples of honey from Greece, Slovenia, Ukraine and Slovakia. The bacterial groups including Actinobacteria, Firmicutes and Gammaproteobacteria were quantified using qRT-PCR with specific primers. To determine the differences between honeys from different bee hives and to identify subsequent of selected bacteria species we used denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The gels were compared using BioNumerics 6.6. The data were follow-up statistically evaluated and graphically processed using IBM SPSS Statistics 24 program.

Microbiota of honey was the most varied in the quantity of Actinobacteria. The smallest differences between bacteria quantity were found in Gammaproteobacteria group. In the samples were identified three probiotic species (*L. acidophilus*, *L. plantarum* and *B. asteroides*), which have protective and nutritional benefits for human. Honey is due the content of bioactive compounds, important and traditional component of healthy diet. Hypothesis of this thesis was confirmed, the microbiota of honey varies depending on the location of bee hive.

**Keywords:** honey, microbiota, DGGE, qPCR

# Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíl práce .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Hypotéza.....</b>	<b>2</b>
<b>2.2 Cíl práce .....</b>	<b>2</b>
<b>3 Literární rešerše .....</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Charakteristika a historie medu .....</b>	<b>3</b>
3.1.1 Definice medu.....	4
<b>3.2 Zdroje pro tvorbu medu.....</b>	<b>5</b>
3.2.1 Nektar.....	5
3.2.2 Medovice .....	6
<b>3.3 Druhy medu .....</b>	<b>7</b>
<b>3.4 Fyzikální vlastnosti medu .....</b>	<b>8</b>
3.4.1 Elektrická vodivost .....	8
3.4.2 Optická otáčivost .....	8
3.4.3 Barva.....	9
3.4.4 Kyselost a pH.....	9
3.4.5 Vlhkost.....	9
3.4.6 Obsah popela.....	10
<b>3.5 Chemické složení medu.....</b>	<b>10</b>
3.5.1 Voda.....	10
3.5.2 Sacharidy .....	11
3.5.3 Dusíkaté látky .....	12
3.5.4 Vitaminy .....	14
3.5.5 Minerální látky.....	15
3.5.6 Kyseliny .....	16

3.5.7	Aromatické látky.....	16
3.5.8	Barviva.....	16
3.5.9	Hydroxymethylfurfural (HMF).....	17
<b>3.6</b>	<b>Mikrobiota medu.....</b>	<b>18</b>
3.6.1	Antibakteriální aktivita medu .....	20
3.6.2	Mikrobiální biofilm.....	22
<b>3.7</b>	<b>Mikrobiální kontaminace .....</b>	<b>23</b>
<b>3.8</b>	<b>Med ve výživě a zdraví.....</b>	<b>25</b>
3.8.1	Med a glykemický index.....	25
3.8.2	Antioxidační účinky medu.....	26
3.8.3	Med při hojení ran.....	26
3.8.4	Med v prevenci proti kašli .....	27
3.8.5	Kojenecký botulismus.....	27
3.8.6	Med jako probiotikum a prebiotikum .....	28
<b>4</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>30</b>
4.1.1	Příprava vzorku.....	30
4.1.2	Izolace DNA .....	31
4.1.3	Elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu (DGGE) .....	31
4.1.4	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qRT-PCR) .....	33
4.1.5	Statistická analýza.....	33
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>48</b>
<b>8</b>	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>49</b>
<b>9</b>	<b>Samostatné přílohy .....</b>	<b>72</b>

# 1 Úvod

Včelí med je cenný přírodní produkt s dlouhou historií. Tradice jeho konzumace a používání v medicíně je společným znakem pro země a národy po celém světě. Pozornost včetně významu medu ve stravě podtrhuje i fakt, že jeho kvalitě se věnuje nejen evropská legislativa, ale i mezinárodní norma Codex Alimentarius.

Přestože je med velmi oblíbenou složkou jídelníčku, v České republice je jeho spotřeba v porovnání se sousedními zeměmi nevyrovnaná a nízká, i když se od roku 1990 čtyřikrát zvýšila. Dle Českého statistického úřadu činila spotřeba medu v roce 2015 1 kg na osobu, zatímco v sousedním Německu byla jeho spotřeba asi 2 kg na osobu za rok a v Rakousku 1,4 kg na osobu za rok.

Ve výživě je med zdrojem širokého spektra látek, které byť jsou v malém množství, mají vliv na organismus člověka. Kromě sacharidů, vody, dusíkatých látek, vitaminů, minerálních látek a další bioaktivních struktur obsahuje i množství bakterií, které ho mohou obohatit nejen z pohledu konzumenta, ale také rozšiřují jeho použití. Prospěšné bakterie do medu přecházejí především z trávicího traktu včel a z květů rostlin. V těle včel mají tyto probiotické druhy ochrannou a nutriční funkci, v medu tvoří mikrobiotu, která se nejspíše není schopná množit, avšak své ostatní vlastnosti si zachovává. Z pohledu člověka jsou důležité laktobacily a bifidobakterie, jejichž živé buňky byly detekovány v čerstvém medu.

Bakteriální společenstva v medu mají rozsáhlé uplatnění a jejich role je předmětem současného výzkumu. Tato diplomová práce je zaměřená na identifikaci a kvantifikaci vybraných skupin bakterií převážně v českých medech pocházejících z různých stanovišť, vzhledem k předpokládanému vlivu stanoviště na bakteriální složení medu.



## **2 Vědecká hypotéza a cíl práce**

### **2.1 Hypotéza**

Mikrobiota medu se mění v závislosti na lokalitě úlu.

### **2.2 Cíl práce**

Cílem této diplomové práce je porovnat mikrobiotu medů pocházejících z různých stanovišť na základě identifikace bakteriálního spektra a kvantifikace vybraných skupin bakterií.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Charakteristika a historie medu

Včely a lidi spojuje historie dlouhá miliony let. Podobně jako člověk, nejspíše i včely pocházejí z Afriky, odkud se rozšířily i na ostatní kontinenty. Není proto překvapivé, že je med jednou z nejstarších složek lidské stravy (Čermáková et al., 2010). Jak dokazují jeskynní malby, lidé vybírali včelám med už v době kamenné (Gustin, 2010). Včely postupem času měnily svá obydlí. Nejprve žily v různých terénních nerovnostech. V zalesněné krajině jim jako obydlí sloužily také dutiny stromů-brtě, ze kterých lidé-brtníci vybírali plástve s medem divokých včel (Šefčík, 2014). Zpočátku lidé nejspíše vybírali med z opuštěných dutin, jelikož sběrem medu i s plásty většinou dochází k nenávratnému poškození včelstva. Člověk se proto naučil využívat divoká včelstva k pravidelnému sběru medu tak, že jim vždy při sběru ponechal část medu, kterou včely potřebují pro přežití (Blažková, 2006). Od dob vypalování pralesů mají včely geneticky zakódovaný útek před kouřem. Brtníci o této skutečnosti věděli, a tak k vytvoření kouře a získání medu používali různé dýmáky (Šefčík, 2014).

Když lidé zjistili, jaké blahodárné účinky má med na lidský organismus, začali stěhovat včely blíže ke svým obydlím (Gustin, 2010). První zmínky o chovu včel pocházejí ze starověkého Egypta, kde již 4000 let př. n. l. byly včely chovány v hliněných nádobách. Med v Egyptě kněží používali při různých obřadech, ke krmení posvátných zvířat a na konzervaci těl při balzamování. Stará egyptská pověst praví, že včely jsou oživené slzy boha slunce Re, které spojují božstvo s královským palácem (Čermáková et al., 2010). Znalosti o chovu včel se z Egypta postupně rozšířily do oblasti východního Středomoří, přes Palestinu, Kypr, Řecko, až do Itálie. Chov včel v uměle vytvořených schránkách znali také Asyřané, Babylóňané a Féničané (Blažková, 2006).

V mytologii starého Řecka byl med pokrmem bohů. Sám Zeus byl jako dítě odchovaný nymfami medem a mlékem. Později použil toxický med z rododendronu proti svému otci Kronovi, který ze strachu, že ho jeho děti jednoho dne připraví o vládu, všechny snědl. Nejmladší Kronův syn Zeus hrozbě unikl, a když dospěl, podstrčil svému otci med z rododendronu, který nutí ke zvracení. Kronos vyvrhl všechny Diovy sourozence, a ti se společně dali do boje proti svému otci (Čermáková et al., 2010). Mezi řecké autory, kteří ve svých spisech zmiňují včelařství, patří například Hesiodos, který popisoval roku 700 př. n. l. klenuté úly. Avšak dlouho nepřekonatelným a významným dílem o včelách

a včelaření vytvořil ve 4. století př. n. l. Aristoteles. Římané jako součást svého systému zemědělského hospodaření chovali včely v úlech v zahradách, sadech, parcích i v blízkosti obytných vil. Římané, stejně jako Egypťané či Řekové, považovali včely za božská, neposkvrněná stvoření a toto uznání v jisté míře přetrvalo i v následující křesťanské éře evropské historie, až do 20. století (Blažková, 2006).

Dlouhou historii konzumace medu a jeho vysokou cenu vysvětluje i fakt, že pro evropskou populaci byl med jediným snadno dostupným sladidlem před vyvinutím metody rafinace cukru z cukrové řepy či cukrové třtiny (Voorhies et al., 1933). Není proto překvapivé, že i dnes je nejvyšší celosvětová spotřeba medu v Evropské unii (EU), která zároveň tvoří 22 % světové produkce medu (Vanhanen et al., 2011). Med slouží k přímé spotřebě, anebo se využívá jako průmyslový med při výrobě potravin. V EU pokrývá průmyslový med 10 % celkové spotřeby, což je odlišné například od Spojených států amerických (USA), kde průmyslový med pokrývá 60–80 % celkové spotřeby medu (Ward a Boynton, 2010).

Spotřeba medu v České republice (ČR) činí 1 kg medu na obyvatele za rok a trend spotřeby medu se mírně zvyšuje (Dupal et al., 2015). Mírné zvyšování spotřeby medu lze přikládat propagaci prodeje medu ze dvora. Ministerstvo zemědělství se v poslední době snaží podporovat rozvoj včelařství, jelikož v závěru roku 2012 stav včelstva v ČR čítal 540 705 včelstev, což ve srovnání s rokem 1993 znamenalo pokles včelstev zhruba o třetinu. K významnému snížení počtu včelařů a včelstev došlo v devadesátých letech především kvůli ekonomické situaci, nikoliv kvůli situaci zdravotní jako v ostatních státech Evropy. Kritickým rokem pro naši zemi však byl rok 2008, kdy počet včelstev poklesl kvůli onemocnění varroózou na 461 086 (Eagri, 2013). Tuto situaci se podařilo postupně vyrovnat, díky nárůstu počtu mladých včelařů a podpoře Ministerstva zemědělství ve spolupráci s Českým svazem včelařů a na konci září 2014 stavy dosáhly počtu 603 392 včelstev (Eagri, 2015).

### **3.1.1 Definice medu**

Med je přírodní sladká látka tvořená včelami sběrem, přeměnou, uskladněním, dehydratací a zráním nektaru rostlin, výměšků rostlin či výměšků hmyzu žijícího na rostlinách (Codex Alimentarius, 1987). Jedná se o substanci tvořenou převážně vodou, fruktosou a glukosou. Mezi další vedlejší složky medu patří proteiny, volné aminokyseliny, vitaminy, pigmenty, těkavé sloučeniny a ostatní látky zodpovědné za nutriční a organoleptické

vlastnosti medu (Consonni a Cagliani, 2008). Barva, vůně a chuť medu určená fyzikálně-chemickými vlastnostmi je specifická pro botanický i geografický původ medu (del Campo et al., 2016). Dle mezinárodních standardů Codex Alimentarius (1987) se zbarvení medu pohybuje v široké škále od téměř bezbarvé až po tmavě hnědou barvu. Konzistence medu může být tekutá, viskózní, částečně až zcela krystalická.

Hygienickou nezávadnost medu v České republice pravidelně kontroluje Státní veterinární správa. Požadavky na jakost, označování a členění medu určuje Vyhláška č. 76/2003 Sb. Ministerstva zemědělství, která stanovuje požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony.

## **3.2 Zdroje pro tvorbu medu**

Rozlišujeme mezi dvěma typy medů. Prvním druhem medu je květový med, který je včelami produkován z nektaru rostlin. Druhým typem je med medovicový, jenž pochází z výměšků rostlin nebo výměšků hmyzu sajícího na rostlinách. Rozlišování těchto medů vzniklo především jako reakce na požadavky spotřebitelů, jelikož v některých zemích konzumenti preferují med květový a v jiných naopak medovicový (Prodolliet a Hischenhuber, 1998). Pro odlišení medovicových a květových medů slouží charakteristika jejich pH, kyselosti, obsahu popela, barvy a elektrické vodivosti (Campos et al., 2001). Využitím vztahu mezi pH, obsahem popela a množstvím redukujících cukrů jako rejstříku pro odlišení dvou typů medů, se ve své studii zabývali Kirkwood et al. (1960). Oba druhy medu mají také svou specifickou optickou rotaci, která souvisí s odlišným obsahem sacharidů (White Jr, 1980). Medovicové medy mají nižší obsah glukosy a fruktosy a naopak vyšší obsah oligosacharidů melezitosy a erlosy (Földházi, 1994). Sacharidový profil medu je proto dalším užitečným znakem pro odlišení těchto medů (Weston a Brocklebank, 1999). Nicméně pro správnou klasifikaci medů nestačí znát pouze obsah monosacharidů a oligosacharidů (Sanz et al., 2005), ale je nutné porovnat i další charakteristické vlastnosti.

### **3.2.1 Nektar**

Nektar je sladká tekutina, kterou produkují nektária rostlin (části květu), které lákají hmyz k opylení (Gustin, 2010). Na produkci může rostlina využít až 37 % své energie (Southwick, 1984). Primárně se jedná o vodný roztok jednoduchých sacharidů sacharosy,

fruktosy a glukosy, který je živočichy snadno přeměněn na energii (Nicolson, 2007). Nektar je proto považován za jakousi alimentární odměnu pro široké množství opylovačů. Dalším jeho úkolem je obrana proti bakteriální invazi a úprava sacharidového profilu po sekreci (Nepi et al., 2012). Kromě jednoduchých cukrů obsahuje i malé množství minerálů, vitaminů, organických kyselin a aromatických látek. Složení nektaru je však odlišné a ovlivněné původem (Havlík et al., 2009).

Včela po nasednutí na květ rostliny jazýčkem nasaje kapku nektaru, kterým si naplňuje medný váček, a když má váček naplněn, vrací se zpátky do úlu. Nektar zpočátku obsahuje 50–80 % vody, která se během letu odpařuje, čímž se roztok koncentruje (Gustin, 2010). Už při spolknutí se nektar obohacuje o výměšky ze slinných žláz včely, donesená kapka je spolknuta a předávána dál ještě několikrát. Tímto procesem se spouští chemicko-fyzikální děje, při kterých dochází ke štěpení vyšších sacharidů a disacharidů na jednoduché cukry, jelikož slinné žlázy včel obsahují invertasu. Zralý nektar (řídový med) je včelami ukládán do buněk plástu, kde dochází ke zrání. Při zrání se med zahušťuje snížením obsahu vody, čímž se vytvoří vysoký osmotický tlak a takto konzervován poskytuje včelám zásobu energie během zimních měsíců, kdy je nedostatek čerstvého nektaru (Havlík et al., 2009).

### **3.2.2 Medovice**

Zdrojem pro vznik medovice je míza proudící sítkovicemi rostliny, kterou vysávají producenti medovice, stejnokřídlý hmyz (Homoptera) a to především mšice (Aphidoidea), červci (Coccoidea) a mery (Psylloidea). Míza proudí do těla hmyzu ve velkém množství a vchází do tzv. filtrační komory, kde se oddělují sacharidy od bílkovin. Sacharidy jsou poté vylučovány zvláštní žlázou na listy a jehličí stromů. Vyloučené kapky, které hmyz rozptýlil, sbírají včely, které medovici přetvářejí na med (Gustin, 2010). Medovicové medy mají tmavší barvu, charakteristické chuťové vlastnosti a delší dobu nepodléhají krystalizaci. Mezi konzumenty jsou známy jako medy lesní (Šefčík, 2014). Medovicový med obsahuje minimální množství pylových proteinů a vysoký podíl polyfenolických látek s antioxidačními a antimikrobiálními účinky. V poslední době probíhají klinické studie zaměřené na potvrzení těchto účinků na hojení různých druhů závažných a dlouhodobých ran, jak pooperačních, tak například i diabetických vředů (Majtán, 2013).

### 3.3 Druhy medu

V České republice se dle legislativy med člení podle původu na med květový a med medovicový. Vyhláška podle způsobu získávání a úpravy rozlišuje: vytočený med, plástečkový med, lisovaný med, vykapáný med, med s plástečky, filtrovaný med a pastový med.

Dle vyhlášky č. 76/2003 Sb. pastový med tvoří směs jemných krystalů, jelikož je po získání upraven do pastovité konzistence. Vytočený med je získán odstřediváním odvíčkových bezplodových plástů. Plástečkový med je uložen a zavíčován včelami do bezplodových plástů, které jsou čerstvě postaveny na mezistěnách vyrobených výhradně ze včelího vosku nebo bez nich a prodáván je v uzavřených celých plástech nebo dílech takových plástů. Vykapáný med je získán vykapáním odvíčkových bezplodových plástů. Med s plástečky obsahuje jeden nebo více kusů plástečkového medu. Lisovaný med je získán lisováním bezplodových plástů při mírném záhřevu do 45 °C nebo bez použití tepla. Filtrovaný med je po získání upraven odstraněním cizích organických či anorganických látek způsobem, při kterém dochází k významnému odstranění pylu. Pekařský neboli průmyslový med je určen výhradně pro průmyslové použití nebo jako složka do jiných potravin, může obsahovat cizí příchut' či pach, vykazovat počínající kvašení nebo mohl být podroben záhřevu.

Druhy medu se také odlišují podle původu nektaru. Hlavními medonosnými bylinami jsou brutnák (*Borrago officinalis*), vřes (*Calluna vulgaris*), pcháč (*Cirsium lanceolatum*, *C. arvense*), brukev řepka (*Brassica napus*), levandule (*Lavandula officinalis*), břečťan popínavý (*Hedera helix*), pampeliška (*Taraxacum officinale*), vojtěška (*Medicago sativa*), ostružník (*Rubus fruticosus*), vičenec setý (*Onobrychis sativa*), tymián (*Thymus vulgaris*) a slunečnice (*Helianthus annuus*). Mezi hlavní medonosné dřeviny řadíme hloh (*Crataegus monogyna*), hlodáš (*Ulex europaeus*), zimostřez (*Buxus sempervirens*), dub (*Quercus robur*), kaštanovník (*Castanea vulgaris*), javor (*Acer*), cesmínu (*Ilex aquifolium*), trnovník akát (*Robinia pseudoacacia*), vrbu (*Salix alba*), bez (*Sambucus nigra*), lípu (*Tilia cordata*) a jehličnaté stromy, na které mšice vylučují medovici, nejčastěji na jedli (*Abies*), smrk (*Picea*) a borovici (*Pinus*). Medy mohou být smíšené či jednodruhové (Gustin, 2010).

### 3.4 Fyzikální vlastnosti medu

Existuje mnoho fyzikálních parametrů pro klasifikaci medu. Mezi hlavní parametry rozlišující druhy medu patří elektrická vodivost, specifická rotace, obsah popela a pH (Ouchemoukh et al., 2007).

#### 3.4.1 Elektrická vodivost

Elektrická vodivost je dobrým ukazatelem botanického původu medu. Používá se rutinně při kontrole kvality medu a pro odlišení medovicového a nektarového medu (Pita-Calvo a Vázquez, 2016). Měření elektrické vodivosti je založeno na stanovení elektrického odporu. V EU podle Směrnice Rady 2001/110/ES ze dne 20. prosince 2001 o medu, nesmí být elektrická vodivost nektarových medů a směsí z nich menší než 0,8 mS/cm. Výjimku tvoří planika velkoplodá (*Arbutus unedo*), vřesovec (*Erica*), blahovičnick (*Eucalyptus*), lípa (*Tilia* spp.), vřes (*Calluna vulgaris*), balmín (*Leptospermum*), kajeput (*Melaleuca* spp.), kromě uvedených i medovicový, kaštanový med, a směs těchto medů s medem květovým nesmí mít elektrickou vodivost menší než 0,8 mS/cm. Pro odhad procentuálního obsahu medovice v medu byla vyvinuta matematická rovnice, která vychází z elektrické vodivosti a procentuálního obsahu fruktosy a glukosy (Soria et al., 2005).

#### 3.4.2 Optická otáčivost

Specifická rotace tedy schopnost medu otáčet rovinu polarizovaného světla, závisí na zastoupení cukrů v něm. Nektarové medy stáčejí rovinu polarizovaného světla doleva. Naopak medy medovicové a falšované obvykle stáčejí rovinu polarizovaného světla doprava. Levotočivost nektarových medů je způsobena převahou fruktosy v medu, jelikož fruktosa má negativní specifickou rotaci ( $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -92,4^\circ$ ), na rozdíl od glukosy ( $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +52,7^\circ$ ). Medovicové medy obvykle obsahují nižší množství fruktosy a obsahují melezitosu ( $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +88,2^\circ$ ) či erlosu ( $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +121,8^\circ$ ), které společně s glukosou určují stáčení polarizovaného světla doprava (Garcia-Alvarez et al., 2002). Ke stanovení optické otáčivosti slouží polarimetry.

### 3.4.3 Barva

Barva medu je závislá na jeho stáří a druhu rostlin, ze kterých pochází nektar (Boffo et al., 2012). Pro jednodruhové medy je určení jejich barvy užitečným klasifikačním kritériem. Například z nektaru tolíce vojtěšky (*Medicago sativa*) je tvořen bílý med, z vřesu obecného (*Calluna vulgaris*) červenohnědý med, z akácie (*Acacia* spp.) a citrusu (*Citrus* spp.) zase medy barvy slámové. Obecně také platí, že medovicové medy obvykle dosahují tmavší barvy než medy květové, které jsou světlejší. Barva medu není závislá pouze na jeho botanickém původu, teplotě a době skladování, ale také závisí na obsahu popela (Baltrušaitytė et al., 2007). Tmavá barva medu často koreluje s obsahem minerálií arsenu, kadmia, železa, síry, olova a vápníku (González-Miret et al., 2005).

Barva medu se vztahuje k jeho chuti. Světlé medy jsou chuťově jemnější, zatímco tmavé medy mají výraznější chuť. Světlé medy obvykle dosahují vyšší kupní ceny. Nicméně v Rakousku, Německu a Švýcarsku jsou naopak tmavé medy obzvláště ceněny. Tmavší zbarvení medu předvídá vyšší obsah derivátů fenolické kyseliny, ale nižší obsah flavonoidů, které jsou více obsaženy ve světlých medech (Bogdanov et al., 2004).

Nejčastěji používané metody pro určení barvy medu jsou založené na optickém srovnávání barvy pomocí standardu Pfund nebo Lovibond (Fell, 1978).

### 3.4.4 Kyselost a pH

Hodnota pH ovlivňuje stabilitu a skladovatelnost medu (Terrab et al., 2004). Slouží proto jako indikátor možné mikrobiální kontaminace medu (Conti, 2000). Hodnoty pH medu se pohybují v rozmezí 3,5–5,5 a jsou ovlivněny především obsahem glukonové kyseliny a anorganických iontů chloridu a fosforečnanu (Pita-Calvo a Vázquez, 2016). Volná kyselost medu by neměla být větší než 50 mekv/kg. Medovicové medy vykazují vyšší kyselost a hodnotu pH oproti medům květovým (Manzanares et al., 2011).

### 3.4.5 Vlhkost

Vlhkost medu je důležitým indikátorem jeho kvality, jelikož určuje stálost medu vůči kažení či kvašení. V EU dle Směrnice Rady 2001/110/ES nesmí být obsah vody vyšší než 20 % (Pita-Calvo a Vázquez, 2016). Dle mezinárodních standardů výjimku tvoří medy vřesu (*Calluna*), u kterých nesmí být obsah vody vyšší než 23 % (Codex Alimentarius, 1987). Jednodruhové medy vykazují typické rozdíly v obsahu vody, které ovlivňují fyzikální



vlastnosti (viskozitu a krystalizaci) a také poměr mezi obsahem glukosy a vody (Persano Oddo a Piro, 2004). Vlhkost medu se běžně stanovuje pomocí refraktometru. Hodnota vlhkosti stanovená refraktometrem je trochu nižší, než je skutečný obsah vody v medu, který lze stanovit titrací podle metody Karla Fischera (Zürcher a Hadorn, 1980).

#### **3.4.6 Obsah popela**

Obsah popela je odrazem obsahu minerálních látek v medu. Je proto považován za kritérium kvality medu. Medovicové medy obsahují zpravidla více minerálních látek než medy květové (Diez et al., 2004). Obecně květové medy obsahují asi  $\leq 0,6$  % popela a medy medovicové či směsný med z medovice a nektaru obsahují kolem  $\leq 1,2$  % popela (Ouchemoukh et al., 2007). Studie, která stanovovala obsah popela u medu z Maroka, u květových medů stanovila  $\leq 0,6$  % množství popela a u medovicových medů se obsah popela pohyboval mezi 0,64–1,1 % (Terrab et al., 2003). Jiná studie, stanovila v nektarových medech množství popela pouze 0,40 % a v medech medovicových 0,84 % (Kirkwood et al., 1960).

### **3.5 Chemické složení medu**

Med je potravina, která obsahuje přibližně 200 látek (Escuredo et al., 2013). Každá složka přítomná v medu svým chemickým chováním a strukturou ovlivňuje stabilitu medu během skladování (Da Silva et al., 2016). Vlastnosti a význam jednotlivých komponent medu jsou popsány níže.

#### **3.5.1 Voda**

Obsah vody v medu patří mezi základní parametry určení jeho kvality. Dle mezinárodních standardů by veškeré druhy medu neměly obsahovat více než 20 % vody, s výjimkou medu vřesového, který nesmí obsahovat více než 23 % vody (Codex Alimentarius, 1987).

Lepším ukazatelem kvality medu než je pouhý obsah vody je však aktivita vody  $a_w$ , která více souvisí se stabilitou, viskozitou a krystalizací medu (Abramovič et al., 2008). Aktivita vody je klíčovým faktorem při kažení medu kvašením, jelikož zodpovídá za růst mikroorganismů (Troller a Christian, 1978). Mezní hodnota aktivity vody pro růst

osmotolerantních kvasinek, které se mohou přirozeně vyskytovat v medu, je  $a_w = 0,61/0,62$  (Zamora a Chirife, 2006).

V průmyslu se však výhradně jako kritérium mikrobiální stability medu používá obsah vody, jelikož je snadno zjistitelný refraktometricky. Množství vody souvisí se zráním medu, které je ovlivněno povětrnostními podmínkami a samotným původem nektaru. Po získání medu se obsah vody v něm může také měnit vzhledem k podmínkám skladování (Zamora et al., 2006).

### 3.5.2 Sacharidy

Složení cukrů medu závisí na botanickém druhu rostlin opylených včelou a zeměpisném původu, které ovlivňuje klima (Escuredo et al., 2014) a na podmínkách zpracování a skladování (Tornuk et al., 2013). Sacharidy medu tvoří ze 75 % monosacharidy, 10–15 % disacharidy a zbytek doplňuje malé množství ostatních cukrů. Cukry přítomné v medu jsou odpovědné za jeho granulaci, viskozitu, hygroskopii a energetickou hodnotu (Kamal a Klein, 2011).

Dominantními sacharidy medu jsou fruktosa a glukosa. Téměř v každém druhu medu převládá obsah fruktosy, s výjimkou některých druhů medu z brukve řepky (*Brassica napus*), pampelišky lékařské (*Taraxacum officinale*) a trichostemy (*Trichostema lanceolatum*), kde je vyšší obsah glukosy (Cavia et al., 2002).

Koncentrace glukosy, fruktosy a poměr mezi nimi je používán jako indikátor při klasifikaci jednodruhových květových medů (Kaškonienė et al., 2010). Profil sacharidů medu z různých oblastí světa je však velmi rozmanitý. Je zastoupen fruktosou, glukosou, sacharosou, rhamnosou, isomaltosou, maltosou, maltotriosou, maltotetraosou, melezitosou, maltulosou, isomaltulosou, rafinosou a dalšími cukry (De La Fuente et al., 2011). Obsah sacharosy v medu by dle mezinárodního standardu neměl být vyšší než 5 g/100 g (Codex Alimentarius, 1987). Nežádoucí vyšší obsah sacharosy v medu než připouští norma, může být způsoben přikrmováním včel sacharosovým sirupem, falšováním nebo příliš brzkou sklizní medu, při níž nestačilo dojít k úplné přeměně sacharosy na glukosu a fruktosu (Guler et al., 2007).

U některých jednodruhových medů tolerance vojtěšky (*Medicago sativa*), trnovníku akátu (*Robinia pseudoacacia*), kopyšníku (*Hedysarum*), blahovičnicku pobřežního (*Eucalyptus camaldulensis*), banksie (*Banksia menziesii*), židelníku (*Eucryphia lucida*, *Eucryphia milligani*) a citrusu (*Citrus* spp.) mezinárodní standardy připouští vyšší obsah řepného cukru,

a to 10 g/100 g. U medu z levandule (*Lavandula* spp.) či brutnáku lékařského (*Borago officinalis*) standardy dokonce připouští obsah sacharosy nejvýše 15 g/100 g (Codex Alimentarius, 1987).

Díky enzymatické činnosti se obsah jednotlivých cukrů v medu mění. Studie Rybak-Chmielewska (2007) sledovala rozdíly v koncentraci sacharidů po ročním skladování při odlišné teplotě u vzorků medu tepelně ošetřených a neošetřených. Koncentrace sacharosy se v tepelně neošetřeném medu skladovaném při 4 °C snížila o 14 %, a u stejného vzorku se při pokojové teplotě 20 °C koncentrace snížila o 79 %. Podobné změny koncentrace byly zaznamenány i u dalších sacharidů. V porovnání s počátečním obsahem fruktosy se její obsah po skladování při 4 °C zvýšil o 4 %, a při teplotě skladování 20 °C činilo zvýšení 7 %. Koncentrace glukosy se při teplotě 4 °C zvýšila o 1,1 %, u vzorku skladovaného při 20 °C se zvýšila o 8,8 %. U tepelně ošetřených vzorků medu se procentuální podíl sacharidů při různých teplotách skladování měnil nepatrně pouze o 0,1–0,2 %, jelikož ošetření při teplotě 100 °C po dobu 15 minut způsobilo inaktivaci enzymů medu.

Při degradaci sacharidů medu vznikají produkty, které se i v ostatních potravinách vyskytují v souvislosti s neenzymatickým hnědnutím způsobeným Maillardovými reakcemi, degradací cukrů v kyselém prostředí a karamelizací. Vzniklé produkty, mezi které patří furany, slouží jako identifikační znaky neboli markery pro tepelné zpracování potravin (Moreira et al., 2010).

Tepelné zpracování medu nebo jeho dlouhodobé uchování tedy způsobuje rozklad hexos a pentos, kdy za pomalé enolizace a rychlé  $\beta$ -eliminace tří molekul vody vznikají nežádoucí sloučeniny jako furany (Chernetsova a Morlock, 2012). Mezi hlavní furany je řazen furfural, který je derivován z pentos a 5-hydroxymethylfurfural (viz kapitola 3.5.9), který je odvozen z hexos, tedy z glukosy a fruktosy (Moreira et al., 2010).

Kromě výše uvedených sloučenin rozkladem sacharidů vznikají i jiné produkty, například působením tepla a přítomností aminokyselin vzniká maltol (Jelen, 2011), isomaltol (Ota et al., 2006) a 2-acetylfuran (Wang et al., 2009), které přispívají ke změně barvy, chuti a vůně medu.

### 3.5.3 Dusíkaté látky

Med obsahuje malé množství proteinů, aminokyselin, enzymů a volných aminokyselin. Obsah proteinů v medu je závislý na druhu včely produkující med. Včela

východní (*Apis cerana*) produkuje med s obsahem proteinu 0,1–3,3 %, zatímco včela medonosná (*Apis mellifera*) vytváří med s obsahem 0,2–1,6 % proteinu (Won et al., 2009). Proteiny i aminokyseliny medu jsou živočišného i rostlinného původu, jelikož pocházejí z výměšků slinných žláz a hltanu včely, nektaru a především z pylu (Escuredo et al., 2013). Aminokyseliny v medu tvoří přibližně 1 % a jejich množství je ovlivněno zdrojem medovice nebo nektaru (Hermosín et al., 2003). Nejvíce zastoupenou aminokyselinou medu a pylu je prolin (Iglesias et al., 2006). Prolin pochází hlavně z výměšků slinných žláz včely medonosné (*Apis mellifera*) při přeměně nektaru na med. Obsah prolínu medu pokrývá 50–85 % celkového množství aminokyselin (Manzanares et al., 2014). Další aminokyseliny medu zahrnují glutamovou kyselinu, asparagovou kyselinu, glutamin, histidin, glycin, threonin,  $\beta$ -alanin, arginin,  $\alpha$ -alanin,  $\gamma$ -aminomáselnou kyselinu, prolin, tyrosin, valin, methionin, cystein, isoleucin, leucin, tryptofan, fenylalanin, ornitin, lysin, serin, asparagin a alanin (Kečkeš et al., 2013). Z těchto aminokyselin med nejběžněji obsahuje glutamovou kyselinu, alanin, fenylalanin, tyrosin, leucin a isoleucin (Di Girolamo et al., 2012). Aminokyseliny mají nezastupitelné místo ve výživě člověka. Pro lidský organismus jsou esenciální aminokyseliny: valin, leucin, isoleucin, fenylalanin, tyrosin, lysin, methionin, cystein, tryptofan a treonin. Mezi semiesenciální aminokyseliny, které mohou být za určitých situací (vážná onemocnění, podvýživa) také nezbytné pro lidský organismus patří glycin, cystein, tyrosin, arginin, prolin, histidin, glutamová kyselina, glutamin a taurin (Svačina et al., 2013). Denní potřeba aminokyselin pro dospělého člověka je pro leucin 14 mg/kg, isoleucin 10 mg/kg, lysin 12 mg/kg, methionin a cystein 13 mg/kg, fenylalanin a tyrosin 14 mg/kg, threonin 7 mg/kg, tryptofan 4 mg/kg a pro valin 10 mg/kg (Zadák, 2008). Příjem aminokyselin z medu je pro svůj nízký obsah v něm v lidské výživě zanedbatelný.

Volné aminokyseliny medu hrají roli při Maillardově reakci, kdy reagují s karboxylovou skupinou na konci redukujících cukrů. Přítomnost aminokyselin lysinu, prolínu,  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny a argininu v medu spouští první krok Maillardovy reakce, jelikož jejich přítomnost vede ke vzniku Amadoriho produktů, ze kterých se dále tvoří hnědé pigmenty melanoidiny (Iglesias et al., 2006).

Další dusíkaté látky medu jsou enzymy, které jsou tvořeny malými frakcemi bílkovin, a patří mezi ně invertasa,  $\alpha$ -glukosidasa,  $\beta$ -glukosidasa, katalasa, kyselá fosfatasa, diastasa a glukosaoxidasa (Won et al., 2009). Diastasa se skládá z  $\alpha$ -amylasy a  $\beta$ -amylasy,  $\alpha$ -amylasa hydrolyzuje  $\alpha$ -1-4-glykosidovou vazbu škrobu za vzniku dextrinu a  $\beta$ -amylasa štěpí konec řetězce, čímž vzniká maltosa (Sak-Bosnar a Sakač, 2012). V medu tento enzym indikuje sníženou jakost vzniklou ředěním či neodborným zacházením. Glukosaoxidasa přeměňuje

glukosu na  $\delta$ -glukonolakton, který se hydrolyzuje na glukonovou kyselinu a také produkuje peroxid vodíku, který má baktericidní účinky (Moreira et al., 2007). Podle obsahu a aktivity enzymů (nejčastěji diastázy) lze usuzovat stáří medu, kdy se vlivem teploty skladování jejich aktivita snižuje. Při skladování medu při teplotě 10 °C aktivita diastázy klesá na polovinu za 35 let a při teplotě 80 °C její aktivita klesá na polovinu za hodinu. Med proto můžeme dát do teplého čaje bez obav, že ztratí svou nutriční hodnotu, avšak není vhodné dávat med do čaje ihned po slití, kdy voda dosahuje bodu varu, ale teprve před konzumací, kdy je teplota čaje nižší (Dupal et al., 2015).

### 3.5.4 Vitaminy

Vitaminy jsou v medu obsaženy pouze v malé míře. Nalezneme zde vitaminy skupiny B: thiamin (B1), riboflavin (B2), niacin (B3), pantothenovou kyselinu (B5), pyridoxin (B6), biotin (B8) a listovou kyselinu (B9), které pocházejí z pylových zrn. Dále med obsahuje vitamin C. Tyto vitaminy jsou v medu uchovány díky jeho nízkému pH (Bonté a Desmoulière, 2013). Vitamin C obsahují téměř všechny druhy medu a jeho obsahu je ceněno především pro jeho antioxidační účinky. Stanovení množství vitaminu C ovšem může sloužit i jako indikátor, jelikož je velmi citlivý vůči chemické či enzymatické oxidaci a působení tepla, světla či kyslíku zrychluje jeho přeměnu (León-Ruiz et al., 2013).

Obsah vitaminů v medu ovlivňuje několik faktorů. Prvním faktorem je filtrace při průmyslovém zpracování medu, která snižuje obsah vitaminů, jelikož je při ní z medu téměř zcela odstraněn pyl. Druhým faktorem, který snižuje obsah askorbové kyseliny, je její oxidace peroxidem vodíku, který v medu produkuje enzym glukosaoxidasa (Ciulu et al., 2011). Množství vitaminů v medu (Tab. 1.) je podstatně nižší než jejich doporučené množství v dietě. Doporučené denní dávky pro dospělého člověka jsou pro thiamin 1,5–2 mg, riboflavin 1,5–2 mg, niacin 20  $\mu$ g, pyridoxin 2 mg, pantothenovou kyselinu 5–10 mg a vitamin C 70–100 mg (Trojan, 2003). Pro pokrytí potřeby vitaminu C, kterého med obsahuje nejvíce, by bylo třeba zkonzumovat alespoň 3 kg medu. Med proto nelze doporučit jako hlavní zdroj vitaminů pro výživu člověka.

**Tab. 1.** Množství vitaminů v medu (Vorlová, 2002)

Vitaminy	Průměrné množství mg/100 g
thiamin (B1)	0,004–0,006
riboflavin (B2)	0,02–0,06
niacin (B3)	0,11–0,36
pyridoxin (B6)	0,008–0,32
pantothenová kyselina (B5)	0,02–0,11
askorbová kyselina (C)	2,2–2,4

### 3.5.5 Minerální látky

Med obsahuje okolo 0,1–1,0 % minerálních látek, množství je závislé na vstřebání těchto látek rostlinou z půdy a z okolního prostředí (De Alda-Garcilope et al., 2012). Minerály na rozdíl od organických látek nepodléhají rozkladu při styku s teplem, světlem, oxidačními činidly a extrémními hodnotami pH. Jsou složkami esenciálních enzymů a hrají roli v řadě metabolických reakcí, proto jsou důležité pro zachování tělesných funkcí člověka a jejich příjem je potravou nezbytný (Pohl et al., 2012). Minerální složení medu může být dobrým základem pro jeho třídění, jelikož minerální látky jsou stabilní a jsou spojeny s půdou, kde medonosné rostliny rostou (Batista et al., 2012).

Při srovnání obsahu minerálií v květových a medovicových medech, mají medovicové medy celkově vyšší množství minerálií, tudíž i vyšší elektrickou vodivost. Hlavním přítomným prvkem je draslík, dále medy obsahují vápník, hořčík, sodík, síru a fosfor. Mezi stopové prvky medu patří železo, zinek, měď a mangan (Lachman et al., 2007). Ve studii minerálního obsahu v medech pocházejících ze španělské Galicie, kaštanové medy obsahovaly daleko větší množství draslíku, hořčíku i fosforu než medy z blahovičnicku. Blahovičnickové medy naopak obsahovaly o něco vyšší obsah vápníku (Escuredo et al., 2013). Také slovinská studie prokázala statisticky významný rozdíl v obsahu minerálií v různých druzích tamního medu. Slovinské medy obsahovaly 16 minerálních prvků, jež se lišily množstvím v medu pocházejícího z akátu, kaštanovníku, lípy, smrku, jedle, květového a lesního medovicového medu (Golob et al., 2005). Je známo, že polské, slovenské a české medy obsahují vyšší množství niklu než medy z ostatních zemí. Medy v České republice při analýze nepřekročily přípustnou výši obsahu niklu 6,0 mg/kg, jež stanovuje Vyhláška č. 53/2002 Sb. Ministerstva zdravotnictví ČR (Lachman et al., 2007).

### 3.5.6 Kyseliny

Organické kyseliny v medu ovlivňují jeho vůni, barvu a chemické vlastnosti jako pH, kyselost a elektrickou vodivost (Mato et al., 2006). Med má nízkou kyselost, obsahuje přibližně pouze 0,57 % organických kyselin (Karabagias et al., 2014), které pocházejí přímo z nektaru, anebo vznikají při přeměně nektaru reakcí enzymů z včelího ústrojí s cukry. Řada studií však popisuje zvýšenou kyselost medu v průběhu dlouhodobého skladování důsledkem fermentace, při které kvasinky přeměňují cukry a alkoholy medu na kyseliny (Cavia et al., 2007). Obsah organických kyselin je velmi rozmanitý a souvisí s původem medu. Med může obsahovat množství máselné, citrónové, octové, mravenčí, fumarové, galakturonové, glukonové, glutarové, 2-hydroxymáselné,  $\alpha$ -hydroxyglutarové, izocitronové,  $\alpha$ -ketoglutarové, mléčné, jablečné, malonové, methylmalonové, propionové, pyrohroznové, jantarové, vinné, šřavelové kyseliny a dalších (Cherchi et al., 1994). Převládající organickou kyselinou medu je glukonová kyselina, která je tvořena včelím enzymem glukosaoxidasou při jeho zrání (Karabagias et al., 2014). Koncentrace glukonové a citronové kyseliny v medu je spolehlivým indikátorem pro odlišení květového a medovicového medu (Mato et al., 2006). Med také může obsahovat ester octové kyseliny a cholinu hormon acetylcholin, který v medu může mít antihypertenzivní účinek (Zhang, 2016).

### 3.5.7 Aromatické látky

Aroma medu udává složitá směs těkavých sloučenin, které jsou ovlivněny původem a vlastnostmi nektaru, podmínkami zpracování a skladování medu. Jednoduché medy mají výrazné aroma díky specifickým těkavým sloučeninám rostliny, ze kterých pocházel nektar (Castro-Vázquez et al., 2007).

Aromatické látky nepocházejí pouze z rostliny, ale jsou produkovány i včelami. Včely mohou také přeměňovat těkavé sloučeniny rostliny, stejně jako mikroorganismy po zrání medu, a tím vytvářet specifické aroma medu (Barra et al., 2010).

### 3.5.8 Barviva

Flavonoidy představují rozsáhlou skupinu rostlinných fenolických pigmentů. Rostliny je obsahují ve velké míře a jejich profil je pro jednotlivé rostliny charakteristický. Množství flavonoidů v medu je okolo 6000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a jedná se o flavanony a flavan-3-oly, které obsahuje

i propolis (Campos et al., 1990). Mezi hlavní flavonoidy vyskytující se v propolisu a medu patří pinocembrin, chrysin, galangin a pinobanksin. Pro vřesový med je typická přítomnost myricetinu a tricetinu, tyto flavonoidy jsou však obsaženy i v dalších květových medech (Anklam, 1998). Květové medy také často obsahují kvercetin, kempferol a isorhamnetin (Ferrerres et al., 1996).

Mezi fenolické kyseliny vyskytující se v medu patří kávová, ferulová, ellagová a p-kumarová kyselina (Vargas a Maza, 2015). Fenolické látky, kterých med obsahuje širokou škálu, se podílejí nejen na barvě medu, ale také mají antioxidační účinky (Bertoncelj et al., 2007). V průběhu skladování medu může docházet k jeho tmavnutí. Tmavnutí může být způsobeno reakcí polyfenolů, karamelizací fruktosy či Maillardovými reakcemi (Bertoncelj et al., 2007).

### **3.5.9 Hydroxymethylfurfural (HMF)**

Hydroxymethylfurfural je důležitý indikátor pro hodnocení délky skladování a tepelného poškození medu. Jak již bylo řečeno, množství HMF se zvyšuje tepelným záhřevem a narůstající dobou skladování, jelikož se jedná o produkt rozpadu sacharidů. Čerstvé medy tudíž obsahují pouze stopové množství HMF (Zappala et al., 2005). Přesněji HMF vzniká kyselé katalyzovanou dehydratací hexos a souvisí s chemickými vlastnostmi medu jako pH, celková kyselost a obsah minerálů (Singh a Parminder, 1998).

Dle mezinárodních standardů (Codex Alimentarius, 1987) množství HMF po zpracování nebo mísení medu nesmí být větší než 40 mg/kg. Výjimku tvoří medy s deklarovaným původem z tropických zemí nebo z regionů s tropickými teplotami, či směsné medy z nich, kde množství HMF nesmí být větší než 80 mg/kg. V EU Směrnice Rady 2001/110/ES ze dne 20. prosince 2001 o medu pevně stanovuje množství HMF, které nesmí být větší než 40 mg/kg obecně u všech medů s výjimkou pekařského medu. Pro medy s jasným původem ze zemí s tropickým klimatem a pro směsi z nich platí, že obsah HMF nesmí být vyšší než 80 mg/kg.

Mezinárodní komise pro med (IHC) doporučuje tři metody pro stanovení obsahu HMF v medu. Doporučené metody zahrnují dvě spektrofotometrické metody široce používané při běžných analýzách a metodu s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) (Bogdanov et al., 1999). Spektrofotometrické stanovení podle White Jr (1979) zahrnuje měření UV absorbance přečištěných vodných roztoků medu bez a s přidavkem bisulfitu. Druhá spektrofotometrická metoda podle Winkler (1955) využívá měření absorbance

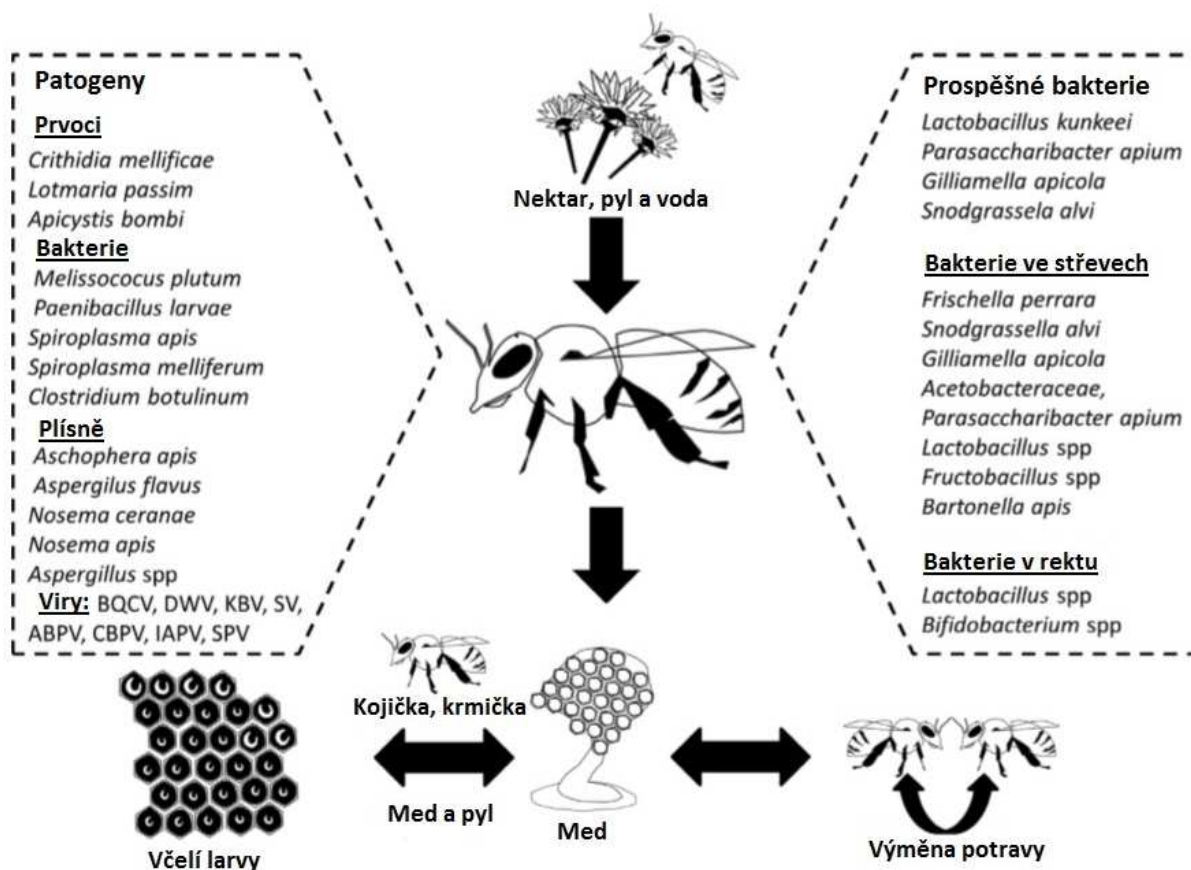


UV roztoků medu pomocí přídavku barbiturové kyseliny a p-toluidinu. Poslední doporučená metoda měření množství HMF je podle Jeuring a Koppers (1980), kdy se med jednoduše rozpustí ve vodě a po filtraci je měřen v reverzní fázi HPLC kolony pomocí izokratické eluce mobilní fáze složené z vody a methanolu. HPLC odděluje HMF od dalších složek, čímž se vyvaruje vzájemnému ovlivňování při měření. HMF může interferovat s různými aldehydy, které jsou v medu přítomné podle jeho květového původu či v medu vznikají vlivem podmínek prostředí nebo jako produkty v průběhu skladování (Wootton a Ryall, 1985). Testování těchto tří metod Mezinárodní komisí pro med přineslo srovnatelné hodnoty měření pouze s velmi malými rozdíly mezi výsledky metod, které jsou zanedbatelné při posuzování kvality medu (Bogdanov et al., 1999). Avšak autoři studií a IHC nedoporučují používat metodu podle Winklera, jelikož p-toluidin je karcinogenní a metoda je o něco méně přesná (Zappala et al., 2005).

### 3.6 Mikrobiota medu

Mikroorganismy přítomné v medu jsou schopné přežít jeho koncentraci cukru, kyselost a antimikrobiální vlastnosti. Do medu mikroby přecházejí z trávicího traktu (TT) včel, pylu, vzduchu, prachu, půdy a rostliny (Olaitan et al., 2007).

Střevní mikrobiota včel je podobná té savců, u obou se skládá převážně z fakultativně anaerobní a mikroaerofilních bakterií, je však oproti savcům jednodušší a dominují v ní specifické druhy, které si včely mezi sebou přenášejí sociálními interakcemi (Obr. 1.). Má ochrannou a nutriční funkci a je odrazem zdraví včel (Kwong a Moran, 2016). Včelí larvy jsou zpočátku sterilní, ale později jsou včelami krmeny nektarem a pylem, čímž dochází k jejich inokulaci ještě před kuklením (Lee a Kime, 1984). Při identifikaci bakterií a kvasinek v plástvích medu bylo zjištěno, že zdrojem kontaminace byly včely, nektar a vnější prostředí. Z pláství medu i těl dospělých včel byl izolován druh *Bacillus*, *Micrococcus* a *Saccharomyces* (Olaitan et al., 2007). Řada mikroorganismů byla také izolována ze včelích larev a výkalů (White, 1996).



Obr. 1. Prospěšné bakterie a patogeny včel (Silva et al., 2017)

TT včel obsahuje asi 1 % kvasinek, 27 % Gram-pozitivních bakterií (*Bacillus*, *Bacteridium*, *Streptococcus*, *Clostridium* spp.), 70 % Gram-negativních či Gram labilních bakterií (*Achromobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*) (Olaitan et al., 2007) a také probiotické bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Alberoni et al., 2016). Všechny tyto bakterie byly identifikovány také v medu, a dále i *Alcaligenes*, *Brevibacterium*, *Neisseria*, *Xanthomonas*. Většina bakterií a mikrobů v medu ovšem nemůže růst a rozmnožovat se, tato nečinnost je důsledek jeho antimikrobiálního účinku (Olaitan et al., 2007). Během 8–24 dní v medu mikroby hynou (al Somal et al., 1994). Přežívají převážně pouze sporulující bakterie, které dobře snášejí nižší teplotu, jejich spory se ve stejném množství v medu vyskytují i po 4 měsících skladování. Ve studii byl med inokulován mikroorganismy *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* a spory *Clostridium botulinum* a skladován při 25 °C, populace *Clostridium botulinum* se ani po ročním skladování medu při 4 °C nezměnila, až při teplotě 65 °C po 5 dnech skladování nebyly identifikovány žádné spory (Olaitan et al., 2007).

Zajímavý je obsah bakterií mléčného kvašení, které do medu přecházejí z TT včel a v čerstvém medu mají antimikrobiální účinek (Olofsson a Vásquez, 2008). Bakterie

mléčného kvašení chrání včely před patogeny nektaru a patogeny vyskytující se v úlu. Je známo 13 specifických druhů bakterií mléčného kvašení, především rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (*L. kunkeei*, *L. apinorum*, *L. mellis*, *L. mellifera*, *L. kullabergensis*, *L. kimbladii*, *L. helsingborgensis*, *L. melliventris*, *L. apis*, *B. coryneforme*, *B. asteroides*, *Bifidobacterium* spp.), které mají inhibiční účinek na včelí (Vásquez et al., 2012) a lidské patogeny (Butler et al., 2014). Každý druh bakterií mléčného kvašení vytváří specifickou sloučeninu, která má inhibiční účinek ve specifickém množství. Některé druhy vytváří peroxid vodíku (Olofsson et al., 2014), jiné vylučují proteiny s inhibičním účinkem (lysozym a bakteriociny) (Butler et al., 2013). Například laktobacily izolované ze žaludku včel vykazovaly inhibiční efekt proti *Escherichia coli* a *Salmonella enterica*, nejvíce bakteriocinů produkoval *L. helsingborgensis* a *L. kunkeei* (Veress et al., 2016). Studie z roku 2013 také zkoumala inhibiční účinek, a to nově izolovaného bakteriálního kmene z medu, který produkuje bakteriociny (*Bacillus* BH072). Bakteriociny vykazovaly fungicidní inhibici vůči *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium* a *Botrytis cinerea* (Zhao et al., 2013). Pomocí produkce bakteriocinů je redukována kompetice o živiny, čímž se vytváří nevhodné prostředí pro vývoj ostatních bakterií. Bakteriociny bakterií mléčného kvašení jsou proto zkoumány jako možná náhrada antibiotik. Ve studiích vykazují vysokou účinnost *in vitro*, *in vivo* a nízkou toxicitu. Výhodou je také jejich příjem společně s probiotiky nebo možnost purifikace pomocí biotechnologií, ovšem stejně jako na patogeny mohou mít příliš agresivní účinek na organismus člověka (Cotter et al., 2012). Všechny výše zmíněné probiotické bakterie jsou v laboratorních podmínkách také schopné tvořit biofilm, avšak bifidobakterií a *Lactobacillus kullabergensis* vytváří biofilm výrazněji (Olofsson et al., 2014). Předpokládá se, že bakterie mléčného kvašení fungují synergicky a byly vyvinuty ve včelím traktu především pro ochranu proti mikroorganismům nektaru a pylu (Forsgren et al., 2010). Mezi bakteriemi mléčného kvašení a včelou existuje mutualistický vztah. Bakterie mléčného kvašení v TT včel vytváří prostředí vedoucí k lepší dostupnosti živin a chrání včely před škodlivými patogeny. Včely uložením nektaru z medného včáčku do pláství naopak vytvářejí ideální prostředí o teplotě 35 °C pro růst probiotických bakterií (Jones et al., 2004).

### 3.6.1 Antibakteriální aktivita medu

Antimikrobiální vlastnosti medu jsou známy již několik století (Zumla a Lulat, 1989). Med má inhibiční účinky vůči přibližně 60 druhům bakterií, a to jak anaerobních, aerobních,

Gram-negativních či Gram-pozitivních (Taormina et al., 2001). Mezi faktory zodpovědné za antibakteriální vliv medu patří vysoké množství osmotických látek, kyselost, přítomnost peroxidu vodíku, lysozymu, fenolických kyselin a flavonoidů (Bogdanov, 1997). Další faktory zahrnují vysoký obsah cukru, methylglyoxalu, dihydroxyacetonu a antibakteriálních peptidů (Adams et al., 2009). Antimikrobiální aktivita medu je většinou závislá hlavně na peroxidové a neperoxidové aktivitě, například studie Irish et al. (2011) zjistila, že antimikrobiální účinky medu jsou způsobené především peroxidem vodíku pocházejícím z enzymu glukosooxidasa.

Studie prokázaly, že antimikrobiální a antioxidační vlastnosti medu jsou také závislé na květinovém zdroji, ze kterého byl včelami sbírán nektar (Liu et al., 2013). Květinový zdroj pro tvorbu medu ovlivňuje podmínky prostředí a zeměpisná poloha (Price a Morgan, 2006). Moderní medicína v praxi využívá antimikrobiální funkce medu v obvazových materiálech (Ismail et al., 2015). Některé druhy medu také vykazují širokospektrální účinnost proti bakteriálním patogenům, které jsou antibioticky rezistentní (Blair et al., 2009). Ve studii Abd-El Aal et al. (2007) měl med výraznější inhibiční efekt (85,7 %) na Gram-negativní bakterie (*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella*) ve srovnání s komerčně používanými antimikrobiálními látkami. Byl také pozorován 100% inhibiční vliv na Gram-pozitivní methicillin rezistentní *Staphylococcus aureus* ve srovnání s použitím samotného antibiotika. Při aplikaci medu s antimikrobiálními látkami bylo dosaženo synergického účinku proti Gram-negativním i pozitivním bakteriím.

V současné době byl pro klinické aplikace schválen Manuka med pocházející z balmínu metlatého (*Leptospermum scoparium*) z Nového Zélandu a Austrálie. Jeho antimikrobiální aktivita je vyjádřena fenolovým koeficientem nazývaným unikátní manuka faktor (UMF stupnice), který představuje koncentraci roztoku fenolů s podobnou inhibiční zónou, jako má med vůči *Staphylococcus aureus* při deskové difuzní metodě. Antimikrobiální aktivita manuka medů byla prokázána vůči mikroorganismům jako je *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *S. aureus* (zahrnující methicillin rezistentní *S. aureus*), *Enterococcus faecium* (zahrnující vancomycin rezistentní enterokoky), *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* a další (Karasawa et al., 2017). UMF stupnice je nejvíce ovlivněna koncentrací flavonoidu leptosinu a methylglyoxalu, který vzniká neenzymatickou přeměnou dihydroxyacetonu, jehož vysoké množství obsahuje nektar z balmínu metlatého. K této neenzymatické přeměně dochází během skladování manuka medu (Adams et al., 2009) a následná koncentrace methylglyoxalu koreluje se schopností medu inhibovat růst *S. aureus*, čímž se podílí na neperoxidové antimikrobiální aktivitě (Karasawa et al., 2017).

Další zdroj ovlivňující antimikrobiální aktivitu je obsah polyfenolů, jejichž působení je proti řadě bakterií a je částečně závislé na přítomnosti peroxidu vodíku. To dokazuje studie Kwakman et al. (2010), ve které izolované polyfenoly medu samostatně nevykazovaly antimikrobiální aktivitu. Důležitým faktem také je, že některé druhy polyfenolů nedokážou inhibovat bakterie, které jiné polyfenoly inhibují, nebo synergicky zvyšují baktericidní schopnost jiných polyfenolů a samy jsou neúčinné (Alvarez et al., 2006). Při využití medu v medicíně je tedy důležité znát složení polyfenolů, které lze odvodit podle květinového zdroje nektaru (Ceksteryte et al., 2006). Studie Fyfe et al. (2017) se zabývala inhibiční aktivitou šesti skotských medů a manuka medu odolnému proti antibiotikům rezistentním *A. calcoaceticus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* a *E. coli* bakteriím. Dva druhy skotských medů měly podobný inhibiční efekt jako manuka med, antimikrobiální aktivita byla zřejmě ovlivněná obsahem fenolů, ovšem nebyla závislá na jejich celkovém počtu. Při analýze pomocí LC-MS (kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem) byly odkryty charakteristické složky polyfenolů v různých druzích medu, ale také byly identifikovány glykosidy deriváty sebakové kyseliny, které mohou souviset s antimikrobiální aktivitou. Sebaková kyselina pochází z mateří kašičky a její glykosidy nebyly v předešlých studiích v medu identifikovány. Tyto glykosidy ve vyšší koncentraci nejspíše obsahují medy s vysokou antimikrobiální aktivitou, proto je nutný další výzkum potvrzující jejich strukturu a antimikrobiální potenciál.

### 3.6.2 Mikrobiální biofilm

Biofilm je shluk mikroorganismů, které jsou přidruženy k biotickému či abiotickému povrchu. Formování biofilmu je dynamický proces, ve kterém jsou zapojeny různé mechanismy pro přilnutí bakterií k povrchu a jejich růstu. Kvůli tvorbě biofilmu často dochází k selhání antimikrobiální léčby, a proto jsou infekční biofilmy velkou hrozbou v moderní medicíně (Satpathy et al., 2016). Podle National Institutes of Health (USA) je dokonce více než 60 % infekčních onemocnění spojeno s tvorbou biofilmu (Lewis, 2001). Důsledkem je vývoj preventivních opatření zahrnující mechanické, chemické či fyzikální metody pro regulaci tvorby biofilmu či jeho odstranění (Satpathy et al., 2016). Většina biofilmů vzniká přilnutím k pevnému povrchu pokrytého exo-polysacharidovou maticí. Mikroorganismy mohou tvořit méně než 10 % suchého podílu komplexu, zatímco matrice může tvořit více než 90 % komplexu (Bryers a Ratner, 2004). Med má antimikrobiální účinek

na biofilm *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* (Cooper et al., 2011). To potvrzuje studie Alandejani et al. (2009) zkoumající efekt medu na biofilm *S. aureus* a *P. aeruginosa in vitro*, ve které měl med 100% smrtící vliv. Toto působení medu může mít zajímavý klinický důsledek vedoucí k novému přístupu léčby chronické rinosinusitidy, což je zánět dutiny nosní a vedlejších nosních dutin. Studie Aissat et al. (2016) zabývající se efektem saharských medů v kombinaci s propolisem na tvorbu biofilmu v močových cestách kvůli přítomnosti *S. aureus*, *P. aeruginosa* a *E. coli*, potvrdila ochrannou funkci medu vůči utváření biofilmu *in vitro*, med by proto mohl být použit také v profylaxi a prevenci močových onemocnění.

Biofilmy nevytvářejí pouze bakterie, ale i další mikroorganismy. Nejčastější infekční kvasinkou tvořící biofilm je *Candida albicans*. Kvasinku *C. albicans* nejčastěji nalezneme na sliznici dutiny ústní, jícnu, trávicího traktu, močového měchýře a pohlavních orgánů (Pfaller a Diekema, 2007). Tato kvasinka adhezuje a kolonizuje epitelové tkáně, kde způsobuje infekce, které jsou pro osoby s oslabenou imunitou patogenní a život ohrožující. Na celém světě je *C. albicans* jednou z hlavních příčin nemoci a úmrtnosti jedinců s oslabenou imunitou (Morgan et al., 2005). Bylo také prokázáno, že rod *Candida* je třetím nejčastěji izolovaným krevním patogenem u pacientů v USA (Ramage et al., 2001). Hlavním problémem při léčbě, je zvýšená odolnost biofilmů *C. albicans* vůči antifungálním látkám jako jsou azolová léčiva a jejich deriváty. Zvýšenou rezistenci kvasinkové buňky způsobují vylučováním extracelulární matrix, která chrání buňky proti protilátkám a zabraňuje pronikání léčiva do biofilmu (Silva et al., 2009). Med snižuje tvorbu polysacharidové extracelulární matrix a zároveň podporuje narušení zralého biofilmu (Irish et al., 2007). Studie Ansari et al. (2013) proto zkoumala vliv medu z rostliny cicimek čínský (*Ziziphus jujuba*) z Arabského poloostrova na růst *C. albicans* a produkci biofilmu. Med inhiboval tvorbu *C. albicans* biofilmu a jeho významné antifungální účinky naznačují, že by mohl sloužit i pro související léčbu infekcí způsobených rodem *Candida*. Je však potřeba dalších studií pro potvrzení vlivu medu na utváření kandidózních biofilmů *in vivo*.

### 3.7 Mikrobiální kontaminace

Díky přirozeným vlastnostem medu a kontrolním opatřením při jeho úpravě je med produktem s minimálním množstvím nežádoucích mikroorganismů, přesto se v něm mohou

vyskytovat mikroby, které za určitých podmínek mohou způsobit onemocnění člověka (Snowdon a Cliver, 1996).

Med má dva hlavní zdroje mikrobiálního znečištění. Primárním zdrojem kontaminace je pyl, TT včely, vzduch, prach, půda a nektar. Sekundární zdroje znečištění medu vyplývají z manipulace lidmi a zahrnují kontaminaci vzduchem, křížovou kontaminaci, znečištění při manipulaci s potravinou či znečištěným zařízením. Primární zdroje kontaminace je prakticky nemožné ovlivnit, naopak druhotné zdroje znečištění lze eliminovat správnou výrobní praxí (Finola et al., 2007).

Mezi mikroorganismy znehodnocující med patří hlavně plísňe, kvasinky a sporující bakterie. Plísňe a kvasinky jsou zodpovědné za kvašení medu při jeho vysokém obsahu vody (nad 21 %). V medu se obvykle vyskytuje rod *Penicillium* a *Mucor*. Přítomnost *Bettysia alvei*, *Ascosphaera apis* a *Ascosphaera major* může indikovat špatné postupy včel v chodu včelího úlu. Mezi dominující kmeny kvasinek vyskytující se v medu patří *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torula* (Owczarczyk et al., 1999), *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Oosporidium*, *Pichiu*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Nematospora*, *Schwanniomyces* a *Zygosaccharomyces*. Kvasinky se vyskytují v mnoha medech v menším množství než 100 KTJ, ovšem počty jejich kolonií mohou snadno rychle růst, proto je v průmyslu standardem provádět kontrolu jejich počtu. Zpravidla čím vyšší vlhkost medu, tím vyšší výskyt kvasinek (Snowdon a Cliver, 1996). Mezi často identifikované bakterie tvořící spory v medu patří rod *Clostridium* a *Bacillus*. Klostridie redukující sulfity patří mezi indikátory znečištění medu. Spory *C. botulinum* se v medu obvykle vyskytují na nízké úrovni (Monetto et al., 1999). Ovšem přítomnost této spory je obzvláště nebezpečná pro kojence a malé děti (Centorbi et al., 1999). Kojenecký botulismus je způsoben především sporami *C. botulinum* (viz kapitola 3.8.5). Laboratorní analýza argentinských medů ukázala přítomnost klostridií redukujících sulfity v 16 z 23 vzorků medu, kromě znečištění mohou tyto klostridie indikovat i spory *C. botulinum*. Studie 59 srbských medů objevila v 5 vzorcích medu spory *C. botulinum* pomocí metody PCR, tradiční kultivační metodou spory ve stejných vzorcích medu nebyly identifikovány (Matovic et al., 2015). Klostridie se vyskytují především v půdě, ale zdrojem může být i prach, zařízení a pracovní prostředí. Aby se snížila možnost kontaminace medu spory *C. botulinum*, je nutná kontrola výrobního řetězce, z čehož vyplývá nezbytná potřeba provádět mikrobiologické rozbory medu pro zajištění bezpečnosti potravin (Finola et al., 2007). Pro zabránění kažení medu je důležitá znalost závislosti teploty a obsahu vody na růst mikroorganismů (Snowdon a Cliver, 1996).

### 3.8 Med ve výživě a zdraví

Medu jsou připisovány léčivé účinky už po tisíciletí. Pro své antioxidační, protizánětlivé, antibakteriální působení je med významnou složkou stravy. Med také zvyšuje přilnavost kožních štěpů, podporuje proces hojení ran, plodnost a slouží jako prevence proti kašli (Meo et al., 2016). Pozitivní efekt medu na lidský organismus ovlivňuje jeho výjimečná skladba a obsah enzymů, které spoluvytvářejí biologickou aktivitu medu. Enzymy pocházejí z hltanových žláz včel, anebo ze snůšky. Med není bohatým zdrojem vitaminů, minerálních látek či organických kyselin. Obsahuje však široké spektrum těchto látek, byť v malém množství, což ovšem nesnižuje dietetický význam medu, neboť podstatná je komplexnost tohoto přírodního produktu (Dupal et al., 2015). Biologickou aktivitu medu vykazují vitaminy A, E, K, B1, B2, B3, B5, B6, C, mastné kyseliny, fenolické sloučeniny a flavonoidy (Bogdanov et al., 2008). Dále také arginin, cystein, glutamová kyselina, asparagová kyselina a prolin (Qamer et al., 2007).

#### 3.8.1 Med a glykemický index

Glykemický index (GI) je bezrozměrná veličina, která udává jak rychle je glukosa z potravin využita lidským organismem. Přesněji je to plocha pod křivkou glykémie po požití potravin obsahující sacharidy, která je vyjádřena jako procento plochy pod křivkou po požití stejného množství referenční testovací potravin, nejčastěji po požití stejného množství čisté glukosy (Jenkins et al., 1981). Příčinou rozdílů hodnot GI je rozdíl v rychlosti trávení a vstřebávání sacharidů. Potraviny s vysokým glykemickým indexem vedou k vyššímu vzestupu insulínu a C-peptidu v porovnání s potravinami s nízkým GI. Hyperinsulinémie může vést ke zvýšení hmotnosti a ukládání živin do tukové tkáně na místo jejich oxidace ve svalu. Vyšší obsah jednoduchých sacharidů u potravin s vysokým GI v potravě vede ke zvýšení oxidace sacharidů a naopak snížení oxidace tuků. GI zřejmě také stimuluje hlad, což může být dalším faktorem způsobujícím vzestup hmotnosti (Hainer, 2011).

GI medu je 50 (Čopíková et al., 2013) a je tedy potravinou s nízkým GI. Nízký GI mají hlavně akátové medy a světlé druhy medů, které mají obvykle vyšší obsah fruktosy. Konzumace potravin s nízkým GI je prospěšná v souvislosti se vznikem metabolických poruch, diabetu a srdečních poruch (Jenkins et al., 2002). Med s nízkým GI může být díky svým výhodným fyziologickým účinkům použit i pro pacienty s endokrinními poruchami (Al-Waili, 2003).



U pacientů trpícím diabetem je med ve stravě kontroverzně diskutován. Pro doporučení upřednostnění medu v dietě pro pacienty s diabetem I. typu, je potřeba posoudit účinky medu po jeho dlouhodobém užívání. Na druhé straně má med zřejmě schopnost stimulovat beta buňky slinivky břišní, což může v budoucnu být předmětem terapeutických studií (Abdulrhman et al., 2013).

### **3.8.2 Antioxidační účinky medu**

Antioxidant je prvek, který má schopnost inhibovat oxidaci jiných molekul. Oxidace je biochemická reakce, při které vznikají volné radikály s řetězovou reakcí, které mohou poškodit buňky, tkáň a fyziologické funkce organismu. Pro vyvážení oxidačního stavu je nutný příjem antioxidantů. Med má antioxidační vliv vůči zánětlivým onemocněním, koronárním a arteriálním onemocněním, neurologickým onemocněním, rakovině a stárnutí (Meo et al., 2016).

Studie zkoumající působení fenolických látek jednodruhových medů na oxidaci červených krvinek zjistila, že med omezuje oxidační poškození buněčné membrány červených krvinek. Omezení oxidačního vlivu zřejmě způsobuje schopnost splnutí látek medu s buněčnou membránou a cytosolem buňky. Antioxidanty medu tak zvyšují funkci a obranyschopnost červených krvinek (Alvarez-Suarez et al., 2012).

### **3.8.3 Med při hojení ran**

Účinek medu při hojení ran je především důsledkem jeho antibakteriálních vlastností. Med udržuje v ráně vlhkost a vysokou viskozitu, a tak tvoří ochranou bariéru zabraňující infekci (Mandal a Mandal, 2011). Jeho pozitivní vliv se uplatňuje především při léčbě popálenin (Jull et al., 2008), nicméně je účinný pro různé druhy ran, kde jsou jiné metody hojení neúspěšné (Meo et al., 2016), včetně těch chirurgických (Goharshenasan et al., 2016). Med nejen minimalizuje riziko vzniku infekce při poranění (Worcester a This, 2011), ale také zvyšuje přilnavost kožních štěpů. Užití medu při léčbě ran snižuje bolest a díky adhezni vlastnosti med fixuje kožní štěp s minimálním rizikem kontrakce (Maghsoudi a Moradi, 2015).

### 3.8.4 Med v prevenci proti kašli

Kašel je nejčastějším problémem, kterým trpí mnoho lidí. Příčina výskytu kašle závisí na věku, geografických, environmentálních, klimatických a epidemiologických podmínkách (Meo et al., 2016). Dlouhodobý či chronický výskyt kašle má nežádoucí škodlivý vliv hlavně u dětí, jelikož děti nemají zcela vyvinutý imunitní systém, a jsou tudíž náchylnější k infekcím a dalším doprovodným onemocněním (Kantar, 2016).

Studie provedená Paul et al. (2007) uvádí výrazné zlepšení klinických příznaků kašle po užívání medu. Cohen et al. (2012) provedli studii, které se účastnilo 300 dětí ve věkové kategorii od 1 do 5 let s onemocněním horních dýchacích cest, které trvalo okolo jednoho týdne. Autoři studie srovnávali účinek noční dávky citrusového medu, eukalyptového medu, medu z hluchavkovitých rostlin a placebo na kašel. U všech tří druhů medu docházelo k výraznému zlepšení kašle ve srovnání s placebem. Med u dětí s respiračním onemocněním také mírnil potíže s usínáním.

### 3.8.5 Kojenecký botulismus

Botulismus je vzácný neuromuskulární stav, který má několik klinických forem. Poprvé byl identifikován v roce 1976 a obvykle se objevuje u dětí mladších 1 roku, které požijí spory bakterie *Clostridium botulinum* (Arnon et al., 1977). V USA je kojenecký botulismus nejběžnější formou botulismu se 70–100 případy v každém roce (Long, 2007). Obvykle se kojenecký botulismus vyskytuje v kombinaci s hypotonií, bulbární slabostí a oslabením kosterního svalstva či dalšími klinickými příznaky. *C. botulinum* je obligátně anaerobní, sporulující, Gram-pozitivní, tyčinkovitá bakterie přítomná v půdních a vodních sedimentech. V závislosti na produkci neurotoxinu existuje sedm podtypů A–G, přičemž onemocnění mohou způsobit pouze podtypy A, E, B a F. *Clostridium baratii* a *Clostridium butyricum* produkují také neurotoxin E a F, ale kojenecký botulismus způsobují jen zřídka (Feigin a Cherry, 2009). Po požití spor *C. botulinum* se spory aktivují v TT, kde se namnoží a začnou produkovat neurotoxin (botulotoxin), který proudí do krevního řečiště. Neurotoxin se pak nevratně váže na receptory presynaptické buněčné membrány a autonomního neuromuskulárního spojení, blokuje uvolňování acetylcholinu z nervových zakončení, a zastavuje tak jeho činnost (Rosow a Strober, 2015).

Botulotoxin je nejsilnější známý jed s letální dávkou pouze  $10^{-9}$  mg/kg tělesné hmotnosti. Předpokládaná inkubační doba je 3–30 dní (Domingo et al., 2008). Citlivost kojenců na botulismus je způsobena nevyvinutým TT, který ještě není schopen odolat

kolonizaci *C. botulinum*. Tento fakt potvrzuje studie na zvířatech, ve které TT mláďat myši byl méně odolný kolonizaci než u starších myši. U lidských kojenců se navíc zvyšuje riziko botulismu po odstavení příjmu mateřského mléka (Long, 2001). Mnoho případů dětského botulismu bylo způsobeno pozřením kontaminovaného medu, ve většině případů však nikdy nebyl konečný zdroj spor *C. botulinum* identifikován (Arnon et al., 1977). U pacientů, u kterých nebyl nalezen žádný zdroj nákazy, se předpokládá požití spory, která je přidružená k mikroskopickým částicím prachu ve vzduchu (Feigin a Cherry, 2009). Ovšem podávání medu dětem do 1 roku se nedoporučuje také z důvodu vzniku alergie (Hoc, 2006). Spory *C. botulinum* se dříve také vyskytovaly v kukuřičném sirupu, nyní díky změně výrobního procesu v kukuřičném sirupu už obsaženy nejsou (Long, 2001), nicméně nepasterizovaný kukuřičný sirup není doporučován pro výživu dětí mladších 12 měsíců (Ogle a Anderson, 2012).

V roce 2003 byla vyvinuta speciální léčba kojeneckého botulismu pomocí intravenózního imunoglobulinu, která výrazně snížila úmrtnost. Kojenci s botulismem se tak při včasné rozpoznání nemoci a zahájení léčby s pečlivou podpůrnou péčí obvykle zcela uzdraví (Rosow a Strober, 2015).

### 3.8.6 Med jako probiotikum a prebiotikum

Nepasterizovaný med obsahuje malé množství druhů bakterií, avšak tato přirozená mikrobiota medu zahrnuje probiotické druhy bakterií (Tsekoura et al., 2006), které jsou pro své hostitele prospěšné (Ajibola et al., 2012). Probiotické bakterie jsou odolné vůči kolonizaci TT, podporují původní anaerobní mikrobiotu a omezují tak potenciálně patogenní mikroorganismy. V gastrointestinálním traktu mohou ovlivňovat aktivitu enzymů, čímž se podílejí na fyziologických účincích (Chow, 2002).

Studie Olofsson a Vásquez (2008) zkoumala medné včelky obsahující nektar z různých druhů rostlin. Bylo zjištěno, že v medném včelce dominují bakterie mléčného kvašení. Pomocí molekulárně-genetických metod byl identifikován a popsán nový druh *Lactobacillus kunkeei*, další dominantní skupinu tvořily blíže neurčené bifidobakterie. V menším množství se v medných včelkách také vyskytovaly *Lactobacillus sp.*, *Paenibacillus larvae* a bakterie čeledi Pasteurellaceae. Bylo prokázáno, že bakterie mléčného kvašení v medu pocházejí výhradně z medného včelky nikoli z povrchu rostlin. Na rozvoj bakterií v této části TT však zřejmě působí sacharidy nektaru rostlin. Druh rostlin, ze kterých pochází nektar, tak může ovlivnit bakteriální spektrum medného včelky.

Bifidobakterie a laktobacily přecházejí do včelích produktů, v čerstvém medu z nektaru malin a ostružin byl zjištěn obsah  $5 \times 10^4$  živých buněk těchto bakterií v 1 g medu (Havlík et al., 2009).

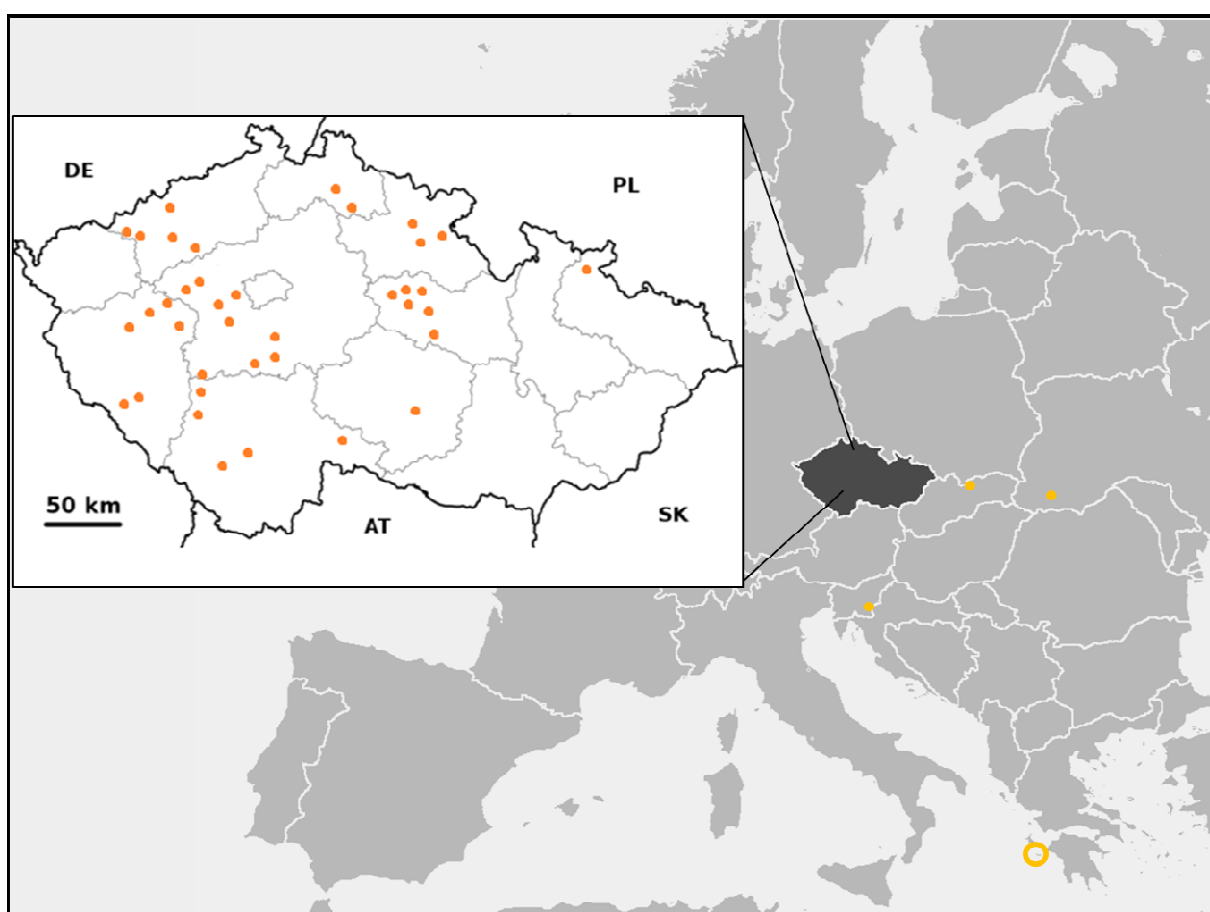
Med obsahuje fruktooligosacharidy, které v organismu fungují jako prebiotika, což jsou nestrávitelné složky potravy, které stimulují růst a aktivitu probiotických bakterií, čímž jsou zdravotně příznivé pro organismus. Fermentace fruktooligosacharidů ve střevech zvyšuje vstřebávání vápníku a objem stolice. Fruktooligosacharidy také prospěšně snižují hladinu lipidů v krvi a zkracují čas trávení (Chow, 2002). Další prebiotika medu tvoří maltooligosacharidy (Morales et al., 2008), ve vzorcích brazilských medů byla nalezena isomaltosa, celobiosa, maltotriosa, melezitosa, rafinosa, maltosa, turanosa a maltotriosa (Leite et al., 2000).

Studie zkoumající efekt sezamových medů z Indie, které se používají hojně v ájurvédě, potvrdila působení tohoto medu na podporu růstu probiotických bakterií *in vitro*. Sezamový med po inkubaci s kultivačním médiem vykazoval významný vzestup růstu *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium bifidum* (Das et al., 2015). Výzkum vlivu medů z naditce (*Prosopis*) na růst a fermentaci *Pediococcus pentosaceus* a *Lactobacillus fermentum* ukázal lepší růst *P. pentosaceus* v přítomnosti medu oproti *L. fermentum*. Kromě toho obě bakterie mléčného kvašení byly schopné upravovat obsah fenolů a flavonoidů v medu, pravděpodobně pomocí biotransformace. Díky významné fermentační kapacitě a schopnosti růstu ve vysokých koncentracích medu je *P. pentosaceus* ideálním mikroorganismem pro zvýšení biologické dostupnosti flavonoidů, což zvýší i antioxidační aktivitu medu (Nutter et al., 2016).

## 4 Materiál a metody

### 4.1.1 Příprava vzorku

Bylo odebráno 40 vzorků (Obr. 2.) medu z České republiky a 7 vzorků medu ze zahraničí (Řecka, Slovinska, Ukrajiny a Slovenska). Všechny vzorky medu pocházely přímo od včelaře z tzv. prodeje ze dvora. Čtyři skupiny regionů jsou zastoupeny pouze jedním vzorkem medu, jedná se o kraj Moravsko-slezský, Vysočinu a zahraniční vzorek z Řecka a Tater.



**Obr. 2.** Mapa znázorňující původ vzorků medu

Příprava vzorků spočívala v odebrání medu a následného navážení množství 100–150 mg vzorku do připravené kolony obsahující homogenizující sterilní kuličky.

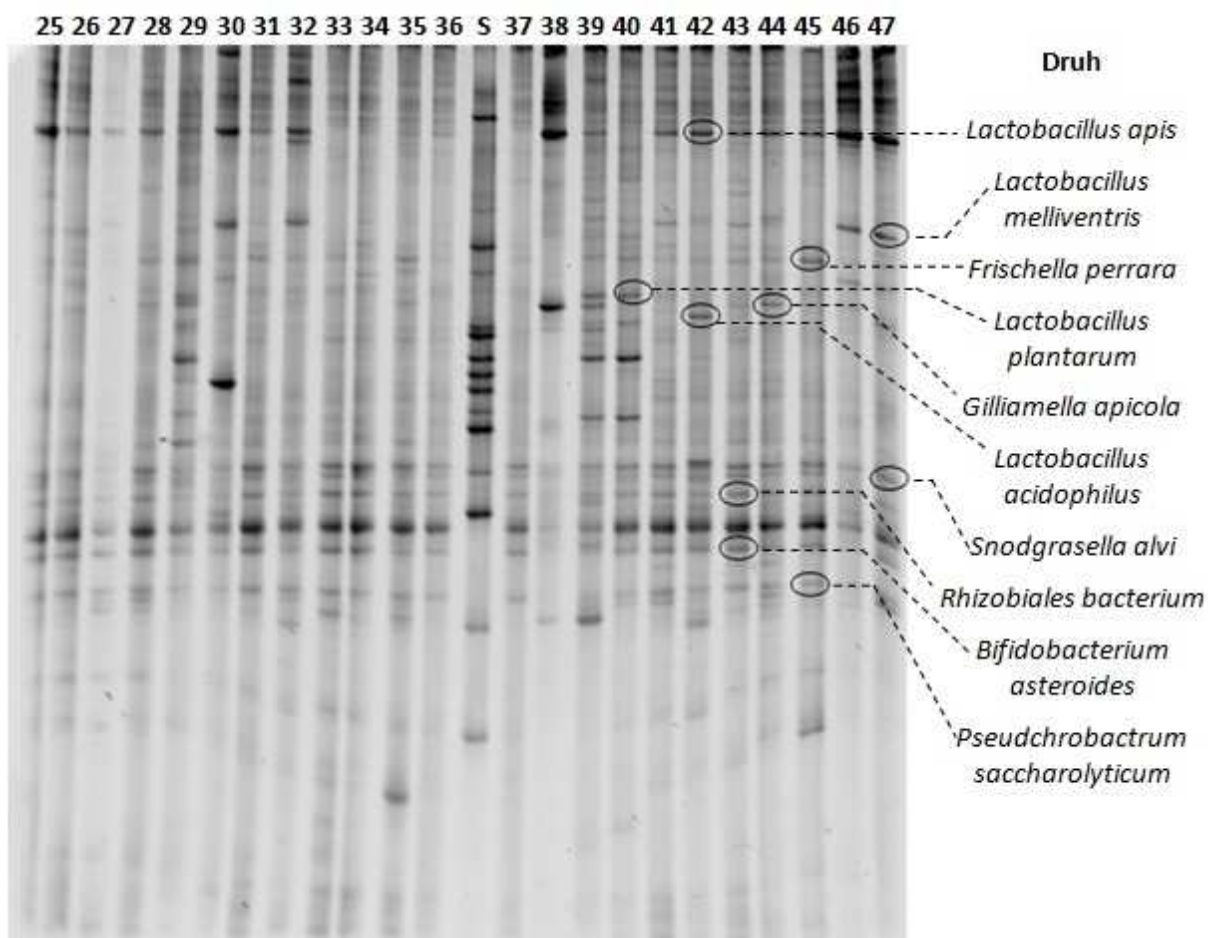
#### 4.1.2 Izolace DNA

K izolaci veškeré bakteriální DNA ze vzorků medu byl použit ZR Faecal DNA MiniPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Izolace proběhla dle protokolu výrobce.

#### 4.1.3 Elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu (DGGE)

Pomocí univerzálních bakteriálních primerů 338GC (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCG CCG CCG CAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') a RP534 (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') amplifikujících variabilní oblast genu pro 16S rRNA (200bp), byla namnožena bakteriální DNA dle PCR programu s následujícími kroky: denaturace (3 min 94 °C), 35 cyklů (1 min 94 °C, 30 s 55 °C, 1 min 72 °C) a finální elongace (10 min 72 °C) (Muyzer et al., 1993).

Poté následovala analýza PCR produktů pomocí elektroforézy v gradientovém denaturačním gelu (DGGE) s gradientem 35–65 % podle (Mrázek et al., 2008). Pro minimalizování chyb při srovnávání dvou gelů byl do středu gelů umístěn standard obsahující směs PCR produktů. DGGE gely byly zpracovány v BioNumerics 6.6 software (AppliedMaths, Sint-Martens-Latem, Belgium) s nastavením: 7 % minimum profiling, 0 % grayzone, 0 % minimum area a 0 shoulder sensitivity. Následně byly vytipovány dva bandy zájmu (Obr. 3.) se stejnými normalizovanými hodnotami Rf.



**Obr. 3.** Polyakrylamidový gel zobrazující vybrané vzorky medů se standardem umístěným v středě a identifikovány bandy zájmu

Vybrané bandy byly vyříznuty z polyakrylamidového gelu sterilním skalpelem, umístěny do sterilní 1,5 ml eppendorf zkumavky a bylo přidáno 100  $\mu$ l sterilní destilované vody. DNA byla pomocí vortexování (1 min) a následnou centrifugací (167 Hz, 10 min) uvolněna. Poté byl 1  $\mu$ l roztoku použit pro amplifikaci a následnou identifikaci bakteriálních druhů použitím primerů FP341 a RP534 dle PCR programu (Muyzer et al., 1993).

Konečné PCR produkty byly přečištěny pomocí QIAquick PCR kitu (Qiagen) a sekvenovány (SeqMe). Výsledné sekvence byly porovnány s V3 regionem bakteriálních druhů v databázi GenBank (NCBI) použitím BLAST algoritmu a druhy se shodou 16S rRNA více než 96 % byly identifikovány.

#### 4.1.4 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qRT-PCR)

Kvantifikace DNA vybraných bakteriálních skupin proběhla pomocí mx3005 termocykleru (Stratagene, La Jolla, CA, USA) a použitím specifických primerů pro Gammaproteobacteria (1080 $\gamma$ F,  $\gamma$ 1202R), Firmicutes (928F-Firm, 1040FirmR) a Actinobacteria (Act920F3, Act1200R) (De Gregoris et al., 2011).

**Tab. 2.** Použité specifické primerové páry (De Gregoris et al., 2011)

Cílová skupina	Název	Sekvence
Gammaproteobacteria	1080 $\gamma$ F	TCGTCAGCTCGTGTYGTGA
	$\gamma$ 1202R	CGTAAGGGCCATGATG
Firmicutes	928F-Firm	TGAAACTYAAAGGAATTGACG
	1040FirmR	ACCATGCACCACCTGTC
Actinobacteria	Act920F3	TACGGCCGCAAGGCTA
	Act1200R	TCRTCCCCACCTTCCTCCG

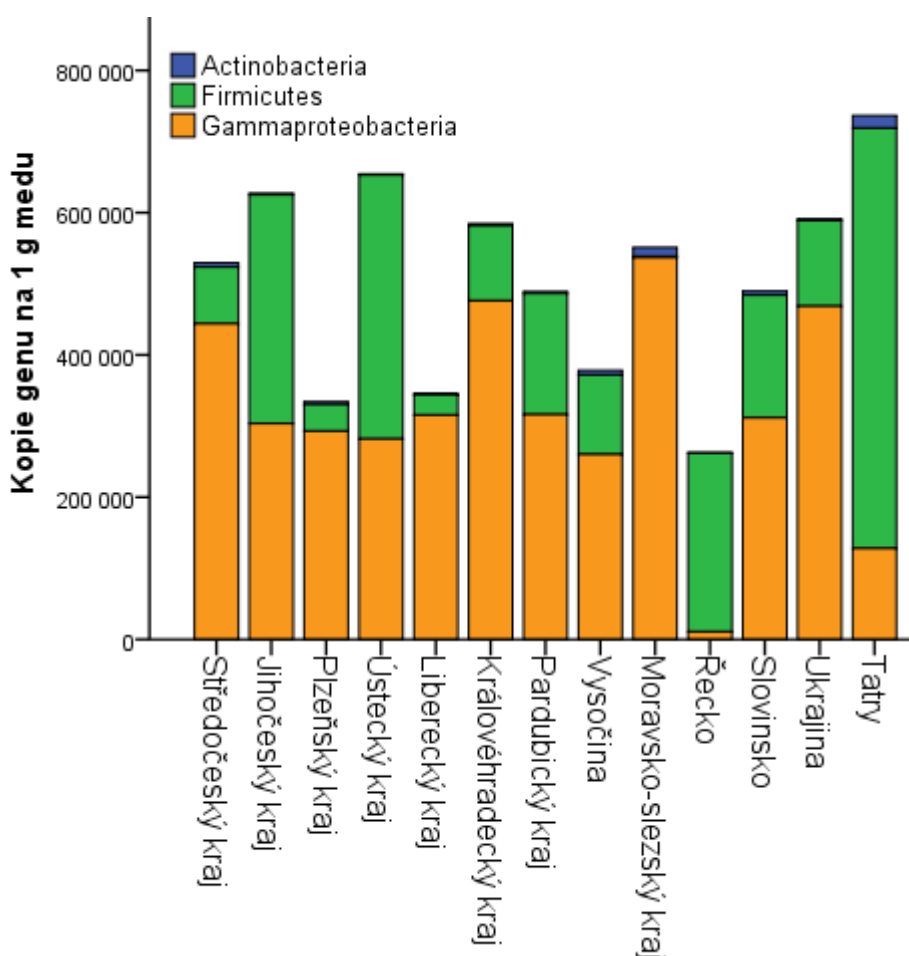
#### 4.1.5 Statistická analýza

Data byla statisticky vyhodnocena pomocí IBM SPSS Statistics 24 (IBM, Armonk, NY, USA). Pomocí stejného programu byla data graficky zobrazena a byly sestrojeny sloupcové a krabicové grafy tzv. boxploty, které zobrazují množství (kopie 16S rRNA genu na gram medu) vybraných skupin bakterií u medu s různým geografickým původem.



## 5 Výsledky

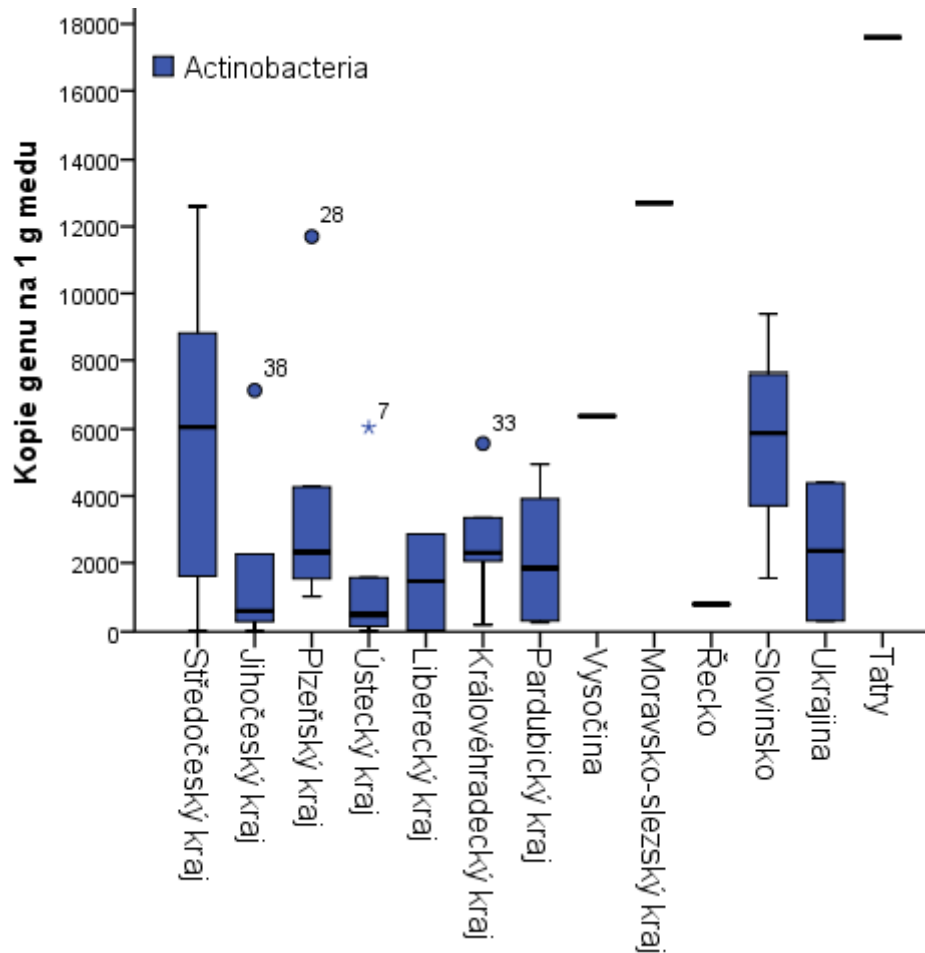
Kvantifikace vybraných bakteriálních skupin (Actinobacteria, Firmicutes a Gammaproteobacteria) proběhla ve 40 vzorcích medu z České republiky a v 7 vzorcích medu ze zahraničí. Všechny vzorky medu pocházely přímo od včelaře z tzv. prodeje ze dvora. Čtyři skupiny regionů jsou zastoupeny pouze jedním vzorkem medu, jedná se o kraj Moravskoslezský, Vysočinu a zahraniční vzorek medu z Řecka a Tater. Množství aktinobakterií, firmikutů a gammaproteobakterií v daných regionech zobrazuje obrázek 4. Celkově nejvíce medy obsahovaly gammaproteobakterie. Nejméně zastoupenou skupinu tvořily aktinobakterie.



**Obr. 4.** Graf zobrazuje množství (kopie 16S rRNA genu na gram medu) bakteriálních skupin v medu s různým geografickým původem.

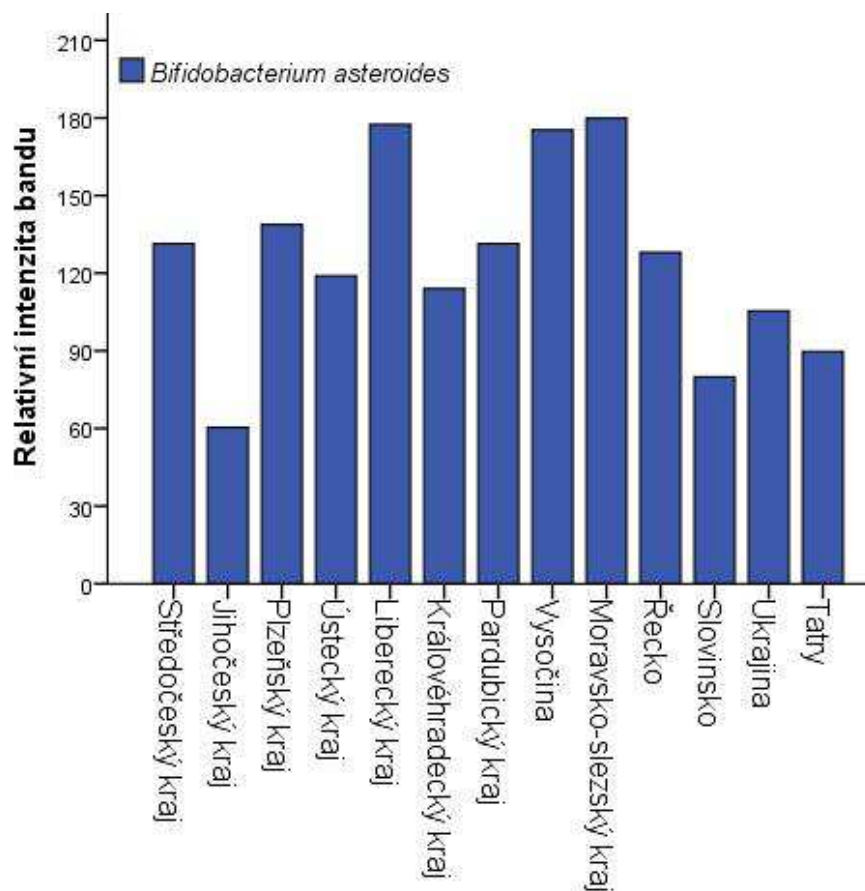
Aktinobakterie (Obr. 5.) byly nejvíce zastoupeny v Tatrách a Moravsko-slezském kraji. Ve Středočeském kraji byl jejich obsah také vysoký a byla zde největší variabilita

v jejich množství. Přítomnost aktinobakterií byla zjištěna u všech vzorků medu, byť byl jejich obsah minoritní.



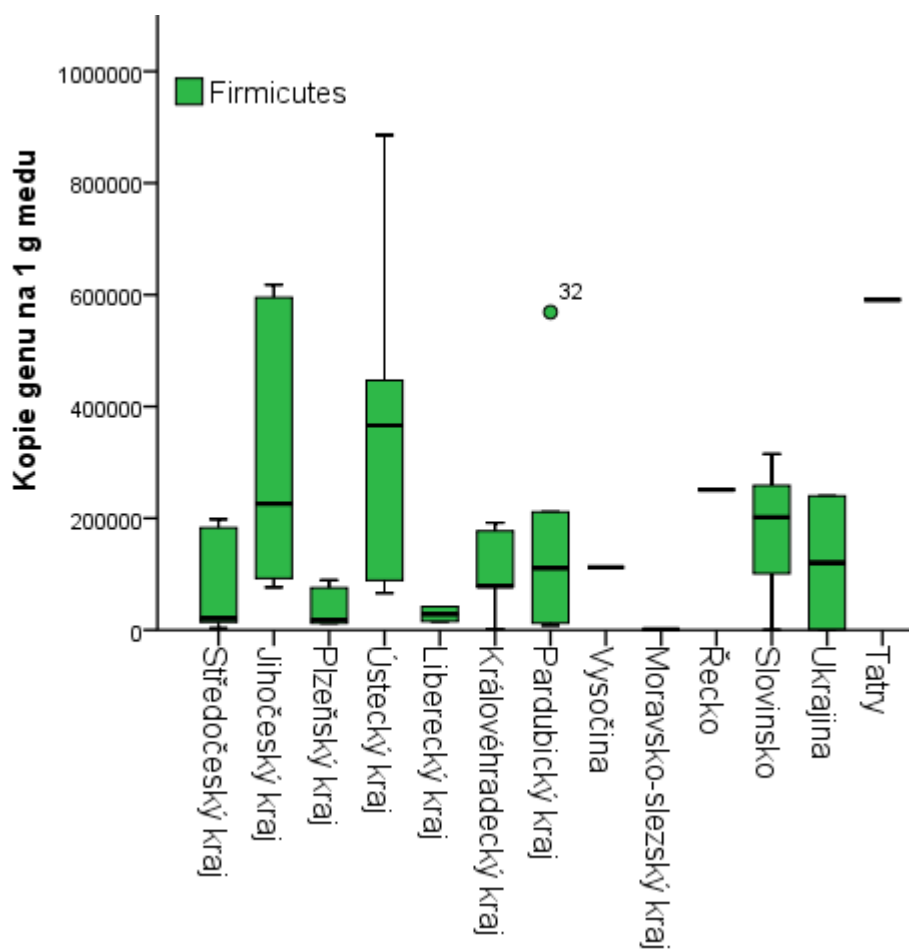
**Obr. 5.** Boxplot (krabicový graf) zobrazuje množství (kopie 16S rRNA genu na gram medu) aktinobakterií v medu s různým geografickým původem.

Bakterie *Bifidobacterium asteroides* (Obr. 6.) se nejvíce vyskytovala v Moravsko-slezském kraji, Libereckém kraji a na Vysočině. Nejméně byl tento druh bifidobakterie identifikován v Jihočeském kraji. Nižší zastoupení bylo i v zahraničních vzorcích medu, vyjma medu řeckého. Ostatní krajiny měly podobné zastoupení *Bifidobacterium asteroides*.



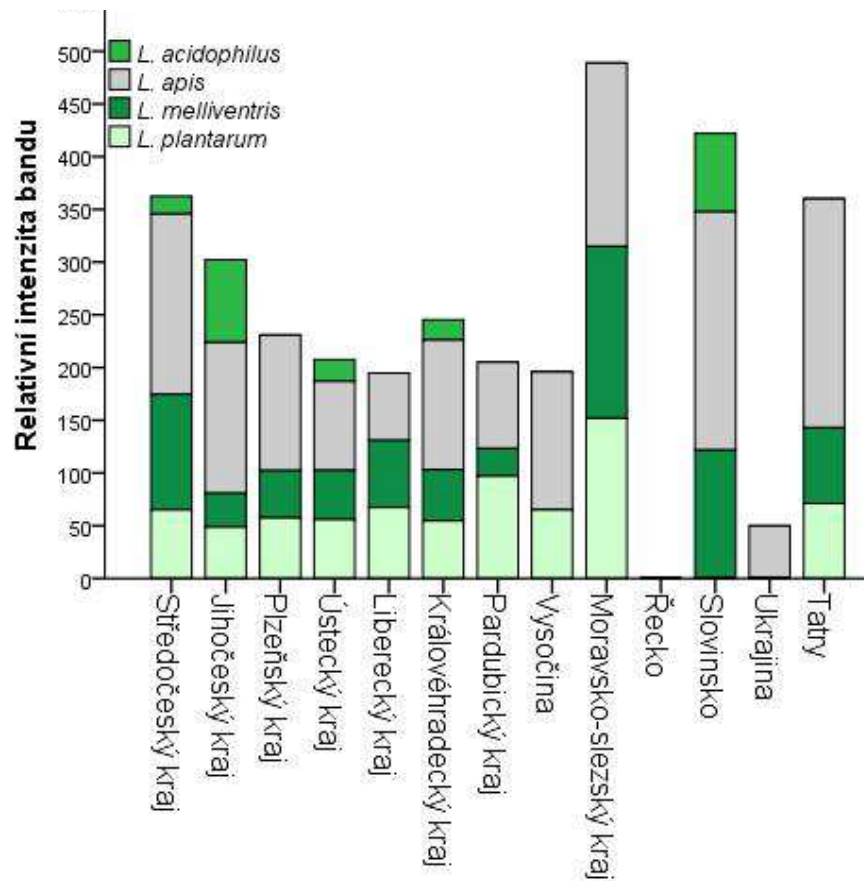
**Obr. 6.** Graf zobrazuje relativní intenzitu bandu, co představuje relativní hojnost *Bifidobacterium asteroides* v jednotlivých medech s různým geografickým původem.

Bakteriální skupina Firmicutes (Obr. 7.) byla druhou nejvíce rozšířenou ve vzorcích medu. Její zastoupení bylo v medech velmi variabilní, v některých regionech tato skupina byla dominantní, v jiných minoritní či nedošlo k její kvantifikaci vůbec. Zdá se, že med z Moravskoslezského kraje neobsahoval žádné firmikuty, obsah blízký nule znázorněný v grafu vzhledem k ostatním krajinám je však způsoben vysokými hodnotami na ose y a tím, že Moravsko-slezský region zastupoval jediný vzorek. Při identifikaci bakterií v jednotlivých vzorcích bylo naopak zjištěno, že vzorek obsahuje nejvíce laktobacilů, jež patří do skupiny firmikutů. V Plzeňském, Libereckém a Středočeském kraji dosahoval medián velmi nízké úrovně blízké nule. Největší rozdíl mezi vzorky byl v Ústeckém kraji. Tatranský vzorek medu obsahoval hojně firmikuty, kolem 60 000 kopií genu na 1 g medu, ve vzorku byla tato skupina dominantní. Firmikuty byly převládající skupinou bakterií i v řeckém medu, jejich množství zde bylo vyšší než 20 000 kopií genu na 1 g medu. V Jihočeském kraji byl výskyt také na vyšší úrovni.



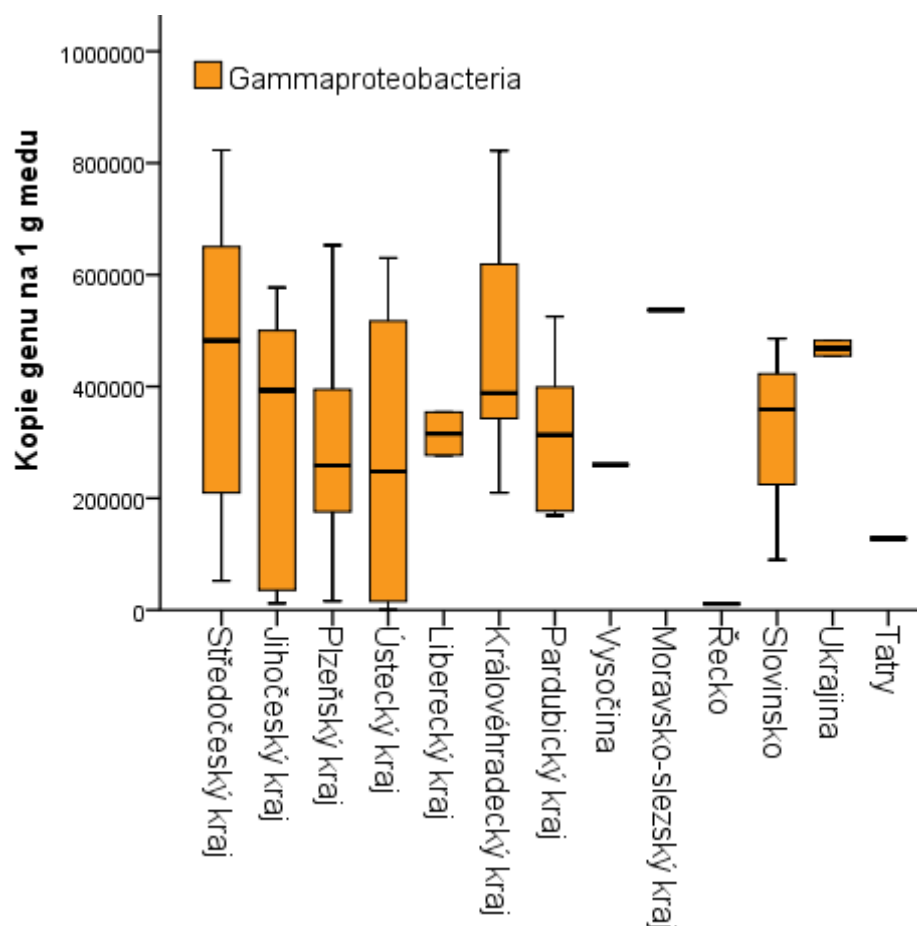
**Obr. 7.** Boxplot (krabicový graf) zobrazuje množství (kopie 16S rRNA genu na gram medu) firmikutů v medu s různým geografickým původem.

Obsah laktobacilů (Obr. 8.) byl ve vzorcích velmi rozmanitý. Pouze ve Středočeském, Jihočeském, Královéhradeckém a Ústeckém kraji byly zastoupeny všechny vybrané druhy laktobacilů (*L. acidophilus*, *L. apis*, *L. melliventris*, *L. plantarum*). Nejvíce laktobacilů obsahoval vzorek z Moravsko-slezského kraje, který mimo *L. acidophilus* obsahoval všechny uvedené druhy. Vybrané laktobacily byly hojně identifikovány i ve slovinských vzorcích, které nejvíce obsahovaly *L. apis*. Dále byly tyto probiotické bakterie nejvíce v tatranském medu a ve vzorcích ze Středočeského kraje, v obou regionech byl nejvíce zastoupen také *L. apis*. Tatranský vzorek měl vyrovnaný obsah *L. melliventris* a *L. plantarum*, ve Středočeském kraji jako druhý převládala *L. melliventris*, dále *L. plantarum* a nejméně *L. acidophilus*. Zahraniční vzorky kromě medu z Tater neobsahovaly *L. plantarum*, ukrajinské vzorky obsahovaly pouze *L. apis* a med z Řecka neobsahoval žádné laktobacily.



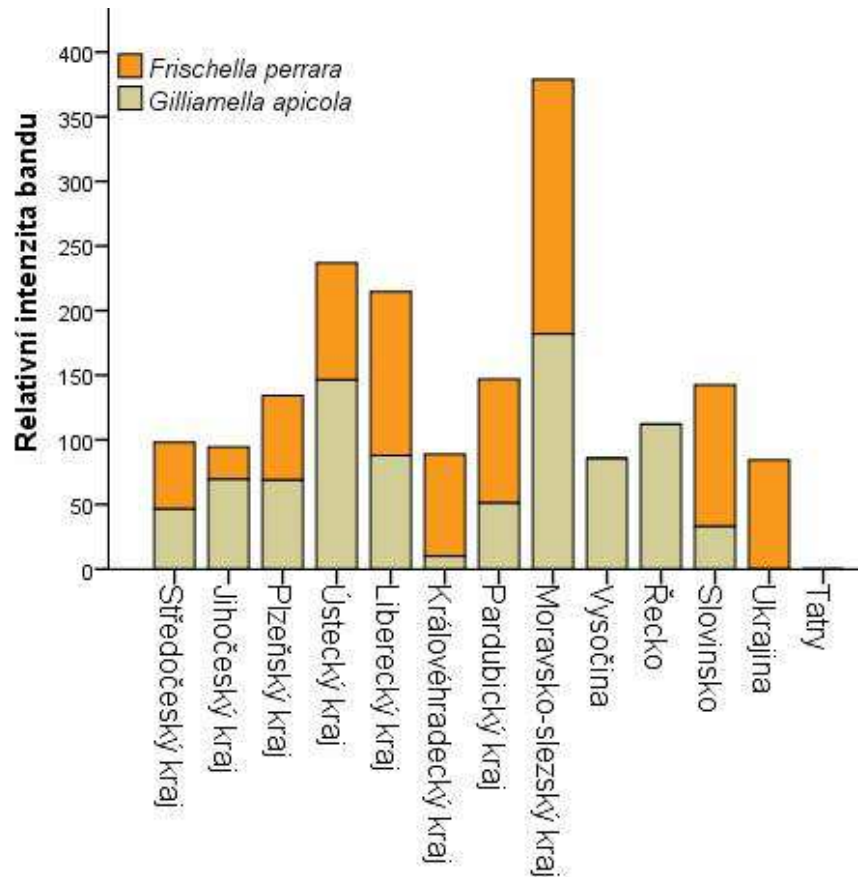
**Obr. 8.** Graf zobrazuje relativní intenzitu bandu, co představuje relativní hojnost vybraných laktobacilů v jednotlivých medech s různým geografickým původem.

Gammaproteobakterie (Obr. 9.) tvořily v medech nejhojnější skupinu. V mnoha regionech tvořily hlavní skupinu bakterií, převládali ve Středočeském, Plzeňském, Libereckém, Královéhradeckém, Pardubickém, Moravskoslezském kraji a také na Vysočině, Ukrajině a Slovinsku. Rozpětí jejich obsahu bylo vysoké ve Středočeském, Jihočeském, Plzeňském, Ústeckém i Královéhradeckém kraji. Nejméně byly kvantifikovány v řeckém medu, kde se jejich obsah blíží k nule.



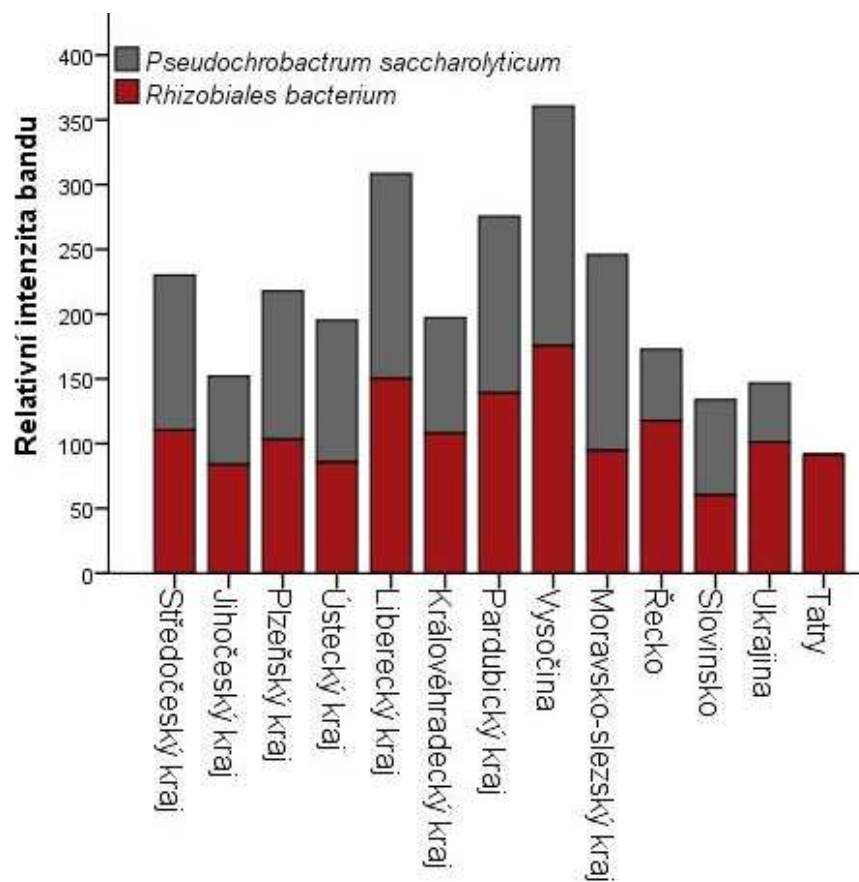
**Obr. 9.** Boxplot (krabicový graf) zobrazuje množství (kopie 16S rRNA genu na gram medu) gammaproteobakterií v medu s různým geografickým původem.

Nejvíce gammaproteobakterií *Frischella perrara* a *Gilliamella apicola* (Obr. 10.) obsahovaly vzorky z Moravsko-slezského kraje. Vzorek medu z Řecka a Vysočiny obsahoval pouze *Gilliamella apicola*. Naopak ukrajinské vzorky obsahovaly pouze *Frischella perrara*. U jediného vzorku z Tater nebyl identifikován žádný z těchto dvou bakteriálních druhů.



**Obr. 10.** Graf zobrazuje relativní intenzitu bandu, co představuje relativní hojnost vybraných druhů gammaproteobakterií v jednotlivých medech s různým geografickým původem.

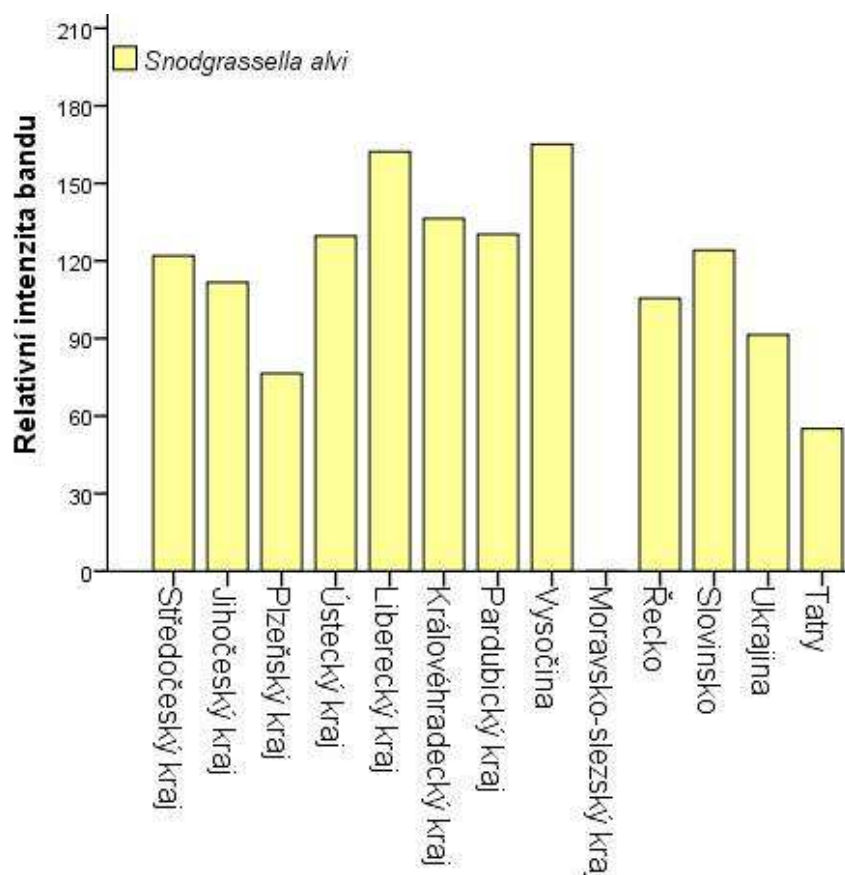
Bakteriální druh *Pseudochrobactrum saccharolyticum* a *Rhizobiales bacterium* (Obr. 11.) byl identifikován v nejvyšším množství na Vysočině, na které bylo zastoupení těchto dvou druhů vyrovnané. Druhé nejvyšší i vyrovnané množství obou alfaproteobakterií bylo v Libereckém kraji a dále v kraji Pardubickém a Moravsko-slezském. V ostatních krajinách bylo zastoupení podobné. Nižší množství *Pseudochrobactrum saccharolyticum* a *Rhizobiales bacterium* bylo zjištěno v Jihočeském kraji a v zahraničních vzorcích. Nejnižší zastoupení těchto dvou bakterií bylo v Tatrách, kde byl identifikován pouze *Rhizobiales bacterium*.



**Obr. 11.** Graf zobrazuje relativní intenzitu bandu, co představuje relativní hojnost vybraných druhů alfaproteobakterií v jednotlivých medech s různým geografickým původem.

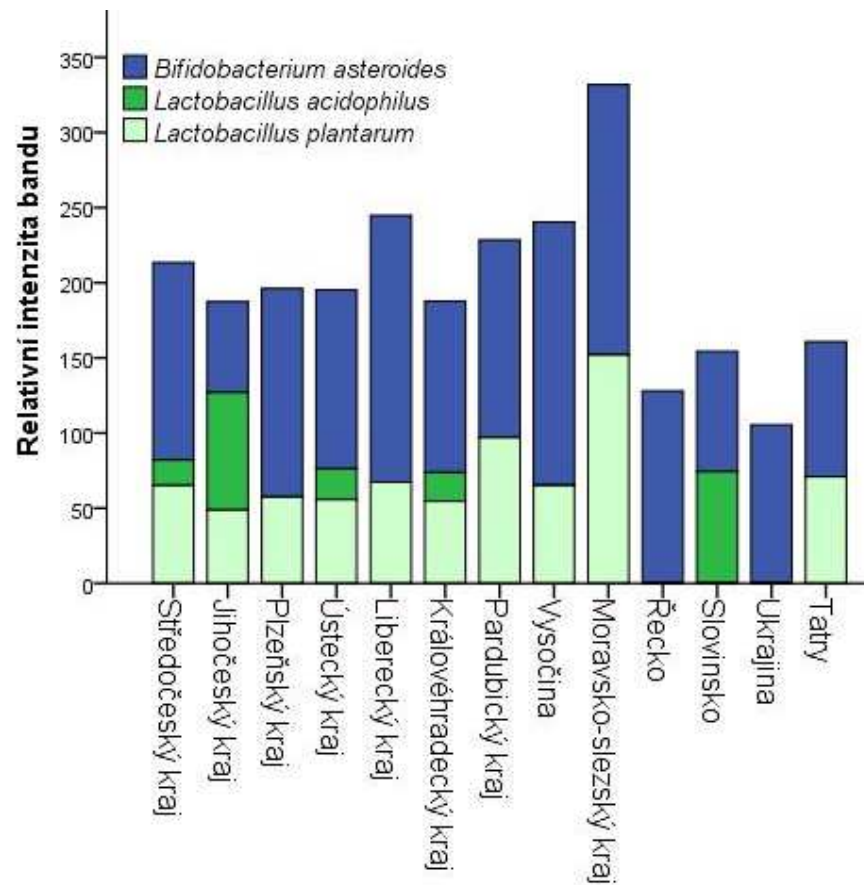
Kromě Moravsko-slezského kraje byla *Snodgrassella alvi* (Obr. 12.) identifikována na všech stanovištích. Její nejvyšší výskyt byl na Vysočině a v Libereckém kraji. Nejméně byla tato betaproteobakterie ve vzorku z Tater, v Plzeňském kraji a na Ukrajině.





**Obr. 12.** Graf zobrazuje relativní intenzitu bandu, co představuje relativní hojnost bakterie *Snodgrassella alvi* v jednotlivých medech s různým geografickým původem.

Nejhojněji obsahoval probiotické bakterie (Obr. 13.) vzorek medu z Moravsko-slezského kraje, který ovšem neobsahoval *L. acidophilus*. Dále byly tyto prospěšné bakterie nejvíce identifikovány v Libereckém kraji, na Vysočině, v Pardubickém a Středočeském kraji. Stejně jako u vzorku medu z Moravsko-slezského kraje i na stanovištích ve Vysočině, Tatrách, Libereckém, Pardubickém a Plzeňském kraji nebyl ve vzorcích identifikován *L. acidophilus*. Nejnižší zastoupení probiotik měly zahraniční medy, z nichž nejméně probiotické bakterie obsahovaly vzorky z Ukrajiny a Řecka.



**Obr. 13.** Graf zobrazuje relativní intenzitu bandu, co představuje relativní hojnost vybraných probiotických druhů v jednotlivých medech s různým geografickým původem.

## 6 Diskuze

Bakteriální spektrum ve vzorcích medu bylo variabilní a rozsáhlé, celkový obsah kopií genu na 1 g medu nepřesáhl 800 000. Nejvíce zastoupenou skupinu tvořily gammaproteobakterie. Tato třída zahrnuje významné bakterie, které jsou mikroaerofilní či anaerobní a pocházejí z TT včel. Nejvyšší množství gammaproteobakterií obsahoval slovinský akátový med. Zdá se, že mikrobiota medu byla nejvíce ovlivněna TT včel, jelikož i ostatní blíže identifikované bakterie v medu jsou součástí především včelí mikrobioty. Výjimkou jsou firmikuty, které se nacházejí i v rostlinných částech a při sběru a zpracování nektaru zřejmě kolonizují trávicí ústrojí včel.

V TT dělnic včely medonosné dominuje hlavních osm skupin bakterií, které tvoří více než 95 % bakterií u většiny jedinců (Ahn et al., 2012). Patří mezi ně *Gilliamella apicola*, *Frischella perrara*, *Snodgrassella alvi*, skupina laktobacilů (*L. mellis*, *L. mellifera*), skupina laktobacilů (*L. helsingborgensis*, *L. melliventris*, *L. kimbladii*), skupina bifidobakterií (*B. asteroides*, *B. actinocoloniiforme*, *B. bohemicum*), Bartonellaceae (*Rhizobiales*) a *Parasaccharibacter apium* (Moran, 2015). Většina těchto bakteriálních druhů byla identifikována i ve vzorcích medu. Přibližně 95 % těchto mikroorganismů pochází ze zadní části TT. Přední část včelího traktu obsahuje také množství bakterií (Olofsson a Vásquez, 2008), ale studie kvantifikace bakteriálních buněk zjistila, že tato populace je velmi nízká (Anderson et al., 2013). V přední části střeva dominují laktobacily (nejvíce *Lactobacillus kunkeei*) a Acetobacteraceae, tyto skupiny najdeme i ve včelím úlu, v potravě včel (nektaru, mateří kašičce) a v medu (Corby-Harris et al., 2014).

Střední část TT obsahuje také relativně málo bakterií, které se shlukují hlavně ve vzdálenější části blíže k zadní části traktu (Martinson et al., 2012). Zadní část TT se skládá ze dvou oddílů. Z ilea, což je úzká trubice s šesti podélnými vychlípeninami, a z většího podobně utvořeného rekta (Moran, 2015). Ileu dominují tři hlavní proteobakteriální druhy *Gilliamella apicola*, *Frischella perrara*, *Snodgrassella alvi*, které vytvářejí hustý biofilm, jenž začíná u křížení s Malpighickou trubicí a pokračuje po celé délce stěny ilea (Powell et al., 2014). *Gilliamella apicola* a *Snodgrassella alvi* utváří biofilm přímo na kutikule lemující střevo. Ve vzorku z Moravsko-slezského kraje a z Kasejovic v Plzeňském kraji, nebyla identifikována žádná kopie genu tohoto druhu, což může indikovat slabý zdravotní stav včelstva. *Snodgrassella alvi* tvorbou biofilmu vytlačuje patogeny a v její nepřítomnosti může být včelstvo snadno napadeno původci nemoci. V malém množství se v lumenu ilea

nachází také *L. helsingborgensis*, *L. melliventris* a *L. kimbladii* (Moran, 2015). *Frischella perrara* je v ileu typicky zastoupena v menší míře, někdy i zcela chybí, ovšem dominuje tamní mikrobiotě okolo 8. dne dospělého věku včely (Powell et al., 2014). Nejvyšší obsah *Frischella perrara* byl ve vzorku květového medu z Moravsko-slezského kraje, tento med byl zřejmě odebrán mladým včelám, kterým v TT převládala *Frischella perrara*. U 18 vzorků medu nebyl tento druh identifikován vůbec, dá se proto předpokládat, že tyto medy pocházely od starších včel.

*Gilliamella apicola* se nejvíce vyskytovala v medu z Moravsko-slezského kraje, Ústeckého kraje a v řeckém medu. Ve studii zkoumající kompletní sekvenční genom kultivovaných izolátů *Gilliamella apicola*, *Snodgrassella alvi* se ukázalo, že tyto dva mikrobiální druhy mají velmi komplementární metabolické funkce. Jelikož *Gilliamella apicola* obsahuje velké množství přenašečů cukru a dráhy na jejich utilizaci, nemůže *Snodgrassella alvi* využívat cukr jako hlavní zdroj uhlíku, z tohoto důvodu využívá produkty metabolismu cukrů karboxyláty. Tato metabolická komplementarita byla nalezena u všech kmenů *G. apicola* a *S. alvi* a naznačuje dlouho koevoluci těchto bakterií (Kwong et al., 2014). Kmeny *G. apicola* izolované ze včel obsahují mnohem více genů pro využití sacharidů, nežli kmeny izolované z čmeláka (Engel et al., 2014), což je v souladu s rozšířenou úlohou včel na jejich výživu, zpracování nektaru a medu. Je proto velmi zajímavé, že vzorek medu z Moravsko-slezského kraje, u něhož byl nejvyšší obsah *Gilliamella apicola*, neobsahoval žádnou kopii genu *Snodgrassella alvi*. Stejným případem byl vzorek medu z Kasejovic z Plzeňského regionu. Pozoruhodné je i porovnání absence těchto mikroorganismů, jelikož nepřítomnost *Gilliamella apicola* ve vzorcích byla vyšší, celkem nebyla identifikována ve 23 vzorcích. Laktobacily a bifidobakterie mají také hlavní funkci při katabolismu sacharidů (Lee et al., 2015), je tudíž možné, že *Snodgrassella alvi* využívá produkty štěpení cukrů probiotických bakterií, nebo bez přítomnosti *Gilliamella apicola* štěpí sacharidy sama.

Mezi další identifikované proteobakterie ve vzorcích medu patří *Rhizobiales bacterium*, nejvíce se vyskytoval na Vysočině, která obsahovala i vysoké množství další alfaproteobakterie *Pseudochrobactrum saccharolyticum*, což je poměrně nově nalezená bakterie, která má vysokou schopnost redukovat chrom (Long et al., 2013). *Rhizobiales bacterium* a *Pseudochrobactrum saccharolyticum* jsou přítomné variabilně v různých částech střev dospělých včel *A. mellifera*, množství v medu proto závisí na osídlení traktu dělnic. Vyšší výskyt obou bakterií byl také v Libereckém a Pardubickém kraji. Vysoký obsah

*R. bacterium* i *P. saccharolyticum* byl i ve vzorku medu z Klatov. Naopak ve vzorku medu z Jaroměře a v květovém medu ze Slovinska nebyly identifikovány tyto bakterie vůbec.

V rektu včely převládá Gram-pozitivní skupina laktobacilů (*L. mellis*, *L. mellifera*, *L. helsingborgensis*, *L. melliventris*, *L. kimbladii*) a bifidobakterií (*B. asteroides*, *B. actinocoloniiforme*, *B. bohemicum*), která zde tvoří rozsáhlou bakteriální komunitu (Martinson et al., 2012). Námi zkoumané vzorky obsahovaly čtyři druhy laktobacilů (*L. acidophilus*, *L. apis*, *L. melliventris*, *L. plantarum*) a to nejvíc Moravsko-slezský kraj, Slovinsko, Tatry a kraj Středočeský. Obsah více druhů laktobacilů v medech těchto krajů může být způsoben pestřejší květovou snůškou, jelikož se nacházejí na květech rostlin. Vysoký obsah laktobacilů je odrazem dobrého zdravotního stavu včelstva, kde tyto potenciálně probiotické bakterie mají ochranný vliv (Vásquez et al., 2012). Laktobacily a bifidobakterie například inhibují růst *Paenibacillus larvae* (Forsgren et al., 2010) a dalších plísňových patogenů (Sabaté et al., 2009).

Pomerančový med z Řecka jako jediný neobsahoval žádné laktobacily, dalo by se tudíž předpokládat, že byl podroben záhřevu. Vzorek ovšem obsahoval hojně *Bifidobacterium asteroides* (128 kopií genu na 1 g medu), který má optimální teplotu růstu 37 °C (Hayashi et al., 2013). Je možné, že *B. asteroides* ve větší míře kolonizovaly střevo včel a tím snáze přešly do včelích produktů. Stejný případ byl objeven u jednoho vzorku ukrajinského medu. Druhý vzorek z Ukrajiny obsahoval pouze *L. apis*, což může indikovat horší zdravotní stav včel. Bakterie mléčného kvašení mají v medu zajímavou úlohu. Ve studii med z vřesu, který obsahoval 13 druhů bakterií mléčného kvašení, vykazoval inhibiční účinek *in vitro* vůči patogenům způsobující mastitidu. I když mechanismus účinku nebyl zcela objasněn, předpokládá se dle minulých studií, že inhibiči způsobují bioaktivní metabolity, extracelulární proteiny a také antimikrobiální aktivita medu. Jelikož sterilovaný med z vřesu sám o sobě nevykazoval bakteriostatický účinek, antibakteriální vliv je připisován bakteriím mléčného kvašení, mezi kterými mimo jiné figuroval *Lactobacillus melliventris*, *Lactobacillus apis* a *Bifidobacterium asteroides* (Piccart et al., 2016).

Nejvyšší výskyt *B. asteroides*, který z TT včel přechází do medu, byl v Moravsko-slezském kraji, Libereckém kraji a na Vysočině. Bifidobakterie patří mezi aktinobakterie, což jsou Gram-pozitivní, striktně anaerobní bakterie, tyčinkovitého tvaru s častým větvením do tvaru „Y“ či „V“. Je zajímavé, že *B. asteroides* přítomné v TT včel, si zachovává kapacitu pro aerobní dýchání na rozdíl od bifidobakterií u savců, které jsou zcela anaerobní (Bottacini et al., 2012). Ve včelím traktu je proto pravděpodobně vyšší koncentrace kyslíku v porovnání se savčím (Moran, 2015).

Nejnižší výskyt *B. asteroides* byl zaznamenán v Jihočeském kraji. Celkem ve 3 vzorcích medu nebyl tento druh identifikován vůbec, jednalo se o vzorek z Jaroměře (Královéhradecký kraj) z Číčenic u Vodňan a Prachatic (Jihočeský kraj). Nejvíce byl *B. asteroides* detekován ve vzorku květového medu z Klatov (Plzeňský region). Nižší výskyt probiotických bakterií nemusí souviset pouze se zdravím včel, ale také ho ovlivňuje doba skladování medu. Ve studii Kňazovická et al. (2015) poklesl obsah bakterií mléčného kvašení ve vzorcích čerstvého řepkového medu o polovinu po jeho šestiměsíčním skladování. Je důležitý další výzkum zaměřující se na bakterie mléčného kvašení, jelikož vede k lepšímu porozumění zdraví včel a produkce medu. Přirozeně v TT vyskytující se bakterie mají velký význam nejen pro budoucnost včel, ale také jako možná probiotika pro člověka (Olofsson a Vásquez, 2008).

Z probiotik byly identifikovány ve vzorcích medu *L. acidophilus*, *L. plantarum* a *B. asteroides*, které se běžně vyskytují v TT člověka. Probiotické bakterie jsou zdravotně prospěšné pro své hostitele. Mezi jejich příznivé účinky patří antimikrobiální efekt vůči patogenům (Cummings et al., 2001), ochranná funkce proti vzniku nádorů (Kumar et al., 2010) a diabetu (Lye et al., 2009). Dále mají vliv na laktosovou intoleranci (Tsai et al., 2012), hladinu cholesterolu (Lye et al., 2009) a léčbu průjmů (Cummings et al., 2001). Nejvyšší výskyt bakterií mléčného kvašení byl detekován v medu Moravsko-slezském, Libereckém, Pardubickém, Středočeském kraji a na Vysočině. Vzorky medu nejvíce obsahovaly druhy *B. asteroides* a *L. plantarum*. Nejméně byl identifikován *L. acidophilus*. Zastoupení, poměr a množství prospěšných bakterií byl v medech proměnlivý. Variabilita obsahu bakterií mléčného kvašení v medu je způsobená rozmanitým původem zdrojů nektaru (Olofsson a Vásquez, 2008). Studie z roku 2009 identifikovala laktobacily, bifidobakterie a Pasteurellaceae v pylu, který byl k analýze shromažďován ze včelích nožiček, obdobné zastoupení bakterií měla i čtrnáctidenní mateří kašička. Bylo zjištěno, že mateří kašička je zřejmě fermentována bakteriemi mléčného kvašení, při míšení nektaru z žaludku včely s pylem (Vásquez a Olofsson, 2009a), pomocí fermentace probiotickými bakteriemi nejspíše dochází také k přeměně nektaru v med (Vásquez et al. 2009b). Množství probiotik v medu je důležité, nejméně jich bylo zastoupeno v zahraničních vzorcích medu. Snížený obsah v zahraničních medech může být způsoben dostupností čerstvého medu vzhledem k jeho vzdálenosti. Z čehož plyne doporučení konzumovat medy ze svého blízkého okolí, nejlépe od známého včelaře, jelikož nejvíce prospěšných bakterií obsahují čerstvé medy.

## 7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo porovnat mikrobiotu medů pocházejících z různých stanovišť na základě identifikace bakteriálního spektra a kvantifikace vybraných skupin bakterií. Mikrobiota medu se nejvíce lišila v počtu aktinobakterií. Nejmenší výkyvy byly zaznamenány u gammaproteobakterií. Ve vzorcích byly identifikovány tři probiotické druhy (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* a *Bifidobacterium asteroides*), které jsou svou ochranou a nutriční funkcí významné pro člověka. Nejvíce jich bylo zaznamenáno v Moravsko-slezském kraji. Med díky obsahu biologicky aktivních struktur, tvoří významnou a tradiční složku našeho jídelníčku. Byla potvrzena hypotéza této diplomové práce, mikrobiota medu se mění v závislosti na lokalitě úlu. V budoucnu, by bylo dobré porovnat mikrobiotu medu i v závislosti na potravinové nabídce včel, rozšířit kvantifikaci bakterií o skupinu alfa proteobakterií a navrhnout primery beta proteobakterií, které hrají důležitou roli v mikrobiotě včel.

## 8 Seznam literatury

- Abd-El Aal, A. M., El-Hadidy, M. R., El-Mashad, N. B., El-Sebaie, A. H. 2007. Antimicrobial effect of bee honey in comparison to antibiotics on organisms isolated from infected burns. *Annals of Burns and fire disasters*. 20 (2). 83.
- Abdulrhman, M., El Hefnawy, M., Ali, R., Abdel Hamid, I., Abou El-Goud, A., Refai, D. 2013. Effects of honey, sucrose and glucose on blood glucose and C-peptide in patients with type 1 diabetes mellitus. *Complementary Therapies in Clinical Practice*. 19 (1). 15-19.
- Abramovič, H., Jamnik, M., Burkan, L., Kač, M. 2008. Water activity and water content in Slovenian honeys. *Food control*. 19 (11). 1086-1090.
- Adams, C. J., Manley-Harris, M., Molan, P. C. 2009. The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydrate Research*. 344 (8). 1050-1053.
- Ahn, J.-H., Hong, I.-P., Bok, J.-I., Kim, B.-Y., Song, J., Weon, H.-Y. 2012. Pyrosequencing analysis of the bacterial communities in the guts of honey bees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Korea. *Journal of Microbiology*. 50 (5). 735-745.
- Aissat, S., Ahmed, M., Djebli, N. 2016. Propolis-Sahara honeys preparation exhibits antibacterial and anti-biofilm activity against bacterial biofilms formed on urinary catheters. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 6 (11). 873-877.
- Ajibola, A., Chamunorwa, J. P., Erlwanger, K. H. 2012. Long-term dietary supplementation with natural honey does not predispose growing male rats to metabolic syndrome. *BioMed Central*. P3.
- al Somal, N., Coley, K. E., Molan, P. C., Hancock, B. M. 1994. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of manuka honey. *J R Soc Med*. 87 (1). 9-12.



Al-Waili, N. 2003. Intrapulmonary administration of natural honey solution, hyperosmolar dextrose or hypoosmolar distill water to normal individuals and to patients with type-2 diabetes mellitus or hypertension: their effects on blood glucose level, plasma insulin and C-peptide, blood pressure and peaked expiratory flow rate. *European journal of medical research*. 8 (7). 295-303.

Alandejani, T., Marsan, J., Ferris, W., Slinger, R., Chan, F. 2009. Effectiveness of honey on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 141 (1). 114-118.

Alberoni, D., Gaggia, F., Baffoni, L., Di Gioia, D. 2016. Beneficial microorganisms for honey bees: problems and progresses. *Appl Microbiol Biotechnol*. 100 (22). 9469-9482.

Alvarez, M. D. L. A., Debattista, N. B., Pappano, N. B. 2006. Synergism of flavonoids with bacteriostatic action against *Staphylococcus aureus* ATCC 25 923 and *Escherichia coli* ATCC 25 922. *Biocell*. 30 (1). 39-42.

Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., González-Paramás, A. M., Damiani, E., Astolfi, P., Martinez-Sanchez, G., Bompadre, S., Quiles, J. L., Santos-Buelga, C., Battino, M. 2012. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*. 50 (5). 1508-1516.

Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Mott, B. M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M. R., Walton, A., Jones, B. M., Corby-Harris, V. 2013. Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*). *PloS one*. 8 (12). e83125.

Anklam, E. 1998. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*. 63 (4). 549-562.

Ansari, M. J., Al-Ghamdi, A., Usmani, S., Al-Waili, N. S., Sharma, D., Nuru, A., Al-Attal, Y. 2013. Effect of Jujube Honey on *Candida albicans* Growth and Biofilm Formation. *Archives of Medical Research*. 44 (5). 352-360.

- Arnon, S. S., Midura, T. F., Clay, S. A., Wood, R. M., Chin, J. 1977. Infant botulism: epidemiological, clinical, and laboratory aspects. *Jama*. 237 (18). 1946-1951.
- Baltrušaitytė, V., Venskutonis, P. R., Čeksterytė, V. 2007. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry*. 101 (2). 502-514.
- Barra, M. P. G., Ponce-Díaz, M. C., Venegas-Gallegos, C. 2010. Volatile compounds in honey produced in the central valley of Ñuble province, Chile. *Chilean Journal of Agricultural research*, 70 (1). 75 – 84.
- Batista, B. L., Da Silva, L. R. S., Rocha, B. A., Rodrigues, J. L., Berretta-Silva, A. A., Bonates, T. O., Barbosa, F., 2012. Multi-element determination in Brazilian honey samples by inductively coupled plasma mass spectrometry and estimation of geographic origin with data mining techniques. *Food Research International*. 49. 209-215. ISSN 0963-9969.
- Bertoncelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M., Golob, T. 2007. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*. 105 (2). 822-828.
- Blair, S. E., Cokcetin, N. N., Harry, E. J., Carter, D. A. 2009. The unusual antibacterial activity of medical-grade *Leptospermum* honey: antibacterial spectrum, resistance and transcriptome analysis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 28 (10). 1199-1208.
- Blažková, L., 2006. *Voskařství*. Grada Publishing a.s. Praha. s. 108. ISBN: 80-247-1341-1.
- Boffo, E. F., Tavares, L. A., Tobias, A. C., Ferreira, M. M., Ferreira, A. G. 2012. Identification of components of Brazilian honey by <sup>1</sup>H NMR and classification of its botanical origin by chemometric methods. *LWT-Food Science and Technology*. 49. 55-63. ISSN 0023-6438.
- Bogdanov, S. 1997. Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *LWT-Food Science and Technology*. 30 (7). 748-753. ISSN 0023-6438.

- Bogdanov, S., Lüllmann, C., Martin, P., von der Ohe, W., Russmann, H., Vorwohl, G., Flamini, C. 1999. Honey quality and international regulatory standards: review by the International Honey Commission. *Bee world*. 80 (2). 61-69. ISSN 0005-772X.
- Bogdanov, S., Ruoff, K., Persano Oddo, L. 2004. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie*. 35 (1). 4-17.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., Gallmann, P. 2008. Honey for nutrition and health: a review. *Journal of the American College of Nutrition*. 27 (6). 677-689.
- Bonté, F., Desmoulière, A. 2013. Le miel: origine et composition. *Actualités pharmaceutiques*. 52 (531). 18-21.
- Bottacini, F., Milani, C., Turrone, F., Sánchez, B., Foroni, E., Duranti, S., Serafini, F., Viappiani, A., Strati, F., Ferrarini, A. 2012. *Bifidobacterium asteroides* PRL2011 genome analysis reveals clues for colonization of the insect gut. *PLoS One*. 7 (9). e44229.
- Bryers, J. D., Ratner, B. D. 2004. Bioinspired implant materials befuddle bacteria. *ASM News-American Society for Microbiology*. 70 (5). 232-232.
- Butler, È., Alsterfjord, M., Olofsson, T. C., Karlsson, C., Malmström, J., Vásquez, A. 2013. Proteins of novel lactic acid bacteria from *Apis mellifera mellifera*: an insight into the production of known extra-cellular proteins during microbial stress. *BMC microbiology*. 13 (1). 235.
- Butler, È., Oien, R. F., Lindholm, C., Olofsson, T. C., Nilson, B., Vásquez, A. 2014. A pilot study investigating lactic acid bacterial symbionts from the honeybee in inhibiting human chronic wound pathogens. *International wound journal*. 13 (5). 729-737.
- Campos, M. D. G. R., Sabatier, S., Amiot, M. J., Aubert, S. 1990. Characterization of flavonoids in three hive products: bee pollen, propolis, and honey. *Planta Medica*. 56 (06). 580-581.

- Campos, G., Della Modesta, R. C., Da Silva, T. J. P., Raslan, D. S. 2001. Comparison of some components between floral honey and honeydew honey. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 60. 59-64.
- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M. S. 2007. Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys. *Food Chemistry*. 103 (2). 601-606.
- Cavia, M. M., Fernández-Muiño, M. A., Gómez-Alonso, E., Montes-Pérez, M. J., Huidobro, J. F., Sancho, M. T. 2002. Evolution of fructose and glucose in honey over one year: influence of induced granulation. *Food Chemistry*. 78 (2). 157-161. ISSN 0308-8146.
- Cavia, M. M., Fernández-Muiño, M. A., Alonso-Torre, S. R., Huidobro, J. F., Sancho, M. T. 2007. Evolution of acidity of honeys from continental climates: Influence of induced granulation. *Food chemistry*. 100 (4). 1728-1733.
- Ceksteryte, V., Kazlauskas, S., Racys, J. 2006. Composition of flavonoids in Lithuanian honey and beebread. *Biologija*. 2. 28-33.
- Centorbi, H. J., Aliendro, O. E., Demo, N. O., Dutto, R., Fernandez, R., de Centorbi, O. N. P. 1999. First case of infant botulism associated with honey feeding in Argentina. *Anaerobe*. 5 (3). 181-183.
- Cherchi, A., Spanedda, L., Tuberoso, C., Cabras, P. 1994. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of organic acids in honey. *Journal of Chromatography A*. 669 (1). 59-64.
- Chernetsova, E. S., Morlock, G. E. 2012. Assessing the capabilities of direct analysis in real time mass spectrometry for 5-hydroxymethylfurfural quantitation in honey. *International Journal of Mass Spectrometry*. 314. 22-32. ISSN 1387-3806.
- Chow, J. 2002. Probiotics and prebiotics: A brief overview. *Journal of Renal Nutrition*. 12 (2). 76-86.

- Ciulu, M., Solinas, S., Floris, I., Panzanelli, A., Pilo, M. I., Piu, P. C., Spano, N., Sanna, G. 2011. RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta*. 83 (3). 924-929.
- Codex Alimentarius, C. 1987. Revised Codex Standard For Honey Codex Stan 12-1981. Rev. 1. 1-7.
- Cohen, H. A., Rozen, J., Kristal, H., Laks, Y., Berkovitch, M., Uziel, Y., Kozer, E., Pomeranz, A., Efrat, H. 2012. Effect of honey on nocturnal cough and sleep quality: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Pediatrics*. 130 (3). 465-471.
- Consonni, R., Cagliani, L. R. 2008. Geographical characterization of polyfloral and acacia honeys by nuclear magnetic resonance and chemometrics. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56 (16). 6873-6880.
- Conti, M. E. 2000. Lazio region (central Italy) honeys: a survey of mineral content and typical quality parameters. *Food Control*. 11 (6). 459-463.
- Cooper, R. A., Lindsay, E., Molan, P. C. 2011. Testing the susceptibility to manuka honey of streptococci isolated from wound swabs. *Journal of ApiProduct & ApiMedical Science*. 3 (3). 117-122.
- Corby-Harris, V., Maes, P., Anderson, K. E. 2014. The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PloS one*, 9 (4). e95056.
- Cotter, P. D., Ross, R. P., Hill, C. 2013. Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics?. *Nature Reviews Microbiology*. 11 (2). 95-105.
- Cummings, J. H., Macfarlane, G. T., Englyst, H. N. 2001. Prebiotic digestion and fermentation. *The American journal of clinical nutrition*. 73 (2). 415s-420s.
- Čermáková, T., Husáriková, M., Chlebo, R. 2010. *Kniha o medu*. Eastone CZR, s.r.o. Bratislava. s. 280. ISBN: 978-80-8109-132-2.

Česko. Vyhláška č. 76/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. Sbírnka zákonů. částka 32/2003. ze dne 27. 3. 2003. [cit. 2017-04-09]. Dostupné z: [http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe\\_uplna-zneni\\_vyhlaska-2003-76-potraviny.html](http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_vyhlaska-2003-76-potraviny.html)

Čopíková, J., Moravcová, J., Wimmer, Z., Opletal, L., Lapčík, O., Drašar, P. 2013. Náhradní sladidla. Chem. Listy. 107. 867-874.

Das, A., Datta, S., Mukherjee, S., Bose, S., Ghosh, S., Dhar, P. 2015. Evaluation of antioxidative, antibacterial and probiotic growth stimulatory activities of *Sesamum indicum* honey containing phenolic compounds and lignans. LWT - Food Science and Technology. 61 (1). 244-250.

Da Silva, P. M., Gauche C., Gonzaga L. V., Costa A. C., Fett R. 2016. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. Food chemistry. 196. 309-323. ISSN 0308-8146.

De Alda-Garcilope, C., Gallego-Picó, A., Bravo-Yagüe, J. C., Garcinuño-Martínez, R. M., Fernández-Hernando, P. 2012. Characterization of Spanish honeys with protected designation of origin "Miel de Granada" according to their mineral content. Food chemistry. 135 (3). 1785-1788. ISSN 0308-8146.

del Campo, G., Zuriarrain, J., Zuriarrain, A., Berregi, I. 2016. Quantitative determination of carboxylic acids, amino acids, carbohydrates, ethanol and hydroxymethylfurfural in honey by <sup>1</sup>H NMR. Food chemistry. 196. 1031-1039.

De La Fuente, E., Ruiz-Matute, A. I., Valencia-Barrera, R. M., Sanz, J., Castro, I. M. 2011. Carbohydrate composition of Spanish unifloral honeys. Food Chemistry. 129 (4). 1483-1489. ISSN 0308-8146.

De Gregoris, T. B., Aldred, N., Clare, A. S., Burgess, J. G. 2011. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. Journal of microbiological methods. 86 (3). 351-356.

- Di Girolamo, F., D'Amato, A., Righetti, P. G. 2012. Assessment of the floral origin of honey via proteomic tools. *Journal of proteomics*. 75 (12). 3688-3693.
- Diez, M. J., Andrés, C., Terrab, A. 2004. Physicochemical parameters and pollen analysis of Moroccan honeydew honeys. *International journal of food science & technology*. 39 (2). 167-176.
- Domingo, R. M., Haller, J. S., Gruenthal, M. 2008. Infant botulism: two recent cases and literature review. *Journal of child neurology*. 23 (11). 1336-1346.
- Dupal, L., Kamler F., Titěra D., Vořechovská M., Vinšová H. 2015. Med. Praha: Sdružení českých spotřebitelů, z.ú. v rámci priority pracovní skupiny Potraviny a spotřebitel při České technologické platformě pro potraviny, Jak poznáme kvalitu?. ISBN 978-80-87719-29-9.
- Engel, P., Stepanauskas, R., Moran, N. A. 2014. Hidden diversity in honey bee gut symbionts detected by single-cell genomics. *PLoS Genet*. 10 (9). e1004596.
- Escuredo, O., Míguez, M., Fernández-González, M., Seijo, M. C. 2013. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food chemistry*. 138 (2). 851-856.
- Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-González, M., Seijo, M. C. 2014. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry*. 149. 84-90. ISSN 0308-8146.
- Fell, R. D. 1978. Color grading of honey. *American Bee Journal*. 118 (12). 782. ISSN 0002-7626.
- Feigin, R. D., Cherry, J. D. 2009. Feigin & Cherry's textbook of pediatric infectious diseases. Saunders/Elsevier. ISBN: 9781416040446.
- Ferreres, F., Andrade, P., Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A. 1996. Floral nectar phenolics as biochemical markers for the botanical origin of heather honey. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 202 (1). 40-44.

- Finola, M. S., Lasagno, M. C., Marioli, J. M. 2007. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chemistry*. 100 (4). 1649-1653.
- Forsgren, E., Olofsson, T. C., Vásquez, A., Fries, I. 2010. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie*. 41 (1). 99-108.
- Földházi, G. 1994. Analysis and quantitation of sugars in honey of different botanical origin using high performance liquid chromatography. *Acta Alimentaria*. 23 (3). 299-311. ISSN 0139-3006.
- Fyfe, L., Okoro, P., Paterson, E., Coyle, S., McDougall, G. J. 2017. Compositional analysis of Scottish honeys with antimicrobial activity against antibiotic-resistant bacteria reveals novel antimicrobial components. *LWT - Food Science and Technology*.
- Garcia-Alvarez, M., Ceresuela, S., Huidobro, J. F., Hermida, M., Rodriguez-Otero, J. L. 2002. Determination of polarimetric parameters of honey by near-infrared transfectance spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*. 50 (3). 419-425.
- Goharshenasan, P., Amini, S., Atria, A., Abtahi, H., Khorasani, G. 2016. Topical Application of Honey on Surgical Wounds: A Randomized Clinical Trial. *Forschende Komplementärmedizin/Research in Complementary Medicine*. 23 (1). 12-15.
- Golob, T., Doberšek, U., Kump, P., Nečemer, M. 2005. Determination of trace and minor elements in Slovenian honey by total reflection X-ray fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry*. 91 (4). 593-600.
- González-Miret, M. L., Terrab, A., Hernanz, D., Fernández-Recamales, M. Á., Heredia, F. J. 2005. Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53 (7). 2574-2580.
- Guler, A., Bakan, A., Nisbet, C., Yavuz, O. 2007. Determination of important biochemical properties of honey to discriminate pure and adulterated honey with sucrose (*Saccharum officinarum* L.) syrup. *Food chemistry*. 105 (3). 1119-1125. ISSN 0308-8146.



- Gustin, Y. 2010. Ilustrované včelařství. Baobab. Praha. s. 228. ISBN: 978-80-87060-27-8.
- Hainer, V. 2011. Základy klinické obezitologie: 2. přepracované a doplněné vydání. Grada Publishing a.s. Praha. s. 464. ISBN: 978-80-247-3252-7.
- Havlík, J., Flesar, J., Rada V. 2009. Biologicky aktivní látky ve výživě včel. Vědecký výbor výživy zvířat. 52.
- Hayashi, K., Maekawa, I., Tanaka, K., Ijyuin, S., Shiwa, Y., Suzuki, I., Niimura, Y., Kawasaki, S. 2013. Purification and characterization of oxygen-inducible haem catalase from oxygen-tolerant *Bifidobacterium asteroides*. Microbiology. 159 (1). 89-95.
- Hermosín, I., Chicón, R. M. and Cabezudo, M. D. 2003. Free amino acid composition and botanical origin of honey. Food Chemistry. 83 (2). 263-268.
- Hoc, A. 2006. Report on Minimally Processed Infant Weaning Foods and the Risk of Infant Botulism. Food Standards Agency. 60.
- Iglesias, M. T., Martín-Álvarez, P. J., Polo, M. C., de Lorenzo, C., González, M., Pueyo, E. 2006. Changes in the free amino acid contents of honeys during storage at ambient temperature. Journal of agricultural and food chemistry. 54 (24). 9099-9104.
- Irish, J., Blair, S., Carter, D. A. 2011. The antibacterial activity of honey derived from Australian flora. PLoS One. 6 (3). e18229.
- Irish, J., Carter, D., Blair, S. 2007. Honey prevents biofilm formation in microbial pathogens. Malays J Med Sci. 14. 112.
- Ismail, Z. B., Alshehabat, M. A., Hananeh, W., Daradka, M., Ali, J. f. H., El-Najjar, E. K. M. 2015. Recent advances in topical wound healing products with special reference to honey: A review. Research Opinions in Animal & Veterinary Sciences. 5 (2).

- Jelen, H. 2011. Food flavors: chemical, sensory and technological properties. CRC Press. s. 504. ISBN 1439814910.
- Jenkins, D. J., Wolever, T. M., Taylor, R. H., Barker, H., Fielden, H., Baldwin, J. M., Bowling, A. C., Newman, H. C., Jenkins, A. L., Goff, D. V. 1981. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *The American journal of clinical nutrition*. 34 (3). 362-366.
- Jenkins, D. J. A., Kendall, C. W. C., Augustin, L. S. A., Franceschi, S., Hamidi, M., Marchie, A., Jenkins, A. L., Axelsen, M. 2002. Glycemic index: overview of implications in health and disease. *The American journal of clinical nutrition*. 76 (1). 266S-273S.
- Jeuring, H. J., Koppers, F. J. 1980. High performance liquid chromatography of furfural and hydroxymethylfurfural in spirits and honey. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*. 63 (6). 1215-1218. ISSN 0004-5756.
- Jones, J. C., Myerscough, M. R., Graham, S., Oldroyd, B. P. 2004. Honey bee nest thermoregulation: diversity promotes stability. *Science*. 305 (5682). 402-404.
- Jull, A. B., Rodgers, A., Walker, N. 2008. Honey as a topical treatment for wounds. *Cochrane Database Syst Rev*. 4.
- Kamal, M. A., Klein, P. 2011. Determination of sugars in honey by liquid chromatography. *Saudi journal of biological sciences*. 18 (1). 17-21. ISSN 1319-562X.
- Kantar, A. 2016. Update on Pediatric Cough. *Lung*. 194 (1). 9-14.
- Karabagias, I. K., Badeka, A., Kontakos, S., Karabournioti, S., Kontominas, M. G. 2014. Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. *Food chemistry*. 146. 548-557.

Karasawa, K., Haraya, S., Okubo, S., Arakawa, H. 2017. Novel assay of antibacterial components in manuka honey using lucigenin-chemiluminescence-HPLC. *Analytica Chimica Acta*. 954. 151-158.

Kaškonienė, V., Venskutonis, P. R., Čeksterytė, V. 2010. Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania. *LWT-Food Science and Technology*. 43 (5). 801-807. ISSN 0023-6438.

Kečkeš, J., Trifković, J., Andrić, F., Jovetić, M., Tešić, Ž., Milojković-Opsenica, D. 2013. Amino acids profile of Serbian unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93 (13). 3368-3376.

Kirkwood, K. C., Mitchell, T. J., Smith, D. 1960. An examination of the occurrence of honeydew in honey. *Analyst*, 85 (1011). 412-416.

Kumar, M., Kumar, A., Nagpal, R., Mohania, D., Behare, P., Verma, V., Kumar, P., Poddar, D., Aggarwal, P. K., Henry, C. J. K., Jain, S., Yadav, H. 2010. Cancer-preventing attributes of probiotics: An update. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 61 (5). 473-496.

Kwakman, P. H. S., te Velde, A. A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Zaat, S. A. J. 2010. How honey kills bacteria. *The FASEB Journal*. 24 (7). 2576-2582.

Kwong, W. K., Engel, P., Koch, H., Moran, N. A. 2014. Genomics and host specialization of honey bee and bumble bee gut symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111 (31). 11509-11514.

Kwong, W. K., Moran, N. A. 2016. Gut microbial communities of social bees. *Nat Rev Microbiol*. 14 (6). 374-84.

Kňazovická, V., Bačiková, A., Bányiová, R., Tkáčová, J., Čanigová, M., Haščík, P. 2015. Honey characteristics after extraction and half-year storage. *Potravinárstvo*. 9 (1). 543-549.

- Lachman, J., Koliňová, D., Miholová, D., Kořata, J., Titěra, D., Kult, K. 2007. Analysis of minority honey components: Possible use for the evaluation of honey quality. *Food Chemistry*. 101 (3). 973-979.
- Lee, C. Y., Kime, R. W. 1984. The use of honey for clarifying apple juice. *Journal of Apicultural Research (UK)*. ISSN: 0021-8839.
- Lee, F. J., Rusch, D. B., Stewart, F. J., Mattila, H. R., Newton, I. L. G. 2015. Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome. *Environmental microbiology*. 17 (3). 796-815.
- Leite, J. M. D. C., Trugo, L. C., Costa, L. S. M., Quinteiro, L. M. C., Barth, O. M., Dutra, V. M. L., De Maria, C. A. B. 2000. Determination of oligosaccharides in Brazilian honeys of different botanical origin. *Food Chemistry*. 70 (1). 93-98.
- Lewis, K. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 45 (4). 999-1007.
- León-Ruiz, V., Vera, S., González-Porto, A. V., San Andrés, M. P. 2013. Analysis of water-soluble vitamins in honey by isocratic RP-HPLC. *Food Analytical Methods*. 6 (2). 488-496.
- Liu, J. R., Ye, Y. L., Lin, T. Y., Wang, Y. W., Peng, C. C. 2013. Effect of floral sources on the antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of honeys in Taiwan. *Food Chemistry*. 139 (1-4). 938-943. ISSN 0308-8146.
- Long, D., Tang, X., Cai, K., Chen, G., Chen, L., Duan, D., Zhu, J., Chen, Y. 2013. Cr(VI) reduction by a potent novel alkaliphilic halotolerant strain *Pseudochrobactrum saccharolyticum* LY10. *Journal of Hazardous Materials*. 256-257. 24-32.
- Long, S. S. 2001. Infant botulism. *The Pediatric infectious disease journal*. 20 (7). 707-709.
- Long, S. S. 2007. Infant botulism and treatment with BIG-IV (BabyBIG®). *The Pediatric infectious disease journal*. 26 (3). 261-262.

- Lye, H.-S., Kuan, C.-Y., Ewe, J.-A., Fung, W.-Y., Liong, M.-T. 2009. The improvement of hypertension by probiotics: effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens. *International journal of molecular sciences*. 10 (9). 3755-3775.
- Maghsoudi, H., Moradi, S. 2015. Honey: a skin graft fixator convenient for both patient and surgeon. *Indian Journal of Surgery*. 77 (3). 863-867.
- Majtán, J. 2013. Medovnica jedľová (*Cinara pectinatae*)(Hemiptera, Aphididae), včelí med a liečba chronických rán. *Entomofauna carpathica*. 25 (1). 25-26.
- Mandal, M. D., Mandal, S. 2011. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1 (2). 154-160.
- Manzanares, A. B., García, Z. H., Galdón, B. R., Rodríguez, E. R., Romero, C. D. 2011. Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. *Food Chemistry*. 126 (2). 664-672.
- Manzanares, A. B., García, Z. H., Galdón, B. R., Rodríguez, E. R., Romero, C. D. 2014. Physicochemical characteristics of minor monofloral honeys from Tenerife, Spain. *LWT-Food Science and Technology*. 55 (2). 572-578.
- Martinson, V. G., Moy, J., Moran, N. A. 2012. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Applied and environmental microbiology*. 78 (8). 2830-2840.
- Mato, I., Huidobro, J. F., Simal-Lozano, J., Sancho, M. T. 2006. Rapid determination of nonaromatic organic acids in honey by capillary zone electrophoresis with direct ultraviolet detection. *Journal of agricultural and food chemistry*. 54 (5). 1541-1550.
- Matovic, K., Baltic, M., Nedic, N., Dmitric, M., Nenadic, D., Vaskovic, N., Jevtic, G., Mistic, D. 2015. The Investigation of the Presence of *Clostridium Botulinum* Spores in Honey in Serbia. *Procedia Food Science*. 5. 180-183.

Meo, S. A., Al-Asiri, S. A., Mahesar, A. L. and Ansari, M. J. 2016. Role of honey in modern medicine. Saudi Journal of Biological Sciences. In press.

Ministerstvo zemědělství České republiky. 2013. Situační a výhledová zpráva.

[cit. 2016-10-28].

Dostupné z: [http://eagri.cz/public/web/file/283622/Vcely\\_2013\\_SVZ\\_obsah.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/283622/Vcely_2013_SVZ_obsah.pdf)

Ministerstvo zemědělství České republiky. 2015. Situační a výhledová zpráva.

[cit. 2016-10-28].

Dostupné z: [http://eagri.cz/public/web/file/457620/SVZ\\_Vcely\\_2015\\_komplet\\_final\\_20042016.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/457620/SVZ_Vcely_2015_komplet_final_20042016.pdf)

Monetto, A. M., Francavilla, A., Rondini, A., Manca, L., Siravegna, M., Fernandez, R. 1999. A study of botulinum spores in honey. *Anaerobe*. 5 (3-4). 185-186.

Morales, V., Corzo, N., Sanz, M. L. 2008. HPAEC-PAD oligosaccharide analysis to detect adulterations of honey with sugar syrups. *Food Chemistry*. 107 (2). 922-928.

Moran, N. A. 2015. Genomics of the honey bee microbiome. *Current Opinion in Insect Science*. 10. 22-28.

Moreira, R. F. A., De Maria, C. A. B., Pietroluongo, M., Trugo, L. C. 2007. Chemical changes in the non-volatile fraction of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. *Food chemistry*. 104 (3). 1236-1241.

Moreira, R. F. A., De Maria, C. A., Pietroluongo, M., Trugo, L. C. 2010. Chemical changes in the volatile fractions of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. *Food chemistry*. 121 (3). 697-704. ISSN 0308-8146.

Morgan, J., Meltzer, M. I., Plikaytis, B. D., Sofair, A. N., Huie-White, S., Wilcox, S., Harrison, L. H., Seaberg, E. C., Hajjeh, R. A., Teutsch, S. M. 2005. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 26 (06). 540-547.

- Mrázek, J., Štrosová, L., Fliegerová, K., Kott, T., Kopečný, J. 2008. Diversity of insect intestinal microflora. *Folia Microbiologica*. 53 (3). 229-233.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*. 59 (3). 695-700.
- Nepi, M., Soligo, C., Nocentini, D., Abate, M., Guarnieri, M., Cai, G., Pacini, E. 2012. Amino acids and protein profile in floral nectar: Much more than a simple reward. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 207 (7). 475-481. ISSN 0367-2530.
- Nicolson, S. W. 2007. Nectar consumers. *Nectaries and nectar*: Springer. 289-342.
- Nutter, J., Fritz, R., Iurlina, M. O., Saiz, A. I. 2016. Effect of *Prosopis* sp. honey on the growth and fermentative ability of *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus fermentum*. *LWT - Food Science and Technology*. 70. 309-314.
- Ogle, J., Anderson, M. 2012. Chapter 42. Infections: bacterial & spirochetal. *CURRENT Diagnosis & Treatment: Pediatrics*. 21st ed. New York. NY: McGraw-Hill.
- Olaitan, P. B., Adeleke, O. E., Iyabo, O. O. 2007. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African health sciences*. 7 (3).
- Olofsson, T. C., Butler, È., Markowicz, P., Lindholm, C., Larsson, L., Vásquez, A. 2014. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees—an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. *International wound journal*. 13 (5). 668-679.
- Olofsson, T. C., Vásquez, A. 2008. Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Current microbiology*. 57 (4). 356-363.

- Ota, M., Kohmura, M., Kawaguchi, H. 2006. Characterization of a new Maillard type reaction product generated by heating 1-deoxymaltulosyl-glycine in the presence of cysteine. *Journal of agricultural and food chemistry*. 54 (14). 5127-5131. ISSN 0021-8561.
- Ouchemoukh, S., Louaileche, H., Schweitzer, P. 2007. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. *Food Control*. 18 (1). 52-58.
- Owczarczyk, H. B., Migdal, W., Kedzia, B., Holderna-Kedzia, E., Madajczyk, D. 1999. Decontamination of natural honey by irradiation. *International Atomic Energy Agency (IAEA)*. 30. 46. (No. IAEA-CN--76).
- Paul, I. M., Beiler, J., McMonagle, A., Shaffer, M. L., Duda, L., Berlin, C. M. 2007. Effect of honey, dextromethorphan, and no treatment on nocturnal cough and sleep quality for coughing children and their parents. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*. 161 (12). 1140-1146.
- Persano Oddo, L., Piro, R. 2004. Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*. 35. S38-S81.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical microbiology reviews*. 20 (1). 133-163.
- Piccart, K., Vázquez, A., Piepers, S., De Vliegher, S., Olofsson, T. C. 2016. Short communication: Lactic acid bacteria from the honeybee inhibit the *in vitro* growth of mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*. 99 (4). 2940-2944.
- Pita-Calvo, C., Vázquez, M. 2016. Differences between honeydew and blossom honeys: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 59. 79-87.
- Pohl, P., Stecka, H., Greda, K., Jamroz, P. 2012. Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn from commercial bee honeys. *Food Chemistry*. 134 (1). 392-396.



- Powell, J. E., Martinson, V. G., Urban-Mead, K., Moran, N. A. 2014. Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. Applied and environmental microbiology. 80 (23). 7378-7387.
- Price, J. N., Morgan, J. W. 2006. Variability in plant fitness influences range expansion of *Leptospermum scoparium*. Ecography. 29 (4). 623-631.
- Prodolliet, J., Hischenhuber, C. 1998. Food authentication by carbohydrate chromatography. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A. 207 (1). 1-12. ISSN 1431-4630.
- Qamer, S., Ehsan, M., Nadeem, S., Shakoori, A. R. 2007. Free amino acids content of Pakistani unifloral honey produced by *Apis mellifera*. Pakistan Journal of Zoology. 39 (2). 99.
- Ramage, G., Walle, K. V., Wickes, B. L., López-Ribot, J. L. 2001. Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45 (9). 2475-2479.
- Rosow, L. K., Strober, J. B. 2015. Infant Botulism: Review and Clinical Update. Pediatric Neurology. 52 (5). 487-492.
- Rybak-Chmielewska, H. 2007. Changes in the carbohydrate composition of honey undergoing during storage. Journal of Apicultural Science. 51 (1). 39-47. ISSN 1643-4439.
- Sabaté, D. C., Carrillo, L., Audisio, M. C. 2009. Inhibition of *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis* by *Bacillus subtilis* isolated from honeybee gut and honey samples. Research in Microbiology. 160 (3). 193-199.
- Sak-Bosnar, M., Sakač, N. 2012. Direct potentiometric determination of diastase activity in honey. Food chemistry. 135 (2). 827-831.
- Sanz, M. L., Gonzalez, M., De Lorenzo, C., Sanz, J., Martinez-Castro, I. 2005. A contribution to the differentiation between nectar honey and honeydew honey. Food Chemistry. 91 (2). 313-317. ISSN 0308-8146.

Satpathy, S., Sen, S. K., Pattanaik, S., Raut, S. 2016. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 7. 56-66.

Silva, M. S., Rabadzhiev, Y., Eller, M. R., Iliev, I., Ivanova, I., Santana, W. C. 2017. *Microorganisms in Honey*. *Honey Analysis: InTech*.

Silva, S., Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R., Williams, D., Azeredo, J. 2009. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Medical Mycology*. 47 (7). 681-689.

Singh, N., Parminder, K. B. 1998. Relationship between heating and hydroxymethylfurfural formation in different honey types. *Journal of food science and technology*. 35 (2). 154-156. ISSN 0022-1155.

Snowdon, J. A., Cliver, D. O. 1996. Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*. 31 (1-3). 1-26.

Soria, A. C., González, M., de Lorenzo, C., Martínez-Castro, I., Sanz, J. 2005. Estimation of the honeydew ratio in honey samples from their physicochemical data and from their volatile composition obtained by SPME and GC-MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85 (5). 817-824.

Southwick, E. E. 1984. Photosynthate allocation to floral nectar: a neglected energy investment. *Ecology*. 65 (6). 1775-1779. ISSN 1939-9170.

Svačina, Š., Müllerová, D., Bretšnajdrová, A. 2013. *Dietologie pro lékaře, farmaceuty, zdravotní sestry a nutriční terapeutky*. 2., upr. vyd. Praha: Triton, Lékařské repetitorium. s. 331. ISBN: 978-80-7387-699-9.

Šefčík, J., 2014. *Začínáme včelařit*. Grada Publishing a.s. Praha. s. 96. ISBN: 978-80-247-4857-3.

Taormina, P. J., Niemira, B. A., Beuchat, L. R. 2001. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *International journal of food microbiology*. 69 (3). 217-225. ISSN 0168-1605.

Terrab, A., Gonzalez, A. G., Díez, M. J., Heredia, F. J. 2003. Mineral content and electrical conductivity of the honeys produced in Northwest Morocco and their contribution to the characterisation of unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83 (7). 637-643.

Terrab, A., Recamales, A. F., Hernanz, D., Heredia, F. J. 2004. Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. *Food Chemistry*. 88 (4). 537-542.

Tornuk, F., Karaman, S., Ozturk, I., Toker, O. S., Tastemur, B., Sagdic, O., Kayacier, A. 2013. Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Industrial Crops and Products*. 46. 124-131. ISSN 0926-6690.

Trojan, S. 2003. *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing a.s. Praha. s. 772. ISBN: 8024705125.

Troller, J. A., Christian, J. H. B. 1978. *Water activity and food*. Academic Press. s. 216. New York, San Francisco, London.

Tsai, Y. T., Cheng, P. C., Pan, T. M. 2012. The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 96 (4). 853-862.

Tsekoura, F., Alexopoulos, A., Stefanis, C., Papadopoulos, I., Voidarou, C., Bolkas, S., Zoulis, N., Giannakourou, M., Gergopoulou, A., Bezirtzoglou, E. 2006. Aerobic and anaerobic bacteriology of Greek honeys. In *Proceedings of the International Congress of Bioprocessing in Food Industry (ICBF)*. Patras-Greece.

- Vanhanen, L. P., Emmertz, A., Savage, G. P. 2011. Mineral analysis of mono-floral New Zealand honey. *Food Chemistry*. 128 (1). 236-240.
- Vargas, O., Maza, F. 2015. *Meliponini* biodiversity and medicinal uses of the honey from El Oro province in Ecuador. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. ISSN: 2079-0538.
- Veress, A., Kömüves, J., Wilk, T., Zajácz, E., Kerényi, Z., Kocsis, R., Olasz, F., Papp, P. 2016. Analysis of bacteria isolated from honey and honeybee stomach. *New Biotechnology*. 33. S175-S176.
- Vásquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R. J., Flaberg, E., Szekely, L., Olofsson, T. C. 2012. Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS One*. 7 (3). e33188.
- Vásquez, A., Olofsson, T. C. 2009a. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *Journal of Apicultural Research*. 48 (3). 189-195.
- Vásquez, A., Olofsson, T. C., Sammataro, D. 2009b. A scientific note on the lactic acid bacterial flora in honeybees in the USA – A comparison with bees from Sweden. *Apidologie*. 40 (1). 26–28.
- Voorhies, E. C.; Todd, F. E.; Galbraith, J. K. 1933. Economic aspects of the bee industry. *Embrapa Semiárido (CPATSA)*. 117.
- Vorlová, L. 2002. *Med: souborná analýza*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, Fakulta veterinární hygieny a ekologie. ISBN 80-7305-450-7.
- Wang, Y., Juliani, H. R., Simon, J. E., Ho, C. T. 2009. Amino acid-dependent formation pathways of 2-acetylfuran and 2, 5-dimethyl-4-hydroxy-3 [2H]-furanone in the Maillard reaction. *Food chemistry*. 115 (1). 233-237. ISSN 0308-8146.
- Ward, R. W., Boynton, B. 2010. US Honey supply chain: structural change, promotions and the China connection. *International Journal on Food System Dynamics*. 1 (1). 13-25.

- Weston, R. J., Brocklebank, L. K. 1999. The oligosaccharide composition of some New Zealand honeys. *Food Chemistry*. 64 (1). 33-37. ISSN 0308-8146.
- White Jr, J. W. 1979. Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*. 62 (3). 509-514. ISSN 0004-5756.
- White Jr, J. W. 1980. Detection of honey adulteration by carbohydrate analysis. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*. 63 (1). 11-18. ISSN 0004-5756.
- White, P. B. 1996. The normal flora of the bee. Agricultural research service. US Department of Agriculture Washinton AC. 301-309.
- Winkler, O. 1955. Beitrag zum Nachweis und zur Bestimmung von Oxymethylfurfurol in Honig und Kunsthonig. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*. 102 (3). 161-167. ISSN 1431-4630.
- Won, S.-R., Li, C.-Y., Kim, J.-W., Rhee, H.-I. 2009. Immunological characterization of honey major protein and its application. *Food Chemistry*. 113 (4). 1334-1338.
- Wootton, M., Ryall, L. 1985. A comparison of Codex Alimentarius Commission and HPLC methods for 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde determination in honey. *Journal of Apicultural Research*. 24 (2). 120-124. ISSN 0021-8839.
- Worcester, U. K., This, H. A. 2011. Silver and nanoparticles of silver in wound dressings: a review of efficacy and safety. *Journal of wound care*. 20 (11). 543.
- Zadák, Z. 2008. *Výživa v intenzivní péči-2., rozšířené a aktualizované vydání*. Grada Publishing a.s. Praha. s. 542. ISBN: 9788024728445.
- Zamora, M. C., Chirife, J. 2006. Determination of water activity change due to crystallization in honeys from Argentina. *Food Control*. 17 (1). 59-64.
- Zamora, M. C., Chirife, J., Roldán, D. 2006. On the nature of the relationship between water activity and % moisture in honey. *Food control*. 17 (8). 642-647.

Zappala, M., Fallico, B., Arena, E., Verzera, A. 2005. Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. *Food control*. 16 (3). 273-277. ISSN 0956-7135.

Zhang, Y. 2016. *Biotechnology and Medical Science: Proceedings of the 2016 International Conference on Biotechnology and Medical Science*. World Scientific Publishing Company. s. 700. ISBN: 978-981-3145-86-3.

Zhao, X., Zhou, Z.-j., Han, Y., Wang, Z.-z., Fan, J., Xiao, H.-z. 2013. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey. *Microbiological research*. 168 (9). 598-606.

Zumla, A., Lulat, A. 1989. Honey--a remedy rediscovered. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 82 (7). 384.

Zürcher, K., Hadorn, H. 1980. Vergleichende Wasserbestimmungen in Honig nach Karl Fischer, aus Dichte, refraktometrisch und gravimetrisch. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*. 71. 396-403.

## 9 Samostatné přílohy

Tab. 3. Původ a charakteristika vzorků

VZOREK	PŮVOD	VZOREK	PŮVOD
<b>Středočeský kraj</b>		<b>Jihočeský kraj</b>	
1	Hrabří	10	Číčenice u Vodňan
2	Hrabří	11	Čimelice u Písku
3	Městečko u Křivoklátu	12	Dobrá voda
4	Městečko u Křivoklátu	13	Prachatice
5	Městečko u Křivoklátu	14	Strmilov
6	Řeřichy	<b>Plzeňský kraj</b>	
7	Senomaty	15	Horažďovice
8	Tmaň u Berouna	16	Kasejovice
9	Unhošť	17	Klatovy
<b>Plzeňský kraj</b>		<b>Liberecký kraj</b>	
18	Kotouň u Nepomuku	26	Ktová
19	Lhotka u Nekmíře	27	Turnov
20	Spüle u Janovic nad Úhlavou	<b>Královéhradecký kraj</b>	
<b>Ústecký kraj</b>		28	Dvůr Králové
21	Hřivice	29	Jaroměř
22	Jirkov u Chomutova	30	Jaroměř
23	Kadaň	31	Přibyslav
24	Klášterecká Jeseň	32	Přibyslav
25	Žatec	<b>Zahraničí</b>	
<b>Pardubický kraj</b>		41	Řecko, Zakynthos
33	Břehy oblast Přelouč	42	Slovinsko, Novo město
34	Hlinsko	43	Slovinsko, Novo město
35	Chvaletice	44	Slovinsko, Novo město
36	Pardubice	45	Ukrajina, Vynohradiv
37	Rašovy u Přelouče	46	Ukrajina, Vynohradiv
38	Slatiňany	47	Slovensko, Tatry
<b>Vysočina</b>		<b>Moravsko-slezský kraj</b>	
39	Velké Meziříčí	40	Hejnov u Krnova