

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



**Využití biologicky aktivních látek z rostlin pro prodloužení úchovy
bezinkového sirupu**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Anna Grosmanová

Vedoucí práce: doc. Ing. Pavel Klouček, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Využití biologicky aktivních látek z rostlin pro prodloužení účhyvy bezinkového sirupu" 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 8. 4. 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Pavlu Kloučkovi, Ph.D., za trpělivé vedení diplomové práce, Ing. Matěji Božíkovi, za pomoc při pokusech a vyhodnocování výsledků, a také všem blízkým, kteří mně ve studiu celou dobu podporovali, především Hendrik Haase, Markéta Grosmanová a Martin Regéczy.

Využití biologicky aktivních látek z rostlin pro prodloužení účhovy bezinkového sirupu

Souhrn

Cílem této práce bylo najít biologicky aktivní látky s antimikrobiální aktivitou vhodné pro použití jako přírodních konzervantů u bylinných sirupů. Jelikož silice jsou mezi přírodními látkami známé pro svou anitimikrobiální aktivitu, byly vybrány silice tymiánu, voňatky citronové a hřebíčku. Testovány byly na bezinkovém sirupu.

Jedním z důvodů výběru tohoto tématu bylo i potenciální praktické využití v soukromé malovýrobě a tedy inovace technologického postupu.

Do vyrobeného sirupu byla vmíchána emulgovaná silice. Po dobu 14 dnů byl sledován vliv silice na počet mikroorganismů, jejichž počet byl stanovován kapkovou metodou. Kultivace mikroorganismů byla prováděna při teplotě 22 °C, vzhledem k běžně očekávaným skladovacím podmínkám pro tyto produkty, vždy po sedmi a následně čtrnácti dnech. Následně byl vypočítán celkový počet narostlých kolonií a ten přečítán na logaritmus všech kolonie tvořících jednotek.

U hřebíčkové silice byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi kontrolním vzorkem a aplikací silice ve všech koncentracích a zároveň byla pro tuto silici zjištěna i statisticky významná závislost na výši koncentrace. Stejně tak byl významný rozdíl mezi kontrolním vzorkem a sirupem ošetřeným silicí prokázán u voňatky citronové a tymiánu, ovšem u tymiánu se neprokázala závislost na výši koncentrace. Silice je v sirupech možné využít jako přírodní konzervanty, protože vynikají nejen svojí anitimikrobiální schopností, ale také jejich cenovou dostupností a snadnou technologií aplikace.

Klíčová slova: bezinka, antimikrobiální látky, konzervace, sirup, silice

The application of plant-derived biologically active substances for shelf-life improvement of elderflower sirup

Summary

The aim of this thesis was to find biologically active substances that would be suitable as natural conservatives for herbal sirups, in our case elderflower sirup.

Because essential oils are among biologically active substances well known for their antimicrobial activity we chose thyme, lemongrass and clove bud essential oils to be tested on the elderflower sirup.

Potential use in a private small scale production was one of the reasons for this particular topic and therefore its technological innovation.

The emulgated essential oil was mixed with the sirup and observed for 14 days for the colonies forming units (CFU) which was determined by the drop plate technique. Cultivation was done at a room temperature 22° C as its expected by the consumer that sirups may be stored this way. After the cultivation the numbers of colony forming units were counted and turned into a logarithmic value.

Clove essential oil proved a significant difference between control specimen and the essential oil preserved specimen. Statistically remarkable correlation was found also between different concentrations. As well as clove, lemongrass essential oils proved certain antimicrobiological activity also with statistical significance. Thyme essential oil proved antimicrobiological activity as well only with no significant difference between concentrations.

Essential oils are suitable as natural conservatives for not only their proven antimicrobiological activity but also low price and easy application.

Keywords: elderflower, antimicrobials, preservation, sirup, essential oil

Obsah:

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Úvod | 10 |
| 2 | Cíl práce..... | 11 |
| 3 | Literární rešerše | 12 |
| 3.1 | Sirupy a nápoje s vysokým obsahem cukru | 12 |
| 3.2 | Sladidla..... | 12 |
| 3.3 | Bylinné sirupy | 14 |
| 3.4 | Skladovatelnost | 15 |
| 3.5 | Bezpečné potraviny | 16 |
| 3.6 | HACCP | 17 |
| 3.7 | Kažení | 18 |
| 3.7.1 | Zdroje mikrobiálního kažení..... | 20 |
| 3.7.2 | Původci kažení | 22 |
| 3.7.2.1 | Bakterie | 22 |
| 3.7.2.2 | Kvasinky | 24 |
| 3.7.2.3 | Plísně..... | 27 |
| 3.7.3 | Faktory ovlivňující kažení | 28 |
| 3.8 | Biologicky aktivní látky prodlužující trvanlivost | 33 |
| 3.9.1 | Silice | 34 |
| 3.9.1.1 | Hřebíčková silice..... | 36 |
| 3.9.1.2 | Tymiánová silice | 36 |
| 3.9.1.3 | Voňatka citronová | 37 |
| 4 | Materiál a metodika | 39 |
| 4.1 | Příprava sirupu | 39 |
| 4.2 | Mikrobiologický rozbor sirupu | 39 |
| 4.3. | Vyhodnocení dat | 40 |

| | | |
|-----|-------------------------|----|
| 5 | Výsledky..... | 41 |
| 5.1 | Voňatka citronová..... | 41 |
| 5.2 | Hřebíčková silice..... | 44 |
| 5.3 | Tymiánová silice..... | 47 |
| 6 | Diskuse..... | 50 |
| 7 | Závěr..... | 54 |
| 8 | Použitá literatura..... | 55 |
| 9 | Přílohy..... | 64 |

1 Úvod

Dnešní doba klade vysoké nároky na skladovatelnost všech potravinářských produktů včetně uchování jejich původních charakteristik a celoroční dostupnost. Není snadné v některých případech zajistit, aby si potravina uchovala potřebné aroma, strukturu, barvu a jiné organoleptické vlastnosti a zároveň zůstala potravinou bezpečnou, tedy neohrožující lidské zdraví.

Vedle těchto požadavků se také zvyšuje poptávka spotřebitele po přírodních konzervantech a co nejšetrnějším zpracování surovin. To klade na výrobce vysoké technologické nároky a tak je stále třeba přicházet s novými řešeními těchto požadavků.

Sekundární metabolity rostlin, v našem případě silice, jsou jedním ze zdrojů biologicky aktivních látek prokazatelně působících proti nežádoucím mikroorganismům v potravinách. Tyto látky jsou podrobovány mnoha vědeckým výzkumům zabývajícím se jejich konzervačními účinky a ukazuje se, že jejich využití je aplikovatelné v mnoha odvětvích potravinářského průmyslu.

Tato práce se zaměřuje na konzervaci bezinkového sirupu, jakožto materiálu často podléhajícímu fermentativnímu kažení různými druhy kvasinek, případně vybranými plísněmi a bakteriemi. Výběr materiálu souvisí s potenciálním využitím ve vlastní malovýrobě, která je velice závislá i na ekonomickém zhodnocení konzervačních procesů. Jelikož silice jsou dnes relativně levnou komoditou, je jejich využití v konzervaci nealkoholických nápojů velice žádoucí, především také protože mohou často i zlepšovat chuťové vlastnosti nápoje.

Byly vybrány tři běžně dostupné silice, u kterých byl předpokládán antimikrobiální účinek pro co nejširší spektrum mikroorganismů. V praxi se často setkáváme s velice pestrou škálou mikroorganismů, proti nimž se často není možné bránit separátně. Proto je třeba najít takovou kombinaci antimikrobiálních přípravků, které působí na co možná nejvíce z nich najednou.

Cílová skupina zákazníků běžně kupujících bylinné sirupy je velice citlivá na používání umělých konzervantů a proto je třeba v rámci prodloužení skladovatelnosti těchto produktů nabídnout alternativu, která bude přijatelná i pro takto vyhraněného spotřebitele.

2 Cíl práce

Cílem této práce je nalezení biologicky aktivních látek, konkrétně silic, které prodlužují trvanlivost bezinkového sirupu. Jedná se o snahu zabránit růstu nežádoucích mikroorganismů v sirupu, za účelem prodloužení jeho skladovatelnosti. Využití silic bylo zvoleno z důvodu hledání alternativních metod konzervace, které by umožnily bylinné sirupy vyrábět za studena a tak zachovat v sirupu mnoho cenných aromatických látek.

3 Literární rešerše

3.1 Sirupy a nápoje s vysokým obsahem cukru

Sirupy jsou základem pro výrobu mnoha nápojů. Jejich produkce obvykle probíhá přípravou extraktů (Niir board of consultants & engineers, 2016) a to buď lisováním zralého ovoce, nebo louhováním jiných částí rostlin, jako jsou například květy, listy, případně kořeny. Vznikají ovocné šťávy nebo maceráty, které se následně svařují s cukrem, přibarvují, nebo aromatizují (Burda, 2013).

Sirupy se obvykle připravují za pomoci cukerných roztoků o hodnotách 70-75° Brix. Aby se zabránilo jejich krystalizaci, mohou být invertovány pomocí lehkého zahřátí a přidáním malého množství kyseliny citronové (Niir board of consultants & engineers, 2016).

Ze sirupů se často ředěním vyrábějí limonády. Slovo limonáda pochází z doby, kdy se limonáda původně připravovala pouze z cukru a citronů (z anglického lemon), ovšem v dnešní době přešlo toto označení i mezi ostatní podobné nealkoholické nápoje, mnohdy na bázi velice odlišných surovin. Limonády se vyznačují například nízkým pH, nízkým obsahem živin (Burda, 2013) a jsou obvykle konzumovány v letních měsících (Görner, 2004).

3.2 Sladidla

Použití sacharidových sladidel ke konzervaci potravin je běžnou praxí již od 8. století před naším letopočtem a to především v návaznosti na konzervaci medem, jakožto nejdostupnějším zdrojem tekutého cukru. Vynález krystalického cukru tak, jak ho známe dnes (sacharózy) se datuje až do období zhruba 5. století našeho letopočtu. Jako náhražka medu představoval cukr velice přijatelnou a především o mnoho levnější alternativu. Využití cukru jako konzervantu bylo následně kombinováno s dalšími ingrediencemi, jako je právě ovoce, bylinné maceráty, nebo například ve směsi s moukou (vznik perníku) (Maccinis, 2002).

Sladidla na bázi sacharidů stále představují největší podíl sladidel na globálním trhu s nápoji a tak se neustále objevují nové zdroje, ze kterých je tyto sacharidy možné čerpat. Jedním z nich je například kukuřičný sirup s vysokým obsahem fruktózy. Ten převažuje v sycených nápojích zejména ve Spojených státech amerických. V Evropě je

používání HFGS (high-fructose-glucose syrup) omezováno produkčními kvótami. Z toho důvodu se často používají spíše čisté glukózové, sacharózové nebo pouze fruktózové sirupy (Ashurst 2005).

Mezi významné vlastnosti cukrů patří jeho schopnost přirozeně konzervovat. Mechanismus tohoto procesu je ve své podstatě velice jednoduchý, protože závisí na obyčejném snižování aktivity vody. Dehydratací produktu se tak docílí zvyšování osmotického tlaku, který je pro spoustu mikroorganismů, jako prostředí pro život, nevhodným. Proto značná část mikroorganismů v prostředí s vysokým obsahem cukru často nepřežívá (Barbosa-Cánovas, 1998).

Sacharóza

Jeden z nejznámějších sacharidů užívaných při přípravě nápojů je sacharóza, nejčastěji získávaná z cukrové řepy, nebo cukrové třtiny. Většinou se dodává jako granulovaná v pevném stavu, nebo jako sirup s cukernatostí 67°Brix. Granulovaný cukr je obvykle levnější, ale vyžaduje použití následné technologie na rozpouštění (Ashurst 2009). Sacharóza je disacharid s molekulární hmotností 342.31, který ovšem obvykle známe pod názvem obyčejný cukr. (Velíšek, 2009).

Invertní cukr

Invertní cukr je často využívanou surovinou pro výrobu nealkoholických nápojů z důvodu jeho snadné dostupnosti. Získává se z obyčejných škrobů jejich hydrolyzou. Je možné jej získat z téměř všech druh škrobu, jako je například bramborový, pšeničný a mnoho dalších (Dziedzic, 1984).

Proces inverze probíhá v kyselém prostředí a to tak, že se sacharóza hydrolyzuje na dvě složky - glukózu a fruktózu, které jsou ve výsledku ještě sladší, než běžná sacharóza. Pojem inverze je závislý na změně optické pravotočivosti sacharózy na silnou levotočivost fruktózy a pravotočivost glukózy (Yudkin 1971).

Glukózový sirup

Dalším z možných sladidel využívaných v nápojářském průmyslu je glukózový sirup vyráběný z kukuřičného, nebo pšeničného škrobu. Glukóza je asi o 20 % méně sladká, než sacharóza a využívá se do speciálních energetických nápojů, nebo nápojů pro sportovce. Na jednotku dodané energie dodává méně sladké chuti a zároveň je dostupnější jako zdroj energie pro tělo (Ashurst 2009).

High fructose glucose syrup (HFCS)

Glukózo-fruktózový sirup je další ze široce využívaných sladidel. Může vzniknout enzymaticky z glukózového sirupu a někdy bývá označován jako high-fructose-corn syrup. Díky restrikcím z CAP (common agricultural policy, společná zemědělská politika) by v zemích EU neměl maximální obsah fruktózy přesáhnout 42 %. Ve Spojených státech amerických se HFCS používáný jako náhradní sladidlo ve většině nealkoholických nápojů a zaujímá tak dominantní místo na trhu. V zemích EU je výroba těchto sirupů silně omezoována z důvodu ochrany pěstitelů cukrové řepy (Ashurst 2009).

Fruktózový sirup

Sirup obsahující okolo 85 % fruktózy a 15 % glukózy se vyrábí z čekanky obecné v severní Francii, Nizozemsku a Belgii. Používá při výrobě nealkoholických nápojů, ale jeho produkce stejně jako HFCS značně omezoována CAP (Ashurst 2009).

3.3 Bylinné sirupy

Bylinné sirupy jsou v současné době velmi oblíbené, vyrábějí z různých částí bylin, keřů a dalších rostlin jako např. saturejka, máta, meduňka a často také z bezu černého.

Název *Sambucus nigra* neboli bez černý pochází z řeckého *sambucu*, což znamená hudební nástroj. Ty se z bezu vyráběly z jeho dutých větví. Ze stejného důvodu se v anglosaských zemích využíval bez k rozdmýchávání ohně (aeld=ohně), z čehož je odvozen název elder neboli anglické elderflower (Clevely 1998).

Květenství bezu tvoří bohaté, ploché, pětiramenné koncové vrcholíky. Květy jsou obojaké, pravidelné se srostlými obaly, silně až nepříjemné aromatické či dokonce páchnoucí. Vyskytuje se hojně ve světlých listnatých lesích, na pasekách, u zdí plotů, kolem polí, na skládkách, rumištích. Najdete ho pouze v Evropě a západní Asii, původně

rostl pouze v luzích a poříčních křovinách. Obvykle je ale považován spíše za plevelnou rostlinu, které je obtížné se zbavit (Jirásek 1989).

Podle Hardinga (2005) a také Kintlerové (1993) obsahuje jako účinné látky některé glykosidy, konkrétně rutin. Dále obsahuje alkaloid sambunigrin, silice, flavonoidy, trísloviny, organické kyseliny, aminokyseliny, cukry a minerální látky (Matějček 2013).

V plodech můžeme najít vitaminy (B1, B2, C), minerální látky (Ca, Mg, P, K), karoteny, antokyany, alkaloidy (sambunigrin, sambucin) a cholin (Kintlerová 1993).

Bez je v dnešní době jednou z velice nedoceněných surovin, a to nejen pro své léčebné charakteristiky (Matějček, 2013). Například horký nálev z bezového květu se používá proti dýchacím potížím (Jirásek 1989) a podle Hardinga (2005) je z plodů možno (stejně tak z květů), vyrábět sirup, který se pak jako bylinná směs používá při chřipce a nachlazení, nebo při zánětu dutin a průduškovém kataru.

Bez je zajímavou a nedoceněnou křovinou také díky mnoha aspektům jeho pěstování. Nevyžaduje totiž příliš specifické půdní ani klimatické podmínky, rozmnožuje se vegetativně a výsadby není nutné oplocovat, protože jej neokusuje zvěř. Vzhledem k době, kdy kvete (konec května) má vysokou odolnost vůči mrazu i slušný hektarový výnos. Dřevina je dlouhověká (až několik desítek let) a přínosem by mohla být i potenciální produkce lignifikované dendromasy při likvidaci a řezu výsadby (Matějček, 2013).

Výroba sirupu z bezu je snadná, ovšem závislá na poměrně krátké sezóně. Proto je v případě, chceme-li si dopřávat dobrý bezinkový sirup po celý rok, zajistit jeho dobrou a bezpečnou skladovatelnost.

3.4 Skladovatelnost

Pojem skladovatelnost (anglicky shelf-life) je podle Steela (2004) doba, během níž nedojde k žádnému z možných druhů kažení. V případě legislativy České republiky jsou z tohoto hlediska zajímavé dva pojmy. Jedná se o datum minimální trvanlivosti a datum použitelnosti potravin.

Podle vyhlášky č. 117/2011 Sb. o způsobu označování potravin a tabákových výrobků se datum použitelnosti uvádění u produktů snadno podléhajících zkáze, u kterých je po jeho překročení nemožné je uvádět do oběhu a konzumovat. Datum minimální

trvanlivosti určuje, do kdy je nejlépe potravinu zkonsumovat, přičemž jsou zaručeny všechny její kvalitativní charakteristiky. Po uplynutí této doby nemusí být výrobek nutně zdravotně závadný. Takovým příkladem jsou právě nápoje, nebo paštiky, čokoláda a jiné trvanlivé potraviny.

Skladovatelnost je ovlivněna způsobem konzervace produktu a je historicky jednou ze základních starostí člověka ve vztahu k výživě. Většina konzervačních technik je založena na snižování počtů mikroorganismů, které by potravinu mohli kazit, případně snižování počtu mikroorganismů, které by mohli být ve větším množství v potravine pro člověka škodlivé. Tradiční metody konzervace se zaměřují na zasolování, slazení, uzení, nebo fermentaci. Modernější způsoby uchovávání potravin, jako je například konzervace, nebo mražení hrají důležitou roli na poli prodlužování trvanlivosti potravin (Tucker, 2008).

Jelikož se ale nikdy nedá spolehnout na pouze jednu techniku ošetření potravin, je třeba kontrolovat celý výrobní proces. Z tohoto důvodu vznikl systém HACCP, díky jehož dodržování se snižuje výskyt patogenních mikroorganismů ve výrobcích a zajišťuje se tak bezpečnost potravin, která má pochopitelně potažmo vliv i na jejich skladovatelnost.

3.5 Bezpečné potraviny

Bezpečné potraviny jsou takové potraviny, které nepředstavují pro člověka vážné zdravotní riziko (Holy, 2006). I přes to, že je třeba počítat s přirozenou imunitou člověka a schopností se vypořádat s jistou dávkou mikroorganismů, které do potraviny přirozeně vnikají, je problematika bezpečnosti potravin velice závažnou oblastí jejich výroby (Jaykus, 2009).

Lidské tělo denně schopno přijmout až 10^{10} CFU (v češtině KTJ - kolonie tvořících jednotek), z čehož 10^6 mohou být mikroorganismy se schopností antimikrobiální resistance. Většinou tyto mikroorganismy představují skupinu neškodných komensálů, spíše než patogenních mikroorganismů, ale i přes to nám toto číslo ukazuje, zdravé, lidské tělo je schopno se s malými dávkami mikroorganismů normálně vypořádat (Jaykus, 2009).

Některé potraviny jsou přirozeně jedovaté, nebo toxické, jiné se tak mohou stát takto nebezpečné během výrobního a distribučního procesu. V každém kroku existuje

riziko chemické, fyzikální, nebo mikrobiologické kontaminace a tak byly vyvinuty systémy bezpečnosti a hygieny potravin. Jsou jimi například HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Point), BRC, nebo IFS. Ty pokrývají všechny výrobní procesy, a tím zajišťují nebo napomáhají zajistit, že potraviny, které konzumujeme, jsou bezpečné (Holy, 2006).

Sirupy a cukerné roztoky nepředstavují z hlediska bezpečnosti potravin nijak zvlášť veliké riziko ovšem a obvykle nejsou spojovány s problematikou alimentárních onemocnění. V případě prevence kažení těchto nápojů je třeba dbát především na hygienu prostředí, všech nástrojů a kvalitu použité vody. Proto se často také volí následné tepelné opracování nápoje (pasterace), nebo plnění za tepla. Stejně tak je třeba brát v potaz způsob následného balení produktu, protože způsob balení může výrazně ovlivnit skladovatelnost výrobku (Heiden, 1994).

Velice nápomocnou disciplínou v rámci detekce bezpečnosti potravin je potravinářská mikrobiologie. A protože i dnes jsou v mnoha zemích nákazy z potravin stále ještě běžným zdrojem onemocnění, je jednoznačné, že systémy managementu kvality a bezpečnosti potravin budou nabývat na důležitosti. K tomu je potřeba znalost právě, jak potravinářské mikrobiologie, tak i jako spolupráce mezi jednotlivci, jejich nadřízenými a nastavováním správných hygienických standardů (Holy, 2006).

3.6 HACCP

System analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů (Hazard Analysis and Critical Control Points) je kontrolní systém založený na prevenci. V rámci identifikace možných rizik, je možné určit limitní hodnoty, které jsou schopné zaručit konzumentovi bezpečné potraviny. Tento preventivní nástroj zjednodušuje především práci koncovým kontrolním orgánům a zabraňuje hromadným alimentárním katastrofám (Mortimore 2013).

Je odhadováno, že na počátku dvacátého století, bylo ve spojených státech dostupných asi okolo stovky různých potravin. O sto let později, se toto číslo znásobilo 1200 krát. Zvyšující se komplexita potravin donutila potravinářský průmysl zaměřit se na lepší management kvality a bezpečnosti potravin, což také vyústilo k vzniku HACCP systému (Sperber 2009).

System analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů je dnes již běžnou praxí a jeho zavádění je vyžadováno nejen legislativou EU a ČR a to ve většině výrobních procesů, včetně primární produkce. Je to systém schopný rizika a procesy k jejich identifikaci řídit avšak nikoliv je přímo posuzovat. Proto je při sestavování HACCP vždy třeba nástroj identifikace mikrobiologických rizik doložit. System HACCP je rozšířeným systémem pro jeho jednoduchost a komplexitu, který přímo napomáhá zvýšení bezpečnosti potravin (Mortimore 2013).

Proč je tak užitečný? Protože nařizuje opatření přiměřená a odpovídající velikosti rizik. HACCP také často bere v potaz cílový spotřebitelský segment. Určení kritických mezí a kontrolních parametrů bývá často problematickou částí, která musí být správně posouzena. (Harrison a Hester, 2001).

HACCP je obvykle formulován na základě několika jednoduchých kroků:

- Co je můj produkt a co ho činí bezpečným/nebezpečným
- Kontrola výrobního procesu od začátku do konce, porozumění výrobním procesům a výrobnímu prostředí
- Identifikace případných rizik a jejich popis
- Aplikace kontrolních aktivit na základě předepsaných limitních hodnot
- Kontrola těchto aktivit
- Dokumentace procesů v papírové formě a archivace kontroly procesů

(Mortimore 2013)

3.7 Kažení

Podle Oxfordského anglického slovníku je kažení definováno jako ztráta původních a funkčních charakteristik. V případě jídla se jedná o změny, které nejsou nadále akceptovatelné, protože mohou v mnoha případech přímo ohrozit zdraví člověka (Adams, 2008). Biologický rozklad může být také definován jako nechtěná změna materiálu, způsobená vitálními vlivy jiných organismů (Tucker, 2008). Podle Steela (2004), je potravin zkažená, už pokud je z nějakého důvodu neakceptovatelná pro zákazníka. Častou formou zkažení je pro běžného spotřebitele i jen pouhá ztráta barvy, textury, nebo aroma.

Adams (2008) uvádí, že tyto změny nemusí být vždy nutně zapříčiněny mikrobiálními vlivy. Ke kažení potravin může docházet i v důsledku napadení hmyzem, vysušením, odbarvením, žluknutím, nebo zatuchnutím, avšak přiznává, že ve valné většině dochází ke kažení vlivem nežádoucích mikroorganismů. Tewari (2007) rozděluje druhy kažení na fyzikální (změna viskozity), chemické (oxidace, změna pH a tak dále), mikrobiologické (pachy, změna chuti, změna barvy, slizovatění), nebo změny způsobené hmyzem a hlodavci. Kyzlink (1990) dodává změny fyzikálně chemické.

Projevem mikrobiálního kažení může být přítomnost slizových částic a kolonií, degradace strukturních komponent, nebo změna barvy. Nejčastějším projevem mikrobiální kontaminace je ovšem produkce metabolitů, jako jsou mnohé pigmenty, plyny, polysacharidy a pachy (Kale 2007).

Mikrobiální změny jsou častější než chemické. Odhaduje se, že ¼ světové produkce je ročně znehodnocena právě díky nežádoucím mikrobiálním aktivitám. V rozvinutých zemích jsou nejčastějším zdrojem zkázy psychotropní kvasinky a plísně, zatím co v rozvojových zemích jsou to hmyz a hlodavci (Tucker, 2008).

Steele (2004) popisuje, že jelikož všechny potraviny jsou původně vyrobené z biologicky surových materiálů, je nevyhnutelné, aby se v nějakou chvíli zkazily. Z toho vyplývá, že nelze docílit nezkazitelné potraviny, a proto je naším jediným cílem tento proces zpomalit. Toho můžeme docílit pomocí lepšího zpracování, balením, skladováním a správným zacházením.

U kažení potravin je vždy potřeba brát v potaz okolní vlivy a jejich vzájemné interakce. Jedná se o teplotu, vlhkost, přísun energie a spousta dalších „neživých“ faktorů, které v případě pozorování a zkoumání kažení potravin nesmíme brát jako jednotlivé a separátní (Kyzlink 1990).

Mikrobiální degradace sirupů a nápojů na bázi cukru se obvykle projevuje kyselými pachy, kaly, usazeninami, nebo zvýšeným obsahem CO₂ (Heiden, 1994).

Nejčastěji je kažení těchto tipů nápojů asociováno s kvasinkami, méně pak s bakteriemi a plísněmi. Může se jednat o zástupce *Sacharomyces*, *Zygosacharomyces*, *Torulopsis*, a *Hansenula*. Nejčastěji asociované plísně jsou *Aspergillus*, *Penicilium*, nebo *Rhizopus*. Z bakterií připadají v úvahu *Leuonostoky*, *Laktobacily* a *Glukonobaktery* (Heiden, 1994).

3.7.1 Zdroje mikrobiálního kažení

Autoři knih o mikrobiologii potravin se obvykle shodují na základním dělení na bakterie, kvasinky a plísně, které také obvykle uvádějí jako nejčastější původce mikrobiálního kažení. Dalšími zdroji mikrobiálního rozkladu mohou být houby, řasy, mechy a játrovky (Okafor, 2007).

Bakteriím, kvasinkám, plísním a virům je třeba se věnovat především proto, že mohou způsobit alimentární nákazy, mohou potraviny nevratně znehodnocovat, ale zároveň mohou být zdrojem jedinečných druhů potravin a nezbytných ingrediencí pro dnešní výživu. Nejmenší riziko výskytu alimentárních nemocí nesou kvasinky (Ray, 2003).

Většina bakterií, plísně a kvasinky mohou potraviny znehodnocovat, protože jsou schopné se v něm množit. Viry se na rozdíl od těchto mikroorganismů v potravinách množit nemohou (Sperber, 2009).

Mnoho mikroorganismů, které jsou postupně identifikovány, jsou pro lidský organismus přínosem a jsou klasifikovány jako bezpečné. Mnohé z nich produkují fermentované potraviny dnešního běžného užití. Bakterie tvoří z těchto čtyř skupin tu největší, protože mají vysokou schopnost reprodukce, dokonce i v podmínkách, kde se nedaří rozmnožovat plísním, ani kvasinkám. Živé buněčné organismy byly na bázi evoluce a fylogenetického vývoje původně rozděleny do pěti říší. Bakterie byly klasifikovány jako prokaryota, a plísně a kvasinky byly klasifikovány do hub. Okolo 1970 se prokaryota změnila na Eubakteria a Archaeobakteria. V roce 1990 se toto změnilo na Bakterie a Achaea. Archaea společně s viry nemají pro potravinářskou mikrobiologii příliš velký význam, a tak je pro nás nejzásadnější třída bakterií, plísní a kvasinek (Ray, 2003).

Zdrojem mikrobiální kontaminace může být v podstatě cokoliv, co se nachází v zemské biosféře. Mohou to být rostliny, zvířata, půda, nebo voda. Mnoho bakterií, jako například bakterie rodu *Pseudomonas*, mikrokoky a koliformní bakterie, se hojně vyskytují na zemědělských a zahradních rostlinách. Mnoho dalších, například enterokoky, kolonizují zvířecí a lidskou kůži jsou také přirozenou součástí gastrointestinálního traktu. Bakterie se z prostředí mohou dostat do potravin společně s primárními materiály během sklizně nebo porážky a nakonec zůstat v potravine jako deriváty těchto zdrojů (Sperber, 2009).

Mikrobiální nákaza přichází do potraviny z její podstaty, tedy zevnitř, nebo z prostředí. Podle toho, z kterého zdroje se do jídla mikroorganismus dostal, můžeme tedy mikroorganismy rozdělovat jako pocházející z půdy, vzduchu, vody, rostlin, nástrojů zpracování, gastrointestinálního traktu, manipulátorů, krmiv, zvířecí kůže nebo prachu (Ray, 2005).

Dále jsou uvedeny dvě prostředí nejčastěji uváděná jako zdroje mikrobiální kontaminace.

Půda

Půda je největším známým rezervoárem a původcem kontaminace. Nachází se v ní široké spektrum mikroorganismů, bakteriemi a plísněmi počínaje, kvasinkami a aktynomycetami konče. V půdě se většině z nich obvykle dobře daří a mohou se velice rychle rozmnožovat. K přímému styku s půdou dochází obvykle během sklizně a následně i pak během zpracování. Nepřímo se může kontaminace z půdy pohybovat pomocí prachových částic ve vzduchu, proto mohou být spory přenosné větrem běžnou příčinou plísnových nákaz a u lidí také alergií (Sperber, 2009).

Voda

Dalším zdrojem kontaminace potravin může být voda, která je nedílnou surovinou při výrobě většiny potravin. Významným původcem kažení potravin vyskytujícím se ve vodě jsou bakterie rodu *Pseudomonas*. Další významnou skupinou bakterií, které se mohou ve vodě vyskytovat, jsou bakterie fekálního původu – enterokoky a koliformní bakterie, které jsou pro lidské zdraví velmi nebezpečné a jejich hodnoty v pitné vodě jsou přísně sledovány. Pro vodu sloužící k zavlažování tak přísné limity stanoveny nejsou (Sperber, 2009).

Bavíme-li se o kažení nápojů, je původ kontaminantů z vody jedním z nejzávažnějších. Pokud nepoužíváme pro výrobu potravin pitnou vodu, můžeme se potýkat s velice významnou kontaminací mikroorganismy. Jeden z důležitých nepřímých zdrojů kontaminace vodou se objevuje při mytí nástrojů, nebo při sanitačních operacích. Vzhledem k tomu, že použití vody při těchto procesech je nevyhnutelné, je třeba kvalitu použité vody bedlivě hlídat. Příkladem kontaminace z mytí je i tvorba aerosolu při mytí proudem vody s vysokým tlakem. Aerosoly obsahující bakterie tak mohou snadno proniknout do surových materiálů a způsobit jejich kontaminaci (Sperber, 2009).

3.7.2 Původci kažení

3.7.2.1 Bakterie

Bakterie jsou jednobuněčné mikroorganismy bez jaderné membrány, mají aktivní metabolismus a rozmnožují se pomocí binárního dělení. Jsou jedním z nejčastějších původců onemocnění, přestože se zdají být jako jedny z nejprimitivnějších forem života, protože jsou vysoce adaptabilní a sofistikované. Bakterie jsou schopné žít paraziticky, ale i samostatně, mohou se velice rychle rozmnožovat a jsou schopny žít v mnoha rozličných prostředích, stejně tak jako využívat mnohé zdroje energie (Simha, 2010).

Běžný rozměr bakterií je 0,5–1,0 x 2,0–10 mikrometrů, velikost je dána tvarem, který může být: kok, bacil a vibrio. Mohou tvořit tetrády, shluky a řetízky a mohou být jak pohyblivé, tak nepohyblivé. Na základě barvitelnosti podle Gramma rozdělujeme bakterie na Gram-pozitivní a Gram-negativní. Gram-negativní bakterie mají dvě membrány, jednu vnější (OM) a jednu vnitřní (MM). OM se skládá z lipoproteinů, lipopolysacharidů a fosfolipidů. Tyto bakterie mají limitovaný transport a vlastní bariérové funkce. Na druhou stranu Gram-pozitivní bakterie mají silnou buněčnou stěnu z několika vrstev mukopeptidů a kyseliny teichoové (Ray 2003).

Malé rozměry bakteriálních buněk mají velmi specifický povrch, který jim umožňuje intenzivní kvantitativní a kvalitativní přeměnu látek podmiňujících jejich rychlý růst a rozmnožování. Za optimálních podmínek mají buňky, například v potravinářství velmi rozšířené bakterie mléčného kvašení, generační čas 20 až 30 minut. Kupříkladu jeden litr kysaného mléka obsahuje až 10^{12} buněk *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, což představuje hmotnost zhruba 0,8 g (jejich specifický povrch tvoří 4,5 m²). Díky takovému povrchu jsou schopny uskutečnit přeměnu laktózy na kyselinu mléčnou a získat tak při tom potřebnou energii na syntézu protoplazmy (Görner, 2004).

Görner (2004) rozděluje bakterie na obligátně aerobní, které vyžadují na získání energie vzdušný kyslík, obligátně anaerobní, které naopak vzdušný kyslík zabíjí (energii získávají jedine fermentací) a nakonec fakultativně anaerobní, které mohou existovat v obojím prostředí.

V taxonomii bakterií bylo v minulosti zaznamenáno mnoho změn, mimo jiné především díky novým poznatkům v oblasti molekulárních genetických metod. Jednou

z metod často využívaných při identifikaci bakterií je rRNA analýza a DNA analýza (Jay, 2005).

Pokud zkoumáme jednotlivé druhy potravin, je vždy dobré znát, jaká prostředí jsou pro dané mikroorganismy specifické a původní. Je možné následně snáze odhadovat, jakým způsobem se potravina kazí.

Bakterie pocházející ze vzduchu

Často je náročné identifikovat mikroorganismy pocházející přímo ze vzduchu. Obvykle jsou bakterie ze vzduchu v dominantním zastoupení Gram-pozitivních koků a tyčinek (pokud nebyl vzduch bezprostředně před expozicí kontaminován zvířetem, nebo člověkem). Pigmentované kolonie jsou obvykle mikrokoky nebo korynebakterie, zatímco bílé až krémově zbarvené kolonie jsou aerobní sporotvorné mikroorganismy z rodiny *Bacillus*. Stejně tak můžeme nalézt malé, kolonie patřící do rodu *Streptomyces*, nebo příbuzné aktinomycet. Různé pigmenty mohou mikroorganismy chránit před běžným, ba i ultrafialovým slunečním zářením. Silné stěny Gram-pozitivních bakterií chrání buňky před vysycháním. Endospory bacilů jsou velice resistantní vůči poškození vzdušnou suspenzí (Adams, 2008).

Bakterie z vody

Mikroorganismy pocházející z vody, můžeme sledovat z několika druhů hledisek. Jedno z nich je, zda pocházejí ze sladké, nebo slané vody. V této práci se budeme zabývat pouze mikroorganismy pocházející ze sladké vody.

Sladké vody jsou častým nosičem pro bakterie, protozoa a viry, které mohou způsobovat nemoci, skrze kontaminaci vodou vytékajících z kanalizace, obsahující fekální znečištění. Často je těžké přímými metodami určit druh bakterie nacházející se ve vodě a tak se používají takzvané indikátorové mikroorganismy, o kterých je jejich přítomnost ve vodách fekálního znečištění známá. Takovým organismem bývá nejčastěji *Escherichia coli* (Adams, 2008).

Bakterie z půdy

Půdní prostředí je extrémně komplexní. Různé druhy půd mají různě diverzifikovanou půdní mikroflóru a složení bakterií, plísní, protozů a řas se může výrazně lišit. Půda je významným rezervoárem mikroorganismů, který nás běžně zásobuje mnoha produkty běžného užití. Takovými jsou například mnohá z antibiotik, enzymů,

aminokyselin, vitaminů a mnoha dalších produktů využívanými farmaceutickými a potravinářským průmyslem. Půdní mikroorganismy se podílejí především na recyklaci dusíkatých a organických látek, což je pro půdu klíčovým prvkem v rámci výživy a růstu rostlin. Na druhou stranu stejná vlastnost způsobuje nežádoucí změny v potravinách, vrcholící jejich kažením. Proto je tedy odstraňování půdních nečistot z potravin jednoznačně ospravedlněno, jako zásadní úkon (Adams, 2008).

Půda je mimo jiné pro bakterie velmi konkurenčním prostředím. Často se její fyzikálně-chemické vlastnosti mění a tak v reakci na tuto nestálost prostředí, v rámci zachování druhu produkují bakterie velice resistantní struktury – spory. Jedním z příkladů jsou například endospory bacilů a klostridií. Tyto formy bakterií jsou schopny přežít rozklad a vysoké rozpětí různých teplotních vlivů (Adams, 2008).

3.7.2.2 Kvasinky

Kvasinky jsou široce rozšířeným mikroorganismem v našem prostředí (Barret, 2005).

Jsou oválné, kulaté, nebo protáhlé, velikostí okolo 5–30 nebo 2–10 mikrometrů. Nepohyblivé, buněčná stěna se skládá z polysacharidů (glykanů), proteinů a lipidů. Cytoplasma má výrazně viditelné ribozomy a organely. Nukleus je velmi dobře viditelný společně s jadernou membránou (Ray 2003).

Kvasinky jsou obvykle řazeny mezi jednobuněčné houby, velikostně několiknásobně přesahující bakterie. V přírodě se vyskytují hojně a najdeme je především v sadech, vinicích, ve vzduchu, ale také v zemi a trávicím traktu zvířat. Jsou velmi důležité z pohledu produkce potravin fermentací, ale v mnohém případě způsobují potravinám i naprostou zkázu (Tucker, 2008).

Ve světě rostlin mohou být izolovány jak z listů, květů a exudátů, tak i plodů. Plody jsou často výrazně kontaminovány kvasinkami. Například jablka mohou být kontaminována kvasinkami v počtu až $10^3 - 10^4$ /gram ovoce. Čím je větší povrch plodu, tím více kvasinek je schopno se na plodu udržet. Dobrým příkladem je například obsah kvasinek na plodech révy vinné, kde se průměrná hodnota pohybuje až okolo 10^6 kvasinek/1 gram hroznů (Barret, 2005).

Kvasinky dělíme na fermentativní a oxidativní. Obvykle jsou kvasinky mezofilního charakteru a rostou nejlépe při hodnotách vodní aktivity 0.9. Plísňe

a kvasinky obecně rostou nižší rychlostí než bakterie a proto obvykle indikují, že potravina byla zkrátka uchovávána po příliš dlouhou dobu (Sperber, 2009). Mohou růst i v poměrně široké části kyselého pH a také v koncentraci ethanolu až do 18 %. Mnoho z nich je také schopno růst v 55-60% sacharóze. Kvasinky mohou produkovat mnoho rozmanitých barev, od krémové, přes růžovou, po červenou (Jay, 2005).

Barret (2005) tvrdí, že kvasinky jsou druhem hub, nejčastěji v jednobuněčné variantě, často se rozmnožujících pučením. V konzervaci potravin je jich významných okolo 215 druhů. Pouze malé množství kvasinek je patogenní pro člověka a žádné patogenní nejsou běžnými kontaminanty nápojů.

Kvasinky fermentativní

Nejznámějšími kvasinkami způsobující kvašení jsou fakultativně anaerobní fermentativní mikroorganismy, produkující ethanol a oxid uhličitý z jednoduchých cukrů. Některé fermentativní kvasinky jsou jedny z nejschopnějších růstu ve velice osmofilním prostředí. Jejich pomalý růst při hodnotách vodní aktivity 0.6 dokazuje i Martorell (2005).

Méně známými jsou pak aerobní kvasinky tvořící biofilmy. Tyto kvasinky rostou na už kvašených produktech a jsou schopné metabolizovat organické kyseliny a alkoholy. Evolučně se řadí mezi fermentativní kvasinky a plísně, přičemž mají morfologické vlastnosti kvasinek a metabolické vlastnosti plísní. Zástupci těchto druhů jsou: *Mycoderma*, *Candida*, *Pichia* a *Debaromyces* (Sperber, 2009). Podle Ray (2004) mohou právě *Pichia membranaefaciens* způsobovat kažení u piva, vína, nebo slaných nálevů.

Na povrchu listů se často nacházejí jedny z pravých kvasinek *Sporobolomyces* a *Bullera*, které se také občas nazývají zrcadlové kvasinky. Tento název pochází ze specifické vlastnosti těchto mikroorganismů. Pokud připevníme list na vnitřní stranu víčka Petriho misky s agarem sladinového typu, tak kvasinka vyprodukuje spory, které vystřelí na protilehlou stranu misky. Ballisporý pak tvoří kolonie, které po nějaké době vytvoří zrcadlový obraz povrchu listu (Adams, 2008).

Příkladem kvasinek hojně napadajících sirupy a další potraviny s vysokým obsahem cukru je například *Rhodotorula*. Rozmanitý organismus, přežívající i velice vysoké koncentrace cukru a je spojován s kažením džemů a marmelád. Stejně tak odolává mrazírenským teplotám a je možné jej nalézt například i na povrchu másla (Tucker, 2008).

Mezi další zástupce mikroorganismů často napadající i prostředí s vysokým obsahem cukru jsou *Zygosaccharomyces* a *Saccharomyces* (Tucker, 2008 a Martorell, 2005).

Tyto mikroorganismy způsobují například kažení marmelád, obdobně jako *Rhodotula*. Konkrétně *Zygosaccharomyces rouxii* roste i při pH 1,8 a vodní aktivitě 0,62, což z něho činí velice odolný mikroorganismus (Tucker, 2008). Zároveň jsou tyto mikroorganismy schopné rozmnožování ve vysoce kyselých prostředích, jako jsou kyselé omáčky, okurky, nebo dressingy. Takovým mikroorganismem je třeba i *Zygosaccharomyces bailii*. (Ray, 2004). To potvrzuje i Tucker (2008) a připojuje do výčtu potravin často tomuto mikroorganismu podléhající majonézy, kečupy, ovocné nápoje a vína.

Zygosaccharomyces bailii také často odolává slabým kyselinám jakožto běžným konzervantům. V případě *Z. bailii* mohou slabé kyseliny glykolýzu podporovat spíše než zpomalovat. (Sperber 2009). Je rezistentní vůči sorbátům a může vyvolávat fermentaci, velmi často například u tropických džusů. (Ashurst, 2009). Podobným mikroorganismem, s obdobnými charakteristikami v rámci kažení nealkoholických nápojů je také *Candida krusei* (Sperber 2009).

U těchto dvou kvasinek byl jejich nejvyšší růst zaznamenán při teplotách okolo 30°C a při aciditě 3,0-4,0 pH (Luubert, 2003).

Alkoholické nápoje jako je pivo, víno, nebo fermentované nápoje může v aerobním prostředí znehodnocovat *Brettanomyces*. Produkuje kyselinu octovou z glukózy a tím způsobuje silnou kyselost potraviny (Tucker, 2008). Znehodnocování ovocných nápojů touto kvasinkou potvrzuje i Barret (2005).

Projevy růstu kvasinek záleží na druhu potraviny a také druhu kvasinky, ale můžeme říci, že kupříkladu u velice fermentativního druhu, jako ne např. *Saccharomyces cerevisiae* může dojít i k tak velké produkci CO₂, že dojde k protržení obalu (Görner, 2004). Růst některých druhů produkují pouze drobný zákal, či sediment. Populace o počtech okolo 10⁵/ml jsou již viditelné pouhým okem. CO₂ a alkohol jsou jedním z primárních metabolických produktů rozvoje kvasinek, avšak je třeba neopominout i tvorbu glycerolu, acetaldehydu, kyseliny pyrohroznové a alfa-glutarové (Rankine 1968).

Podle (Ray 2004) tekutá sladidla, jako je například med, cukerné sirupy, javorový sirup, či kukuřičný sirup a melasy, které mají běžně vodní aktivitu okolo 0.8, nebo méně

běžně mikrobiální zkáze nepodléhají, ovšem nakonec přiznává, že i tyto produkty mohou zkáze podléhat. Obvykle v důsledku osmofilních kvasinek z rodu *Zygosaccharomyces rouxii*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Torulopsis holmii* a *Candida valida*.

3.7.2.3 Plísně

Plísně jsou nepohyblivé, rozvětvené a vláknité. Buněčná stěna se skládá s celulózy, chitinu, nebo obojího. Plíseň je obvykle tvořena vysokým počtem vláknitých filament, kterým se říká hyfy. Část hyfy se jmenuje mycelium. Hyfy mohou být vegetativní, nebo generativní. Generativní hyfy jsou schopné se rozrůstat do vzduchu a vytvářet exospory. A to buď volné (konidie), nebo zapouzdřené (sporangia) (Ray, 2003). Plísně se mohou rozmnožovat pohlavně, nepohlavně, nebo pomocí kombinace obojího. Nepohlavní plísně se rozmnožují přímo z mycelia a říká se jim thallospory, conidiospory nebo sporangiospory. Pohlavní spory se nazývají oospory, zygospory, askospory a bazidiospory. (Banwart, 1998). Taxonomicky rozlišujeme spory podle tvaru, velikosti a barev (Ray, 2003).

Na plísních je zajímavé, že jsou schopny porůstat povrchy i v rychlosti několika centimetrů za den (Tucker, 2008). Stejně tak uvádí Jay (2005), že plísně mohou porůst plochu několika centimetrů za 2-3 dny.

Askospory některých druh jsou z hlediska každá potravin obzvláště významné proto, že jsou schopné odolávat i velice vysokým teplotám (Tucker, 2008).

Plísně jsou všudypřítomné, ale jejich hlavním zdrojem je vzduch, půda, voda a rozkládající se organická hmota. Od vyšších rostlin a algae se liší tím, že neprodukují chlorofyl a že nemají a tedy se obvykle chovají saprofiticky nebo paraziticky. Od bakterií se liší větší velikostí a jejich komplexní strukturou. (Banwart 1998)

Nealkoholické nápoje, běžně konzervované sorbáty, bez přidaného CO₂ mohou být napadány plísní *Penicillium roquefortii*. Kyselinu sorbovou metabolizuje tato plíseň na 1,3-pentadiene, který má velmi podobné aroma, jako například naftová paliva. V nealkoholických nápojích mohou problémy způsobovat i další kmeny rodu *Penicillium* (Ashurst, 2009).

Mikroorganismy pocházející z rostlin

Specializované plísně, kvasinky a bakterie, žijící jako komensálové na zdravých a mladých rostlinách obvykle nejsou problematickými mikroorganismy v kontextu s kažením potravin po sklizni. Během dorůstání a zrání rostliny se ale povrchová mikroflóra mění. Počet pektinolytických bakterií se se stářím zeleniny zvyšuje a povrch tak může napadat větší množství plísní. Tyto mikroorganismy by v normálním světě bez lidí pouze zajistili přirozený koloběh živin, ale pokud do tohoto řetězce zapojíme lidi, konkrétně s jejich potřebou sklízet ovocné plody, kořeny, semena a další části rostlin, tak právě tyto přirozeně se vyskytující mikroorganismy mohou způsobit pro člověka potíže (Adams, 2008).

Klasickou pasteraci, například u džusů, běžně přežívá termofilní bakterie *Alicyclobacillus acidoterrestris*, která může značně vychýlit chuťové vlastnosti šťáv a tedy potenciálně i sirupů (Ashurst, 2009).

3.7.3 Faktory ovlivňující kažení

Tewari (2007) popisuje, že způsob kažení a růst patogenních mikroorganismů může pocházet z různých zdrojů. To zahrnuje části rostlin, zvířat, vzduchu, aditiv, koření, různé typy povrchů a nástrojů, se kterými se potravina během zpracování setká, odpadní vody a spousta dalších zdrojů, jako obaly a obalové materiály, hmyz a hlodavci. Faktory ovlivňující kažení potravin mohou pocházet buď zevnitř, přímo z potraviny, anebo zvenčí. Vnitřní prostředí je determinováno vlastnostmi potraviny samotné, vnější pak jejím skladováním a prostředím okolo.

Mezi vnitřní vlastnosti patří například vodní aktivita, pH, přirozeně obsažené konzervační látky, nebo oxidačně redukční potenciál (Sperber 2009).

Každá z těchto charakteristik může být člověkem manipulována a upravena tak, aby byla zajištěna lepší bezpečnost potravin. V minulosti jsme byli svědkem velkého rozmachu zpracovatelských technologií, které nám dovolily značně rozšířit celkové portfolium potravinářských produktů. (Sperber 2009).

Vodní aktivita

Voda je jednou z nejesenciálnějších molekul potřebných pro život. Z tohoto důvodu se voda stává jedním z neklíčovějších proměnných ovlivňujících růst mikroorganismů. Dostupnost vody pro mikroorganismy závisí na dvou faktorech. Prvním

z nich je obsah vody v okolí a druhým koncentrace v ní rozpuštěných látek, jako je například sůl, cukr apod. Dostupnost vody, nebo-li voda, kterou mohou mikroorganismy přímo využít pro svůj růst je definována jako aktivita vody (Kale 2007).

Aktivita vody není totožná s obsahem vody v potravinách, který určuje obsah celkové, tj. volné i vázané vody v potravine. Aktivita vody je z technologického hlediska definována jako poměr tlaku vodních par potravin k tlaku par destilované vody při určité teplotě. Například, pokud relativní vlhkost vzduchu nad potravinou dosahuje hodnoty 95 %, vodní aktivita se rovná 0,95 (Kale 2007).

Stanovení hodnoty vodní aktivity (a_w – z anglického available water, nebo-li dostupná voda) nahradilo metodu stanovování procentuální vlhkosti potravin a je považováno za poměrně přesnou metodu, co do odhadu potenciální kazivosti potravin. Je možné aktivitu vody měřit manometricky, pokud vydělíme tlak páry nad potravinou tlakem nad destilovanou vodou anebo matematicky, pokud počet molů vody vydělíme počtem molů roztoku sečtenými s moly vody. Nejsnadněji je vodní aktivita determinována pomocí měření rovnovážné relativní vlhkosti následně dělené 100.

Zatímco hodnoty relativní vlhkosti se mohou pohybovat mezi 0-100 %, hodnota vodní aktivity může dosahovat hodnot mezi 0-1 (Tewari, 2007).

Ve většině případů obsahuje buněčná cytoplasma větší koncentraci rozpuštěných látek, než její okolí. Mnoho metabolický dějů se bez vody neobejde a tak je obsah vody v cytoplazmě naprosto klíčový. Mikrobiální buňka obsahuje 80-90 % vody a tedy aby nedošlo ke ztrátě vnitrobuněčné vody, musí být dostatečné množství vody obsaženo také ve vnějším prostředí. Voda na základě zákonů osmózy obvykle difunduje z prostředí o větší koncentraci do toho s menší koncentrací, což v případě, umístíme-li mikrobiální buňku do hypertonického (prostředí s nízkou aktivitou vody) prostředí, způsobí prakticky její vysušení a následnou plazmolýzu. Existují pochopitelně osmoresistentní mikroorganismy, které těmto tlakovým extrémům odolávají, ale převážná většina mikroorganismů se může rozmnožovat pouze v rozmezí hodnot vodní aktivity 0,98-1. Z toho důvodu jsou sušení, nebo zasolování a zacukřování jedny z nejpoužívanějších konzervačních metod (Kale, 2007).

Z logiky věci tedy vyplývá, že kupříkladu čistá voda má hodnotu vodní aktivity 1. Optimální hodnota pro růst mikroorganismů je 0,92 a nejnižší hodnota, při které mikroorganismy ještě mohou růst, je 0,9 (s výjimkou osmoresistentních mikrobů).

Obecně můžeme říci, že bakterie vyžadují pro svůj růst obvykle vyšší hodnoty vodní aktivity, než houby a Gram negativní bakterie mají vyšší nároky na vodu než bakterie Gram pozitivní (Jay, 2005). Nejnižší limity pro růst plísní a kvasinek je hodnota vodní aktivity okolo 0,60. S jistotou nulového růstu pod hodnotu 0,60 (Beuchat 1983).

Minimální hodnoty vodní aktivity pro většinu gram negativních bakterií, většinu gram pozitivních bakterií, většinu kvasinek, většinu filamentárních hub, halofilních bakterií a xerofilních hub jsou 0,97, 0,90, 0,80, 0,75 a 0,61 (Adams and Moss 2000).

Forsythe (2010) uvádí běžné hodnoty pro sirupy a cukerné roztoky okolo 0,87-0,80, což je ale kupříkladu pro osmoresistentní kvasinky stále příliš vysoká hodnota.

Vodní aktivita se dá obvykle snadno snížit přidáním soli (nakládaná zelenina, maso), nebo cukru (džemy, ovocné produkty), (Forsythe 2000). Zároveň může být ovlivněna hodnotami pH, kyselostí a případnými přirozenými nutrienty obsaženými v potravine (Tewari, 2007).

Obvykle si vodu představujeme jako kapalinu, pro kterou se hraniční teploty pohybují okolo 0-100°C, což tedy zároveň považujeme jako limitní hodnotu pro možný růst mikroorganismů. Ovšem bod tání a varu vody může být pozmeněn v návaznosti na látku v jejím roztoku rozpuštěné. To může v důsledku znamenat, že pokud mikroorganismus obsahuje nějakou z látek, která pozmenňuje bod tuhnutí (například polyol - protimrzoucí sloučenina), může takový organismus přežít i v mnohem extrémnějších podmínkách (Adams 2008).

Stejně tak může být pozmeněn bod varu, v návaznosti kupříkladu na zvýšený hydrostatický tlak. Hezkým příkladem jsou bakterie žijící blízko vulkanických prúdů, které díky vysokému tlaku v hlubokých podmorských podmínkách zvyšují bod varu své cytoplazmaticky vázané vody a tak jsou schopny přežít i velice vysoké teploty (Adams, 2008).

Tímto se dostáváme k významu a vlivu teploty na růst mikroorganismů.

Teplota

Naprosto všechny živé organismy na planetě jsou ovlivněny tímto fyzikálním parametrem, mikroby nevyjímaje. Růst a rychlost množení mikroorganismů je ve skutečnosti na teplotě okolí závislé velice významně, poněvadž souvisí s rychlostí enzymatické aktivity. Enzymy mají jisté rozmezí, ve kterém fungují. Čím větší je teplota,

tím se jejich aktivita zvyšuje, ovšem i zde je platí jakýsi horní teplotní limit, který v případě jeho překročení způsobí denaturaci enzymů, a tedy znemožní buňce fungovat. Vyšší funkčnost enzymů způsobuje rychlejší růst a tedy i rozmnožování buňky. V podstatě můžeme říci, že zneškodnění buňky dochází zničením transportních molekul, enzymatického charakteru, což buňce znemožní udržet své životní funkce (Kale 2007).

Mikroorganismy podle toho, jakým způsobem se vypořádávají s různými teplotami, dělíme na termofilní, mezofilní a psychofilní (Forsythe, 2010).

Tabulka č. 1

| Mikroorganismy | minimum °C | optimum °C | maximum °C |
|----------------|------------|------------|------------|
| psychofilní | -5 | 12-15 | 20 |
| mezofilní | 5 | 30-45 | 47 |
| termofilní | 40 | 55-75 | 60-90 |

Tabulka č. 1 nám ukazuje teplotní rozmezí pro dané organismy tak, jak je rozděluje Forsythe (2010).

Gorner (2004) uvádí hodnoty:

Tabulka č. 2

| Mikroorganismy | minimum °C | optimum °C | maximum °C |
|------------------------|------------|------------|------------|
| Psychofilní bakterie | -5 až +5 | 12 až 15 | 15 až 20 |
| Psychrotrofní bakterie | -5 až +5 | 25 až 30 | 30 až 35 |
| Mezofilní bakterie | -5 až +15 | 30 až 40 | 35 až 47 |
| Termofilní bakterie | 40 až 45 | 55 až 75 | 60 až 90 |

Z hlediska konzervace sirupů připadají jako nejzajímavější bakterie rostoucí za běžných pokojových teplot, vzhledem k běžné praxi a očekávání konzumentů na jejich skladování. To jsou tedy převážně bakterie psychrotrofní a mezofilní.

Pokud chceme u potravin nějakým způsobem vyjádřit jejich kazivost v závislosti na teplotě, můžeme se orientovat podle Q_{10} faktoru. Q_{10} je definováno jako poměr

rychlosti změny růstu mikroorganismů (reakcí) při změně teploty o 10°C. Toto číslo nám tedy může říct, o kolik více či méně budou organismy růst v případě změny teploty. Obvykle se hodnoty Q_{10} pohybují okolo 2-3, jsou bezjednotkové a proto především orientační. Jedná se o faktor, nikoliv hodnotu množství.

Například, pokud při teplotě 25°C nám na agarové misce narostlo 20 kolonií a při teplotě 35°C narostlo kolonií 70, můžeme po výpočtu $Q_{10} = (R_2/R_1)^{10/t_1 - t_2}$ zjistit, že Q_{10} faktor je roven 3,5. (Steele, 2004).

Kyzlink (1990) uvádí, že hodnota Q_{10} má své limity, obzvláště u měření změny rychlosti enzymatických reakcí, vzhledem k bodům denaturace a tedy rapidních změn v chování měřených látek.

pH

Hodnota pH je koncentrace hydrogenových iontů (Tewari, 2007), nebo-li záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů.

$$\text{pH} = -\log_{10} [\text{H}^+] = \log_{10} 1/[\text{H}^+]$$

kde $[\text{H}^+]$ je koncentrace hydrogenových iontů

Hodnota pH nám určuje, zda je látka kyselá, nebo zásaditá. Okolo hodnot rovných 7, je látka takzvaně neutrální, pod tuto hodnotu kyselá, nad tuto hodnotu zásaditá (Sperber 2009).

Každý mikroorganismus má svoje rozmezí a minimální a maximální hodnoty, ve kterých je životaschopný a v případě vychýlení z těchto hodnot se jeho životaschopnost zhoršuje. V případě potravin je třeba brát v úvahu přirozené změny pH během skladování. pH se může lišit výrazně na začátku skladování, nebo zpracování v porovnání s konečným produktem. Proto je třeba s těmito změnami počítat, především proto, že kyselost/zásaditost potravin mohou v některých případech ve svůj prospěch měnit sami organismy. (Forsythe, 2010).

Potravin s pH pod hodnoty 4,6 se nazývají velmi kyselé, ty s hodnotami nad 4,6 se nazývají málo kyselé. Tento limit byl odvozen od spor *Clostridium Botulinum*, které pod touto hodnotou nejsou schopné sporulace a produkce toxinů (Sperber, 2009).

Optimum pro růst mikroorganismů je zhruba okolo hodnoty pH 7 a většina mikroorganismů neroste pod hodnoty 4,6. Bakterie jsou na kyselosti prostředí o něco více

náchylné, a vybíravější než plísně a kvasinky (Jay, 2005). Obecně platí, že optimální pH pro bakterie je 6,0–8,0, pro kvasinky 4,5–6,0, pro filamentární houby 3,5–4,0 (Adams, 2008).

Podle Ray (2001) je pro plísně je rozmezí růstu poměrně široké, a to 1,5–9,0, pro kvasinky 2,0–8,5, pro Gram pozitivní bakterie 4,0–8,5 a pro Gram negativní bakterie 4,5–9,0.

Některé mikroorganismy vyvinuly schopnost odolávat extrémním pH, především velice kyselým prostředím. Sperber (2009) uvádí dokonce rozmezí od hodnot pH 0,5 do pH 11,0. Tento fakt a schopnost mikroorganismů přizpůsobovat svoje vitální pochody, často vede k používání většího množství a více bariér v rámci konzervace potravin.

Pufrovací kapacita potravin je její schopnost reagovat a přizpůsobovat se změnám pH. Tuto schopnost (nebo neschopnost) je třeba brát v potaz, v případě, chystáme-li se potraviny okyselit, nebo konzervovat fermentací. Ovoce a zelenina mají obvykle nízkou pufrovací kapacitu v porovnání s živočišnými materiály. Vysoký obsah bílkovin obvykle napomáhá zvýšení pufrovací kapacity (Tewari, 2007).

Mikroorganismy často napadající sirupy se nejraději a nejlépe množí při pH 3-4 (Lubbert, 2001).

Množství a dostupnost nutrientů

Pro mikroorganismy jsou klíčové především tyto nutrienty: voda, uhlík, dusík a vybrané vitaminy a minerály. Nejvyšší nároky na nutrienty mají bakterie, na druhou stranu plísně mají na nutrienty nároky nejnižší. Kvasinky mají střední nároky na nutrienty. Některé komponenty v potravinách mohou mít na růst mikroorganismů vliv negativní a působit tedy přímo antimikrobiálně (Sperber, 2009).

3.8 Biologicky aktivní látky prodlužující trvanlivost

Biologicky aktivní látky byly zkoumány v mnoha rostlinných druzích vždy se snahou identifikovat konkrétní látku s antimikrobiálními účinky. V mnoha případech bylo zjištěno, že onou biologicky aktivní látkou s antiseptickými a antimikrobiálními účinky byly silice. Složení silic je často závislé na geografickém původu rostliny, stejně tak jako na období sklizně a klimatických podmínkách (Linksens, 1991).

Vyšší rostliny byly jako zdroj biologicky aktivních látek využívány od pradávna. Schopnost některých látek inhibovat mikrobiální znehodnocení, nebezpečné bakterie, lidské i zvířecí patogeny, a mnohé z filamentárních hub, byla pro člověka klíčová po mnohá staletí. (Linksens, 1991)

3.9.1 Silice

Silice jsou produktem sekundárního metabolismu rostlin. Sekundárními metabolity se zpravidla míní takové produkty, které rostlina vytváří, ale bez jejichž přítomnosti je stále životaschopná. Příkladem podobných látek mohou být například i alkaloidy, saponiny, nebo fenolové glykosidy (Jirásek, 1989). Jednotlivé silice se obvykle nazývají podle rostliny, ze které jsou běžně získávány a jejich vůně je podobná té části rostliny, ze které se získává. (Preedy, 2015)

Silice jsou obvykle těkavé látky, aromatického charakteru, složené z organických sloučenin. Mají olejovitou konzistenci a mnohým olejům se podobají i svými vlastnostmi. Proto se jim často také říká éterické oleje. Silice můžeme najít v různých částech rostlin, často v květech, plodech, nebo listech ale hojně jsou k nalezení i v kůře, nebo kořenech rostlin. Obvykle se nacházejí v žláznatých buňkách, papílách, kanálcích, nebo mezibuněčných prostorech. V mnoha případech slouží jako aromatická složka rostliny, lákající hmyz k opílování, nebo naopak jako protipatogenní činidlo, zabraňující rozvoji nežádoucích mikroorganismů (Jirásek 1989).

Jsou těžko rozpustné ve vodě, ale jsou rozpustné ve většině organických rozpouštědlech, včetně diethyletheru, nebo ethanolu. Dobře se směšují s rostlinnými oleji, tuky a vosky (Preedy, 2015).

Ve formě silic si rostlina ukládá většinu svých chuťových a aromatických látek. Jsou to směsi těkavých siličných látek, které jsou v čerstvém stavu bezbarvé. Obvykle směsí uhlovodíků, nebo jiných kyslíkových derivátů, často s charakterem terpenů, seskviterpenů, alkoholů, esterů, aldehydů, ketonů, fenol, etherů, nebo peroxidů.

Silice také často zodpovídají za léčivé účinky rostlin a kvůli této vlastnosti bývají také často pěstovány a kultivovány. Silice mohou působit protizánětlivě a mohou brzdit růst bakterií (Small, 2006).

Složení silice se v různých částech rostliny může měnit. Dobrým příkladem je kupříkladu skořicovník. V kůře najdeme jako hlavní složku aldehyd, v silici izolované v listech převažuje eugenol a v kořenech zase kafr (Jirásek, 1989).

Silice se široce využívají například jako přísada do cukrovinek, nealkoholických nápojů a destilovaných alkoholických nápojů (Kettenring and Geeganage, 2010).

Jejich schopnost působit antibakteriálně, protiplísňově, antivirálně, insekticidně a antioxidačně je využívána v mnoha zemědělských a nutričních odvětvích (Turek and Stintzing, 2013; Lopez-Reyes et al., 2013).

Způsob získávání silic:

Metody získávání: parní destilací (pára prochází materiálem a s sebou bere vonné látky, které jsou následně zkondenzovány a sbírány) nebo destilací (zahřátí a následné zchlazení směsi látek, které se oddělí na základě různé těkavosti) (Small 2006).

Silice se získávají pomocí destilace drogy v čerstvém stavu s vodní párou, nebo louhováním s organickými rozpouštědly. Dále je možné silice získávat enfleuráží bezpachým tukem za studena, nebo macerací v horkém tuku. Destilace s vodní parou je nejčastějším způsobem ovšem ta může poškodit jemné tóny dané silice (Jirásek, 1989).
ověřit dnešní metody

Silice, které jsou za stálých teplot nestálé, se získávají mechanickým lisováním. Někdy má destilace za následek přítomnost nežádoucích příměsí, které se mohou svými vlastnostmi od silice lišit (Small, 2006).

Silice nejsou stálé sloučeniny a skladováním se jejich složky zhoršují. Pokud obsahují hodně nenasycených uhlovodíků, často mohou pryskyřičnatět (Jirásek, 1989).

Silice jsou také řazeny mezi takzvaná korigencie, nebo-li látky, které zlepšují a zpříjemňují chuťové a čichové vjemy. To má vliv nejen na jejich využití v potravinářském průmyslu (Jirásek, 1989).

Studie provedené na toxiny produkujících plísňích prokázaly jednoznačný efekt na výskyt toxinů v přítomnosti esenciálních olejů. Produkce aflatoxinů z rodu *Aspergillus* byl výrazně nižší i při nízkých koncentracích. Ve studii na *Pimpinella anisum* byla pozorována významná antifungicidní aktivita u rodů *Alternaria*, *Apergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* a *Penicilium* (Linskens, 1991).

3.9.1.1 Hřebíčková silice

Poupata hřebíčkovce kořeněného nebo vonného (*Syzygium aromaticum* nebo *Eugenia Caryophyllata*, Myrtaceae) poskytující koření hřebíček kupříkladu produkují 16-18 silic (konkrétně kultivar ze Zanzibaru). Další kultivar, původem z ostrova Ambonia může produkovat až okolo 20 % této silice. Nejčastější využití hřebíčkové silice je jako zubní antiseptikum (Rystonová, 2007).

Kultivován kromě Zanzibaru také na Pembě, v Penangu, na Madagaskaru, na Karibských ostrovech, na Srí Lance, a v Jižní Indii. Rostlina produkující hřebíček dosahuje nejlepších produkčních výsledků až po zhruba 15 až 20 letech růstu. Sklizeň probíhá ručně, nebo pomocí bambusových tyčí. Poupata jsou optimální ke sklizni, když začnou ze zelené měnit barvu na růžové. Jejich hnědá barva se docílí až sušením (Preedy, 2015).

3.9.1.2 Tymiánová silice

Silice pocházející z Tymiánu obecného (*Thymus vulgaris*) se získává parní destilací nebo vodní destilací z květenství a listů. Existuje několik druhů tymiánu, ale nejjemnější silice pochází z linalolového tymiánu. Zemí původu je obvykle Francie, Maroko, Španělsko, Řecko, Alžírsko, Německo, nebo Amerika (Farrer-Halls, 2007).

V tymiánové silici můžeme nalézt mnoho polymorfních variací na monoterpeny. Patří mezi ně například geraniol, α -terpineol, thuyanol-4, linalool, karvakrol, a thymol. (Thompson et al., 2003). Thymol a karvakrol jsou dva z nejaktivnějších komponent tymiánového esenciálního oleje, které jsou hojně využívány pro svojí širokou škálu antimikrobiálních účinků (Soliman and Badea, 2002).

Využití tymiánu a jeho silic je také významné z hlediska chuti. Jeho schopnost potlačit nežádoucí pachy (jako například tri-methylamin a hydroxy toluene) v jídle je jednou ze zásadních charakteristik pro které je tak hojně využíván. Mimo jiné poskytuje také vynikající antioxidační schopnosti, v mnoha případech s lepšími výsledky než poskytují syntetické antioxidanty (Preedy, 2015).

Tymiánové silice prokázaly efektivitu proti patogenním mikroorganismům jako je například *Campylobacter jejuni*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *S. aureus*, a *L. monocytogenes* (Smith-Palmer et al., 1998).

Rabiei et al. (2011) úspěšně demonstrovali antimikrobiální vliv tymiánových silic na jablkách (*Malus domestica*) s koncentrací (100 ppb) v rámci zlepšení posklizňové kvality.

Shabnum and Wagay (2011) testovali protiplísňové schopnosti tymiánových esenciálních olejů na jahodách (*Botrytis cinerea* a *Rhizopus stolonifer*) a podařilo se jim tak snížit šedé plísňe a měknutí jahod o 75.8 % a 74.8 %. Po čtrnácti dnech byla dávka TEO zvýšena.

Karami-Osboo et al. (2010) uvádí schopnost TEO (tymiánového esenciálního oleje) o složení: karvakrol; 4.78% a thymol; 49.5%, potlačit růst *Erwinia amylovora*, způsobující onemocnění na jablkách a hruškách.

Díky své širokospektrosti jako antimikrobiální činitel a vysoké účinnosti i při srovnání se syntetickými antimikrobianty, je TEO jedna z vysoce využívaných přírodních látek. Jeho předností je také netoxičita vůči savcům a schopnost snižovat výskyt aflatoxinů (Kumar et al., 2008).

Nguefack et al., 2004 uvádí pozitivní efekt na inhibici konidiální germinace a růst mykotoxiny produkujících mikroorganismů jako je *Fusarium moniliforme*, *A. flavus*, a *Aspergillus fumigatus* při koncentracích 1000 ppm.

O něco později stejný autor potvrzuje efektivitu těchto silic jako antimikrobiálních činitelů u *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium expansum*, a *Penicillium verrucosum* (Nguefack et al. 2009).

3.9.1.3 Voňatka citronová

Lemongrassová silice je nažloutlé, nebo jantarové barvy. Je získávána parní destilací z citronové trávy druhu *Cymbopogon*, konkrétně *Cymbopogon citratus*, jenž je původem z Jižní Asie. a *Cymbopogon flexuosus*, která je kultivována převážně v Africe, Jihovýchodní Asii a ostrovech Indického oceánu (Farrer-Halls, 2007).

Využití samostatné lemongrassové silice v džusech se příliš neosvědčila, vzhledem ke svému výraznému vlivu na chuťové vlastnosti produktu. Na druhou stranu, v kombinaci s jinými konzervačními metodami se ukázala jako poměrně vhodná. Studie, ve které bylo využito nanoeksapsulačního systému (slunečnicový olej a palmový olej jako organické fáze a glycerol monooleát, sojový lecitin, tween 20 a Cleargum jako emulgátory) potvrdila antimikrobiální aktivity proti *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, and *Lactobacillus delbrueckii* v pomerančových a hruškových džusech a zároveň zachování jejich původních chuťových vlastností (Donse et al., 2011).

Mishra and Dubey (1994) dokázali vliv lemongrassových silic, jakožto posklizňového fungicidu. Silice prokázala schopnost inhibovat růst 35ti, 45ti, a 47mi druhů mikroorganismů při koncentraci 500, 1000, a 1500 ppm. Svoji schopnost si udržela po 210 dní skladování, poté se schopnost snižovala.

V jiném experimentu došlo k výraznému snížení růstu kolonií u významných posklizňových patogenů *Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer*, a *Aspergillus niger*. Produkce spor byla snížena o 70 % při koncentraci 25 ppm. Při koncentraci 500 ppm sporulace byla naprosto zastavena. Zároveň byla inhibována aktivita *C. coccodes*, *B. cinerea*, *C. herbarum*, a *R. stolonifer* v přímé úměře ke koncentraci, ovšem došlo ke zvýšení aktivity *Aspergillus niger* a to až do koncentrace 100 ppm (Tzortzakis and Economakis, 2007).

Raybaudi-Massilia et al. (2006) ve svém experimentu dokázali inhibiční schopnosti lemongrassové silice u *Salmonella Enteritidis*, *E. coli*, a *Listeria innocua*, konkrétně v jablečném, hruškovém a melounovém džusu.

4 Materiál a metodika

4.1 Příprava sirupu

Příprava sirupů probíhala v mikrobiologické laboratoři Katedry kvality zemědělských produktů, za běžných hygienických podmínek, které lze dosáhnout i v běžných malovýrobních provozech. Sirup byl připraven ve 150 ml erlmajerově baňce z 60 gramů cukru (sacharózy) společně s 40 ml vody a následně za studena rozmíchán magnetickým míchadlem. Použita byla nepřevařená, pitná voda z vodovodní sítě na České zemědělské univerzitě. Jako sladidlo byla použita běžně dostupná krystalická sacharóza, řepný cukr. Na přípravu bezinkového sirupu byly použity sušené květy *Sambucus nigra* (Byliny Mikeš) Přípraveného cukerného roztoku bylo přidáno 5 gramů sušeného bezinkového květu. Po 12 hodinách byla směs zfiltrována.

Pomocí vysokootáčkového mixéru – IKA ULTRA-TURRAX (Švédsko) bylo připraveno 10 ml mikroemulgovaných (20 tis. ot./min po dobu 10 s.) zásobních roztoků hřebíčkové, voňatkové a tymiánové silice v cukerném roztoku o koncentraci 10,24 g silice na litr sirupu. Takto připravený zásobní roztok byl následně přidán do základního sirupu tak aby vznikly 10 ml vzorky o finálních koncentracích 512, 256, 128 a 64 g/l. Pokud probíhal ve skleněných mikrobiologických zkumavkách uzavřených víčkem. Vzorky byly ve svislé poloze skladovány při pokojové teplotě.

4.2 Mikrobiologický rozbor sirupu

U každého vzorku byl v intervalech 7 a 14 dní proveden mikrobiologický rozbor pro stanovení celkového počtu mikroorganismů ve vzorku.

Před každým rozbohem byl vzorek homogenizován na vortexu. Byly použité sterilní nástroje a pomůcky. Pipetou bylo odebráno 100 ul vzorku a v TSB (Tryptone Soya Broth, Oxoid) bujónu bylo provedeno desítkové ředění. První ředění do mikro zkumavky typu ependorf a následně v mikrotitrační destičce. První ředění bylo v objemu 1ml, smícháním 900 mikrolitrů bujónu TSB a 100 mikrolitrů sirupu. Další ředění až do 6. byly připraveny ve dvou opakováních do mikrotitračních destiček, ve kterých bylo připraveno 180 mikrolitrů bujónu.

Pro vlastní stanovení byla použita modifikovaná kapková metoda (Chen et al., 2003), která je velice efektivní a umožňuje za nízké spotřeby materiálu a času uskutečnit tři nezávislá opakování. Z příslušného ředění na mikrotitrační destičce bylo přepipetováno 9,7 (~10 ul) vzorku na předem připravené a ve sterilních podmínkách osušené kultivační půdy. Pro větší přesnost byly použity vždy dvě kapky příslušného ředění, ze kterých byl následně vypočítán průměr hodnot KTJ. Veškerá práce probíhala v laminárním mikrobiologickém boxu.

Pro stanovení celkového počtu mikroorganismů bylo použito dvou živných půd, Plate count agar (Oxoid), který je určen pro stanovení celkového počtu mikroorganismů a Sabouraud Dextrose Agar (Oxoid), na kterém bývají stanovovány houby. A však pozdější výsledky ukázaly, že mezi použitými médii nebyl významný rozdíl.

Vzorky byly kultivovány při pokojové teplotě ± 23 °C po dobu 24-72 hodin a byly pravidelně kontrolovány. Vzhledem k přirozené mikroflóře vzorků nebylo možné určit přesný čas kultivace, bakteriální kultury rostou pomaleji než houby. Vzorky proto byly vyhodnocovány dle aktuálního stavu nárůstu. V každém počítatelném ředění byly spočítány vzrostlé kolonie bakterií / hub. A výsledky byly vyjádřeny jako KTJ/ml vzorku.

Sledované znaky:

Množství kolonie tvořících jednotek/ml v sirupech s přidanou silicí v porovnání s kontrolou, která byla ponechána bez silice.

4.3. Vyhodnocení dat

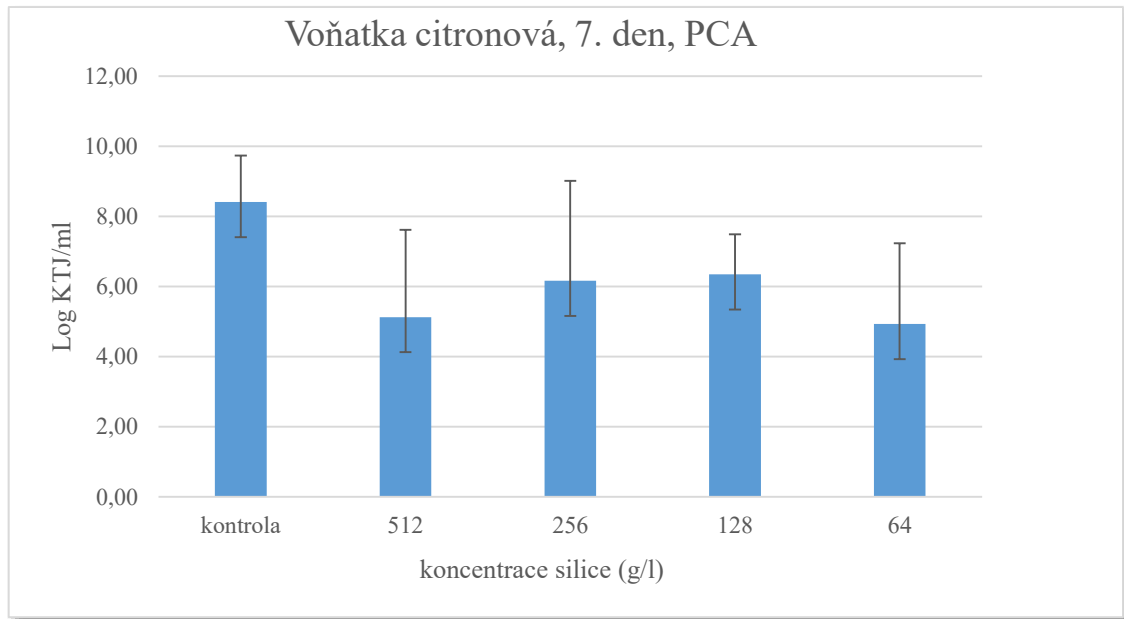
Získaná data byla vyhodnocena ve statistickém programu R na hladině významnosti 0,05 a pro úplnost je u signifikantních výsledků uvedena velikost vzorků (n) a p-hodnota (p). Grafy byly zpracovány v programu MS Excel.

Pro stanovení závislosti byla použita jednoduchá regrese a pro stanovení rozdílů mezi kontrolními vzorky a koncentracemi silic byla použita ANOVA.

5 Výsledky

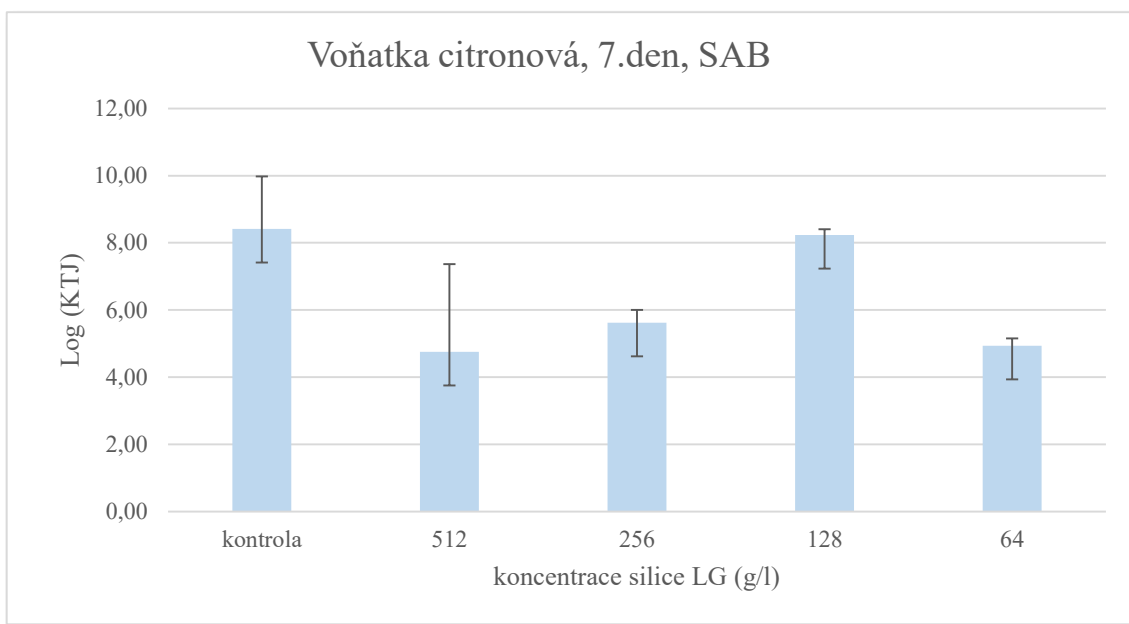
Výsledky jsou řazeny podle jednotlivých silic, takže ke každé z nich jsou přiřazeny 4 graficky vyjádřené výsledky. Vždy Po 7 dnech, po 14 dnech, na Plate count agaru a Sabouraud Dextrose Agar.

5.1 Voňatka citronová



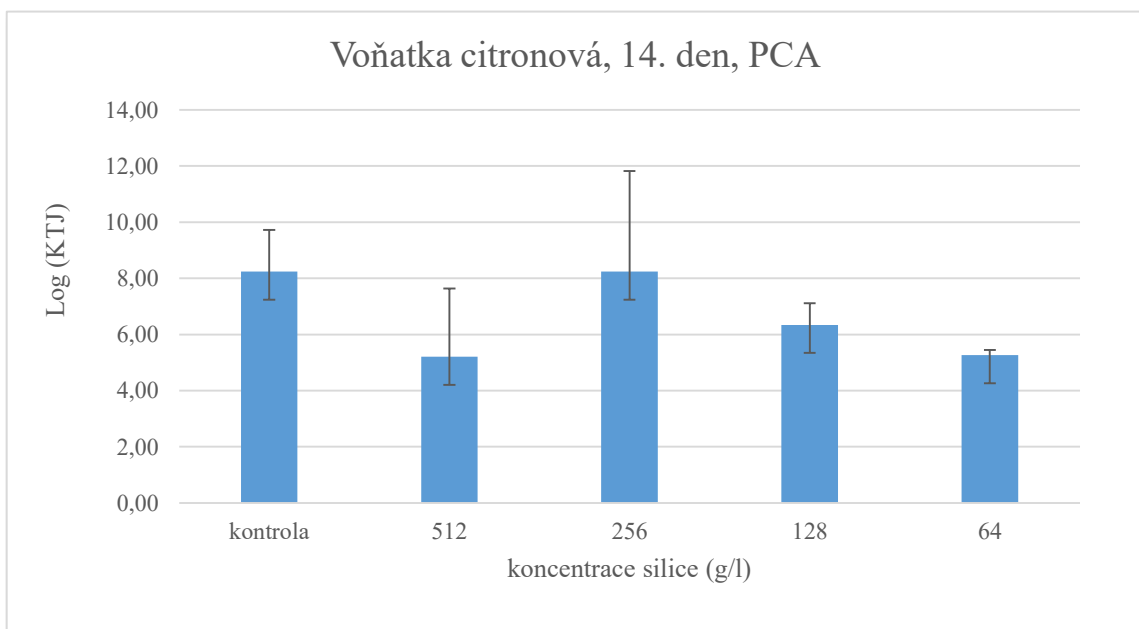
Graf č. 1

Z grafu č. 1 vyplývá, že silice významně inhibuje nárůst mikroorganismů, nejvíce v koncentraci 512 g/l.



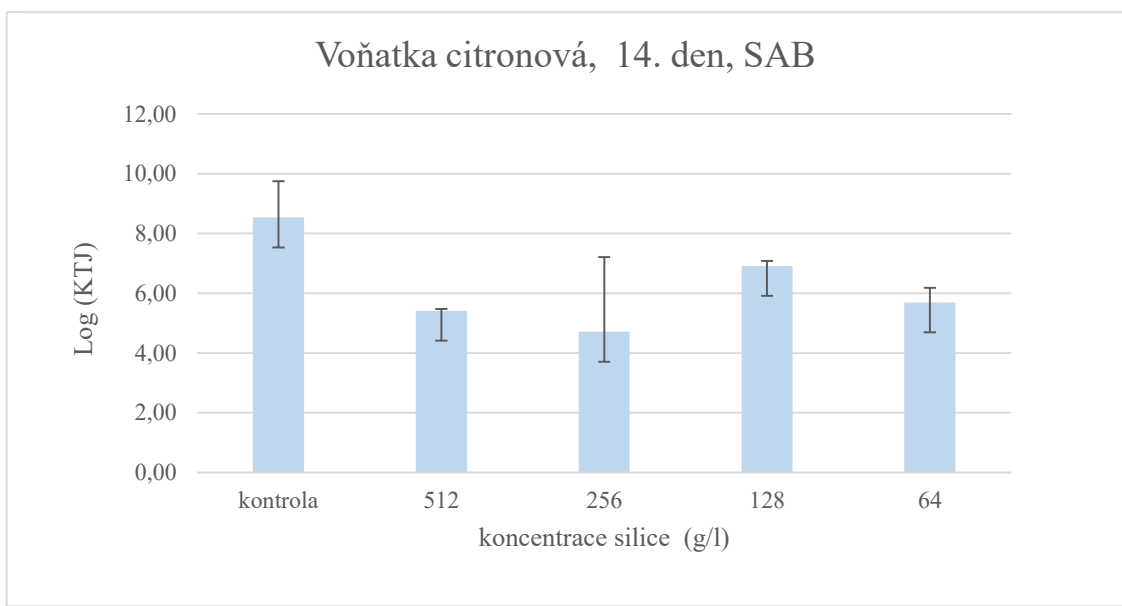
Graf č. 2

Z grafu č. 2 vyplývá, že silice významně inhibuje nárůst mikroorganismů, nejvíce v koncentraci 512 g/l.



Graf č. 3

Z grafu č. 3 vyplývá, že silice významně inhibuje nárůst mikroorganismů, nejvíce v koncentraci 512 g/l.

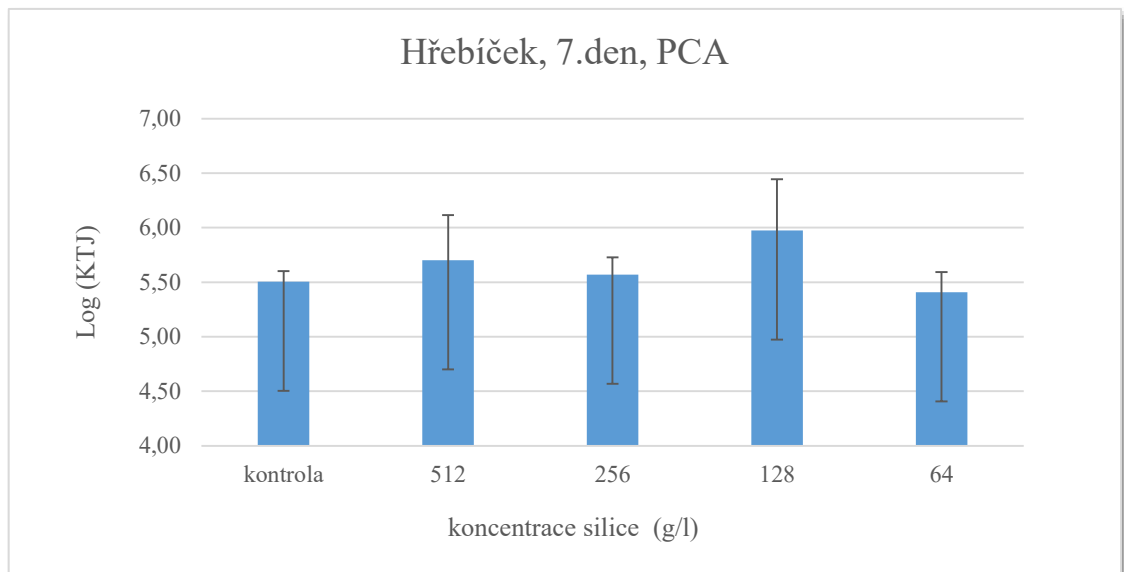


Graf č. 4

Z grafu č. 4 vyplývá, že silice voňatky nejvýrazněji inhibovala růst mikroorganismů v koncentraci 256 g/l.

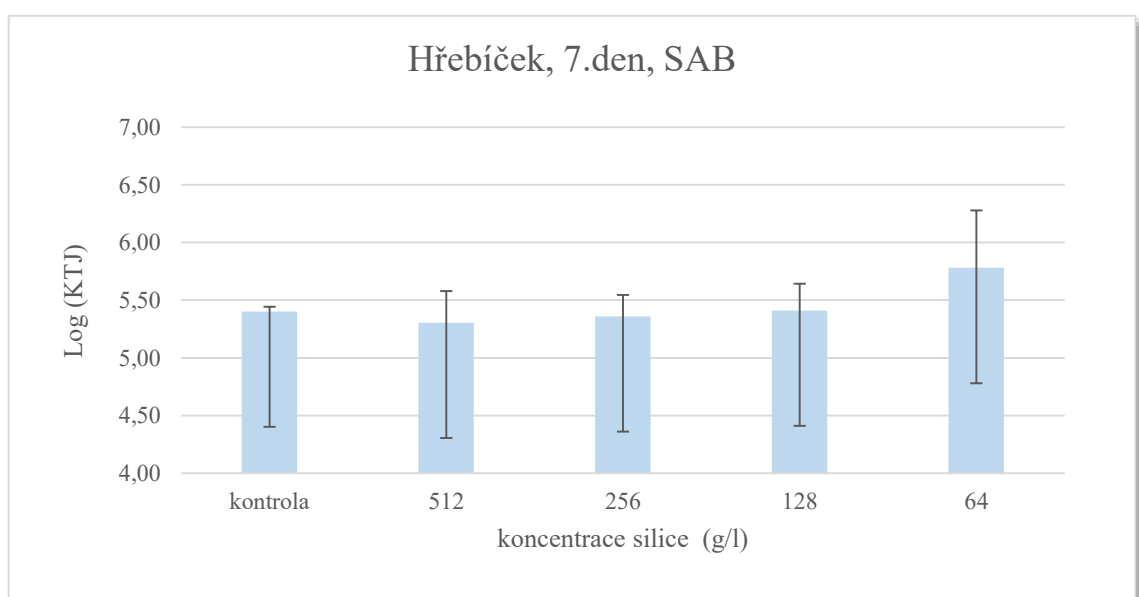
Mezi kontrolním vzorkem a vzorky ošetřenými silicí voňatky byl prokázán statisticky významný rozdíl na hladině $p = 0,0007$, ($n=50$) a byla prokázána závislost počtů KTJ na koncentraci silice u voňatky na hladině $p = 0,0297$ ($n=40$). U silice voňatky nebyl prokázán mezi PCA a SAB statisticky významný rozdíl.

5.2 Hřebíčková silice



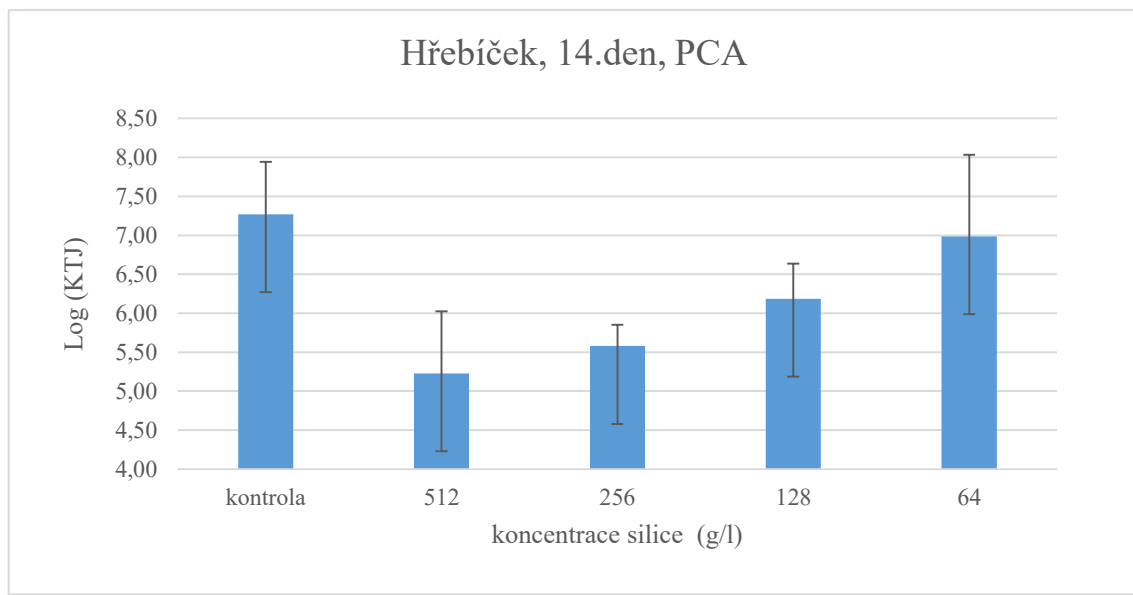
Graf č. 5

V mikrobiologickém rozboru po 7 dnech od založení nebyl na agaru PCA viditelný inhibiční účinek hřebíčkové silice. Hodnoty log KTJ z ošetřených vzorků se jevily srovnatelné s kontrolou.



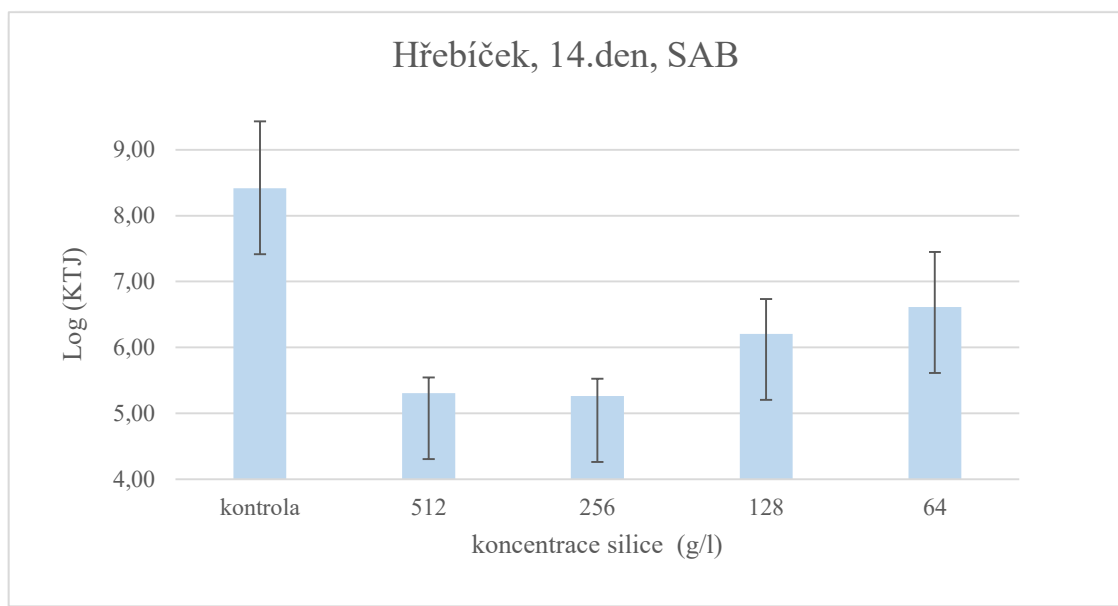
Graf č. 6

V mikrobiologickém rozboru po 7 dnech od založení nebyl na agaru SAB viditelný inhibiční účinek hřebíčkové silice. Hodnoty log KTJ z ošetřených vzorků se jevily srovnatelné s kontrolou.



Graf č. 7

Oproti výsledkům ze 7. dne jsou výsledky po 14 významně odlišné a je zde patrný významný vliv hřebíčkové silice na růst mikroorganismů v sirupu. Naměřené hodnoty log KTJ v ošetřených vzorcích byly výrazně nižší než v kontrolním vzorku.



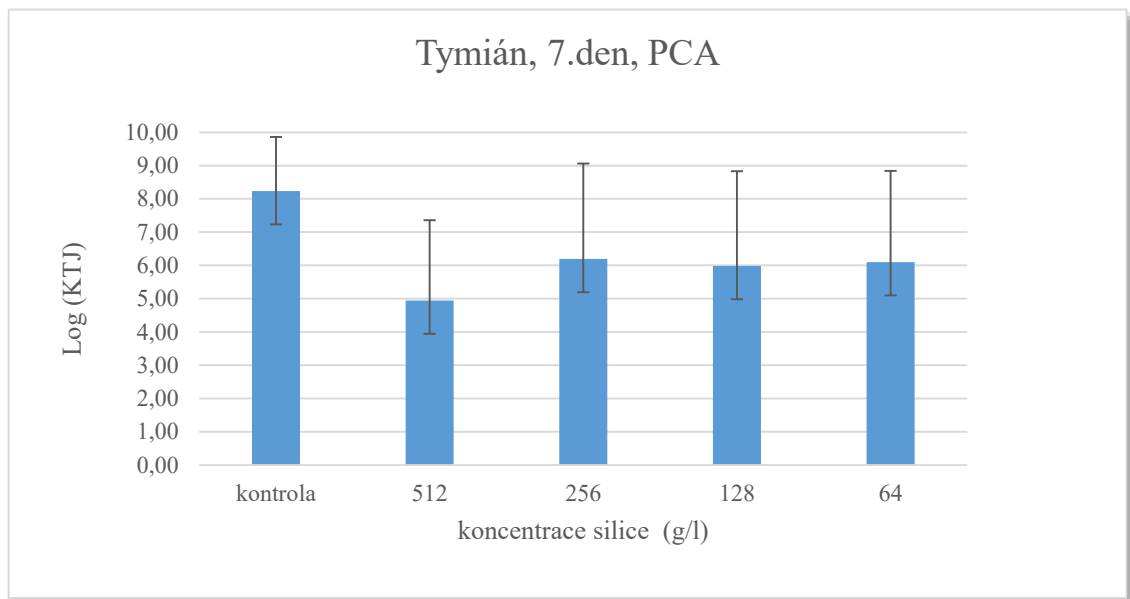
Graf č. 8

Oproti výsledkům ze 7. dne jsou výsledky po 14 významně odlišné a je zde patrný významný vliv hřebíčkové silice na růst mikroorganismů v sirupu. Naměřené hodnoty log KTJ v ošetřených vzorcích byly výrazně nižší než v kontrolním vzorku.

U silice hřebíčku nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi agary PCA a SAB.

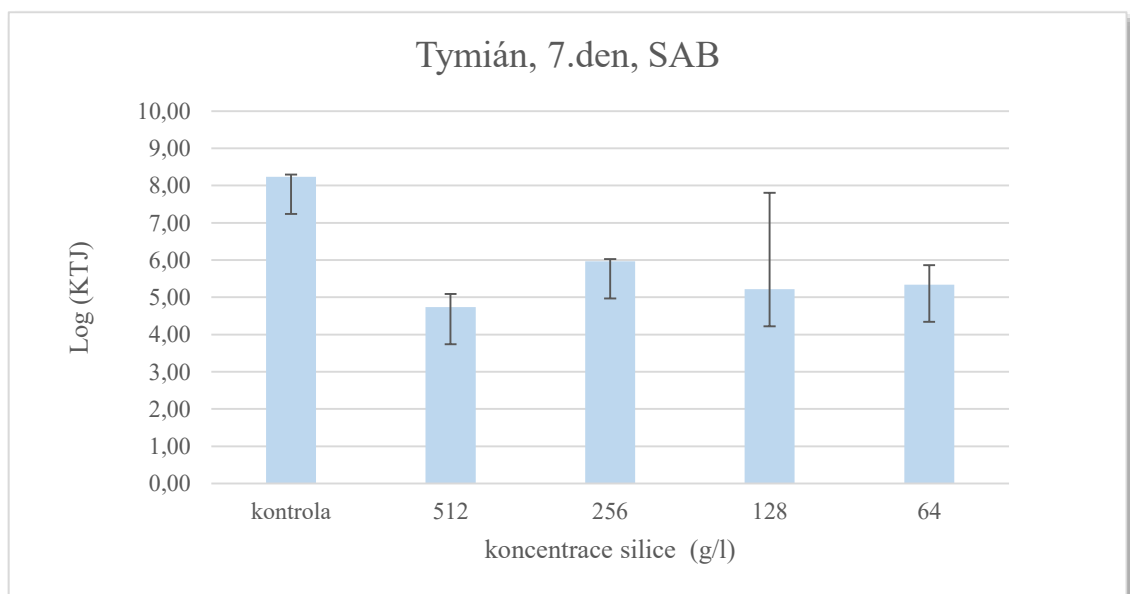
Mezi kontrolním vzorkem a vzorky ošetřenými silicí hřebíčku byl prokázán statisticky významný rozdíl na hladině $p = 0,0117$, ($n=60$) a byla prokázána závislost počtů KTJ na koncentraci silice u hřebíčku na hladině $p = 0,0050$ ($n=48$).

5.3 Tymiánová silice



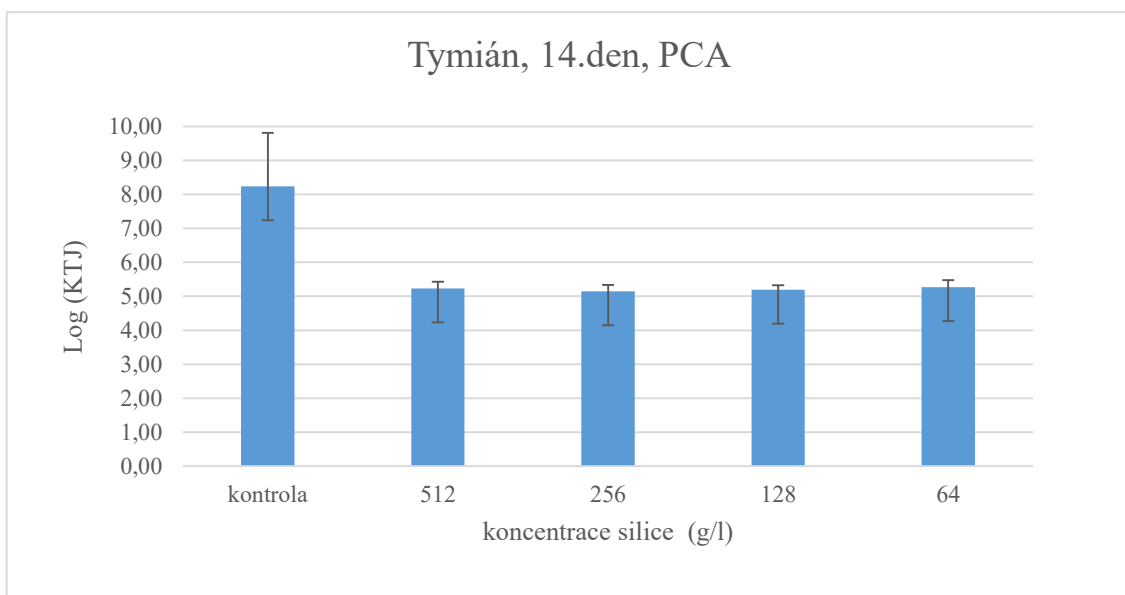
Graf č. 9

Z grafu č. 9 vyplývá, že silice významně inhibuje nárůst mikroorganismů, nejvíce v koncentraci 512 g/l.



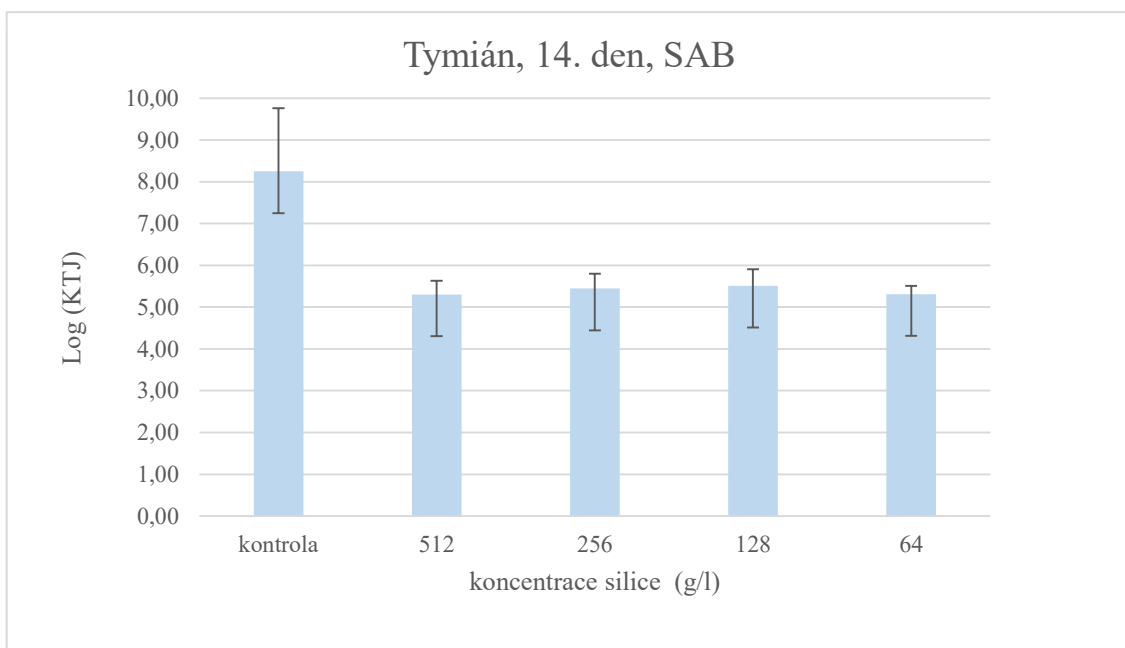
Graf č. 10

Z grafu č. 10 vyplývá, že silice významně inhibuje nárůst mikroorganismů, nejvíce v koncentraci 512 g/l.



Graf č. 11

Z grafu č. 11 vyplývá, že silice významně inhibuje nárůst mikroorganismů s podobnými výsledky ve všech koncentracích.



Graf č. 12

Z grafu č. 12 vyplývá, že silice významně inhibuje nárůst mikroorganismů s podobnými výsledky ve všech koncentracích.

U silice tymiánu nebyl prokázán mezi PCA a SAB statisticky významný rozdíl.

Mezi kontrolním vzorkem a vzorky ošetřenými silicí tymiánu byl prokázán statisticky významný rozdíl na hladině $p = 0,0087$, ($n=44$) a nebyla prokázána závislost počtů KTJ na koncentraci.

6 Diskuse

V úvodu práce bylo zmíněno, že cílem práce bylo potvrdit antimikrobiální účinky silic v bezinkovém sirupu v podmínkách podobným malovýrobnímu procesu. Je třeba si uvědomit, že bezpečnost potravin je vždy na prvním místě a tak je třeba antimikrobiální účinky daných látek vztahovat předně k mikroorganismům potenciálně způsobujících alimentární onemocnění. Teprve v druhé řadě je na místě zabývat se původem látek a šetrnosti zacházení s materiálem, jako je například šetrná pasterace, nebo přidavek dalších konzervantů.

Burt (2004) tvrdí, že in vitro studie prokázaly antibakteriální efekt silic na plísně, kvasinky a bakterie například proti *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella dysenteria*, *Bacillus cereus* a *Staphylococcus aureus* v koncentracích mezi 0,2-10 g/l. Množství siličných složek bylo identifikováno jako efektivní proti mikrobiálnímu růstu. Jsou jimi například thymol, karvakrol, eugenol, s minimální inhibiční schopností okolo 0,05-5 g/l in vitro.

O něco vyšších koncentrací je třeba dosahovat při konzervaci potravin in vivo. Studie na čerstvém mase (Pittman et al., 2011), rybách (Ilhak a Guran, 2014), mléce (Chen et al. 2015), zelenině (de Oliviera et al., 2015) a ovocných produktech, včetně džusů a cideru (Kiskó a Roller, 2005), (Knight a McKellar, 2007) prokázaly signifikantní antibakteriální efekt v koncentracích mezi 0,5-20 g/l a mezi 0,1-10 g/l v roztocích na omývání ovoce a zeleniny, z čehož vyplívá i vztah našich koncentrací a jejich vlivu na růst mikroorganismů a tím pádem relevance našich výsledků, která byla v rozmezí 0,512-0,064 g/l.

Podobné koncentrace potvrzuje i studie hodnotící in vitro antimikrobiální aktivitu eugenolu, limonenu a citrusových extraktů na bakteriích, kvasinkách a mikroflóře specifické pro džusy proti třem bakteriím *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Bacillus coagulans*, a tři kvasinky *Saccharomyces bayanus*, *Pichia membranifaciens*, a *Rhodotorula bacarum*, což jsou mikroorganismy reprezentující mikroflóru v džusech (Bevilacqua et. al., 2010).

Ve všech studiích výše zmíněných, šlo především o prevenci výskytu patogenních mikroorganismů, v některých o prodloužení skladovatelnosti produktů. V našem případě jsme se snažili o prodloužení skladovatelnosti skrze snížení celkového počtu všech

mikroorganismů najednou. V našich výsledcích se našel rozdíl řádově o 2-3 log KTJ, což koresponduje s výsledky jiných autorů.

Silice obsahují vysoký počet různých látek, což může způsobit jejich schopnost zasahovat více mikroorganismů najednou (Burt, 2004). Toto tvrzení přímo potvrzuje naši hypotézu, že silice mohou hubit větší počet druhů mikroorganismů najednou a je tedy možné zkoumat vliv antimikrobiální aktivity silic pro všechny plísně, kvasinky i bakterie najednou.

Vědecká práce z roku 2002 (Friedman et al., 2002) se zabývala vlivem silic na *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* a *Salmonella enterica*. Zkoumáno bylo 96 různých silic a 23 siličných složek, z čehož 27 silic prokázalo antimikrobiální účinky proti všem čtyřem bakteriálním druhům. Silice s největším vlivem byly mimojiné také právě tymián, hřebíček a voňatka citronová. Jako účinné látky byly identifikovány karvakrol, benzaldehyd, citral, thymol a eugenol.

Stejně tak potvrdil Moreira et al. (2005), že hřebíčková silice měla inhibiční vliv na růst *E. coli* O157:H7, jakožto známého patogenu. Zajímavostí je, že v této studii byly také pozorovány antimikrobiální účinky u jiných silic, konkrétně u eukalyptu (*Eucalyptus globules*), rozmarýnu (*Rosmarinus officinalis*), máty (*Mentha piperita*), růže mošusové (*Rosa moschata*), citronu (*Citrus limonum*), oregána (*Origanum vulgare*), borovice (*Pinus silvestrys*) a sladké bazalky (*Ocimum basilicum*). Hřebíček (*Syzygium aromaticum*) ze všech z nich prokázal nejlepší inhibiční vlastnost proti tomuto patogenu.

Vlivem silic na prodloužení skladovatelnosti se zabývala studie Friedmanan et al. (2004), která prokázala antimikrobiální aktivitu proti *Salmonella* Hadar a *E. coli* O157:H7 v jablečném moštu. Nejméně aktivními složkami silic byly mezi dalšími čtyřmi předně karvakrol, geraniol, eugenol, silice z hřebíčku a silice z voňatky citronové. To se shoduje s našimi výsledky v rámci snížení antimikrobiální aktivity na vybraném produktu. Velice zajímavým poznatkem z této studie je mimo jiné i to, že tyto látky prokazovaly vyšší antimikrobiální schopnost v návaznosti na delší dobu skladovacího času. To by mohlo potvrzovat náš rozdílný výsledek mezi jednotlivými týdny, například u hřebíčku, kde jsme zaznamenali výraznou změnu v inhibici mikroorganismů mezi jednotlivými týdny. Zároveň jsme na začátku našeho testování inokulovali orientačně i pár vzorků jablečného moštu a pozorovali jsme podobnosti chování, z čehož jsme usoudili, že je možné srovnávat výsledky našeho měření na sirupech s výsledky na moštech.

Eugenol a thymol byly také úspěšně testovány jako ochranný film na rajčatech, pro zabránění jejich posklizňovému rozkladu. Lu et al. (2014) vyvinuli omývací roztok, jehož aplikací dosáhli snížení log KTJ o 7,5 u druhu rodu *Salmonella enteritica* v porovnání s kontrolou. Toto ošetření také prokázalo snížení o 1,3 log KTJ ve všech aerobních bakteriích a také redukci rodů *Salmonella* o 5 log KTJ v použité vodě. Tyto informace jsou řádově odpovídající našemu měření a poukazují na antimikrobiální vliv silic i v kontextu širšího spektra mikroorganismů.

Dalšími patogenními mikroorganismy často nalezených v potravinách jsou například *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*. Autoři Sokovic et al (2010) testovali celkem 10 běžně užívaných a konzumovaných druhů koření: *Citrus aurantium*, *C. limon*, *Lavandula angustifolia*, *Matricaria chamomilla*, *Mentha piperita*, *M. spicata*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* a *Salvia officinalis*, které obsahovali tyto sledované siličné komponenty: kafr, karvakrol, 1,8-cineol, linalol, linalyl acetát, limonen, mentol, a-pinen, b-pinen, a tymol. Mezi nimi nejvíce vynikal karvakrol, který velice dobře působil na tyto patogenní bakterie: *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* O157:H7, *Micrococcus flavus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *S. epidermidis*, *S. typhimurium*, a *Staphylococcus aureus*. Siličná složka karvakrol izolovaná z oregana, ale jinak také nalezená v tymiánu prokázala nejlepší antimikrobiální aktivitu a je tedy považována za klíčovou. Lepší antimikrobiální účinky měly všechny sledované silice na Gram-pozitivní bakterie, než na Gram-negativní bakterie.

Autor Friedly et al. (2009) pozorovali signifikantní synergie mezi použitím silic v kombinaci s různými organickými kyselinami. Patřili mezi ně kyselina citronová, kyselina jablečná, askorbová a vinná. Kyseliny zvyšovaly schopnost některých silic působit antimikrobiálně. Konkrétně byl vliv prokazován proti *L. monocytogenes*. Autoři uvádějí, že je tímto způsobem možné snížit nutnou koncentraci silice až desetkrát. To by například v našem experimentu znamenalo významnou změnu a zároveň by se prokázala i větší ekonomická atraktivita vzhledem k cenám slabých organických kyselin.

Mnohé silice prokazují významné synergie, v případě že jsou vzájemně kombinovány. Například směs 62,5 mg/kg thymolu a 75 mg/kg karvakrolu, nebo 56,26 mg/kg thymolu a 125 mg/kg eugenolu kompletně zamezili růstu *L. innocua*, stejně tak, jako se podařilo u kombinace karvakrol, thymol, eugenol (75/31;25;56,25 mg/kg) Z toho vyplývá, že správná kombinace silic by mohla snížit množství použitého materiálu,

vzhledem k tomu, že v nižších koncentracích, ale za to v kombinaci s ostatními působí ještě účinněji. Obzvláště zajímavé jsou pak kombinace účinných silic, se špatným sensorickým profilem s těmi, které by tento negativní sensorický profil mohly vyrušit (García-García et al., 2011).

Návrhem na další zkoumání je tedy jednoznačně hlubší zkoumání silic a jejich vzájemných kombinací, nejen mezi sebou, ale také v kombinaci se slabými kyselinami, případně s šetrným záhřevem.

V našem případě jsme také používali nepřevařenou vodu, což by v případě použití vody sterilní, také mohlo značně ovlivnit výsledky výzkumu.

7 Závěr

Z výsledků vyplývá, že biologicky aktivní látky, v našem případě silice, mají významný inhibiční vliv na růst mikroorganismů, způsobujících kažení sirupu a jejich použitím je tedy možné prodloužit trvanlivost bylinných sirupů, konkrétně bezinkového sirupu. Hypotéza byla tímto potvrzena.

8 Použitá literatura

ADAMS, Martin M a M MOSS. *Food microbiology*. 3rd ed. Cambridge: RSC Publishing, c2008. ISBN 978-0-85404-284-5.

ASHURST, P. *Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices*. 2nd ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2005. ISBN 1405122862.

ASHURST, P. AND ROBERT HARGITT. *Soft drink and fruit juice problems solved*. Cambridge, England: Woodhead Pub, 2009. ISBN 9781845693268.

BANWART GEORGE J. *Basic Food Microbiology*. Second Edition. Boston, MA: Springer US, 1998. ISBN 9781468464559.

BARBOSA-CÁNOVAS, Gustavo V. *Nonthermal preservation of foods*. New York: Marcel Dekker, c1998. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 82. ISBN 0824799798.

BARRETT, Diane M, Laszlo P SOMOGYI a Hosahalli S RAMASWAMY. *Processing fruits: science and technology*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, c2005. ISBN 084931478X.

BEUCHAT, L.R. (1983). Indigenous Fermented foods, In : Biotechnology vol. 5, Food and Feed Production with Microorganisms; Reed G. (Ed). Verlag Chemie, Weinheim 477.

BEVILACQUA, Antonio, Maria Rosaria CORBO a , Milena SINIGAGLIA. In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of Eugenol, Limonene, and Citrus Extract against Bacteria and Yeasts, Representative of the Spoiling Microflora of Fruit Juices. *Journal of Food protection*. 2010, May(5), 812-1002.

BURDA, Alexandr. *O kávě, čaji a dalších nápojích*. Vyd. 1. Opava [i.e. Praha]: Carter eproplus, 2013. ISBN 978-80-87613-00-9.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2004, **94**(3), 223-253 [cit. 2016-04-07]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022. ISSN 01681605.

CHEN, Chin-Yi, Gary W NACE a Peter L IRWIN. A 6×6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2003, **55**(2), 475-479 [cit. 2016-04-06]. DOI: 10.1016/S0167-7012(03)00194-5. ISSN 01677012.

CHEN, Huaiqiong, Yue ZHANG a Qixin ZHONG. Physical and antimicrobial properties of spray-dried zein-casein nanocapsules with co-encapsulated eugenol and thymol. *Journal of Food Engineering* [online]. 2015, **144**, 93-102 [cit. 2016-04-07]. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2014.07.021. ISSN 02608774.

CLEVELY, A a Katherine RICHMOND. *Velká kniha bylinek*. Čes. vyd. 1. Praha: Svojtka & Co., 1998. ISBN 80-7237-132-0.

DE OLIVEIRA, Kataryne Árabe Rimá, Jossana Pereira DE SOUSA, José Alberto DA COSTA MEDEIROS, Regina Célia Bressan Queiroz DE FIGUEIREDO, Marciane MAGNANI, José Pinto DE SIQUEIRA a Evandro Leite DE SOUZA. Synergistic inhibition of bacteria associated with minimally processed vegetables in mixed culture by carvacrol and 1,8-cineole. *Food Control* [online]. 2015, **47**, 334-339 [cit. 2016-04-07]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.07.014. ISSN 09567135.

DOLEJŠÍ, Antonín, Vladimír KOTT a Lubomír ŠENK. *Méně známé ovoce*. Vyd. 1. Praha: Zemědělské nakladatelství Brázda, 1991. Zahrádka. ISBN 80-209-0188-4.

DONSE, F., Annunziata, M., Sessa, M., Ferrari, G., 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 44 (9), 1908–1914.

DZIEDZIC, S a M KEARSLEY. *Glucose syrups: science and technology*. New York, NY, USA: Elsevier Science Pub Co. [distributor], c1984. ISBN 0853342997.

HARRISON, R, Hester, R.E. *Food safety and food quality*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2001. ISBN 1847550894.

FARRER-HALLS, Gill. *Aromaterapie od A do Z: podrobný průvodce světem esenciálních olejů*. Vyd. 1. V Praze: Metafora, 2007. ISBN 978-80-7359-086-4.

FORSYTHE, S. *The microbiology of safe food*. Malden, MA: Blackwell Science, 2000.

FORSYTHE, J. Stephen. *The microbiology of safe food*. 2nd ed. Chichester, U.K: Wiley-Blackwell Pub, 2010. ISBN 9781405140058.

FRIEDLY, E.C., P.G. CRANDALL, S.C. RICKE, M. ROMAN, C. O'BRYAN a V.I. CHALOVA. In vitro Antilisterial Effects of Citrus Oil Fractions in Combination with Organic Acids. *Journal of Food Science* [online]. 2009, **74**(2), M67-M72 [cit. 2016-04-07]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01056.x. ISSN 00221147.

FRIEDMAN, M., Henika, P.R. & Mandrell, R.E. *Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against Campylobacter jejuni, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, and Salmonella enterica*. *J. Food Prot.* 65, 1545-1560

GARCÍA-GARCÍA, Rebeca, Aurelio LÓPEZ-MALO a Enrique PALOU. Bactericidal Action of Binary and Ternary Mixtures of Carvacrol, Thymol, and Eugenol against *Listeria innocua*. *Journal of Food Science* [online]. 2011, **76**(2), M95-M100 [cit. 2016-04-07]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.02005.x. ISSN 00221147.

GÖRNER, Fridrich a Lubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004. ISBN 80-967064-9-7.

GUEST EDITORS, Professor Alex von Holy and Dr. *Food safety thinking globally acting locally*. Bradford, England: Emerald Group Pub, 2006. ISBN 9781845448806.

HARDING, Jennie. *Tajemný svět bylin: užitečný rádce pro pěstování a používání bylinek*. Vyd. 1. Praha: Slovart, 2005. ISBN 80-7209-707-5.

HEIJDEN, Kees van der (ed.). *International food safety handbook: science, international regulation, and control*. New York: Dekker, c1999. Food science and technology. ISBN 0-8247-9354-4.

HESTER, R a Roy M HARRISON. *Food safety and food quality*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, c2001. ISBN 0854042709.

HOLY, Alex von a Denise LINDSAY. *Food safety: thinking globally acting locally*. Bradford, England: Emerald Group Publishing, c2006.

ILHAK, Osman Irfan a Husnu Sahan GURAN. Combined Antimicrobial Effect of Thymol and Sodium Lactate against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* in Fish Patty. *Journal of Food Safety*[online]. 2014, **34**(3), 211-217 [cit. 2016-04-07]. DOI: 10.1111/jfs.12115. ISSN 01496085

JAY, James M, Martin J LOESSNER a David Allen GOLDEN. *Modern food microbiology*. 7th ed. New York: Springer Science+Business Media, 2005. Food science text series. ISBN 0-387-23180-3

JAYKUS, Lee-Ann, Hua H WANG a Larry S SCHLESINGER. *Food-borne microbes: shaping the host ecosystem*. Washington, D.C.: ASM Press, c2009. Emerging issues in food safety.

JIRÁSEK, Václav a František STARÝ. *Atlas léčivých rostlin. 2*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1989.

JOLICOEUR, Claude. *The new cider maker's handbook: a comprehensive guide for craft producers*. White River Junction, Vermont: Chelsea Green Publishing, 2013. ISBN 9781603584739.

KARAMI-OSBOO, R., Khodaverdi, M., Ali-Akbari, A., 2010. Antibacterial effect of effective compounds of *Satureja hortensis* and *Thymus vulgaris* essential oils against *Erwinia amylovora*. *J. Agr. Sci. Tech.* 12, 35–45.

KINTLEROVÁ, A., ŠILHÁŘ, S., KAŘAROVÁ, s. Baza černá – významná surovina vo výrobe zdravých potravín. *Záhradníctvo*, 1993, roč. 18, 11, s. 410 – 412

KALE, Vinita V a Kishore P BHOSARI. *Applied microbiology*. Rev. ed. Mumbai: Himalaya Pub. House, 2007.

KETTENRING, M.M., Geeganage, M.V., 2010. Aroma-vital cuisine. In: Baser, K.H.C., Buchbauer, G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. CRC Press, Boca Raton, pp. 863–880.

- Kumar, A., Shukla, R., Singh, P., Prasad, C.S., Dube, N.K., 2008. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9, 575–580.
- KISKÓ, Gabriella a Sibel ROLLER. *BMC Microbiology* [online]. 5(1), 36- [cit. 2016-04-07]. DOI: 10.1186/1471-2180-5-36. ISSN 14712180.
- KNIGHT, K. P., & McKellar, R. C. (2007a). Influence of cinnamon and clove essential oils on the D- and z-values of Escherichia coli O157:H7 in apple cider. *Journal of Food Protection*, 70(9), 2089–94.
- KYZLINK, Vladimír. *Principles of food preservation*. Překlad Jiří Špalek. Prague: SNTL, 1990. Developments in Food Science. ISBN 0-444-98844-0.
- LINSKENS, JACKSON a John F. *Essential Oils and Waxes: (Molecular Methods of Plant Analysis)*. 1. Berlin: Springer, 1991. ISBN 9783540519157.
- LOPEZ-REYES, J.G., Spadaro, D., Prella, A., Garibaldi, A., Gullino, M.L., 2013. Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rots caused by fungi on different stone fruits in vivo. *J. Food Prot.* 76, 631–639.
- LU, Yingjian, Rolf JOERGER a Changqing WU. Similar Reduction of Salmonella enterica Typhimurium on Grape Tomatoes and Its Cross-Contamination in Wash Water by Washing with Natural Antimicrobials as Compared with Chlorine Treatment. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 2014, 7(3), 661-670 [cit. 2016-04-07]. DOI: 10.1007/s11947-013-1105-9. ISSN 1935-5130.
- LUBBERT, Dijkhuizen, Veurink JANINE H. a Euverink GERT-JAN W. Growth of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in microtiter plates: effects of NaCl, pH and temperature on growth and fusel alcohol production from branched-chain amino acids. *FEMS Yeast Research*. 2003
- MACINNIS, Peter. *Bittersweet: the story of sugar*. Crows Nest NSW: Allen & Unwin, 2002. ISBN 1865086576.

MARTORELL, P., A. QUEROL a M. T. FERNANDEZ-ESPINAR. Rapid Identification and Enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* Cells in Wine by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, **71**(11), 6823-6830. DOI: 10.1128/AEM.71.11.6823-6830.2005. ISSN 0099-2240.

MISHRA, A.K., Dubey, N.K., 1994. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1101–1105.

MOREIRA, M.R., A.G PONCE, C.E. DEL VALLE a S.I. ROURA. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2005, **38**(5), 565-570 [cit. 2016-04-07]. DOI: 10.1016/j.lwt.2004.07.012. ISSN 00236438.

MORTIMORE S., Carol Wallace a FOREWORD BY WILLIAM H. SPERBER. *HACCP a practical approach*. 3rd ed. New York: Springer, 2013. ISBN 9781461450283.

NGUEFACK, J., Dongmo, J.B., Dakole, C.D., Leth, V., Vismer, H.F., Torp, J., et al., 2009. Food preservative potential of essential oils and fractions from

Cymbopogon citratus, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 131, 151–156.

NGUEFACK, J., Leth, V., Zollo, P.H.A., Mathur, S.B., 2004. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 329–334.

NIIR BOARD OF CONSULTANTS & ENGINEERS. *The Complete Technology Book on Processing, Dehydration, Canning, Preservation of Fruits & Vegetables*. 3. Indie: NIIR PROJECT CONSULTANCY SERVICES, 2016. ISBN 9789381039694.

OKAFOR, Nduka. *Modern industrial microbiology and biotechnology*. Enfield, (NH): Science Publishers, c2007.

PITTMAN, C.I., S. Pendleton, B. Bisha, C. OBryan, L. Goodridge, P.G. Crandall, and S.C. Ricke. 2011. Validation of the use of citrus essential oils as a post-harvest

intervention against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on beef primal cuts. *J. Food Sci.* 76: M433-M438.

RANKINE, B.C. (1968), The importance of yeasts in determining the composition and quality of wines, *Vitis* 7, 22-49.

Rabiei, V., Shirzadeh, E., Rabbi Angourani, H., Sharafi, Y., 2011. Effect of thyme and lavender essential oils on the qualitative and quantitative traits and storage life of apple 'Jonagold' cultivar. *J. Med. Plant Res.* 5, 5522–5527.

RAY, Bibek. *Fundamental food microbiology*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, c2004. ISBN 0849316103.

RAY, Bibek a Arun K BHUNIA. *Fundamental food microbiology*. Fifth edition. Boca Raton: CRS Press, Taylor & Francis Group, an informa business, 2014. ISBN 9781466564435.

Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J., Martin-Belloso, O., 2006. Antimicrobial activity of essential oils on *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, and *Listeria innocua* in fruit juices. *J. Food Prot.* 69, 1579–1586.

RYSTONOVÁ, Ida. *Průvodce lidovými názvy rostlin i jiných léčivých přírodnin a jejich produktů*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2007. ISBN 978-80-200-1332-3.

SHABNUM, S., Wagay, M.G., 2011. Essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. and their uses. *J. Res. Dev.* 11, 83–94.

SIMHA, Uma Shankar a Kiran KAPOOR. *Introductory microbiology*. Jaipur, India: Oxford Book Co., 2010.

SMALL, Ernest. *Velká kniha koření, bylin a aromatických rostlin*. Vyd. 1. Praha: Volvox Globator, 2006. Verbena. ISBN 80-7207-462-8.

SMITH-PALMER, A., Stewart, J., Fyfe, L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 118–122.

SOKOVIĆ, Marina, Jasmina GLAMOČLIJA, Petar D. MARIN, Dejan BRKIĆ a Leo J. L. D. van GRIENSVEN. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model. *Molecules* [online]. 2010, **15**(11), 7532-7546 [cit. 2016-04-07]. DOI: 10.3390/molecules15117532. ISSN 1420-3049

SOLIMAN, K.M., Badeae, R.I., 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem. Toxicol.* 40, 1669–1675.

SPERBER, William H a Michael P DOYLE. *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*. New York: Springer, c2009. Food microbiology and food safety series. ISBN 1441908250.

STEELE, R. *Understanding and measuring the shelf-life of food*. Cambridge: Woodhead Pub., 2004. ISBN 185573902X.

TEWARI, Gaurav a Vijay K JUNEJA. *Advances in thermal and non-thermal food preservation*. 1st ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2007.

THOMPSON, J., Chalcha, J., Michet, A., Linhart, Y., Ehlers, B., 2003. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *J. Chem. Ecol.* 29, 859–880.

TUCKER, Gary. *Food biodeterioration and preservation*. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2008.

Tzortzakis, N.G., Economakis, C.D., 2007. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 8 (1), 111–116.

Turek, C., Stintzing, F.C., 2013. Stability of essential oils: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12, 40–53.

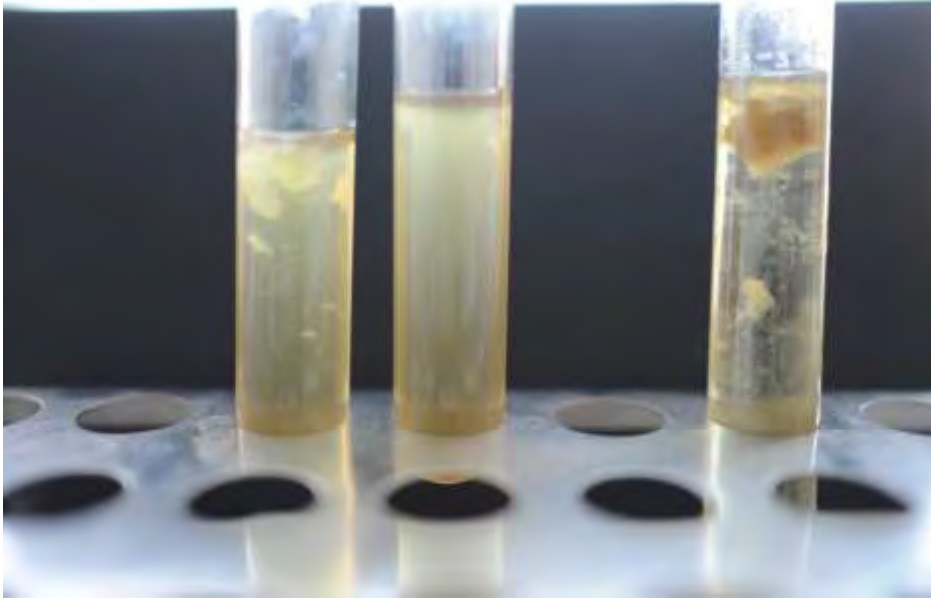
VELÍŠEK, Jan a Andy MEADEN. *The chemistry of food*. Chichester, England: Wiley, 2014. ISBN 978-1-118-38383-4.

YUDKIN, John, Jack EDELMAN a Leslie HOUGH. *Sugar: chemical, biological and nutritional aspects of sucrose*. London: Butterworths, 1971. ISBN 0408701722.

Česká republika 2015, Vyhláška č. 117/2011 Sb., o způsobu označování potravin a tabákových výrobků, Sbírka zákonů České republiky. 2011. částka 39. s. 2578-2582.

9 Přílohy

Příloha č. 1



Vpravo kontrolní vzorek, uprostřed koncentrace voňatkové silice 512 g/l, vlevo 256 g/l.



Z leva doprava jsou řazená ředění, na obrázku je ukázka drop plate techniky, konkrétně u tymiánové koncentrace 128 g/l.