ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra rostlinné výroby

Využití antimikrobiální aktivity silic při úchově potravin

.....

doktorská disertační práce

Autor: **Ing. Adéla Fraňková**

Školitel: **doc. Ing. Pavel Klouček, Ph.D.**

Praha 2 0 1 4

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou disertační práci „Využití antimikrobiální aktivity silic při úchově potravin“ jsem vypracovala samostatně pod vedením školitele 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 disertační práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze 20. 8. 2014 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli doc. Ing. Pavlu Kloučkovi, Ph.D. za vedení a podporu během studia. Velký dík dále patří členům katedry KRV a celému týmu „LAKR“, který je tvořen studenty doktorského, magisterského a bakalářského studia. Pouze díky jejich spolupráci mohla tato práce vzniknout. Nelze opomenout ani Evu Kuželkovou (korektorku textu). V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu během studia.

Obsah

ÚVOD **1**

HYPOTÉZA **2**

CÍL PRÁCE **2**

1. SILICE **3**

1.1 Chemická podstata silic a faktory ovlivňující jejich složení **3**

1.2 Biologická aktivita silic **4**

1.2.1 Antimikrobiální aktivita silic – mechanismus účinku 5

1.2.2 In vitro antimikrobiální aktivita silic 7

1.2.3 Testy antimikrobiální aktivity silic v potravinách 8

2. CHARAKTERISTIKA SILIČNATÝCH ROSTLIN VYBRANÝCH PRO EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST PRÁCE **13**

2.1 Hřebíčkovec kořenný (*Eugenia caryophyllata*) **13**

2.2 Skořicovník cejlonský (*Cinnamomum verum*) **14**

2.3 Zavinutka prostřední (*Monarda media* Willd) **14**

2.4 Bazalka (Ocimum basilicum) **14**

2.4.1 Pěstování 15

2.5 Dobromysl (*Origanum sp*.) **16**

2.5.1 Pěstování 16

2.6 Tymián obecný (*Thymus vulgaris*) **16**

2.6.1 Pěstování 17

2.7 Saturejka zahradní (*Satureja hortensis*) **18**

2.7.1 Pěstování 18

3. ČERSTVÉ A MINIMÁLNĚ ZPRACOVANÉ POTRAVINY (FRESH-CUT/READY-TO-EAT PRODUKTY **20**

3.1 Mikrobiologie minimálně zpracovaného ovoce a zeleniny 21
3.1.1 Přirozená mikroflóra fresh-cut produktů 22
3.1.2 Patogenní mikroorganismy vyskytující se na fresh-cut ovoci a zelenině 24
3.1.2.1 *Salmonella spp*. na minimálně zpracovaných potravinách 25
3.1.2.2 *Escherichia coli* na minimálně zpracovaných potravinách 26
3.1.2.3 *Listeria monocytogenes* na minimálně zpracovaných potravinách 26

3.2 Produkce fresh-cut produktů a klíčků – všeobecné zásady a metody pro zajištění shelf-life a zdravotní nezávadnosti 27
3.2.1 Opatření při příjmu suroviny a během jejího zpracování 29
3.2.2 Opatření po zpracování a při skladování fresh-cut produktů 31

4. METODIKA 33

4.1 Pěstební pokusy s rostlinami z čeledi *Lamiaceae* 33
4.1.1 Charakteristika pěstební lokality 33
4.1.2 Pěstební pokusy v prvním a druhém roce 33
4.1.3 Pěstební pokusy v roce 2013 35

4.2 Sušení rostlin 35

4.3 Kvantitativní a kvalitativní hodnocení silic 36

4.4 Testy antimikrobiální aktivity silic 37
4.4.1 Testování antimikrobiální aktivity silic v plynné fázi 37
4.4.1.1 Testované silice 37
4.4.1.2 Testované mikroorganismy 38
4.4.1.3 *In vitro* testy antimikrobiální aktivity silic v kombinaci s atmosférickým a nízkým tlakem 38
4.4.1.4 Testování plynné fáze silic na minimálně zpracovaných potravinách 39
4.4.1.4.1 Testování plynné fáze silic proti *S. enteritidis* na naklíčených semenech mungo (*Vigna radiata*) 39
4.4.1.4.1.1 Desková kultivační metoda 40
4.4.1.4.2 Testování plynné fáze silice saturejky a zavinutky proti *E. coli* na listech špenátu (*Spinacia*) 41
4.4.1.4.3 Testování plynné fáze silice oregana proti *E. coli* na listech polníčku (*Valerianella locusta*) 42

4.5 Senzorické hodnocení minimálně zpracovaných potravin 42
4.5.1. Senzorické analýza klíčků mungo 42
4.5.2 Senzorické hodnocení polníčku a špenátových listů ošetřených silicí 43

4.6 Statistické vyhodnocení dat 43

5. VÝSLEDKY A DISKUSE 44

5.1 Výsledky polních pokusů z prvního roku pěstování rostlin čeledi *Lamiaceae* **44**
5.1.1 Pěstební pokusy v roce 2011 44
5.1.1.1 Složení silic pěstovaných saturejek zahradních 45
5.1.1.2 Složení silic pěstovaných oregan a majoránky 47
5.1.1.3 Složení silic pěstovaných tymiánů 47
5.1.1.4 Složení silic pěstovaných bazalek 47
5.1.2 Pěstební pokusy v roce 2012 48
5.1.3 Pěstební pokusy v roce 2013 49

5.2 Diskuse pěstební pokusy **52**

5.3 Výsledky a diskuse *in vitro* testů antimikrobiální aktivity silic v kombinaci s atmosférickým a nízkým tlakem **55**

5.4 Výsledky a diskuse testování plynné fáze silic proti *S. enetritidis* na naklíčených semenech mungo (*Vigna radiata*) **57**
5.4.1 Ošetření klíčků mungo silicí oregana 57
5.4.2 Senzorický profil klíčků 58
5.4.3 Diskuse antimikrobiální aktivita silice oregana na ošetřovaných klíčcích, senzorické zhodnocení výsledných produktů 59

5.5 Výsledky a diskuse testování plynné fáze silice oregana, saturejky a zavinutky proti *E. coli* na listech polníčku (*Valerianella locusta*) a špenátu (*Spinacia*) **62**
5.5.1 Ošetření polníčku silicí oregana 62
5.5.2 Výsledky ošetření špenátu silicí saturejky a zavinutky 62
5.5.3 Výsledky a diskuse senzorického hodnocení polníčku a špenátu 65
5.5.4 Diskuse antimikrobiální aktivita silic na ošetřovaných salátech, senzorické zhodnocení výsledných produktů 68

6. ZÁVĚR A DOPORUČENÍ **71**

7. SEZNAM ZKRATEK **73**

8. POUŽITÁ LITERATURA **75**

9. SEZNAM PŘÍLOH **86**

10. SEZNAM TABULEK, GRAFŮ A OBRÁZKŮ **87**

Úvod

Dlouhodobý výzkum biologicky aktivních přírodních látek odhalil jejich mnohé dříve neznámé účinky a také částečně objasnil mechanismy jejich účinku na různé organismy. Díky těmto poznatkům a současnému trendu tzv. „zeleného spotřebitelství“ začaly být přírodní látky chápány jako možné alternativy k dnes široce využívaným syntetickým látkám. Probíhající výzkumy jsou zaměřeny především na jejich možné použití v potravinářském, zemědělském a farmaceutickém průmyslu.

Mezi biologicky aktivní přírodní látky se řadí i silice, které mají díky svým antimikrobiálním účinkům potenciál stát se např. alternativními konzervanty potravin. Tato práce zkoumá antimikrobiální aktivitu silic v plynné fázi proti nežádoucím a patogenním mikroorganismům, které se vyskytují na minimálně zpracovaném (fresh-cut) ovoci a zelenině.

Fresh-cut produkty nebyly vybrány náhodou, trh s nimi se díky propagaci zdravého životního stylu rychle rozvíjí. Avšak v souvislosti se zvýšenou spotřebou těchto produktů stoupá i počet epidemií průjmových onemocnění, jejichž příčinou jsou právě patogenní mikroorganismy přítomné na fresh-cut produktech. Riziko nákazy nelze vzhledem k výrobním postupům fresh--cut produktů podceňovat. V současnosti totiž neexistují dostatečně účinná opatření, která by dokázala z fresh-cut produktů nežádoucí mikroorganismy zcela odstranit.

Je proto třeba hledat nová opatření, která přispějí k větší bezpečnosti těchto produktů.

Hypotéza

- Silice v plynné fázi lze úspěšně využít k potlačení výskytu patogenních a dalších nežádoucích mikroorganismů v minimálně zpracovaném ovoci a zelenině.
- Silice působí pozitivně nebo neutrálně na organoleptické vlastnosti testovaných potravin.
- Aplikace silic v plynné fázi na produkty je ekonomicky výhodná a snadno použitelná, lze ji tedy využít v odvětví potravinářského průmyslu zaměřujícím se na výrobu minimálně zpracovaných potravin, především pak ovoce a zeleniny.

Cíl práce

Hlavní cíl

Optimalizace metody aplikace vybraných silic v plynné fázi na minimálně zpracované ovoce a zeleninu a posouzení jejího možného využití v běžné potravinářské praxi.

Dílčí cíle

1. Výběr nejvhodnějších odrůd bazalky, dobromysli, tymiánu a saturejky z hlediska kvantitativních (výnos) a kvalitativních (antimikrobiální aktivita) vlastností silic. Izolace silic s vypěstovaných rostlin.
2. Určení vhodné metody aplikace plynné fáze silic na vybrané minimálně zpracované potraviny.
3. Určení minimální inhibiční koncentrace plynné fáze vybraných silic (MIC), která jednak zajistí inaktivaci patogenních mikroorganismů a dále prodlouží uchovatelnost vybraných potravin.
4. Určení vhodné kombinace „silice-potravina“ s ohledem na výsledné organoleptické vlastnosti produktů.

1. Silice

Silice neboli esenciální oleje jsou směsi vonných, těkavých látek přírodního původu, které lze získat z téměř všech částí různých druhů rostlin za pomoci destilace. Siličnaté rostliny byly člověkem využívány odnepaměti např. jako koření, konzervanty, složky vonných mastí apod. Více než 2000 let př. n. l. se Egypťané naučili silice izolovat pomocí destilace, což napomohlo k diverzifikaci jejich použití a také k rozšíření obchodu s nimi. Od 13. století se proto v Evropě začínají více využívat v lékařství a s objevem mikroorganismů je objasňována i jejich léčivá podstata. Avšak na začátku 19. století význam silic jako léčiv a konzervačních látek, vzhledem k vývoji účinnějších a „snadno dávkovatelných" syntetických látek, upadá. Od 20. století tak nacházejí hlavní uplatnění jako ochucovadla a aromata v potravinářském a také v kosmetickém průmyslu (Edris, 2007). Znalosti léčivých vlastností jsou pak využívány převážně v alternativní medicíně. Dosud bylo popsáno cca 3000 silic, z toho je 300 komerčně významných (Burt, 2004).

V posledních desetiletích se ukazuje, že masivní využívání syntetických přípravků jak v medicíně, tak v potravinářství, snížilo účinnost těchto látek proti nežádoucím mikroorganismům a stále častěji se objevují i organismy k daným prostředkům rezistentní. Četné studie navíc poukazují na potenciální zdravotní rizika spojená s používáním těchto prostředků (Parke a Lewis, 1992). Tato fakta a také současný trend západní společnosti – odmítání všeho syntetického a návrat k přírodě – vede k renesanci ve výzkumu využití antimikrobiálních, virucidních, antiparazitických a dalších vlastností silic, ale i jiných biologicky aktivních přírodních látek. Jedním z odvětví výzkumu je potravinářství, kde je zkoumána možnost uplatnění silic jako alternativních konzervantů různých druhů potravin.

1.1 Chemická podstata silic a faktory ovlivňující jejich složení

Silice jsou sekundární metabolity rostlin. V čistém stavu se vyskytují v podobě olejovitých kapalin různých barev. Jsou to těkavé, hydrofobní směsi tvořené velkým počtem látek (např. 20–60), přičemž zpravidla tři látky tvoří majoritní část silice (až 85 %) a určují její biologické vlastnosti (Tajkarimi et al., 2010). Látky obsažené ve směsích jsou různé chemické povahy a rostliny je syntetizují několika různými způsoby. Jednotlivé složky lze podle jejich biosyntetických drah rozdělit do tří skupin.

Hlavní, početnější skupinu tvoří terpeny a terpenoidní látky, např. cymen a mentol. Základním stavebním prvkem terpenů je molekula izoprenu (2-methyl-1,3-butadien). Podle počtu izoprenových jednotek účastnících se na jejich stavbě se terpeny dále dělí

na hemiterpeny, monoterpeny, seskviterpeny, tetraterpeny atd., přičemž mohou molekuly izoprenu tvořit cyklický nebo alifatický řetězec.

Složky silic patří především do skupiny monoterpenů (C10) a seskviterpenů (C15). Terpenické látky obsažené v silicích lze dále rozlišovat podle navázaných funkčních skupin (např. alkoholy – borneol, mentol, aldehydy – geranial, ketony – karvon, fenoly – tymol, karvakrol atd.) (Bakkali et al., 2008).

Druhou méně početnou skupinou jsou látky s aromatickým jádrem, za jejich základní stavební prvek je považován fenylpropan. Řadí se sem například cinnamaldehyd, eugenol, anethol a další.

Třetí nejméně početnou skupinou jsou alifatické sloučeniny obsahující síru nebo dusík např. isothiokyanát, diallyldisulfid (Bakkali et al., 2008).

Složení silic je závislé na mnoha vnitřních a vnějších faktorech. Kompozice silic je ovlivněna chemotypem rostliny, ontogenetickou fází rostliny, kdy např. bylo pozorováno, že během růstu *Cymbopogon martini* se zvyšuje obsah eugenolu v silici z 65 na 81 % (Sangwan et al., 2001). Složení silic se může lišit i s ohledem na orgán rostliny, ve kterém je silice metabolizována. Např. silice získaná z kůry skořicovníků obsahuje jako hlavní složku cinnamaldehyd, zatímco silice z listů té samé rostliny má za hlavní složku eugenol (Flach, 1999).

Obsah silic v rostlině je ovlivněn ontogenetickým stádiem rostliny. Obecně lze konstatovat, že nejvyšší množství silice je v rostlinách obsaženo před a na začátku kvetení (Hay a Waterman, 1993). Mezi další faktory ovlivňující množství silice v rostlině se řadí vnější podmínky – lokalita, množství srážek, doba slunečního svitu, hnojení (Hay a Waterman, 1993; Sangwan et al., 2001).

Silice rostlinám primárně slouží jako komunikační prostředek s okolím. Zprostředkovávají komunikaci mezi samotnými rostlinami, dále slouží jako atraktant pro opylovače a v neposlední řadě jako ochrana před nežádoucími organismy, kdy silice nejen že jsou schopny nežádoucí organismus odpudit, ale i zcela zničit. A právě jejich biologický účinek na nejrůznější organismy je předmětem intenzivního zkoumání.

1.2 Biologická aktivita silic

Četné studie potvrzují a shrnují antimikrobiální, virucidní, antiparazitickou a insekticidní aktivitu silic známou z tradičního využití (Burt, 2004; Bakkali et al., 2008; Tajkarimi et al., 2010; Lang a Buchbauer, 2012). Intenzivní výzkum dále odhalil jejich další využitelné

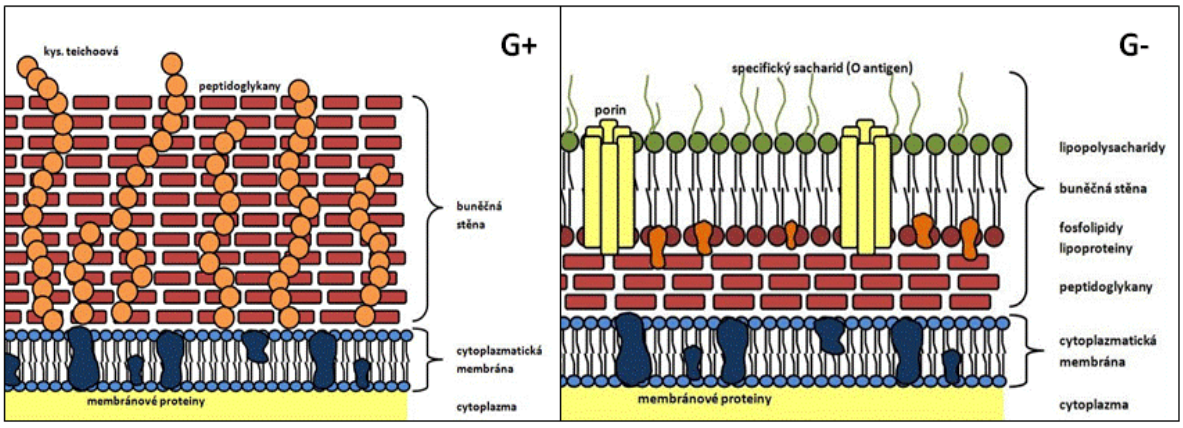
vlastnosti jako antioxidační, protinádorovou a nociceptivní aktivitu (Edris, 2007; Adorjan a Buchbauer, 2010). Pravděpodobně nejčastěji je však dokumentována antimikrobiální aktivita, které se bude věnovat následující podkapitola.

1.2.1 Antimikrobiální aktivita silic – mechanismus účinku

Vzhledem ke značné různorodosti chemické povahy jednotlivých látek, ze kterých jsou silice složeny, nelze předpokládat, že by všechny látky působily stejným způsobem, ani že by každá látka působila pouze na jedinou specifickou část buňky (Carson et al., 1995; Burt, 2004; Bakkali et al., 2008; Tiwari et al., 2009). O popsání mechanismu účinku jednotlivých silic (popř. jejich hlavních komponentů) proti různým mikroorganismům usiluje řada studií. Dosavadní poznatky rozsáhle shrnuje např. Hyldgaard (2012) a Nazzaro (2013).

V převážné většině případů bylo prokázáno, že gram negativní mikroorganismy (G-) jsou v porovnání s gram pozitivními (G+) vůči účinku silic odolnější. Tato odlišnost je dána rozdílným charakterem buněčné stěny G+ a G- bakterií (obr. 1). Buněčná stěna G- mikroorganismů je tvořena kromě peptidoglykanů i vrstvou lipopolysacharidů. Předpokládá se, že tato vrstva dokáže do jisté míry zachytit hydrofobní složky silic, a omezit tak jejich průnik do buňky samotné (Vaara, 1992; Nikaido, 2003).

Obrázek 1: Struktura buněčné stěny G+ a G- bakterií



Převzato z http://www.wikiskripta.eu

Nejčastěji je zkoumán mechanismus účinku silic obsahující látky jako karvakrol, tymol, cinnamaldehyd a eugenol, u kterých byla prokázána největší antimikrobiální účinnost.

Bylo zjištěno, že pro antimikrobiální aktivitu karvakrolu a tymolu je důležitá hydroxylová funkční skupina a delokalizované elektrony aromatického jádra (Ultee et al., 2002).

Tyto dvě látky reagují s membránovými proteiny, a způsobují tak její funkční a strukturální změny, což má za následek zvýšení propustnosti membrány – dokumentované např. ztrátou membránového potenciálu, únikem K iontů a ATP. Karvakrol má také vliv na složení mastných kyselin v cytoplazmatické membráně buněk.

U G- bakterií reagují tyto látky s fosfolipidovou částí buněčné stěny (vnější membrána), v nízkých koncentracích dochází ke zvýšení fluidity membrány a k následným změnám v její struktuře, které mají způsobené změny vyrovnat. Ve vyšších koncentracích dochází k destrukci membrány.

Karvakrol má vliv i na syntézu flagelinu a snížením membránového potenciálu také ovlivňuje motilitu buněk s bičíky (Burt, 2004). Za zmínku stojí schopnost potlačení tvorby toxinů u některých mikroorganismů (Lambert et al., 2001; Burt, 2004).

V případě tymolu byl dále prokázán vliv na citrátový cyklus a enzymy přímo nebo nepřímo zapojené do syntézy ATP (Di Pasqua et al., 2010).

U látek ze skupiny fenylpropanů – eugenolu a cinnamaldehydu byl také dokumentován mechanimus účinku. Eugenol zvyšuje propustnost cytoplazmatické membrány, avšak nemění její strukturu (Gill a Holley, 2006). V cytoplazmě buňky se eugenol díky hydroxylové skupině váže a mění vlastnosti proteinů, což bylo prokázáno např. inhibicí funkce enzymů jako amyláza, proteáza ATPáza (Hyldgaard et al., 2012).

Cinnamaldehyd se díky přítomné aldehydové skupině kovalentně váže na aminoskupiny DNA a bílkovin, a mění tak jejich funkci. Bylo prokázáno, že účinek cinnamaldehydu je závislý na koncentraci. V nízkých koncentracích například inhibuje enzymy zodpovědné za dělení buněk, v subletálních inhibuje ATPázu. V letálních mění (narušuje) buněčnou membránu, což se projevuje např. změnou ve složení lipidů membrány, její depolarizací nebo ztrátou její integrity (Nazzaro et al., 2013).

Při zkoumání mechanismu účinku jednotlivých složek silic bylo také zjištěno, že složky, které samy nemají letální účinek, mohou působit v synergii s účinnými složkami. Příkladem je např. p-cymen (prekurzor tymolu a karvakrolu). Tato látka působí jako „membránová nečistota“, jež způsobuje změny, které pro buňku nejsou smrtelné (např. změny v membránovém potenciálu, pokles entalpie membrán a následné snížení bodu rozpustnosti membrán). Tyto fyziologické procesy však usnadňují vstup účinnějších látek (karvakrolu) do buňky (Ultee et al., 2002; Cristani et al., 2007).

Z výše uvedeného přehledu, který zdaleka není vyčerpávající, lze konstatovat, že mechanismus účinku silic je velice různorodý, v mnoha případech není zcela objasněn a závisí na silici i daném mikroorganismu (Holley a Patel, 2005). Za hlavní cesty

antimikrobiálního účinku silic lze však považovat vliv na propustnost membrán, inhibici funkce různých enzymů a změny ve struktuře DNA a proteinů.

1.2.2 In vitro antimikrobiální aktivita silic

In vitro antimikrobiální aktivita silic např. proti patogenním mikroorganismům zvířat, člověka, ale i rostlin, je pravděpodobně nejčastěji dokumentovaná vlastnost silic. Míra účinnosti je vyjadřována jako minimální baktericidní koncentrace (MBC), častěji však jako minimální inhibiční koncentrace (MIC). MBC je nejčastěji definována jako nejnižší koncentrace dané látky, která vede k usmrcení 99,9 % buněk (Skandamis et al., 2001). MIC je pak nejnižší koncentrace látky, která inhibuje viditelný růst mikroorganismů. V literatuře si autoři definici MIC a MBC mírně upravují, proto je mnohdy obtížné porovnávat výsledky jednotlivých studií. Přehled různých definic MIC a MBC udává např. Burt (2004).

Silice jsou testovány převážně ve své kapalné fázi pomocí diskových a dilučních metod, avšak v posledních dvaceti letech se zájem přesouvá k antimikrobiální aktivitě silic v plynné fázi (Tyagi et al., 2012), testovaných pomocí difuzních metod. Tyto metody využívají přirozené těkavosti silic, eliminují některé nedostatky testů v kapalné fázi silic a zároveň poskytují stejné, nebo i výrazně lepší výsledky, tedy nižší minimálně inhibiční koncentrace (MIC) (Laird a Phillips, 2012).

Silice testované v *in vitro* podmínkách bez ohledu na testovací metodu prokázaly účinnost proti řadě patogenních mikroorganismů např. *Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Salmonella enteritidis* a dalších, které jsou nejčastější příčinou vzniku onemocnění z potravin. (Tassou et al., 1996; Lopez et al., 2005; Moreira et al., 2005; Nedorostova et al., 2008; Nyachuba, 2010). Za nejefektivnější lze považovat silice obsahující tymol, karvakrol a cinnamaldehyd (Kloucek et al., 2012). MIC daných látek může v závislosti na daném mikroorganismu, metodě a silici být i pouhých 3,9 μg/l (Bakkali et al., 2008). Silice jsou také účinné proti plísním, bakteriím a kvasinkám způsobujícím kažení potravin jako *Pseudomonas sp. Alternaria sp., Aspergillus sp.* atd. (Tournas, 2005; Antunes a Cavaco, 2010).

Všechny *in vitro* studie poukazují na značný potenciál využití antimikrobiálních vlastností silic v potravinářském průmyslu. Kromě jejich těkavosti a vysoké účinnosti se za přednost považuje i to, že řada komponentů silic je registrována Evropskou komisí (EC, 2002) a americkou FDA (Food nad Drug Administration) jako potravinářská aditiva, a jsou tedy chápány jako látky nepředstavující žádné nebezpečí pro zdraví spotřebitelů. Celá řada silic, včetně těch testovaných v rámci této práce, je zařazena v FDA seznamu GRAS (Burt, 2004).

1.2.3 Testy antimikrobiální aktivity silic v potravinách

Antimikrobiální aktivita silic je v potravinách testována jednak proti patogenním mikroorganismům představujícím nebezpečí pro člověka a dále proti mikroorganismům způsobujícím kažení potravin. Silice jsou testovány na celé řadě produktů živočišného (mléko, mléčné výrobky, maso, masné výrobky, mořské plody) ale i rostlinného původu (ovoce, zelenina, džusy atd.). V mnoha případech vede aplikace silic k významné eliminaci patogenních mikroorganismů (Tiwari et al., 2009; Tajkarimi et al., 2010). Zároveň se však ukazuje, že účinnost silic v potravinách je ovlivněna řadou faktorů: pH, obsahem tuku, bílkovin, vody a povrchem potraviny (Burt, 2004). Převážná většina těchto faktorů účinek silic snižuje, proto je k zajištění účinnosti srovnatelné *s in vitro* testy nutné zvýšit koncentrace silic 10 až 100krát (Burt, 2004). Avšak tak vysoké koncentrace silic mají zpravidla negativní vliv na organoleptické vlastnosti produktu – od vzhledu přes chuť až po texturu (Tiwari et al., 2009). Vzhledem k těmto protichůdným vlastnostem silic jsou v současnosti v potravinářství komerčně využívány pouze dva konzervační přípravky s jejich přídavkem[1].

Na druhou stranu se ukazuje, že účinnou koncentraci silic lze snížit, pokud jsou použity v kombinaci s jinou konzervační technikou, tedy na principu překážkového efektu (Holley a Patel, 2005). Doposud byly účinky silic ověřovány jednak v kombinaci s běžně používanými konzervačními metodami (např. modifikovaná atmosféra, vysoký tlak, teplota, ozáření, snížení pH), ale i se zcela novými experimentálními technikami jako např. negativní ionty vzduchu (Burt, 2004; Lopez et al., 2005; Tyagi et al., 2012). Např. kombinace cinnamaldehydu a nízké teploty použitá k ošetření mrkvového pyré vedla k potlačení bakterií a byla i dobře senzoricky hodnocena (Valero a Salmeron, 2003). Experimenty tedy potvrzují, že vhodná kombinace silice a další konzervační metody může vést k výrobě chutné a bezpečné potraviny.

Trendem ve výzkumu komerčního využití silic v potravinářství jako antibakteriálního agens je tedy nalezení optimální metody jejich aplikace na různé druhy potravin. Značná pozornost je zaměřována především na jejich možné využití při výrobě minimálně zpracovaného ovoce a zeleniny (Lanciotti et al., 2004), které vzhledem ke způsobu výroby (kap. 3) představují pro spotřebitele riziko v podobě nákazy patogenními mikroorganismy vyvolávajícími převážně průjmová onemocnění různé závažnosti. Příklady experimentální aplikace silic na minimálně zpracované produkty uvádí tabulka 1a a 1b.

[1] Např DMC.Base Natural - potravinářský konzervant vyráběny firmou DOMCA S.A., Alhendı´n, Granada, Spain obsahuje 50 % silic (mix šalvěje, rozmarýnu a citronu) a 50 % glycerolu. Dále přípravky Protecta One a Protecta Two - rostlinné extrakty vyráběné firmou by Bavaria Corp. Apopka určené k potlačení růstu mikroorganismů v masných produktech.

Tabulka 1a: Příklady experimentální aplikace silic na minimálně zpracované produkty

produkt	silice	použitá koncentrace	mikroorganismus	zjištěná redukce mikroorganismů KTJ/g	reference
celer	cinnamaldehyd	1%	S. Newport	cinnamaldehyd 1–2,3 log	(Ravishankar et al., 2010)
	karvakrol	1%		karvakrol kompletní redukce	
rajče	karvakrol,cinnamaldehyd, eugenol, β resorcinolová k.	0,25–1%	*Salmonella* spp	≈6 log	(Mattson et al., 2011)
krájená rajčata a ledový salát	myrta	1000ppm	S*. typhimurium*	≈ 1,66–1,89 log	(Gunduz et al., 2009)
ledový salát	oreganová silice	75ppm	S. *typhimurium*	signifikantní	(Gunduz et al., 2010)
rajčata	oreganová silice	15,75, 100ppm	S. *typhimurium*	≈2,78 log	Gunduz (2010)
kiwi	karvakrol	1mM	přirozená mikroflóra	>3 log	(Roller a Seedhar, 2002)
meloun cukrový	karvakrol, cinnamaldehyd	1mM	přirozená mikroflóra	≤ 1,5 log	(Roller a Seedhar, 2002)
naklíčená vojtěška	cinnamaldehyd, karvakrol	200 a 600mg/l vzduchu	*Salmonella spp* (6 serovarů)	≤ 1,5 log	(Weissinger et al., 2001)
jablka, švestky, meloun, džusy	lemograss, geraniol	-	*E. coli*	3 log v jablkách	(Raybaudi-Massilia et al., 2006)
salát hlávkový	tymiánová silice	0,1–10ml/l v roztoku	*E. coli* O157H:H7	≤ 1,5 log	(Singh et al., 2002)
salát ledový	tymiánová silice	0,1–10ml/l v roztoku	*E. coli* O157H:H8	≤ 1,5 log, 1,5–3 log	(Singh et al., 2002)
salát hlávkový	estragol	0,1–1% v/v	přirozená mikroflóra	1,5–3 log	(Wan et al., 1998)

Tabulka je kompilací dat převzatých z (Burt, 2004; Bajpai et al., 2012).; S. = *Salmonella*

Tabulka 1b: Přehled testovaných silic na fresh-cut salátech

produkt	silice	použitá koncentrace	mikroorganismus	zjištěná redukce mikroorganismů log KTJ/g	reference	senzorické zkoušky
salát hlávkový	cinnamaldehyd+tween	800 ppm	*Escherichia coli* O157:H7	2,89 log	(Yossa et al., 2013)	ne
			Salmonella enterica	1,5 log		
			přirozená mikroflóra	pokles, po skladování nárůst		
směs baby listů špenátu, lolo roso, rukola	oregano	3%, 5%, 10% emulze	*Escherichia coli O157:H7*	0,5 log (10% emulze)	(Azizkhani et al., 2013)	ne
	hřebíček			2,5 log(5% a 10% emulze)		
	zataria (*Zataria multiflora*)			1,7; 2,2 a 3,5 log		
směs: ledový salát, řepa rukola	oregano (karvakrol); rozmarýn (1,8 cineol); mix silic (1/4 MIC oregano+1/MIC rozmarýn)	0,125% (O), 2% (R)	*L. monocytogenes*	6,5; 2,7; 2,2 log	(De Azeredo et al., 2011)	největší rozdíly v hodnocení aromatu, celkové hodnocení
			Y. enterocolitica	5,3; 2; 2,1 log		
			A. hydrophilla	>7; 3; 2,5 log		
		0,5% (O), 4% (R)	*P. fluorescens*	4,9; 1,9; 2,3 log		
salát	oregano	250 ppm	CPM, enterobakterie, pseudomonas	0,5; 1,24; 1,17 log(0. den po ošetření)	(Gutierrez et al., 2009)	potlačení aromatu salátu, 7. den nepoživatelné jako kontrola
	oregano + tymián	125 + 250 ppm		0,63; 0,97; 1,17 (0. den po ošetření)		
	chlor	120 ppm		1,17; 0,55; 1,58		
salát	máta, bazalka	0,01 ml/l,	*S. typhimurium*	0,75 – md (M), 1,2–1,8 (B)	(Karagozlu	ne

		0,032 ml/l, 0,08 ml/l	E. coli O157:H7	0,27 – md (M) 1–1,7 (B)	et al., 2011)	
salát	chlor	150 mg/ml	*E. coli* O157:H7	1,23 log	(Posada-Izquierdo et al., 2013)	ne
salát	ClO2, ozonovaná voda, tymiánová silice	10 mg/l, 10 mg/l, 0,1%	*E. coli* O157:H7	1,5–1,9 log; 1,5–1,6 log; 1,7–2,15 lo	(Singh et al., 2002)	ne
čekanka	eukalyptus, tea tree, hřebíček	?	mezofilní b., enterobakterie	cca 2 log, cca 0,5log	(Ponce et al., 2003)	po ošetření nepoživa-telné
baby špenát, salát ledový, salát	lemograss	0,1- až 0,5%	*Salmonella* Newport	0,5–4,3 log	(Moore-Neibel et al., 2011)	ne
špenátové listy	proud elektronů + enkapsulovaný cinnamaldehyd, eugenol, česnekový extrakt, extrakt propolisu,	0,5% silice v enkapsulo-vaném mat. 0,11–0,19 kGy	*Salmonella* spp.	Silice snížily dávku proudu elektronů potřebnou k dosažení D_{10} hodnoty pro Salmonella spp	(Gomes et al., 2011)	ne
salát	plynná fáze ClO_2	4,1 mg/l	*Salmonella, Listeria monocytogenes, Escherichia coli* O157:H7	1,53–1,58 log	(Sy et al., 2005)	nepoživa-telné
zelí				3,13–4,42 log		
mrkev				5,15–5,88 log		

Silice se nacházejí v celé řadě rostlin spadajících do různých čeledí např. *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Ranunculaceae*, *Lamiaceae* a další. Přestože tyto směsi obsahují stovky různých látek, z výsledků *in vitro* antimikrobiálních testů vyplývá, že mezi nejúčinnější silice patří ty, jež obsahují karvakrol, tymol, cinnamaldehyd, eugenol, geraniol, allylisothiokyanát, diallyldisulfid a několik málo dalších sloučenin. Pro experimentální část práce proto byly vybrány rostliny a silice, které jako hlavní účinné látky obsahují první čtyři výše jmenované.

2. Charakteristika siličnatých rostlin vybraných pro experimentální část práce

Jedním z cílů práce je i výběr nejvhodnějších druhů rostlin s ohledem na kvantitativní (výnos) a kvalitativní (antimikrobiální aktivita) vlastnosti jejich silic. Pro tento účel bylo vybráno několik druhů rostlin z čeledi *Lamiaceae*, které v různých poměrech obsahují karvakrol, tymol a eugenol. Jedná se o rostliny, které lze pěstovat v ČR, a sice o bazalku, dobromysl, tymián a saturejku.

Pro experimentální část práce byly vybrány i silice dalších rostlin, které v předchozích *in vitro* testech (Kloucek et al., 2008; Nedorostova et al., 2008) prokázaly vysokou účinnost proti patogenním mikroorganismům a plísním, ale jejichž pěstování v ČR v polních podmínkách není možné. Jedná o silice skořicovníku (*Cinnamonum* sp.) a hřebíčku (*Eugenia caryophyllata*). Do některých testů byla ve spolupráci s Katedrou chemie zařazena i silice zavinutky podvojné (*Monarda media* Willd), jejíž silice obsahuje vysoké množství karvakrolu. U všech vybraných druhů rostlin bude uvedena jejich stručná charakteristika, u rostlin z čeledi *Lamiaceae* (kromě zavinutky) bude následovat i stručný popis pěstování.

2.1 Hřebíčkovec kořenný (*Eugenia caryophyllata*)

čeleď*:* Myrtovité (*Myrtaceae*)

Hřebíčkovec je stálezelený strom původem z Indonésie dosahující výšky až 8–30 m. Listy jsou hladké na spodní straně s četnými olejovými váčky. Květy jsou čtyřčetné, plody obsahují jedno semeno a mají olivový tvar. Kůra, listy a květy obsahují aromatické látky. Sušená poupata jsou u nás známá jako koření „hřebíčkový květ“. Hřebíček je starým léčivým prostředkem; tradičně se používá při obtížích trávicího traktu, především jako karminativum. Dále se tradičně využívá jako dezinfekce dutiny ústní. V Indonésii jsou také populární hřebíčkové cigarety.

Silice je z hřebíčkovce získávána destilací z listů, plodů a kůry, její hlavní účinnou látkou je eugenol (4-allyl-2-metoxyfenol). Množství a složení oleje se liší v závislosti na orgánu, ze kterého je silice získávána. Hřebíčkový květ obsahuje (15–18 %) silice, její složení je následující: eugenol (80–90 %), eugenyl acetát (2–27 %), β-karyofylen (5–12 %), dále může silice obsahovat metylsalicilát, metyleugenol, benzaldehyd, metylamyl keton a α-ylangen. Výtěžnost silice získávané z listů se pohybuje okolo 2 %, z toho tvoří eugenol 82–88 %. Nejvíce eugenolu (90–95 %) pak obsahuje silice získávaná z kůry; výtěžnost: 4–6 %. (Barnes et al., 2007).

2.2 Skořicovník cejlonský (*Cinnamomum verum*)

čeleď: Vavřínovité (*Lauraceae*)

Vždyzelený strom vysoký 8 až 17 m původem z Indonésie. Kožovité listy jsou řapíkaté, svrchu lesklé, naspodu šedozelené, celokrajné, asi 15 cm dlouhé a 5 cm široké, vejčité, podlouhlé, s 3–5 výraznými žilkami, které vycházejí ze spodiny a na vrcholu se sbíhají. Květy mají zdužnatělou číšku, jsou drobné, bělozelené, vonné, sestavené do vrcholíků. Plod je vejčitá bobule uzavřená do poloviny ve zdužnatělé číšce. V době zralosti jsou modročerné a obsahují hnědé semeno (Atlasrostlin.cz).

Kůra skořicovníku je populárním kořením a také tradičním léčivým prostředkem, působí jako astringens, stimulant a karminativum, dále slouží ke kontrole nevolnosti a zvracení. Komerčně je využívána především v potravinářském průmyslu. Silice se získává destilací z kůry a listů skořicovníku. Kůra obsahuje 0,5–2 % silice světle žluté barvy, hlavní účinnou látkou je cinnamaldehyd (50–75 %), eugenol (5–18 %), cinnamyl acetát, linalool, 1,8-cineol, 'β'-karyofylen a benzyl benzoát. Listy obsahují 0,7–1,2 % žlutohnědé silice, s eugenolem jako hlavní složkou (70–75 %), dalšími látkami jsou cinnamaldehyd (< 5 %), benzyl benzoát, linalool a 'β'-karyofylen (Barnes et al., 2007).

2.3 Zavinutka prostřední (*Monarda media* Willd)

čeleď: Hluchavkovité (*Lamiaceae*)

Jedná se o vytrvalou rostlinu původem ze severovýchodní Ameriky a přilehlé části Kanady. Jedná se pravděpodobně o hybrid druhů *Monarda didyma* (zavinutka podvojná) a *Monarda fistulosa* (Egler, 1973). Rostliny rodu Monarda dosahují výšky 0,5–1 m. Mají růžové pyskaté květy uspořádané v koncových přeslenech, listy jsou vejčité s pilovitým okrajem (Kresánek a Kresánek, 2008).

Původně byly rostliny používány indiány proti zánětům a jako čaj proti nachlazení. V současnosti se rostliny rodu Monarda pěstují jako okrasné rostliny a využívají se do suchých vazeb.

Účinnými látkami jsou silice, třísloviny a hořčiny. Silice jsou v závislosti na chemotypu bohaté na karvakrol, tymol, geraniol nebo borneol (Gwinn et al., 2010).

2.4 Bazalka (Ocimum basilicum)

čeleď: Hluchavkovité (*Lamiaceae*)

Bazalka se řadí do rodu *Ocimum*, který čítá 50–150 druhů bylin a křovin, taxonomie rodu je vzhledem k možnému mezidruhovému křížení, polyploidii a existenci mnoha chemotypů dosti nepřehledná.

Samotnou bazalku pravou reprezentuje minimálně 6 chemotypů a množství kultivarů. Obecně se jedná o jednoletou teplomilnou rostlinu keříkovitého vzrůstu dorůstající až 50 cm. Listy jsou lesklé a mají vejčitý tvar. Bazalka kvete od června do září bílými nebo žlutobílými květy, které jsou pyskaté a uspořádané do klasu. Rostlina pravděpodobně pochází z východní Asie, odkud se rozšířila do celého světa.

V současnosti se bazalka komerčně pěstuje ve Středomoří, USA, na Madagaskaru, v Indii a Thajsku, avšak celková osevní plocha není známa. Komerčně jsou významné tři typy bazalky – francouzská, egyptská a bulharská bazalka, které se liší složením silice. V Evropě pěstovaná tzv. Francouzská bazalka obsahuje hlavně metyl chavikol neboli estragol (20–25 %) a linalool (20–40 %), mezi další látky obsažené v silici patří např. 1,8-cineol, kafr, pinen, ocimen, v menších množstvích i eugenol, geraniol, α-terpineol, β-karyofylen. Celkové množství silice v rostlině se pohybuje od 0,3–1,5 % (Aguilar, 1999).

Mezi další účinné látky patří např. třísloviny, saponiny, flavonoidy a glykosidy.

Bazalka je celosvětově známým kořením, mimo to se v tradiční medicíně užívá jako karminativum, k potlačení kašle, chronické dysenterie a průjmů. Silice a extrakty bazalky jsou používány v potravinářství (pekařství, likérnictví, koření do omáček), dále nacházejí uplatnění v kosmetickém průmyslu jako součást produktů určených pro dentální hygienu a používají se i pro přípravu parfémů.

2.4.1 Pěstování

Bazalku je vhodné pěstovat na hlinitopísčitých půdách s vysokým obsahem humusu s pH od 4,3 do 8,4 přičemž optimální pH je 5,6– 6,5. Půdu je vhodné na podzim hnojit např. ar 1–2 t/ha superfosfátu, 4 t/ha 40% draselné soli a 1 t/ha ledku, je možné použít i organická hnojiva (Mikešová, 2004). Semena bazalky klíčí při 13– 25 °C, optimální teplota růstu ve vegetačním období se pohybuje okolo 20 °C. Porost bazalek lze zakládat setím i sázením předpěstovaných sazenic. Sazenice je vhodné předpěstovat ve skleníku a koncem května sázet do sponu 30 x 15 cm. V případě setí sejeme do řádků na vzdálenost 50 cm. Vegetační období bazalky trvá 80– 110(180) dní, během kterých je nutné rostliny pravidelně zalévat a plečkovat. Rostliny se sklízí na začátku květu ve výšce 10–15 cm nad zemí, rostlina později znovu obroste a je možná ještě druhá sklizeň. Výnos čerstvé hmoty se pohybuje mezi 5–20 t/ha, výnos silice okolo 40 kg/ha (Simon et al., 1990; Aguilar, 1999).

2.5 Dobromysl (*Origanum sp.*)

čeleď: Hluchavkovité (*Lamiaceae*)

Rod *Origanum* zahrnuje 38 různých druhů rostlin. Taxonomie druhu dobromysl je stejně jako u všech ostatních druhů z rodu čeledi *Lamiaceae* značně nepřehledná. V současnosti je rozlišováno 6 poddruhů a nesčetné množství kultivarů, které jsou mezi sebou snadno zaměnitelné. Dobromysl je původní rostlinou Středozemí, v současnosti je však hojně rozšířena a pěstována po celém světě (de Guzman a Jansen, 1999; Mikešová, 2004).

Dobromysl je vytrvalá 30–60 cm vysoká rostlina s vstřícnými řapíkatými, vejčitými listy, které jsou na okraji jemně zoubkované. Květenství tvoří vrcholičnatá lata s červenofialovými nebo bílými květy. Rostlina v suchém stavu obsahuje 0,1–6 % silice, jejíž hlavní účinnou látkou je karvakrol. Květy v porovnání s listy obsahují více silice (de Guzman a Jansen, 1999; Mikešová, 2004).

Oregano se odpradávna používalo jako koření, některé druhy k barvení látek. V tradiční medicíně se užíval, jako např. karminativum, k potlačení astmatu, dezinfekci dutiny ústní a proti pavoučím kousnutím. V současnosti je komerčně využíváno především v potravinářství.

2.5.1 Pěstování

Oregano je teplomilná rostlina vyžadující lehké suché půdy s pH 4,5–8,7. Porost je možné zakládat z předpěstovaných sazenic, dělením trsů nebo řízkováním. Nejčastěji se zakládá přímým jarním výsevem, vzdálenost řádků by měla být 50–60 cm. Těsně před vysetím je vhodné na pozemek aplikovat dusíkaté hnojivo (100 kg N/ha). Oregano lze pěstovat jako jednoletou, ale i víceletou plodinu. Nejvyšší obsah silice je v oreganu v období na začátku kvetení, před obdobím tvoření semen, kdy se také rostliny sklízejí. Výnos se v prvním roce sklizně pohybuje mezi 2,6–3,2 t/ha, ve druhém roce je vyšší (3,8–5,0 t/ha). Během vegetačního období je vhodné oregano zavlažovat (de Guzman a Jansen, 1999; Mikešová, 2004).

2.6 Tymián obecný (*Thymus vulgaris*)

čeleď: Hluchavkovité (*Lamiaceae*)

Tymián obecný se řadí do rodu *Thymus*, který čítá 35–350 druhů, taxonomie rodu je složitá a z velké části neznámá (Widodo, 1999).

Tymián obecný je původem ze Středozemí (Řecko, Portugalsko). Jedná se o víceletý polokeř vysoký až 35(50) cm, ve spodní části silně zdřevnatělý. Listy jsou čárkovitě kopinaté, na okrajích dolů ohrnuté, plstnaté, zespodu lysé. Květy jsou nachové barvy, vyrůstají v úžlabí horních listů a tvoří lichoklas. Tymián se komerčně pěstuje v místě svého původu, ale také v Rusku, Japonsku, Číně, USA a Kanadě. Mezi významné pěstované druhy se kromě tymiánu obecného řadí dále *T. zygis* (španělský tymián), *T. serpyllum* (mateřídouška obecná), *T. satureoides* (marocký tymián), *T. pulegioides* (širokolistý tymián), *T. capitatus* (španělské oregano), *T. citriodorus* (citronový tymián). Jejich celková roční produkce je odhadována na 1500 t (Widodo, 1999; Mikešová, 2004).

Tymián obvykle obsahuje 1–3 % (nejčastěji 2–2,5 %) silice světle žluté až červené barvy. Hlavními složkami silice (20– 80 %) jsou tymol a karvakrol, silice dále obsahuje např. *p*-cymen, γ-terpinen, linalool, α-terpineol, a tujan-4-ol. Dalšími účinnými látkami jsou např. flavonoidy, saponiny a taniny (Barnes et al., 2007).

Tymián je běžně užívaným kořením, v tradiční medicíně je podáván proti nadýmání, nachlazení, jako desinfekce dutiny ústní, expektorans, proti cukrovce apod. Komerčně se využívá jako dochucovadlo potravin, příměs léčivých čajů, ale i v kosmetice a parfumérství.

2.6.1 Pěstování

Tymián je vhodné pěstovat na teplých slunných lokalitách chráněných před silnými větry. Vhodné jsou lehce alkalické, dostatečně humózní hlinitopísčité půdy. Tymián je možné pěstovat jako jednoletou, tak i víceletou rostlinu. V podmínkách ČR je vzhledem k vymrzání porostů vhodnější jednoleté pěstování. Porost lze založit přímým výsevem, z předpěstovaných sazenic nebo vegetativně. Přímý výsev se provádí v dubnu do řádků vzdálených 20(25)–50 cm, v případě zakládání porostu ze sazenic se rostliny umísťují do sponu 25 x 45 cm. Optimální teplota pro růst rostlin se pohybuje okolo 16°C. Sklizeň se provádí těsně před nebo v květu rostlin. Nať se sklízí přibližně 5– 8 cm nad zemí bez zdřevnatělých částí, které později znovu obrůstají. Sklizeň v prvním roce dosahuje 5 t/ha, v následujících letech 12–14 t/ha čerstvé hmoty (Widodo, 1999; Mikešová, 2004). Během vegetačního období je vhodné potlačovat plevele pomocí mulčování. Tymián je relativně nenáročný na živiny, pozemek je však vhodné přihnojit organickými hnojivy; přihnojení dusíkem pak přispívá k vyššímu obsahu silice (Baranauskiene et al., 2003).

2.7 Saturejka zahradní (*Satureja hortensis*)

čeleď: Hluchavkovité (*Lamiaceae*)

Rod *Satureja* je relativně špatně popsán a s ohledem na různá kriteria se do něj může řadit 30–200 druhů rostlin. Samotná saturejka zahradní je velice variabilním druhem a v současnosti existuje značné množství rozdílných subklasifikací tohoto druhu (Dzuong Duc Huyen & Brink, 1999).

Saturejka pochází ze západní oblasti Středozemí, odkud se rozšířila do celého světa. Je to jednoletá až 40 cm vysoká rostlina s tenkou keříkovitě rozvětvenou lodyhou, která je chlupatá a ve spodní části zdřevnatělá. Listy jsou úzké kopinaté, květy světle fialové vyrůstající z paždí listů. Velice podobnou rostlinou je saturejka horská (*Satureja montana*), která je i stejného původu, poskytuje však produkty horší kvality.

V listech a květech rostliny je obsaženo 1–2 % silice žluté barvy, která se může skládat z více jak 100 složek. Jejími majoritními složkami jsou karvakrol (> 30 %), γ-terpinen (> 20%) a p-cymen. Rostlina také obsahuje velké množství polyfenolických látek, především ze skupiny tříslovin a flavonoidů (4–9 %), dále pak pryskyřice, hořčiny a minerální látky (Barnes et al., 2007).

Saturejka je hojně používaná pro kulinářské úpravy různých pokrmů, v tradiční medicíně byla užívána při zažívacích obtížích. Komerčně se využívá jako potravinářské aditivum, v likérnictví a při výrobě parfémů.

2.7.1 Pěstování

Saturejku je vhodné pěstovat na teplé slunné lokalitě na hlinitopísčitých půdách s vysokým obsahem humusu s mírně alkalickým pH (7). Do půdy je vhodné v rámci základní přípravy aplikovat fosforečná hnojiva v dávce 20–30 kg/ha P a 50–70 kg/ha K. Dusíkatá hnojiva (50–80 kg/ha) se mohou zapravit do půdy buď při předseťové přípravě, nebo aplikovat stimulačně v průběhu vegetace (1–2 dávky do 30 kg/ha). Doporučuje se při předseťové přípravě aplikovat vícesložková hnojiva typu NPK, přičemž v průběhu vegetace se aplikují jedna až dvě dávky dusíku do 30 kg/ha. Celková doporučená dávka N je 50–80 kg/ha. Porosty se nejčastěji zakládají přímým výsevem do řádků od sebe vzdálených 30– 45 cm, respektive do sponu 40 x 25 cm, pokud je porost zakládán z předpěstovaných sazenic. Ošetřování porostu je zaměřené na pravidelné provzdušňování a kypření půdy, odplevelování a podle potřeby zavlažování. V polních podmínkách osivo vyklíčí za 14–21 dní. Vzešlé rostliny se jednotí na 0,10 m vzdálenost v řádku. Vegetační období trvá 140–160

dní. Sklizeň by měla probíhat v době květu rostlin. Výnos činí 1–2 tuny drogy na hektar (Pavela a Bárnet, 2011).

3. Čerstvé a minimálně zpracované potraviny (fresh-cut/ready-to-eat produkty)

Pojem minimálně zpracované ovoce a zelenina (fresh-cut) zahrnuje dle International Fresh-Cut Produce Association (IFPA) jakékoliv čerstvé ovoce nebo zeleninu, které bylo zpracováno za pomoci fyzikálních metod (loupání, krájení, sekání, mytí) za účelem získání 100% konzumovatelného produktu. Tento produkt je následně balen a uchováván za chladírenské teploty (IFPA, 2005).

Fresh-cut produkty jsou podskupinou široké skupiny ready-to-eat produktů, tedy produktů připravených k přímé (okamžité) konzumaci. Tato relativně široká skupina potravin v sobě zahrnuje (kromě výše uvedeného) také polotovary určené např. k ohřátí v mikrovlnné troubě, ale i naklíčená semena apod.

Pojmy ready-to-eat a fresh-cut jsou často zaměňovány, a způsobují tak různá nedorozumění. S ohledem na cíle této práce bude proto v textu dále používán termín fresh-cut produkty, případně minimálně zpracované produkty. Tyto pojmy budou zahrnovat jednak minimálně zpracované ovoce a zeleninu, ale také naklíčená semena různých rostlin, a to vzhledem ke stejné problematice týkající se těchto produktů (Rojas-Grau et al., 2010).

Fresh-cut produkty byly původně určeny pro jídelny a restaurace, avšak měnící se životní styl a především masivní podpora zdravého životního stylu, a tedy i konzumace ovoce a zeleniny, ze strany národních a mezinárodních organizací (FAO, WHO, EU např. kampaň „minimálně 5 kusů ovoce nebo zeleniny denně“) přivedla nabídku fresh-cut produktů i do obchodů pro běžné spotřebitele.

V posledních dvaceti letech se trh s těmito produkty neustále rozšiřuje a jejich nabídka se zpestřuje. V současnosti je v supermarketech k dostání přes 400 druhů minimálně zpracovaného ovoce a zeleniny, zatímco v počátcích (polovina 70. let) bylo v nabídce pouze 150 těchto produktů (Rojas-Grau et al., 2010).

Oblíbenost jednotlivých produktů se liší v závislosti na státu, ale i kontinentu. V Evropě a Americe jsou nejpopulárnější směsi listových salátů, ty se např. v maloobchodní síti v USA staly druhým nejprodávanějším zbožím po balené vodě. Předpřipravené ovoce zatím tak vyhledávané není. Spolu s rozšiřující se nabídkou druhů a možnostmi zpracování se však obliba ovoce postupně zvyšuje, navíc se předpřipravené ovoce a zelenina balené v malých porcích stává oblíbenou a zdravou alternativou k rychlým svačinám. V budoucnu se proto předpokládá další rozšiřování tohoto trhu.

Rozvíjející se trh a rozšiřující se nabídka těchto produktů přináší výrobcům staronové výzvy týkající se jednak uchovávání (shelf-life), kdy je kladen požadavek na co nejdelší udržitelnost prakticky bez použití jakýchkoliv konzervantů. Druhou výzvou je pak zajištění zdravotní nezávadnosti těchto produktů z mikrobiologického hlediska, o čemž svědčí narůstající výskyt průjmových onemocnění způsobených patogenními mikroorganismy přítomnými právě na fresh-cut produkci.

Skladování potravin a zajištění jejich bezpečnosti spolu úzce souvisí. Minimálně zpracované ovoce a zelenina podléhá v porovnání s nezpracovaným ovocem a zeleninou daleko rychleji fyziologické a mikrobiální zkáze. Fyziologická zkáza obvykle předchází mikrobiálnímu kažení potravin. To je dáno především tím, že byť i minimálním zpracováním ovoce a zeleniny dochází k narušení jejich pletiv. Rostlinné pletivo je stresováno, následkem čehož dochází ke zrychlení respirace, produkci etylenu, a tedy rychlejšímu dozrávání a zároveň k jeho degradaci (Watada a Qi, 1999; Zagory, 1999; Ragaert et al., 2007). Narušením buněčných stěn zároveň dochází ke kontaktu enzymů a jejich substrátů a následně ke zrychlení metabolismu.

Poraněná rostlinná pletiva a volně přístupné živiny jsou branou pro vstup mikroorganismů přítomných na povrchu produktů (Mercier a Lindow, 2000), jejich metabolická aktivita má za následek další degradaci produktů (Watada a Qi, 1999; Zagory, 1999; Artes et al., 2007). Kromě mikroorganismů způsobujících kažení potravin se na ovoci a zelenině mohou vyskytovat i mikroorganismy, které jsou patogenní pro člověka.

Vzhledem k absenci jakéhokoliv konzervačního kroku v přípravě fresh-cut produktů, který by přítomné mikroorganismy spolehlivě usmrtil (např. sterilace teplem), tyto přežívají a dále se na daném produktu množí. Podrobnějšímu přehledu výskytu mikroorganismů (patogenních i nepatogenních) na čerstvé produkci se bude věnovat následující kapitola.

3.1 Mikrobiologie minimálně zpracovaného ovoce a zeleniny

Ovoce a zelenina jsou přirozeně osídleny velkým množstvím mikroorganismů, které se na jejich povrch dostávají v průběhu pěstování nejrůznějšími cestami, např. z půdy, závlahovou vodou, hnojením a v neposlední řadě také stykem s živočichy. V průběhu zpracování na fresh-cut produkty může docházet k další kontaminaci např. oplachovou vodou, prostřednictvím zaměstnanců, zpracovatelských strojů apod.

Čerstvě zpracované ovoce a zelenina tak v závislosti na druhu a míře primární kontaminace v průměru obsahuje 3–6 log KTJ/g (KTJ – kolonie tvořících jednotek) produktu (Nguyen-the a Carlin, 1994; Ragaert et al., 2007). Obecně se sleduje celkový počet

mezofilních mikroorganismů, výskyt koliformních bakterií, bakterií mléčného kvašení, kvasinek a plísní. Přesné druhové složení mikroorganismů není cíleně sledováno a je závislé na vlastnostech produktu jako např. na pH, množství živin – především pak cukru.

3.1.1 Přirozená mikroflóra fresh-cut produktů

Čerstvě zpracovaná zelenina je vzhledem ke svému vyššímu pH v porovnání s ovocem náchylnější k bakteriálnímu kažení (Adams a Moss, 2008). Na zelenině se vyskytují především bakterie rodu *Pseudomonacae (P. fluorescenc)*, které tvoří 50–90 % celkové populace mikroorganismů (Zagory, 1999), *Enterobacteriaceae (Erwinia herbicolla)* a v menší míře pak bakterie mléčného kvašení (Ragaert et al., 2010).

Tournas (2005), který se věnoval výskytu plísní a kvasinek na čerstvě zpracované zelenině, zaznamenal 33- až 100% četnost výskytu kvasinek na druzích zeleniny, přičemž jejich počty se pohybovaly od 4 do 6 log KTJ/g produktu, celkový počet mikroorganismů ani specifikaci rodů kvasinek neuvádí. Nguyen-the (1994) za nejčastější rody kvasinek vyskytující se na zelenině uvedla *Candida* sp, *Cryptococcus* sp., *Rhodothorulla* sp., *Trichosporon* sp., *Pichia* sp. a *Torulospora* sp. Jako nejčastěji se vyskytující plísně uvádí Tournas (2005) rody *Alternaria, Cladosporium a Penicillium*; ty se vyskytovaly na 5–66 procentech zkoumaných druhů v množství do 4 KTJ/g produktu.

Mikroflóra naklíčených semen je více méně shodná s mikroflórou minimálně zpracované zeleniny, počty mikroorganismů jsou však v průměru vyšší (tabulka 2).

Předpřipravené ovoce je díky svému nižšímu pH a zpravidla vyššímu obsahu cukrů náchylnější ke kažení kvasinkami a plísněmi. Tournas (2006) uvádí, že 97 % ze 38 vzorků předpřipravených ovocných salátů obsahovalo kvasinky rodu *Pichia spp., Rhodotorula spp., Candida spp*., vzorky melounu, malin, ananasu a dalšího ovoce obsahovaly od < 2 do 9,72 log KTJ/g kvasinek. Vzorky ananasu, malin a salátového mixu obsahovaly také plísně rodu *Cladosporium spp*. a *Penicillium spp*.

Poměrně názorný přehled o výskytu mikroorganismů na fresh-cut produktech a nezpracovaném ovoci a zelenině poskytuje studie španělského trhu (Abadias et al., 2008). Souhrn výsledků počtu mezofilních, psychrotropních a dalších důležitých mikroorganismů je uveden v tabulce 2. Přehled dokazuje, že fresh-cut zelenina a naklíčená semena jsou, co do počtu mikroorganismů a jejich rodového složení, kritickou skupinou.

Během skladování produktů dochází k pomalému množení mikroorganismů, které spolu s fyziologickými změnami způsobují kažení produktů charakteristické např. nepříjemným

zápachem, vadnutím, hnědnutím a měknutím rostlinných tkání. Na konci životnosti fresh-cut produktu se celkový počet mikroorganismů pohybuje nad 8 log KTJ/g. Průměrná doba uchovatelnosti (shelf-life) produktu se pohybuje od 7 do 20 dní (Watada a Qi, 1999). Spolu s nárůstem přirozené mikroflóry dochází i k množení přítomných patogenních mikroorganismů. Přehledu těch nejdůležitějších se věnuje následující podkapitola.

Tabulka 2: Počty mikroorganismů na fresh-cut produkci v obchodech v porovnání s nezpracovaným ovocem a zeleninou

(Abadias et al., 2008) % zastoupení vzorků v dané kategorii počtu mikroorganismů

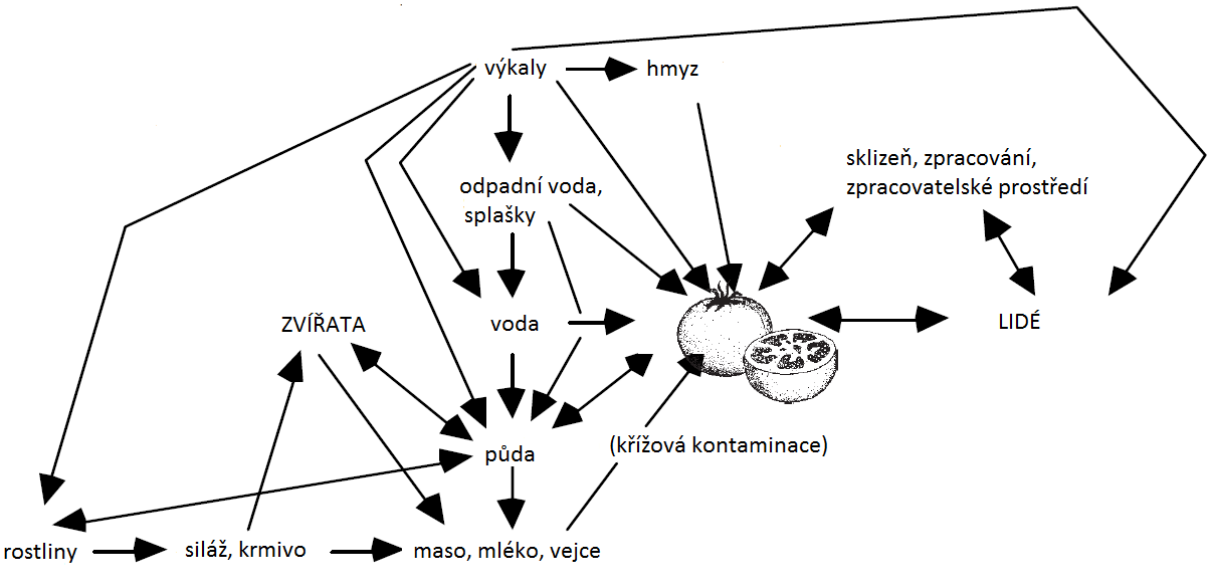
mezofilní bakterie	počet vzorků	$<10^5$	10^{5-6}	10^{6-7}	10^{7-8}	$>10^8$	Interval KTJ/g	Průměr KTJ/g
fresh-cut zelenina	263	1,7	10,2	34,3	47,9	5,9	4,3–8,9	**7**
fresh-cut ovoce	21	90,4	4,8	0	4,8	0	2,0–7,1	**3,8**
naklíčená semena	15	0	0	0	60	40	7,1–9,2	**7,9**
nezpracovaná zelenina	28	14,3	32,1	35,7	17,9	0	2,7–8,0	**5,9**
psychrotrofní bakterie								
fresh-cut zelenina	263	1,3	8,9	35,2	46,2	8,5	4,3–8,9	**7**
fresh-cut ovoce	21	85,7	9,5	0	4,8	0	1,7–7,1	**3,6**
naklíčená semena	15	0	0	46,6	26,7	26,7	6,3–8,9	**7,3**
nezpracovaná zelenina	28	14,3	35,7	35,7	14,3	0	3,0–7,8	**5,8**
plísně a kvasinky								
fresh-cut zelenina	263	36,9	45,3	14,8	3	0	2,0–7,8	**5,2**
fresh-cut ovoce	21	95,2	4,8	0	0	0	1,7–4,9	**3,6**
naklíčená semena	15	46,7	26,7	20	6,7	0	2,8–7,6	**5,2**
nezpracovaná zelenina	28	64,3	32,1	3,6	0	0	2,2–6,1	**4,5**
bakterie mléčného kvašení								
fresh-cut zelenina	263	66,9	14	12,3	2,5	0	<1,0–8,5	**4,2**
fresh-cut ovoce	21	100	0	0	0	0	1,7–4,8	**3**
naklíčená semena	15	40	20	13,3	26,7	0	3,4–7,5	**5,5**
nezpracovaná zelenina	28	100	0	0	0	0	<1,0–3,3	**1,6**
enterobakterie								
fresh-cut zelenina	263	39,8	33,9	21,2	5,1	0	<1,0–8,0	**3,5**
fresh-cut ovoce	21	100	0	0	0	0	1,8–4,8	**3**
naklíčená semena	15	0	0	33,3	66,7	0	6,3–8,1	**7,2**
nezpracovaná zelenina	28	78,6	14,3	7,1	0	0	<1,0–6,0	**3,5**

3.1.2 Patogenní mikroorganismy vyskytující se na fresh-cut ovoci a zelenině

Mikroorganismy přítomné na čerstvé produkci, které jsou patogenní pro člověka, způsobují onemocnění postihující převážně trávicí trakt. Tato onemocnění se projevují širokou škálou příznaků od průjmů, přes horečky až po zvracení. Primárním zdrojem těchto mikroorganismů jsou výkaly různých živočichů, především pak hospodářských zvířat.

Jak je vidět z obrázku 2, cest, kterými se mohou tyto patogenní organismy dostat z výkalů na ovoce a zeleninu, je mnoho. Za ty hlavní jsou považovány: kontaminovaná půda, znečištěná závlahová nebo oplachová voda a pracovníci potravinářského průmyslu. V současné době neexistuje dostatečně účinné opatření, které by původce gastroenteritických onemocnění z fresh-cut produktů spolehlivě odstranilo. Jejich množství na čerstvých produktech je v porovnání s počty nepatogenních mikroorganismů zanedbatelné, je však třeba mít na paměti, že infekční dávky těchto mikroorganismů mohou být velice nízké např. od 10 do 100 mikroorganismů (Harris et al., 2003).

Obrázek 2: Možné cesty kontaminace fresh-cut produktů patogenními mikroorganismy



Převzato z Harris (1997).

Donedávna byla gastrointestinální onemocnění považována za problém hlavně v produkci potravin živočišného původu. Avšak ukazuje se, že zvyšující se obliba a spotřeba minimálně zpracovaných produktů s sebou přináší i nárůst evidovaných epidemií průjmových onemocnění, jejichž původce byl izolován právě z minimálně zpracovaných potravin.

Výsledky výzkumu EFSA ukazují, že potraviny neživočišného původu v letech 2007–2011 byly příčinou 10 % všech zdokumentovaných zoonozních epidemií, 26 % jednotlivých případů, 35 % hospitalizací a 46 % úmrtí. Pokud by ze statistik byla vyjmuta masivní epidemie *E. coli* v roce 2011, podílely by se potraviny neživočišného původu na 18 % jednotlivých evidovaných případů, 8 % hospitalizací a 5 % úmrtí (EFSA, 2013). Případů zoonozních epidemií nepřibývá pouze v Evropě, zvyšující se množství epidemií je dokumentováno i v ostatních částech světa (Nyachuba, 2010). Nejčastějšími patogenními mikroorganismy, které jsou dávány do souvislosti s minimálně zpracovanou produkcí, jsou bakterie především *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* a *Listeria monocytogenes* (Francis et al., 1999; EFSA, 2013). Jejich výskytu se bude podrobněji věnovat následující podkapitola. Nelze také opomenout příležitostné patogeny jako *Staphyloccocus aureus*, *Areomonas hydrophylla* a *Bacillus cereus*.

Dalšími původci zoonóz jsou viry – především noroviry a žloutenka typu A – které se na čerstvou produkci dostávají především prostřednictvím pracovníků (Harris et al., 2003). Pozornost si zasluhují i protozoální parazité *Cryptosporidium pravum* a *Giardia lamblia*.

3.1.2.1 *Salmonella spp*. na minimálně zpracovaných potravinách

Bakterie rodu *Salmonella spp*. patří do skupiny *Enterobacteriaceae* a jsou to G- nesporulující fakultativně anaerobní tyčinky. Nacházejí se převážně v trávicím traktu živočichů a do prostředí se dostávají prostřednictvím jejich výkalů. Jsou schopné přežívat v půdě i ve vodě (Jacobsen a Bech, 2012). Teplotní rozmezí jejich růstu je 5– 41 °C, optimální teplotou pro jejich množení je 37 °C. Laboratorní testy ukazují, že salmonela je po dobu několika dní schopna přežívat i při teplotách od 0 do 5 °C a i přechodné zvýšení teploty nad 12 °C podporuje její růst (Francis et al., 1999).

Celkem rod *Salmonella* čítá 2700 sérotypů. Za původce průjmových nemocnění je považován poddruh S. *enteritica* a jeho sérovary nejčastěji *S.* Enteritiditis, *S.* Typhimurium (ECDC, 2013). Salmonela je na čerstvém ovoci a zelenině identifikována relativně často, studie prováděné od roku 1987– 2008 v různých částech světa uvádějí výskyt salmonely v 0–35 % produktů dostupných na běžném trhu (Abadias et al., 2008; Heaton a Jones, 2008). Salmonela stejně jako i ostatní patogenní mikroorganismy odolává běžným sanitárním prostředkům používaným při výrobě fresh-cut produktů. Jedním z důvodů, proč není těmito prostředky eliminována, je i fakt, že je stejně jako *Escherichia* schopná internalizace do buněčných pletiv, do kterých mohou bakterie vniknout jednak poškozenými buňkami, ale i během růstu rostlin (Gomez-Lopez et al., 2008; Deering et al., 2012).

3.1.2.2 *Escherichia coli* na minimálně zpracovaných potravinách

Rod *Escherichia* patří stejně jako *Salmonella* do skupiny *Enteriobacteriacae*, je to nesporulující G- tyčinka. Je přirozenou součástí mikroflóry značné skupiny živočichů a je častou součástí jejich výkalů. Převážná většina druhů není nebezpečná a je využívána jako indikátorový organismus fekálního znečištění. Jedná se o mezofilní organismus, který je schopný se rozmnožovat a přežívat v teplotním rozmezí od 7–10 do 50 °C (optimum 37 °C).

Průjmová onemocnění různých stupňů závažnosti jsou způsobována čtyřmi kmeny těchto bakterií, a sice enteropatogenní *E. coli* (EPEC), enteroinvazivní *E. coli* (EIEC), enterotoxigenní *E. coli* (ETEC) a enterohemoragické *E. coli* (EHEC) (Adams a Moss, 2008). Posledně jmenovaný kmen EHEC, někdy také nazývaný verotoxin produkující (VTEC), či shiga-like toxin a přednostně sérovar O157:H7 je odpovědný za převážnou většinu průjmových epidemií (EFSA, 2013). Epidemie jsou v případě čerstvé produkce (stejně jako u salmonel) dávány do souvislosti s listovými saláty, klíčky ale i nepasterovanými džusy (Brackett, 1999). Stejně jako výše uvedený rod odolává *E. coli* účinku běžně používaných sanitačních prostředků používaných v produkci minimálně zpracovaných potravin, a to díky její možné internalizaci do rostlinných tkání (kap. 3.1.2.1).

3.1.2.3 *Listeria monocytogenes* na minimálně zpracovaných potravinách

Rod *Listeria* je na rozdíl od výše uvedených, G+ psychrotrofní fakultativně anaerobní mikroorganismus. Dokáže se množit v širokém rozmezí teplot 0–42 °C s optimem mezi 30–33 °C. Byl prokázán její růst i na minimálně zpracovaných potravinách při chladírenských teplotách (Harris et al., 2003). Četné testy prokázaly její všudypřítomnost v okolním prostředí. Na rozdíl od předchozích bakterií nezpůsobuje průjmová onemocnění, ale onemocnění, které se v případě mírného průběhu projevuje jako chřipka, v případě závažného průběhu způsobuje encefalitidu a celkovou sepsi organismu. Listerióza je hrozbou především pro oslabené jedince a těhotné. Mortalita po nákaze listerií se pohybuje kolem 20–30 %. Naštěstí se toto onemocnění v porovnání se salmonelózou vyskytuje velice zřídka, např. na 100 tis. obyvatel připadá 21,31 případu salmonelózy a 0,33 případu listeriózy (ECDC, 2013). V období 2007–2011 byly v EU v souvislosti s minimálně zpracovanými potravinami zaznamenány případy epidemií po požití salátových směsí (EFSA, 2013).

3.2 Produkce fresh-cut produktů a klíčků – všeobecné zásady a metody pro zajištění shelf-life a zdravotní nezávadnosti

Obecné schéma přípravy fresh-cut produktů udává obrázek 3. Jedná se o relativně jednoduchý proces, avšak prakticky v celém jeho průběhu může docházet k situacím, které mohou vést k podpoře růstu nežádoucích a patogenních mikroorganismů. Schéma výroby naklíčených semen je na obrázku 4. Ze schémat jednoznačně vyplývá, že jedním z hlavních rozdílů mezi výrobou fresh-cut produktů a naklíčených semen je zpracovatelská teplota.

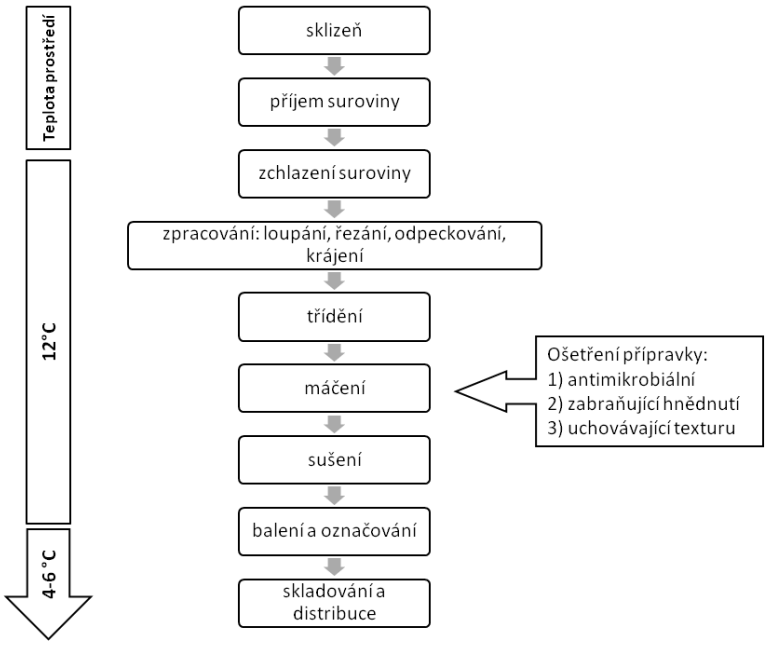
U fresh-cut produktů se teplota od příjmu po skladování snižuje a je jedním z hlavních faktorů zabraňujícím biochemickým a mikrobiologickým změnám produktu (Zagory, 1999). U klíčků je tomu přesně naopak, teplota musí být v průběhu klíčení po dobu několika dní udržována v rozmezí 21–26 °C. Proces klíčení se tak vzhledem k teplotě a dalším faktorům (vlhko, tma) stává ideálním pro množení mikroorganismů, což dokazují i četné studie zabývající se počty mikroorganismů na čerstvé produkci, kdy je téměř pravidlem, že klíčky obsahují největší počty mikroorganismů (Abadias et al., 2008).

Během přípravy fresh-cut produktů nelze vzhledem k povaze konečného produktu využívat takových konzervačních prostředků (např. sterilace), které by zajistily zdravotní nezávadnost produktu a jeho dlouhou uchovatelnost. V současnosti lze pomocí různých preventivních opatření a mírných konzervačních technik zajistit 12– 14denní shelf-life fresh-cut zeleniny a 8–10denní shelf-life fresh-cut ovoce (Lamikanra, 2002). Použití mírných konzervačních technik zaručuje 90- až 99% eliminaci patogenních mikroorganismů (Sapers, 2001) v průběhu výrobního procesu.

Jako preventivní opatření pro eliminaci mikroorganismů je chápáno dodržování správné výrobní praxe (GMP) a správné hygienické praxe (GHP). Pro fresh-cut produkty vydalo soubory GMP a GHP několik institucí (FDA, EU, Codex Alimentarius). Přesto se ukazuje, že obzvláště menší výrobci těchto produktů některá opatření do své výroby nezahrnují (Freshfel, 2011).

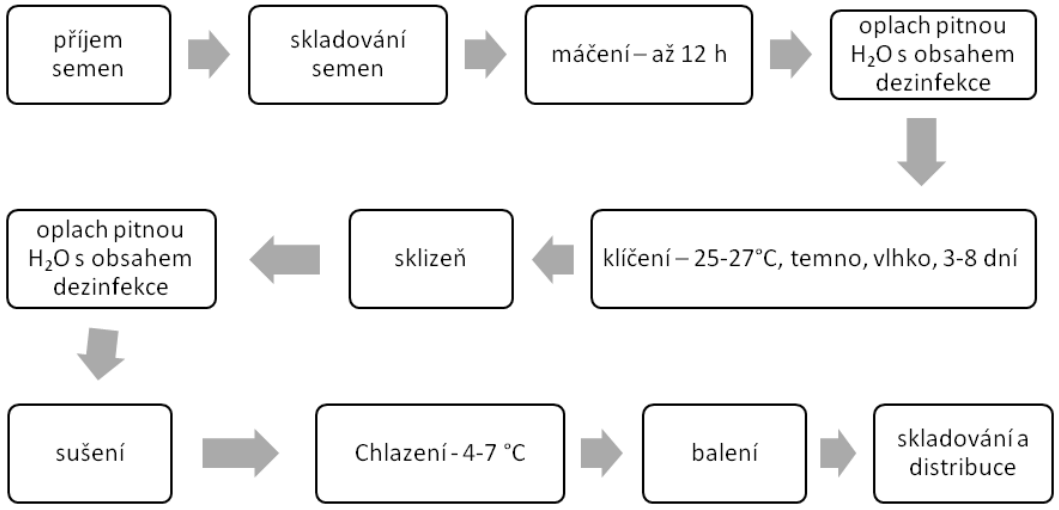
Techniky a opatření, která mají vést k zajištění dlouhé údržnosti potravin a jejich zdravotní nezávadnosti, se od sebe nedají jednoznačně oddělit. V současnosti se při výrobě fresh-cut produktů nepoužívají techniky cílené pouze na eliminaci patogenních mikroorganismů. To je dáno historickým vývojem, kdy nebyly patogenní mikroorganismy na čerstvé produkci vnímány jako hrozba, a tak všechna opatření směřovala jednak k eliminaci nečistot a nežádoucí mikroflóry z původních surovin a dále k potlačení biochemických procesů podílejících se na kažení potravin.

Obrázek 3: Obecné schéma výroby fresh-cut ovoce a zeleniny



Převzato z Fresh-cut fruits and vegetables a Risk posed by pathogens in food of non-animal origin: Part 1 (Lamikanra, 2002; EFSA, 2013).

Obrázek 4: Obecné schéma výroby naklíčených semen



Převzato z Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (1999).

Další opatření (konzervační metody), která mají zamezit prodloužení shelf-life a zajistit zdravotní nezávadnost produktu, se dají rozdělit do dvou skupin podle vstupu do výrobního procesu. První jsou opatření učiněná při příjmu surovin a jejich zpracování, ve druhém případě se jedná o opatření během jejich procesu skladování a distribuce.

3.2.1 Opatření při příjmu suroviny a během jejího zpracování

Zpracovatelé by měli usilovat o příjem surovin od zemědělců dodržujících správnou zemědělskou praxi (GAP), která by měla být zárukou dodání co nejméně kontaminovaných potravin. Čím více je surovina (ovoce, zelenina, semena na klíčení) kontaminována, tím mají mikroorganismy větší šanci na množení, vytváření biofilmů, proniknutí do odumřelých buněčných tkání, a tím obtížnější je možnost jejich eliminace (Sapers, 2001; Rico et al., 2007; Gomez-Lopez et al., 2008; Ayala-Zavala a Gustavo, 2010).

Velký důraz by měl být kladen na znalost původu semen určených ke klíčení, neboť v případě klíčků se ukazuje, že většina patogenů je přítomna právě na samotných semenech. Producenti by nikdy neměli používat semena určená k výsevu, která jsou chemicky ošetřena – je s nimi nakládáno jinak než jako s potravinou. Semena určená ke klíčení nemusejí být na rozdíl od zeleniny a ovoce zpracována ihned, bez problémů mohou být použita až dva roky po jejich dodávce. Proto je třeba během uskladnění zabránit jejich styku s hlodavci.

Během zpracování surovin by teplota neměla převyšovat 12 °C, později pak 4 °C. Nízké teploty jednak zpomalují nežádoucí fyziologické procesy, ale také zabraňují množení nežádoucí mikroflóry.

Při zpracování (krájení, sekání) by měly být používány co nejostřejší čepele, které minimálně poškozují tkáň ovoce nebo zeleniny. Poškozená tkáň snadno podléhá nežádoucím biochemickým procesům a je ideální živnou půdou pro mikroorganismy. Bylo prokázáno, že ostré nástroje mohou zlepšit mikrobiologickou kvalitu produktů (Ahvenainen, 1996).

Dalším krokem zpracovatelského procesu je oplach suroviny, který je z mikrobiálního hlediska nejdůležitější. Standardem by mělo být používání zdravotně nezávadné vody. Teplota vody by dále měla být co nejnižší, avšak rozdíl teplot mezi produktem a vodou by neměl být příliš výrazný, neboť při velkém rozdílu může docházet k internalizaci mikroorganismů do tkání (Harris et al., 2003).

Do vody se často přidávají různá antimikrobiální agens, jejichž hlavním účelem je zamezení množení mikroorganismů ve vodě, vedlejším efektem je i snížení počtu mikroorganismů na samotné produkci.

Všechny komerčně dostupné přípravky jsou schopné pouze částečné eliminace mikroorganismů. Za tradiční a také nejúčinnější antimikrobiální agens je považován chlor ve formě hypochlorové kys. (HOCl) a prostředky na jeho bázi. Chlor je obvykle používán v koncentracích od 50 do 200 ppm a kontaktní doba s produktem je v průměru 1–2 minuty. Účinnost chloru je ovlivněna množstvím přítomných nečistot ve vodě, jejím pH a teplotou (Parish et al., 2003). Nicméně četné studie ukazují, že chlor a jeho sloučeniny nemají výrazný vliv na snížení počtu patogenních mikroorganismů (Adams et al., 1989; Beuchat, 1999). Výraznější pokles patogenních mikroorganismů při použití chloru byl zaznamenán až ve vyšších koncentracích, např. po ošetření klíčků vojtěšky chlorem v koncentraci 500 ppm došlo k redukci salmonely o 3,4 log KTJ; při použití koncentrace 2000 ppm nebyla salmonela detekovatelná (Beuchat a Ryu, 1997). Avšak na ostatních testovaných produktech (jablka, rajčata, salát) způsobila nejvyšší použitá koncentrace snížení počtu salmonel pouze o 2,3 log KTJ/cm^2.

Použití chloru a jeho sloučenin ve fresh-cut produkci začíná být vzhledem k jeho možným negativním účinkům na zdraví člověka omezováno, v některých zemích – Nizozemsko, Belgie a Švýcarsko je použití chloru ve fresh-cut produkci zcela zakázáno (Rico et al., 2007).

Alternativními antimikrobiálními komerčně využívanými prostředky jsou jód, kvarterní amoniové soli, kyseliny, zásadité látky, ozón, peroxid a další (Rico et al., 2007).

První dva uvedené prostředky nejsou schváleny pro přímý kontakt s potravinami, omezeně jich lze využít k desinfekci slupek ovoce a zeleniny, které se budou během výrobního procesu loupat (Ayala-Zavala a Gustavo, 2010). Organické kyseliny (jako fytová, mléčná a citronová kys.) se ukazují být dobrými látkami potlačující růst psychrotropní a mezofilní mikroflóry na čerstvých produktech, a to především díky schopnosti snížit pH a negativnímu efektu na funkci membránového transportu mikroorganismů. Snížení počtu patogenních mikroorganismů např. *S. typhi*, *Yersinia enterolytica*, *Campyobacter jejuni* o 75–100 % bylo pozorováno po aplikaci různých kyselin (octová, citronová) např. na papáje nebo pórku. Problémem ošetření je negativní vliv na organoleptické vlastnosti výsledného produktu (Parish et al., 2003). Většina ovoce některou z daných kyselin obsahuje, a přirozeně tak zajišťuje částečnou mikrobiální ochranu produktů. Organické kyseliny kromě antimikrobiální funkce působí antioxidačně, a tedy zamezují hnědnutí produktů (Rico et al., 2007).

Zásadité látky (hydroxid sodný, draselný, soda) jsou také velmi účinné při redukci mikroorganismů (např. 90 až 99% snížení salmonel a *E. coli* (Parish et al., 2003). Překážkou k jejich širšímu využití je především jejich pH a problematická likvidace (Ayala-Zavala a Gustavo, 2010).

Ozón a peroxid jsou posledními dvěma významnějšími prostředky. Oba lze využívat jednak k dezinfekci vody, ale i v plynné formě. Restaino (1995) pozoroval, že ozon ve vodě v koncentraci 20 ppm působí baktericidně proti patogenům jako *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Yersinia*, *Listeria* (Parish, 2008). Ozón má smíšený vliv na shelf-life produktů. Beuchat et al (1998) pozoroval redukci počtu mikroorganismů a prodloužení shelf-life u jablek, bobulových plodů, švestek. Oproti tomu Parish (2003) udává poškození banánů po jejich ošetření ozónem. Širšímu rozšíření ozónu ve fresh-cut produkci brání jeho korozivní vlastnosti a vyšší nároky na zajištění bezpečnosti pracovníků při práci s ním (Ayala-Zavala a Gustavo, 2010). Podobné výsledky, výhody a nevýhody skýtá i používání peroxidu vodíku.

Po oplachu nakrájeného produktu následuje aplikace (máčením, rozprašováním, vakuovou infiltrací) dalších prostředků vedoucí k prodloužení shelf-life. Jedná se především o látky zpomalující biochemické procesy, a to antioxidanty a látky udržující texturu výsledného produktu. Tyto látky však nemají výrazný vliv na mikrobiální populaci vyskytující se na produktech.

3.2.2 Opatření po zpracování a při skladování fresh-cut produktů

Posledními produkčními kroky, ve kterých lze ovlivnit dobu úchovy fresh-cut produktů a klíčků, je balení a skladování produktů. Přetrvávajícím trendem ve fresh-cut produkci je balení produktů do modifikované atmosféry (MAP), která především potlačuje tkáňové dýchání, a zpomaluje tak dozrávání (kažení) produktů (Sandhya, 2010).

Balení produktů do modifikované atmosféry bylo dříve považováno za významné z hlediska mikrobiologické kvality fresh-cut produktů. Četné výzkumy však dokazují, že MAP nemá na mikrobiologickou kvalitu produktů výrazný vliv, někdy může být spíše kontraproduktivní (Zagory, 1999; Sapers, 2001; Rosnes et al., 2003).

Celkově nejdůležitějším opatřením v celém procesu výroby fresh-cut produktů je chladírenská teplota a její udržování nejen v průběhu skladování, ale i v průběhu celého zpracovatelského procesu a distribuce, neboť i krátká doba nárůstu teploty může vést k množení nežádoucích mikroorganismů a urychlení nežádoucích fyziologických procesů.

Všechny dostupné komerční prostředky, jež mají eliminovat nežádoucí mikroorganismy v produktech, jsou účinné maximálně z 99 % (Zagory, 1999). Některé z nich mohou mít negativní vliv na zdraví člověka a životní prostředí. Výrobci jsou tak legislativně, ale také spotřebiteli žádajícími zdravé potraviny bez syntetických aditiv nuceni hledat nové „zdravější“ alternativy těchto konzervantů. Pro fresh-cut produkty se za nadějné alternativy

považují bifidobakterie, a dále biologicky aktivní přírodní látky – především pak silice, jejichž vlastnosti byly popsány v kapitole 1.3. Jejich účinky na čerstvých produktech budou diskutovány v rámci výsledkové části práce.

Pokud bychom měli shrnout současnou situaci týkající se zajištění udržitelnosti a zdravotní nezávadnosti fresh-cut produktů a klíčků, dojdeme k následujícím závěrům. K zabránění rychlému mikrobiálnímu znehodnocení produktů je třeba, aby fresh-cut produkty a klíčky byly vyráběny z co nejkvalitnějších surovin (málo poškozené, známý původ apod.). Během zpracování by mělo být co nejvíce eliminováno zbytečné poškození tkání (např. tupými noži). Po celou dobu zpracování by nemělo dojít k překročení doporučených výrobních teplot (obr. 3 a 4). Také je třeba důsledně dodržovat GMP a GHP a využívat vhodných kombinací šetrných konzervačních metod.

4. Metodika

4.1 Pěstební pokusy s rostlinami z čeledi *Lamiaceae*

Pro pěstební pokusy byly vybrány takové rostliny, jejichž silice jsou známy obsahem látek s vysokou antimikrobiální účinností (Burt, 2004) a zároveň je možné je pěstovat v podmínkách ČR. V saturejkách, tymiánech a dobromyslích byl sledován obsah tymolu, karvakrolu a p-cymenu, v bazalce pak obsah eugenolu a linaloolu.

4.1.1 Charakteristika pěstební lokality

Všechny pěstební pokusy s vybranými rostlinami z čeledi *Lamiaceae* byly založeny v pokusné stanici KRV v Uhříněvsi. Pozemky stanice se rozkládají na 15,7 ha, a to ve dvou lokalitách – Uhříněves 12,5 ha a Hájek 2,3 ha. Pozemky se nacházejí v oblasti řepařského výrobního typu a řepařsko–pšeničného subtypu. Průměrná nadmořská výška činí 295 metrů. Průměrná denní teplota vzduchu dosahuje 8,3 °C a průměrná teplota ve vegetačním období je 14,6 °C. Nejteplejším měsícem je červenec s průměrnou teplotou vzduchu 18,2 °C. Průměrný roční úhrn srážek činí 575 mm, z toho na vegetační období duben–září připadá celkové množství srážek 380 mm. Půda se řadí mezi hnědozemě do skupiny jílovitých hlín. Hloubka ornice činí 32 cm, humusový horizont dosahuje hloubky 70 cm a jeho profil je mírně až středně humózní s neutrální reakcí v celém horizontu. Hladina spodní vody se nachází přibližně v metrové hloubce a má trvalý charakter.

4.1.2 Pěstební pokusy v prvním a druhém roce

Účelem prvního a druhého roku pěstebních pokusů bylo vybrat takové odrůdy bazalky, dobromysli, tymiánu a saturejky, které poskytují silice s nejvhodnějším složením z hlediska antimikrobiální aktivity a zároveň s vysokou výtěžností.

V maloobchodní síti proto bylo zakoupeno vždy několik odrůd od každého z výše uvedených druhů. Přehled odrůd, dodavatele a číselné označení udává tabulka 3. Pozemek (18 x 4 m) byl před samotným zasetím rostlin zbaven kamenů, které by mohly negativně působit na vzcházení rostlin, a také odplevelen. Semena byla vyseta ručně v květnu do 2–4 řádků v závislosti na množství semen v sáčku. Po zasetí byl pozemek zakryt bílou netkanou textilií, aby se v co nejvyšší míře podpořilo vzcházení rostlin. Do doby první sklizně byl vzcházející porost pravidelně kontrolován, v případě potřeby plečkován a mulčován. Netkaná textilie byla ze vzrostlých rostlin odstraněna 15. června.

Ve vegetačním období bylo provedeno šest sklizní (14. a 27. 7., 12. a 26. 8. a 8. a 23. 9.). V rámci každé sklizně byl sledován obsah silice a její složení.

Ve druhém roce byly pro výsev vybrány rostliny od dalších dodavatelů (tabulka 4), rostliny byly tentokrát vysety do tří řádků ve vzdálenosti 30 cm od sebe na parcelky o rozloze 4 x 1 m. Na každou parcelku bylo ručně vyseto 100 semen. Semena od každého dodavatele byla vyseta ve 4 opakováních. Vstupy do porostů byly obdobné jako v prvním roce pěstování. Ve druhém roce pěstování byla provedena pouze jedna sklizeň, a to v říjnu.

Tabulka 3: Rostliny vybrané pro první rok polních pokusů (2011)

druh	dodavatel	číslo šarže
Ocimum basilicum	Gardenson	46
Ocimum basilicum citronová	Kiepenkerl	5171
Ocimum basilicum chianti	Kiepenkerl	5639
Ocimum basilicum salátová	Semo	0-0040-99073-01
Ocimum basilicum širokolistá	Semo	8-0040-90506-01
Origanum majorana	Kiepenkerl	5194
Origanum vulgare	Kiepenkerl	5197
Origanum vulgare	Semo	0-0040-99224-01
Origanum vulgare	Seva Flora	7020
Origanum vulgare	Seva seed	7-0041-90203-01
Origanum vulgare řecké seno	Semo	0-0040-99068-01
Satureja hortensis	Kiepenkerl	5176
Satureja hortensis	Semo	0-0040-99071-01
Satureja hortensis	Semo	9-0040-99197-01
Satureja hortensis	Seva seed	9-0041-20213-01
Thymus vulgaris	Gardenson	48
Thymus vulgaris	Nohel Garden	8-0051-69478-01
Thymus vulgaris	Semo	8-0041-90218-01
Thymus vulgaris	Seva seed	9-0041-L0215-01

Tabulka 4: Rostliny vybrané pro druhý rok polních pokusů (2012)

druh	dodavatel	číslo šarže
Thymus vulgaris	Quality seeds	115213
Thymus vulgaris	Nohelgarden	1-0051-69128-01
Thymus vulgaris	FloraSelf	P1T

4.1.3 Pěstební pokusy v roce 2013

Ve třetím roce bylo na základě předchozích výsledků vybráno osivo od firem Semo, Gardenson a SevaSeed (tabulka 5) a dále bylo zařazeno i osivo od německého dodavatele Pharmasaat GmbH. Osivo bylo zaseto secím strojem na pozemek o výměře 18 x 30 metrů. Jako předplodina byla zvolena slunečnice. V rámci předseťové přípravy byl pozemek 29. 11. 2012 zorán a v termínech 5., 12. a 17. 4. 2013 byla provedena podmínka a urovnání pozemku.

V dubnu (18. 4.) byl proveden přímý výsev na parcelky o rozměrech 2 x 5 m, každá parcelka měla 4 řádky ve vzdálenosti 30 cm od sebe. Osivo od každého výrobce bylo zaseto ve třech opakováních. Výsevek na jednu parcelku byl 0,5 g pro oregano, 1 g pro tymián a 3 g pro saturejku. Celkem bylo na jednu parcelku vyseto při HTS pohybující se v rozmezí 0,25 (tymián) až 0,65 (saturejka) okolo 4000 semen. Pokus byl založen metodou úplně znárodněných bloků (obr. 5). Za účelem eliminace okrajového efektu byl celý blok obset jinými plodinami (obr. 5). V průběhu pokusu byla sledována vzcházivost porostu, výtěžnost

a složení silice. Vstupy do porostů byly obdobné jako v předchozích letech. U víceletých druhů byla provedena jedna ruční sklizeň, a to 29. 7. 2013. Jednoletá saturejka zahradní byla sklizena dvakrát (29. 7. 2013 a 7. 10. 2013).

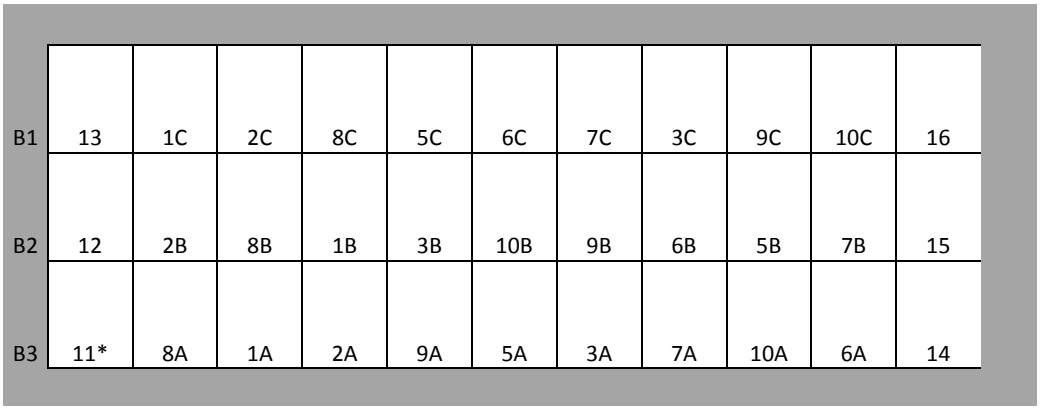
Tabulka 5: Rostliny vybrané pro pěstební pokusy ve třetím roce (2013)

druh	dodavatel	číslo šarže	označení
Satureja hortensis	Semo	1-0040-99244-01	1A, 1B, 1C
Satureja hortensis	Pharmasaat	ShSoH631	2A, 2B, 2C
Satureja hortensis	Gardenson	45059	3A, 3B, 3C
Satureja montana	Pharmasaat	SmAAk630041	8A, 8B, 8C
Satureja montana	SevaSeed	0-0041-Lo215-01	5A, 5B, 5C
Origanum vulgare	Semo	2-0040-99262-01	6A, 6B, 6C
Thymus vulgaris	Pharmasaat	TvDJH7631	7A, 7B, 7C
Origanum vulgare	Pharmasaat	Ovo9630	9A, 9B, 9C
Origanum vulgare	SevaSeed	9-0041-Lo-203-01	10A, 10B, 10C

4.2 Sušení rostlin

Sušení rostlin ve všech výzkumných letech probíhalo na půdě Výzkumné stanice v Uhříněvsi. Bezprostředně po sklizni byly rostliny umístěny v plastových přepravkách na půdu, kde se nechaly přirozeně uschnout. Poté byly rostliny převezeny na ČZU, kde byly postoupeny dalšímu zpracování.

Obrázek 5: Uspořádání pěstebních pokusů v roce 2013



*obsev: 11, *Petroselium envipur*, 12, *Melissa officianalis*, 13, *Origanum majorana*, 14, *Allium schoenoprasum*, 15, *Petroselinum crispum* convar. vulgare, 16, *Ocimum basilicum*

4.3 Kvantitativní a kvalitativní hodnocení silic

Silice z usušených rostlin byly získány metodou hydrodestilace v Clevengerově přístroji (ČL, 2009), destilace trvala 2,5 hodiny. Výtěžnost silic byla zjištěna porovnáním hmotnosti sušiny a hmotnosti vydestilované silice. V prvním roce byla vzhledem k nedostatku rostlinného materiálu každá varianta pokusu destilována pouze jednou. Ve zbývajících letech byly provedeny tři nezávislé destilace každého vzorku.

Kvalitativní hodnocení silic zahrnovalo jednak zjištění chemického složení silic pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS) na základě porovnání hmotnostních spekter a relativních retenčních indexů s databází Národního institutu standardů a technologické knihovny USA (NIST 05) a komerčními standardy (Sigma-Aldrich, ČR): p-cymen, tymol, karvakrol, eugenol. Analýza silic byla provedena na přístroji Varian 450-240 (Varian, Santa Clara, CA, USA), charakteristika analýzy je uvedena v tabulce 6.

Dále bylo zjišťováno relativní zastoupení identifikovaných látek v silici, a to za pomoci plynového chromatografu s plameno-ionizačním detektorem Agilent 6890 GC-FID (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Charakter analýzy opět uvádí tabulka 6.

Relativní podíly jednotlivých složek v silicích byly zjištěny porovnáním plochy píku sledované látky ku celkové ploše všech detekovaných píků. Uváděné zastoupení sledovaných látek představuje průměrné hodnoty ze tří destilací, tj. ze tří biologických opakování (kromě dat z prvního roku). Silice byla vždy analyzována v koncentraci 1 µl/ml hexanu.

Tabulka 6: Podmínky analýzy silic

	GC/MS	GC/FID
kolona	VF-5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, (Varian, Santa Clara, CA, USA)	RTX-5 20 m x 0,18 mm x 0,2 µm (Restek, Bellefonte)
fáze	5% fenylmetylpolysiloxan	difenyl dimetyl polysiloxan
nosný plyn, průtok	He, 1 ml/min.	N2, 1 ml/min.
nástřik	1 µl, split 1 : 50	1 µl, split 1 : 50
teplota nástřiku	250 °C	250 °C
teplotní program	50°–250 °C, 3 °C/min., 250 °C po dobu 10 min.	50°–250 °C, 3 °C/min., 250 °C po dobu 10 min.

4.4 Testy antimikrobiální aktivity silic

4.4.1 Testování antimikrobiální aktivity silic v plynné fázi

Cílem práce bylo najít vhodnou metodu ošetření minimálně zpracovaných produktů plynnou fází silice. Metodika pokusu se proto vyvíjela a pozměňovala s ohledem na dosažené výsledky testů a charakter produktu. Způsoby ošetření jednotlivých produktů byly koncipovány tak, aby je v případě pozitivních výsledků bylo možné začlenit do současných výrobních postupů minimálně zpracovaných potravin. Ve zkoušených postupech byl kladen důraz na princip překážkového efektu, tedy užití několika konzervačních prostředků dohromady. Antimikrobiální aktivita silic byla v experimentech kombinována především s fyzikálními konzervačními metodami jako nízký tlak, teplota apod. Možné kombinace fyzikálních konzervačních metod a plynné fáze silic byly (vzhledem k relativně vysokým nákladům na *in vivo* testy) před samotnými testy v minimálně zpracovaných potravinách testovány *in vitro*. Testované koncentrace vybraných silic vycházely jednak z předchozích screeningových *in vitro* testů (Nedorostova et al., 2011; Kloucek et al., 2012) (příloha 1) a dále z průběžně dosažených výsledků v *in vitro* testech v kombinaci s jinou konzervační metodou. Testy antimikrobiální aktivity silic byly vzhledem k nedostatku vlastních silic v prvním a druhém roce experimentů prováděny za pomoci zakoupených silic oregana, hřebíčku, skořice a voňatky citronové (dále jen lemongrass). Z vlastní produkce byla k testování použita silice saturejky zahradní a zavinutky.

4.4.1.1 Testované silice

Ve testech byly použity silice **oregana** (64,5 % karvakrol, 5,2 % p-cymen a 2,9 % tymol), **hřebíčku (**82,3 % eugenol, 14,4 % β-karyofylen), **lemongrass** (45,34 % citral, 33,5 % verbenol, 4,0 % nerol, 3,3 % neryl acetát), a **skořice (**73,1 % cinnamaldehyd, 5,0 % limonen,

5,0 % linalool, 3,7 % cinamyl acetát, 3,5 % eugenol) od společnosti Biomedica s.r.o., CZ, ***Monarda media* Willd**. (43,3 % tymol, 15,8 % p-cymen, 12,3 % karvakrol), **saturejka zahradní** (46,2 % karvakrol, 0,13 % tymol, 3,9 % p-cymen) – směsný vzorek všech odrůd z produkce roku 2013 v Uhříněvsi. Složení silic bylo zjišťováno podle výše uvedené metody (kap. 4.3).

4.4.1.2 Testované mikroorganismy

Pokusy byly zaměřeny především na antimikrobiální aktivitu silic proti mikroorganismům způsobujícím průjmová onemocnění. V testech byly používány následující mikroorganismy: *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 a *Escherichia coli* ATCC 25922 zakoupené od firmy Oxoid (Brno, CZ).

4.4.1.3 *In vitro* testy antimikrobiální aktivity silic v kombinaci s atmosférickým a nízkým tlakem

In vitro byla ověřena antimikrobiální aktivita silic v plynné fázi v kombinaci s nízkým tlakem, který byl vybrán vzhledem k jeho možnému použití při balení, chlazení/sušení (vakuová impregnace) minimálně zpracovaných produktů. Bylo zjišťováno, zda použití nízkého tlaku v kombinaci se silicí sníží možnou dobu ošetření v porovnání s atmosférickým tlakem. Dále bylo ověřeno, zda se v podtlaku sníží MIC silic.

In vitro testy byly provedeny pomocí upravené diskové difuzní metody (Kloucek et al., 2012) následovně:

Na Petriho misky (průměr 6 mm) obsahující 5 ml agaru (Mueller Hinton, Oxoid Brno) a 20 ml vzduchu bylo naneseno 20 µl inokula, které bylo rovnoměrně rozetřeno po celé ploše agaru. Na filtrační papír stejného průměru jako vnitřní průměr víčka misky byla nanesená silice rozpuštěná v 150 ml ethylacetátu. Po odpaření ethylacetátu (cca 30 s) byl filtrační papír umístěn na spodní stranu víčka, které bylo přiloženo na spodní část misky inokulované bakterií. Uzavřené Petriho misky byly vloženy dnem vzhůru do dvou exsikátorů; z jednoho byl odsán vzduch, až vzniklo hrubé vakuum (1,7 kPa), ve druhém byl ponechán atmosférický tlak (101,3 kPa).

Inokulované Petriho misky byly takto v exsikátorech ponechány po dobu 5, 15, 30, 60 a 120 minut. Po uplynutí daného času byly Petriho misky z exsikátorů vyňaty a byl odstraněn filtrační papír se silicí. Bakteriální růst byl hodnocen po 24 hodinách inkubace misek

při 37 °C. Bylo porovnáváno, zda použití nízkého tlaku v kombinaci se silicí sníží možnou dobu ošetření v porovnání s atmosférickým tlakem.

Všechny silice byly testovány proti oběma mikroorganismům ve třech opakováních. Jako kontrola byl v testech použit filtrační papír s ethylacetátem. Na Petriho misky bylo nanášeno inokulum o koncentraci 1,5 x 10^8 (0,5 McFarland) připravené v Mueller-Hinton bujónu (MHB) z 24 hodin staré kultury kultivované taktéž v MHB při 37 °C.

Všechny silice byly testovány ve své minimální inhibiční koncentraci (MIC), která byla pro tento účel definována a zjištěna jako minimální koncentrace silice zcela inhibující viditelný růst mikroorganismů, které byly po dobu 24 hodin vystaveny působení jejich par. Nejvyšší testovaná koncentrace byla 512 µl/l.

4.4.1.4 Testování plynné fáze silic na minimálně zpracovaných potravinách

K testování plynné fáze silic byly vybrány klíčky munga, listy baby špenátu a polníčku. Důvodem pro vybrání prvních dvou potravin bylo, že právě konzumace těchto potravin byla příčinou vzniku několika epidemií průjmových onemocnění po celém světě (Olaimat a Holley, 2012). Polníček byl vybrán pro jeho stále vzrůstající spotřebu a popularitu. Dále byla testována rukola. Během prvního pokusu se ukázalo, že uměle inokulovaná *E. coli* na rukole nepřežívá. Tento druh salátů byl proto z dalších pokusů vyjmut.

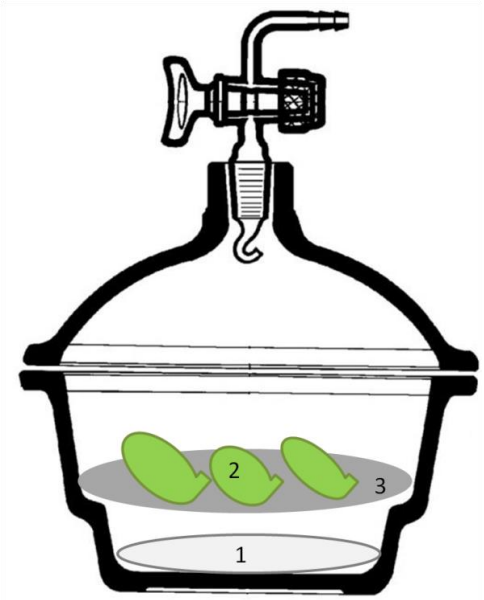
4.4.1.4.1 Testování plynné fáze silic proti *S. enteritidis* na naklíčených semenech mungo (*Vigna radiata*)

V maloobchodní síti byla zakoupena semena fazole mungo v bio kvalitě. Do sterilní baňky bylo odváženo vždy 5 g semen, následně bylo přidáno 45 ml sterilní peptonové vody a 5 ml inokula *S. enteritidis* o koncentraci 1 x 10^8 KTJ/ml, výsledná koncentrace salmonel tedy byla 1 x 10^7 KTJ/ml. V tomto roztoku byla semena máčena po dobu 9–10 h, poté bylo inokulum odstraněno. Následovalo 4denní klíčení semen při teplotě 25–27 °C v temnu. Po naklíčení byla semena ošetřena plynnou fází oreganové silice za nízkého (1,7 kPa) a atmosférického tlaku. Kontrola nárůstu *S. enteritidis* byla ošetřena stejným způsobem bez použití silice. Schéma ošetření udává obrázek 6. Varianty ošetření a množství použité silice udává tabulka 7. Každá varianta byla provedena ve třech opakováních. Počty přeživší *S. enteritidis* a celkový počet mikroorganismů (CPM) byl vyhodnocován bezprostředně a čtvrtý den po ošetření oreganovou silicí kvantitativně pomocí standardní kultivační deskové metody.

Obrázek 6: Schéma ošetření klíčků

1. filtrační papír se silicí
2. klíčky inokulované *S. enteritidis*
3. gáza zabraňující přímému styku klíčků a silice

Obrázek 7: Schéma ošetření baby špenátu



1. filtrační papír se silicí
2. špenátové listy inokulované *E. coli*
3. gázová mřížka

4.4.1.4.1.1 Desková kultivační metoda

Bezprostředně po ošetření byly klíčky rozděleny na dvě poloviny. První polovina byla zvážena a přemístěna do sterilní baňky. K danému množství klíčků byl přidán sterilní fyziologický roztok s přídavkem Tween 80, tak aby výsledný poměr vzorek : fyziologický roztok byl 1 : 9. Vzorek byl následně třepán na třepačce po dobu 10 minut při nejvyšší frekvenci třepání. Z vytřepaného vzorku byl odebrán 1 ml tekutiny a do zkumavek byla připravena ředící řada od 10^{-2} do 10^{-7}. Celkový počet mikroorganismů byl stanovován na plate count agar (PCA, Oxoid, Brno), po inkubaci inokulovaných ploten po dobu 3 dnů při 27 °C. Množství salmonel pak bylo vyhodnocováno na selektivním médiu Salmonella-Shigella agar (Oxoid, Brno), po kultivaci inokulovaných ploten 24 h při 37 °C. Na Petriho misky bylo nanášeno ředění od 10^{-7} do 10^{-3}, vždy ve dvou opakováních.

Tabulka 7: Varianty ošetření naklíčených semen mungo

Varianta	tlak	koncentrace silice [µl/ml vzduchu]	čas ošetření [min.]
A	atm^{+}	1	60
B	↓$^{+}$	1	60
C	atm	1	15
D	↓	1	15
L	atm	1	5*
Z	↓	1	5*
N	atm	0,1	5*
M	↓	0,1	5*
K1	atm	0	60
K2	atm	0	5

+ atm – atmosférický tlak; ↓ - nízký tlak 1,7 kPa

* odpaření silice bylo podpořeno 1min. zahřátím

4.4.1.4.2 Testování plynné fáze silice saturejky a zavinutky proti *E. coli* na listech špenátu (*Spinacia*)

V maloobchodní síti bylo zakoupeno 400g balení špenátových listů. Každý špenátový list byl inokulován 3 x 10 µl *E. coli* o koncentraci 10^7 KTJ/ml (výsledná koncentrace na listu 3 x 10^5 KTJ/list). Dávka inokula byla rovnoměrně rozetřena po celém listu za pomoci sterilní roztěrky a nechala se 20 min. zaschnout ve sterilním prostředí flow boxu. Poté byly vždy 4 listy umístěny na gázovou mřížku a v exsikátoru, na jehož dno bylo bezprostředně před vložením špenátových listů umístěno magnetické míchadlo a filtrační papír obsahující silici saturejky v koncentraci – 128, 64, 32, 16, 8 a 4 µl/l vzduchu (obr. 7). Silice zavinutky byl testována v koncentracích 8 a 4 µl/l vzduchu. Exsikátory byly uzavřeny, z jednoho byl odsán vzduch (1,7 kPa) a ve druhém byl ponechán atmosférický tlak. Exsikátory byly umístěny na 10 min. na plotýnku (70 °C) a bylo zapnuto magnetické míchadlo. Zvýšená teplota a míchání podpořily odpařování silice. Po 10 min. byly exsikátory sundány z plotýnky a dalších 50 min. ponechány zavřené za pokojové teploty. Poté byly listy z nádob vyjmuty, dva z nich byly použity k vyhodnocení účinku silice bezprostředně po ošetření, zbývající dva byly uloženy do sterilních baněk a po 4 dnech skladování (4 °C) postoupeny k vyhodnocení. Kontrolní varianta zahrnovala vždy 4 špenátové listy inokulované *E. coli*, ale dále neošetřené. Množství *E. coli* bylo zjišťováno ve stejné dny jako u ošetřených variant.

Dále bylo ověřeno, zda samotný snížený tlak nebo zvýšená teplota neovlivňuje množství inokulované *E. coli*. Špenátové lisy této kontrolní varianty byly inokulovány *E. coli* a ošetřeny v exsikátorech (viz výše) bez použití silice. Počty přeživší *E. coli* a celkový počet mikroorganismů (CPM) byly vyhodnocovány bezprostředně a čtvrtý den po ošetření silicí ze saturejky a zavinutky kvantitativně pomocí výše popsané standardní kultivační deskové metody, jako selektivní médium byl použit McConkey agar.

4.4.1.4.3 Testování plynné fáze silice oregana proti *E. coli* na listech polníčku (*Valerianella locusta*)

Testování polníčku probíhalo stejným způsobem jako testování špenátu (kap. 4.4.1.4.2). Na polníčku byla testována silice oregana v koncentracích 128, 64, 32, 16, 8 a 4 μl/l vzduchu.

4.5 Senzorické hodnocení minimálně zpracovaných potravin

4.5.1. Senzorické analýza klíčků mungo

Naklíčená semena munga (100 g) byla umístěna na gáze do exsikátoru, tak aby se nedotýkala dna nádoby. Na dno exsikátoru byl vložen filtrační papír s oreganovou silicí. Množství silice odpovídalo koncentraci 226 μl/l vzduchu. K hodnocení byla zvolena koncentrace o polovinu vyšší než koncentrace nejúčinnější varianty ošetření. Klíčky mungo byly dále ošetřeny stejnou koncentrací silice hřebíčku a lemongrass. Ošetřená semena byla přes noc skladována v chladu (4 °C) a druhý den byla podrobena degustačním zkouškám. Naklíčená semena hodnotil panel 11 studentů, kteří absolvovali předmět „Senzorická analýza zemědělských produktů“. Byli tedy proškoleni k provádění degustačních zkoušek. Hodnotitelé byli seznámeni s dotazníkem a poučeni, jak ho vyplňovat. Následně obdrželi 5 g naklíčených semen od každé varianty. Jako neutralizátor chuti mezi každým vzorkem byla použita voda.

Senzorické hodnocení mělo za cíl zjistit, zda mezi vzorky s přídavkem a bez přídavku silic existuje statisticky průkazný rozdíl.

Předlohou dotazníku (příloha 5) byl formulář vytvořený pro degustaci klíčků v jiném experimentu (Troszynska et al., 2006). Celkem bylo v rámci senzorického profilu hodnoceno 19 deskriptorů a to za použití grafické lineární orientované nestrukturované stupnice (100 mm). Hodnocení bylo zaměřeno především na stanovení intenzity dílčích deskriptorů chuti, vůně a konzistence. Jako doplněk bylo zařazeno i hedonické hodnocení, tedy hodnocení příjemnosti některých deskriptorů (např. chuti).

Hodnocení probíhalo v místnosti z velké části splňující normu pro uspořádání senzorického pracoviště (ISO 8589:1998), jednotliví hodnotitelé pouze neměli k dispozici samostatné kóje.

4.5.2 Senzorické hodnocení polníčku a špenátových listů ošetřených silicí

Listy salátů byly ošetřeny nalezenými MIC testovaných silic v atmosférickém tlaku, a to stejným způsobem jako v kapitole 4.4.1.4.2, s tím rozdílem, že listy nebyly inokulovány *E. coli*. Hodinu po ošetření byly listy předány panelu 9 hodnotitelů sestávajících z proškolených pracovníků a studentů ČZU. Každý z nich obdržel 4 listy od každé sledované varianty. Hodnocení probíhalo stejně jako u klíčků mungo. Hodnocené deskriptory byly až na hodnocení dílčích chutí v podstatě stejné (formulář hodnocení příloha 6 a 7). Získané hodnoty byly opět statisticky zpracovány (viz kap 4.6).

4.6 Statistické vyhodnocení dat

Výsledky jednotlivých částí práce byly statisticky vyhodnoceny pomocí statistického softwaru STATISTICA 12 (StatSoft). Byly stanoveny základní popisné statistiky (průměr, směrodatná odchylka). Dále byly pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) zjišťovány statisticky průkazné rozdíly mezi relevantními pokusnými variantami. V případě nedostatku dat, nebyla data statisticky hodnocena.

5. Výsledky a diskuse

Rozdělení kapitoly bude, vzhledem k tomu, že se práce skládá z několika samostatných částí, následující. V prvé řadě budou uvedeny výsledky pěstování rostlin v letech 2011–2013, které budou souhrnně diskutovány. Dále budou uvedeny a diskutovány výsledky *in vitro* testů. Následovat budou výsledky a diskuse k ošetřování klíčků mungo a jejich senzorické zhodnocení. Na závěr budou uvedeny výsledky ošetřování salátů (špenát a polníček) silicí, jejich senzorické zhodnocení a společná diskuse.

5.1 Výsledky polních pokusů z prvního roku pěstování rostlin čeledi *Lamiaceae*

5.1.1 Pěstební pokusy v roce 2011

V prvním roce pokusů bylo zaseto po čtyřech odrůdách saturejky zahradní, dobromysli, tymiánu a bazalky. Dále byla zaseta jedna majoránka (tab. 3). Semena rostlin nevzcházela rovnoměrně, první děložní lístky byly u jednotlivých variant pozorovatelné po 14–25 dnech od zasetí, některé z vybraných druhů rostlin např. *Origanum vulgare* 7020 (Seva Flora) nevzešly vůbec. Pouze 8 odrůd ze všech pěstovaných bylo schopno do poslední sklizně (27.9.) vytvořit zapojený porost.

Problémy se vzcházivostí mohly být způsobeny jednak špatnou vitalitou semen a také značným suchem. Měsíční úhrny srážek v dubnu a květnu se pohybovaly okolo 20 mm pod dlouhodobým průměrem. Zároveň se teploty v těchto měsících pohybovaly 2–3,7 °C nad dlouhodobým normálem (grafy 15 a 16, příloha 4). Dalším problémem se ukázalo zaplevelení pozemku, kdy v prvních týdnech po zasetí nebylo možné rozeznat pěstované rostliny od plevelů a pozemek řádně proplet. U značné části druhů tak nebylo možné provést všechny plánované sklizně (grafy 1–4). Vzhledem k nedostatku dat z jednotlivých sklizní nebylo vhodné provádět podrobné statistické zhodnocení dat. Grafy 1–4 udávají průměr poměrného zastoupení sledovaných látek v silicích jednotlivých druhů rostlin. Tabulka 8 udává průměrnou výtěžnost silic ze vzešlých druhů rostlin.

Tabulka 8: Výběr sledovaných charakteristik pěstovaných rostlin v roce 2011

druh, číslo šarže	označení v grafu	x výtěžnost [ml/kg]	σ	druh, číslo šarže	označení v grafu	x výtěžnost [ml/kg]	σ
Satureja hortensis, 9-0041-20213-01	SH Seva seed	**24,98**	± 3,07	Tymián, 48	TV Gardenson	**8,95**	± 0,2
Satureja hortensis, 5176	SH Kiepenkerl	**13,81**	± 3,24	Tymián, 8-0041-90218-01	TV Nohelgarden	**10,31**	± 1,68
Satureja hortensis, 9-0040-99197-01	SH Semo 1	**20,02**	± 3,21	Tymián, 8-0051-69478-01	TV Semo	**13,17**	± 2,01
Satureja hortensis, 0-0040-99071-01	SH Semo 2	**10,65**	± 2,63	Tymián, 9-0041-L0215-01	TV Seva seed	**9,25**	± na
Origanum majorana, 5194	OM Kiepenkerl	**3,57**	± 2,84	Bazalka citronová	Bazalka citronová	**15,75**	± 5,48
Origanum vulgare, 5197	OV Kiepenkerl	**2,73**	± 1,85	Bazalka chianti	Bazalka chianti	**3,52**	± 1,1
Origanum vulgare, 0-0040-99068-01	OV Semo 1	**15,38**	± na	Bazalka salátová	Bazalka salátová	**4,52**	± 1,3
Origanum vulgare, 0-0040-99224-01	OV Semo 2	**2,07**	± 1,02	Bazalka širokolistá	Bazalka širokolistá	**3,6**	± 1,36

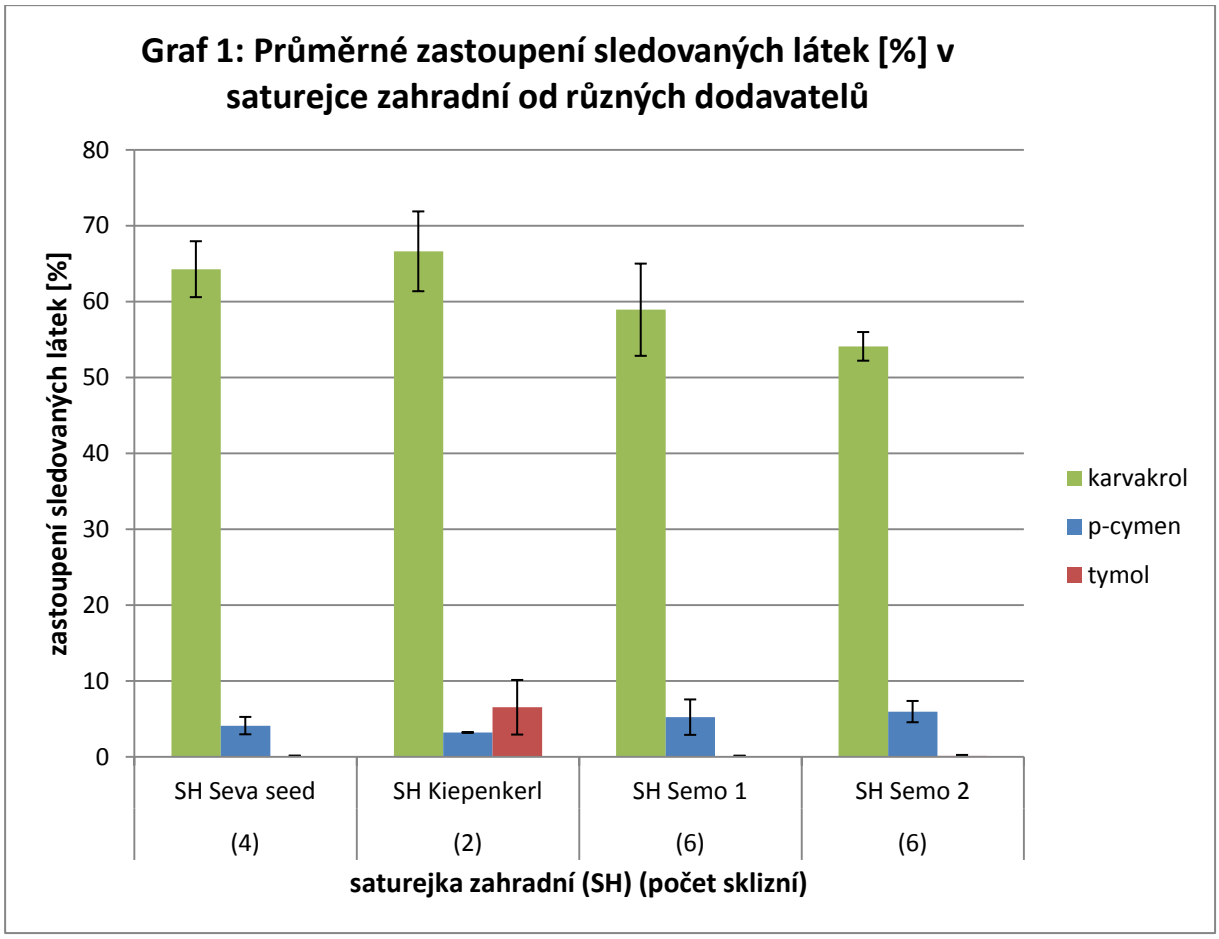
*výtěžnost je vztažena k sušině, x – průměrná výtěžnost, σ-směrodatná odchylka

Největší výtěžnost byla zjištěna u většiny vzešlých saturejek, více jak 15 ml/kg silice dále poskytly rostliny oregana od firmy Semo (Semo1) a bazalka citronová. Nejmenší výnos silice (< 5 ml/kg) byl zjištěn u většiny z pěstovaných oregan a bazalek.

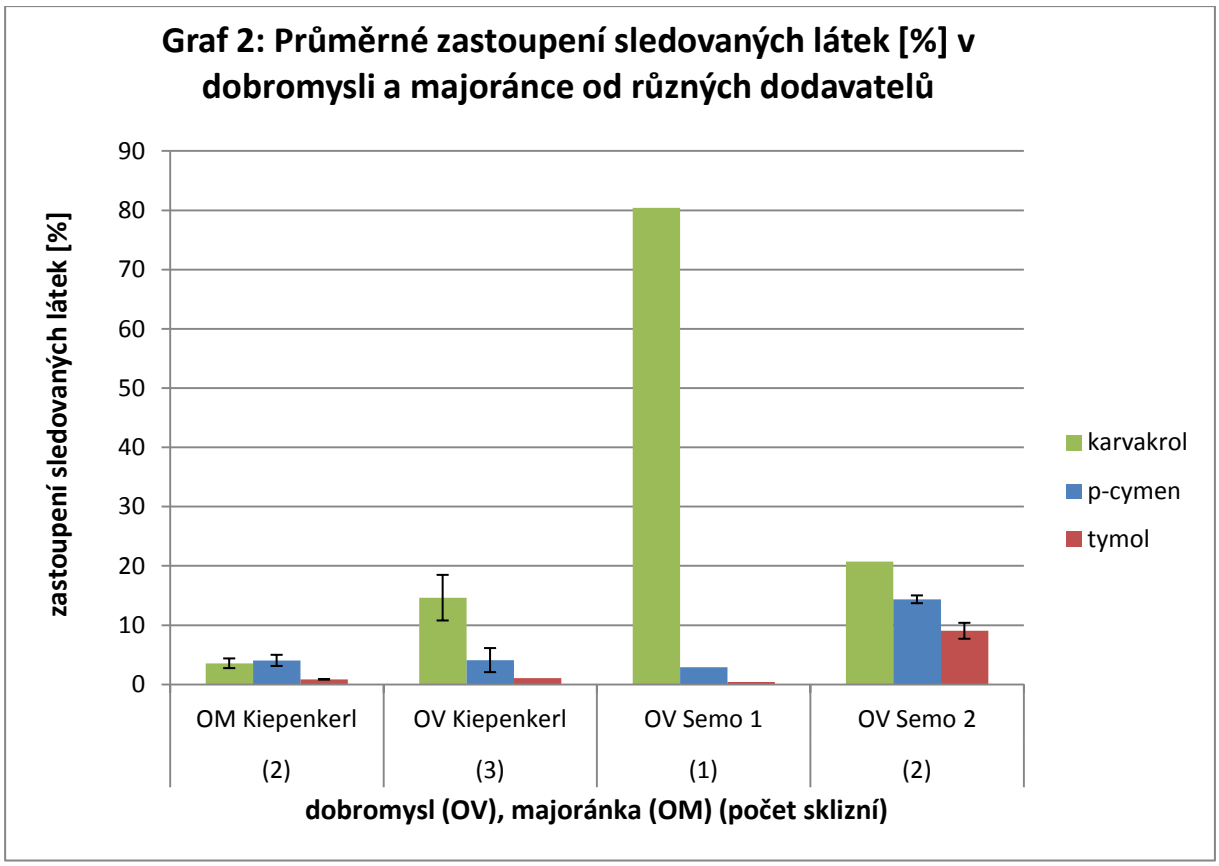
Z hlediska vzcházivosti a rychlosti vytvoření zapojeného porostu byly nejlepší odrůdy saturejky od firmy Semo. Nejdéle trvalo vytvoření zapojeného porostu dobromysli.

5.1.1.1 Složení silic pěstovaných saturejek zahradních

Množství karvakrolu a p-cymenu v saturejkách bylo celkem vyrovnané (54–66 %, 3–6 %), nejvíce se rostliny lišily v množství tymolu, kdy pouze saturejka od Kiepenkerl obsahovala více než 1 % této látky, tato varianta vykázala druhou nejhorší výtěžnost (tab 8). Nejlepší výtěžnost 24 ml/kg byla zjištěna u saturejky od firmy Seva seed a Semo.



*úsečky v grafu 1 a 2 znázorňují směrodatnou odchylku

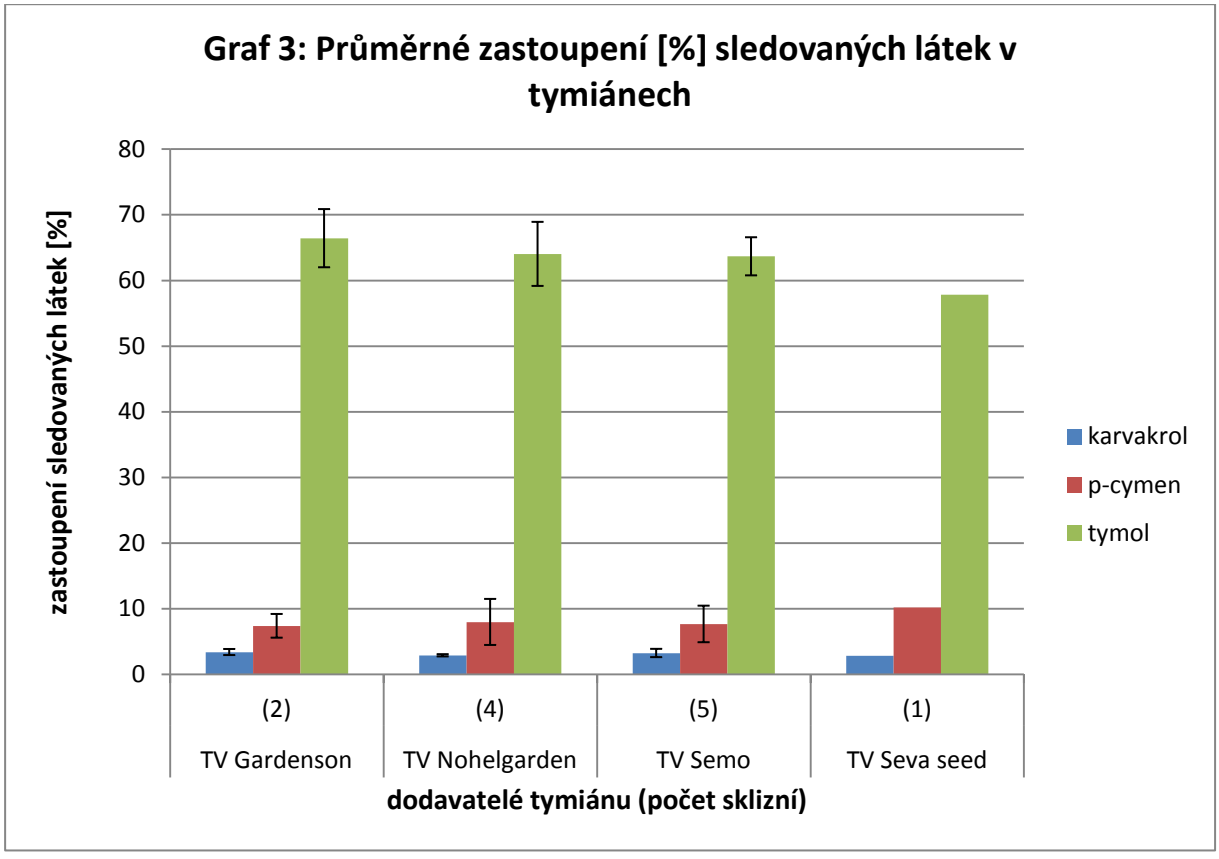


5.1.1.2 Složení silic pěstovaných oregan a majoránky

Majoránka kromě nízké výtěžnosti (tab. 8) obsahovala i malé množství sledovaných látek v poměru k ostatním látkám obsaženým v silici (graf 2), z dalších pokusů proto byla vyřazena. Nejvíce karvakrolu (80 %) a největší výtěžnost byla sledována u dobromysli od firmy Semo (Semo 1, graf 2), tuto rostlinu však bylo možné sklidit pouze jednou.

5.1.1.3 Složení silic pěstovaných tymiánů

Z grafu 3 vyplývá, že nejvitálnější byly porosty tymiánů od firmy Nohel Garden a Semo (viz počet sklizní), složení účinných látek a výtěžnost (tab. 8) byly obdobné u všech sledovaných variant.

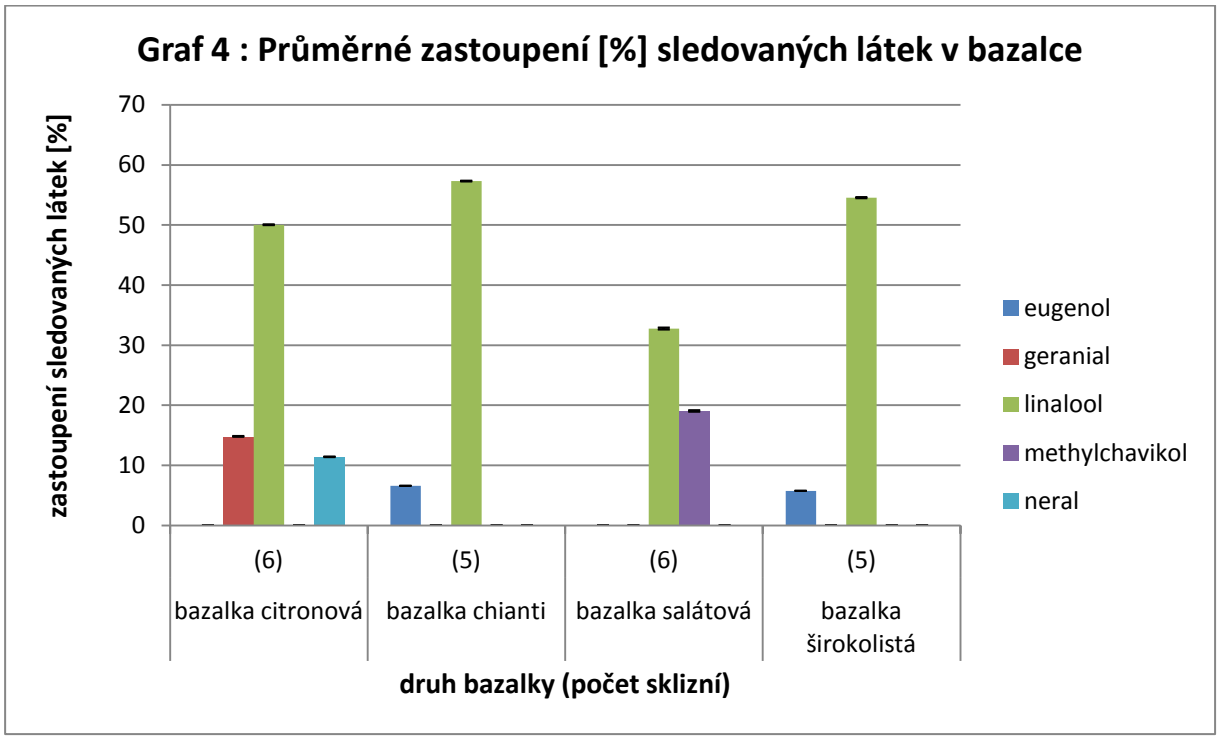


*úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku

5.1.1.4 Složení silic pěstovaných bazalek

Hlavní sledovanou látkou u bazalek byl linalool, jeho množství v rostlinách od různých dodavatelů kolísalo v rozmezí 32–63 %. Bazalka citrónová dále ve významnějším množství obsahovala neral a geranial. Bazalka salátová obsahovala 19 % methylchavikolu. Pouze dvě

ze sledovaných bazalek obsahovaly eugenol. Nejlepší výtěžnost prokázala bazalka citronová nejhorší pak bazalka chianti (tab. 8).



*úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku

5.1.2 Pěstební pokusy v roce 2012

Ve druhém roce pěstování byly vysety tymiány od tří dodavatelů (tab. 9). Byly zasety i tři odrůdy saturejky horské a zahradní, údaje o složení jejich silic a výtěžnosti zde nejsou vzhledem ke ztrátě části dat prezentovány.

Během vzcházení rostlin se opět jako velký problém ukázalo zaplevelení pozemku, kdy nebylo možné spolehlivě rozeznat mladé rostliny tymiánu od plevele a pokusnou plochu řádně proplet. Značné zaplevelení pozemku a sucho v květnu a červnu (graf 15, příloha 4) mělo vliv na nízkou vzcházivost rostlin (36–41 %) a ve výsledku i výnos silice. Průměrný výnos jednotlivých tymiánů udává tab. 9, průměrné zastoupení silic udává graf 5.

Tabulka 9: Průměrná výtěžnost silic pěstovaných v roce 2012

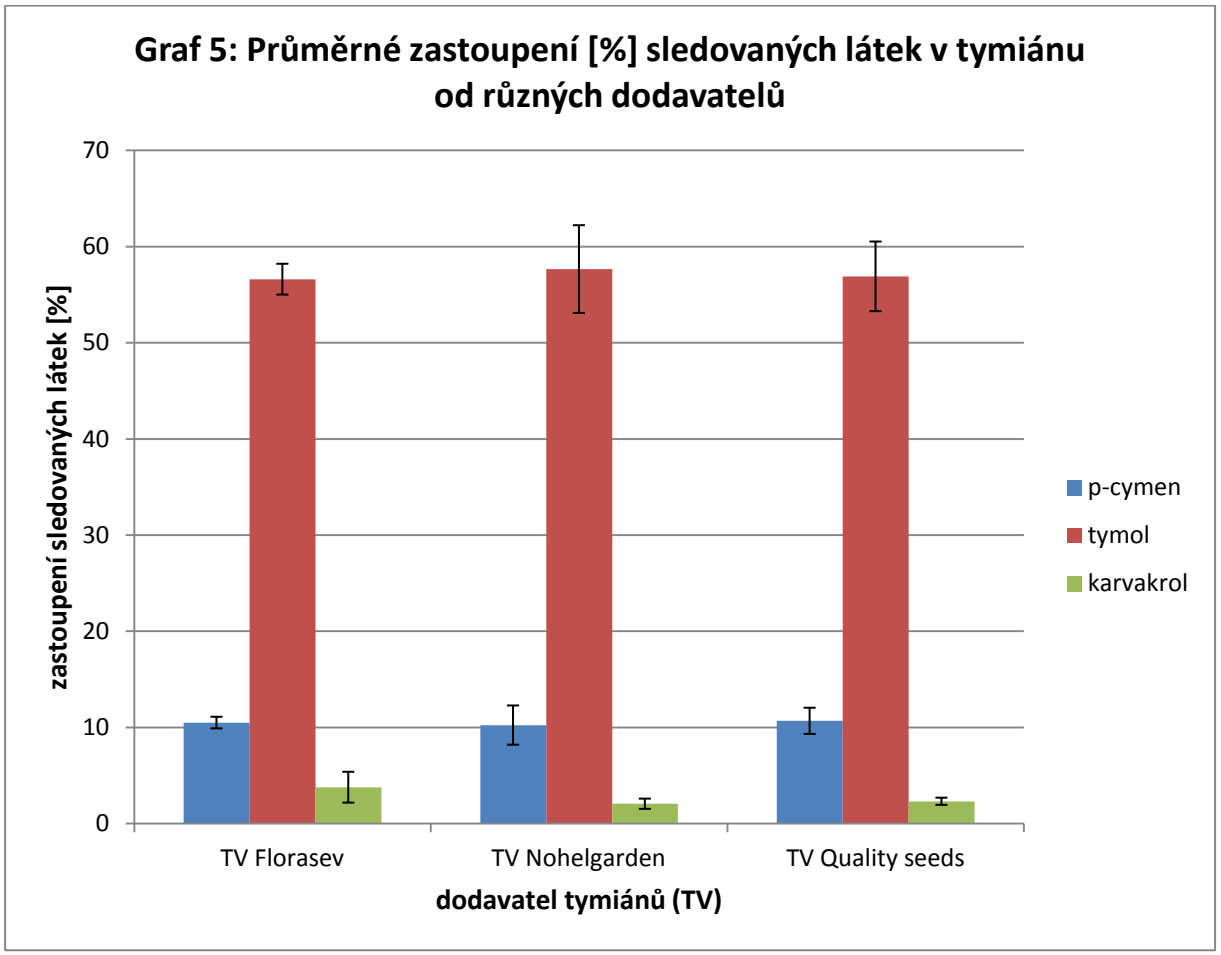
průměrná výtěžnost silic [%] z tymiánu*

Floraself			Nohelgarden			Quality seeds		
x		σ	x		σ	x		σ
16,75	±	1,29	17,25	±	4,56	16,58	±	3,04

* výtěžnost je vztažena k sušině, x – průměrná výtěžnost, σ-směrodatná odchylka

Mezi výtěžností a složením silice pěstovaných tymiánů nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly ($p < 0,01$). Výtěžnost silice se pohybovala okolo 17 ml/kg, množství

tymolu kolísalo od 56 do 57,5 %, karvakrolu okolo 2,5 % a p-cymenu okolo 10 %. Všechny pěstované tymiány vykázaly vyrovnanou výtěžnost a velice podobné složení silice.



*úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku

5.1.3 Pěstební pokusy v roce 2013

Celková nejlepší výtěžnost silic byla zjištěna u saturejky horské a tymiánu (28–37 ml/kg) (tab 10). Nejmenší výtěžnost byla tradičně pozorována u všech pěstovaných dobromyslí (3,8 – 4,1 % ml/kg). Mezi výtěžnostmi silic všech rostlin ($p < 0,001$), ale i mezi jednotlivými druhy saturejky (tab. 11) byly prokázány statisticky významné rozdíly. Z grafu 6 je vidět, že nejlépe vzcházela saturejka od firmy Semo a Pharmassat, nejhůře vzcházelo oregano, což koresponduje i s nízkou výtěžností silice. Tymián i přes svoji relativně nízkou vzcházivost v porovnání se saturejkou prokázal nejvyšší výtěžnost silice. Průměrné zastoupení sledovaných účinných látek v rostlinách udávají grafy 7 a 8.

Tabulka 10: Výtěžnost silic rostlin pěstovaných v roce 2013

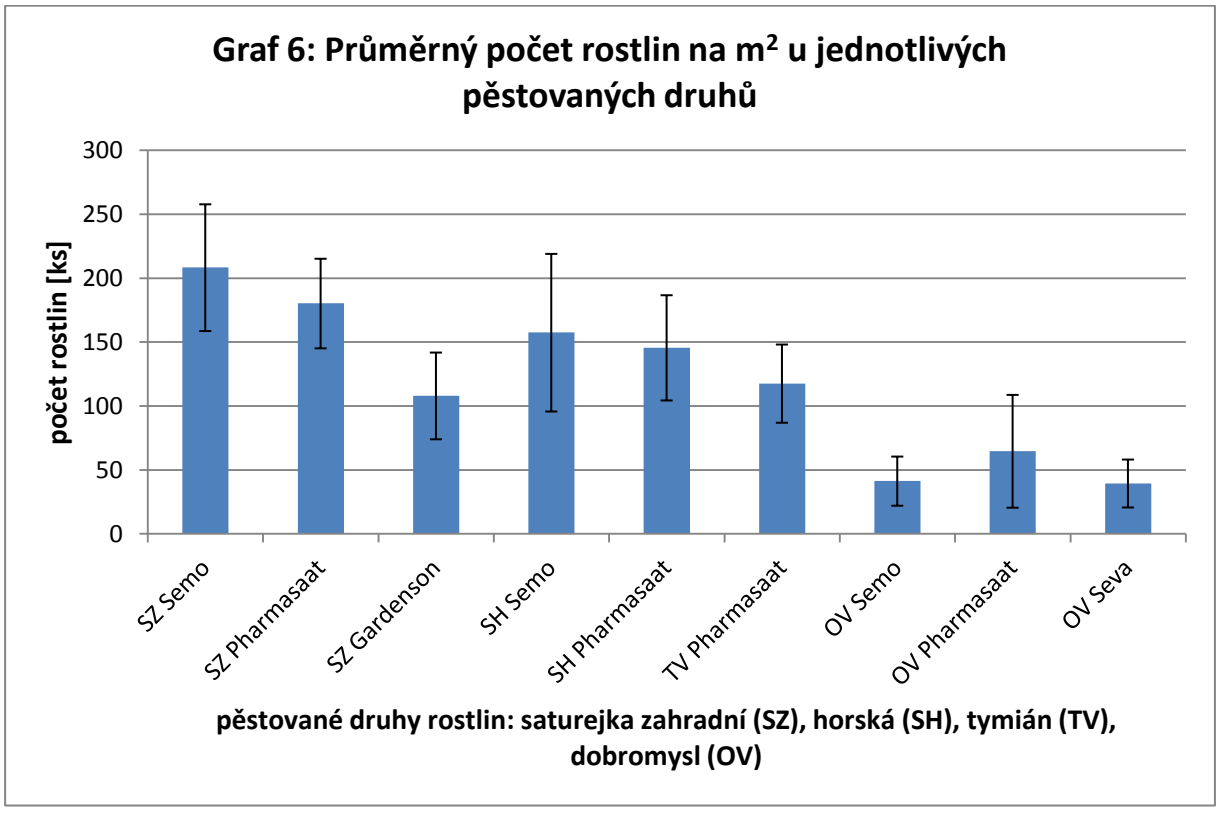
rostlina	x výtěžnost [ml/kg]		σ	rostlina	x výtěžnost [ml/kg]		σ
OV Seva	4,16	±	1,80	SM Semo	13,30	±	2,16
SZ Semo	15,58	±	3,01	OV Semo	4,16	±	1,08
SZ Pharmasaat	22,74	±	5,49	TV Pharmasaat	28,82	±	8,54
SZ Gardenson	10,69	±	3,38	SH Pharmasaat	37,02	±	7,57
OV Pharmasaat	3,82	±	0,88				

OV – *Origanum vulgare*, SZ – *Satureja hortensis*, SM – *Satureja montana*, TV – *Thymus vulgaris*; výtěžnost je vztažena k sušině, x – průměrná výtěžnost, σ-směrodatná odchylka

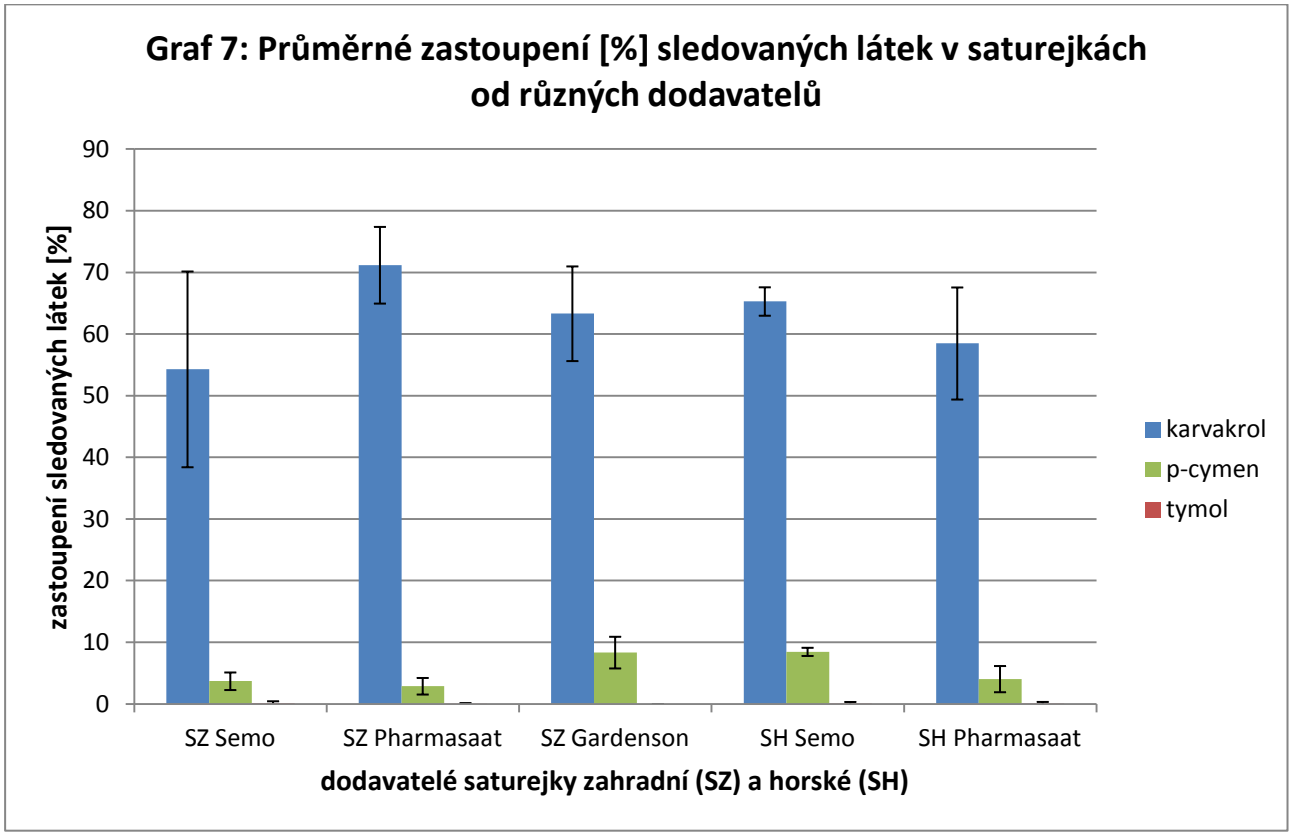
Tabulka 11: Statisticky významné rozdíly ve výtěžnosti pěstovaných saturejek

rostlina		1	2	3	5
SZ Semo	**1**				
SZ Pharmasaat	**2**	0,0203*			
SZ Gardenson	**3**	0,1978	0,0002		
SH Semo	**5**	0,8535	0,0018	0,7822	
SH Pharmasaat	**8**	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

*červeně vyznačené hodnoty značí statisticky průkazné rozdíly



*úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku



*úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku

V pěstovaných saturejkách převažovala jako hlavní účinná látka karvakrol (54–70 %), Statisticky významně ($p < 0,05$) se množství této látky lišilo u SZ Semo x SZ Pharmasaat a také mezi SZ Semo x SH Pharmasaat. Množství tymolu bylo zanedbatelné (<1 %). Nejvíce se tedy saturejky lišily v obsahu p-cymenu, statisticky významné odlišnosti udává tab. 12.

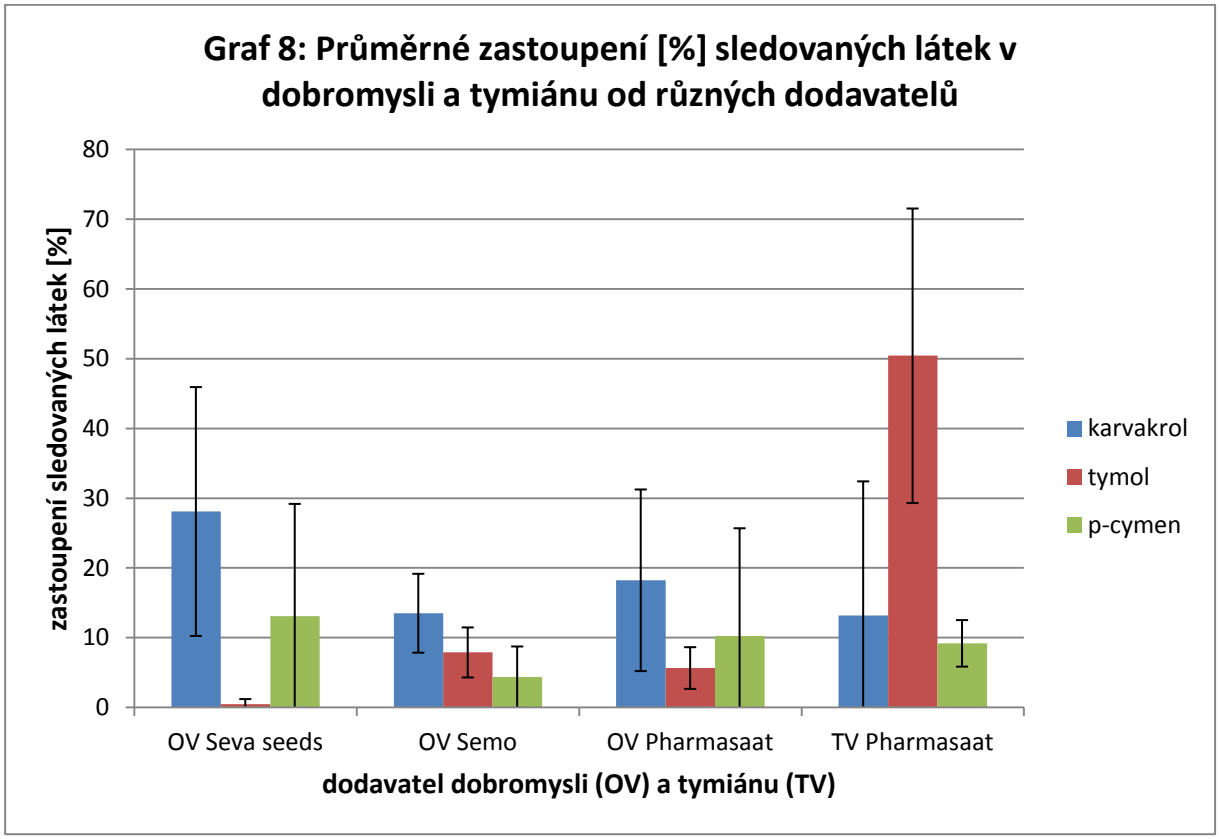
Tabulka 12: Statisticky významné rozdíly v množství p-cymenu v saturejkách

rostlina		1	2	3	5
SZ Semo	1				
SZ Pharmasaat	2	0,8930			
SZ Gardenson	3	0,0002	0,0001		
SH Semo	5	0,0002	0,0001	0,9999	
SH Pharmasaat	8	0,9910	0,5906	0,0001	0,0002

*červeně vyznačené hodnoty značí statisticky průkazné rozdíly

Pěstované rostliny oregana obsahovaly jako hlavní účinnou látku karvakrol (13–28 %), obsah p-cymenu se pohyboval v rozmezí 4–13 %. Statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) byl

zaznamenán v obsahu tymolu u „OV Seva seeds“ (graf 8) oproti dvěma dalším sledovaným dodavatelům. Tymián od firmy Pharmasaat obsahoval nejmenší množství tymolu oproti rostlinám pěstovaným v předchozích letech (grafy 5 a 3).



*úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylky

5.2 Diskuse pěstební pokusy

Výtěžnost silic bazalek vztažená na čerstvou hmotu rostlin byla 0,3 až 0,45%, a pohybovala se tedy okolo minimálních hodnot udávaných v literatuře (0,3 %) (Aguilar, 1999). Nízký výnos silice je pravděpodobně zapříčiněn ne zcela cela optimálními agroklimatickými podmínkami (Hussain et al., 2008). Je známo, že bazalka je choulostivá na sucho a zimu a k růstu potřebuje relativně vysoké teplotní optimum (Hay a Waterman, 1993). Nejzastoupenější účinnou látkou byl linalool. Pěstované bazalky tedy odpovídají linaloovému chemotypu, který identifikoval např. (Telci et al., 2006). V poměru ostatních účinných látek se však studie rozcházejí. Výše uvedení autoři uváděli vysoký obsah kadinolu, bergamotenu, 1,8 cineol, eugenolu nebo cadinenu. Většina těchto látek v námi pěstovaných rostlinách nebyla identifikována.

Obsah hlavních účinných látek není z antimikrobiálního hlediska u pěstovaných bazalek příliš vhodný. Pro toto použití by byl vhodnější druh s vyšším obsahem eugenolu, který je

v porovnání s linaloolem účinnější proti bakteriím. Bazalka salátová také obsahovala vysoký obsah estragolu, který je strukturně podobný karcinogenním fenyl propanolům a pro potravinářské účely proto není příliš vhodná (Telci et al., 2006). Bazalka byla z důvodů nízké výtěžnosti a nevhodného složení silice z dalších pěstebních pokusů vyřazena.

Všechny pěstované tymiány bez ohledu na rok pěstování a dodavatele byly vyrovnané co do obsahu a poměrného zastoupení látek. I obsah p-cymenu, který je prekurzorem tymolu a jeho množství se může v závislosti na době sklizně lišit (Jordán et al., 2006), byl stabilní u všech sledovaných tymiánů. Dle vysokého obsahu tymolu u všech pěstovaných variant lze usuzovat, že se jedná o tymolové chemotypy (Thompson et al., 2003). Výnos silice vztažený na čerstvou hmotu se pohyboval v rozmezí 1–3,25 % a v porovnání s obvykle udávanými hodnotami výtěžností 0,8– 2,6 % (Barnes et al., 2007) byl nadprůměrný. Podobné poměrné zastoupení hlavních účinných látek silice bylo popsáno mnoha autory (Baranauskiene et al., 2003; Rota et al., 2008; Alizadeh et al., 2011; Nikolič et al., 2014).

Z hlediska antimikrobiálních vlastností se tymiánová silice díky vysokému obsahu tymolu a p-cymenu, který podporuje integraci tymolu do mikrobiálních membrán (Burt, 2004), jeví jako velice vhodná pro další pokusy.

Všechny sledované saturejky obsahovaly více jak 50 % karvakrolu a zanedbatelné množství tymolu (krom SH od Kipenkierel), složení odpovídá komerčním požadavkům na tuto silici (Dzuong Duc Huyen & Brink, 1999). V saturejkách horských a zahradních popsaných v jiných studiích množství karvakrolu kolísá v rozmezí 5–84 % (Kustrak et al., 1996; Gulluce et al., 2003; Skočibušič a Bezič, 2004; Djenane et al., 2011). Dalšími účinnými látkami zastoupenými ve významném množství (>10 %) byly ve výše uvedených studiích p-cymen, γ-terpinen a např. geraniol. Značná diverzita v obsahu karvakrolu je pravděpodobně způsobena hodnocením různých variet saturejek (přesná taxonomie tohoto druhu zatím neexistuje) (Dzuong Duc Huyen & Brink, 1999) a různými oblastmi sběru a pěstování (Hay a Waterman, 1993).

Výnosy silice pěstovaných saturejek vztažené k čerstvé hmotnosti se pohybovaly v rozmezí 0,8–1,8 %, což odpovídá hodnotám výnosů uváděných v literatuře, tedy 1–2 % (Dzuong Duc Huyen & Brink, 1999).

Z hlediska antimikrobiálních vlastností je silice saturejky vzhledem ke svému složení velmi perspektivní pro další použití. Saturejka zahradní byla úspěšně použita i v pokusech zahrnutých v této práci.

Pěstovaná oregana nabízená různými dodavateli lze z hlediska složení silice rozdělit do dvou skupin. Oregana obsahující karvakrol jako majoritní složku (karvakrolový chemotyp)

a oregana obsahující podobné množství karvakrolu a tymolu, jedná se o přechodný typ mezi karvakrolovým a tymolovým chemotypem oregana (D'Antuono et al., 2000). Poměrné zastoupení námi sledovaných látek, je odlišné od oregan popsaných v jiných studiích (Sahin et al., 2004), což je dáno velkou variabilitou v rámci taxonu (de Guzman a Jansen, 1999). V porovnání s oreganovou silicí, která byla zakoupena a používána při testování (kap. 4.4.1.1), obsahovaly pěstované druhy o přibližně 30 % méně karvakrolu. Výtěžnost silice se pohybovala v rozmezí 0,15–0,75 % čerstvé hmoty a byla na spodní hranici udávaných hodnot výtěžností (0,1–6 %).

Analyzované oreganové silice, lze z hlediska složení pokládat za antimikrobiálně účinné, avšak z hlediska výtěžnosti a vzcházivosti nejsou oregana vhodná pro pěstování v ČR.

Cílem této části práce bylo vybrat vhodné odrůdy výše uvedených rostlin z hlediska kvantitativních (výnos) a kvalitativních (složení silice, antimikrobiální aktivita) vlastností silic. Za nejvhodnější lze na základě uvedených výsledků považovat saturejky, především pak saturejku zahradní od firem Pharmasaat a Semo (*Satureja hortensis*, 9-0040-99197-01), které měly vysoké výnosy, dobrou vzcházivost a vhodné složení silice, z tymiánů pak ten od firmy Pharmasaat. Bazalky nebyly vyhovující z hlediska složení silic a výnosu, oregana pak nevyhovovala z hlediska vzcházivosti a výnosu.

5.3 Výsledky a diskuse *in vitro* testů antimikrobiální aktivity silic v kombinaci s atmosférickým a nízkým tlakem

V *in vitro* testech bylo zjišťováno, zda kombinace nízkého tlaku a plynné fáze silice povede k rychlejší inhibici mikroorganismů v porovnání se stejným ošetřením za atmosférického tlaku. MIC se pohybovala v rozmezí 64–512 μl/l. *E. coli* byla v porovnání s *S.enteritidis* k testovaným silicím citlivější. Nejnižší MIC byla sledována u oregana, naopak lemongrass v atmosférickém tlaku nebyl proti sledovaným mikroorganismům účinný. Podtlak ve většině případů (tab. 13) působil synergisticky s plynnou fází silice, a výsledkem byla 2 až 48krát rychlejší inhibice patogenních mikroorganismů.

Tabulka 13: Minimální inhibiční časy (MIT) plynné fáze silic za atmosférického a nízkého tlaku

Silice	mikroorganismus	MIC [μl/l]	MIT [min.]* tlak		Redukce času atm./nízký tlak
			nízký	atmosférický	
skořice	*S. enteritidis*	512	15	30	2
	E. coli	128	15	240	16
hřebíček	*S. enteritidis*	512	60	240	4
	E. coli	256	240	1440	6
lemongrass	*S. enteritidis*	>512	-	-	-
	E. coli	>512	-	-	-
oregano	*S. enteritidis*	64	15	240	16
	E. coli	64	30	1440	48

*MIT = minimální inhibiční čas; MIC = minimální inhibiční koncentrace určená po 24hod. působení silice v atm. tlaku; '-' = netestováno; atmosférický tlak = 101.3 kPa, podtlak = 1.7 kPa

Dále bylo zjišťováno, zda se MIC, primárně určená po 24hodinovém působení silice na mikroorganismus, může v podtlaku dále snížit. MIC se u všech silic (kromě hřebíčkové silice) snížila (tabulka 14). Pro různé koncentrace silice byly v podtlaku určeny i různé MIT. Dokonce i jinak neúčinná silice lemongrass dokázala inhibovat růst *E. coli* (tab. 14).

Tabulka 14: Rozdílné MIC plynné fáze silic v podtlaku a atmosferickém tlaku

silice	mikroorganismus	24MIC [µl/l]	MIC* [µl/l]	MIT [min.] nízký tlak
skořice	*S. enteritidis*	512	128	15
			64	30
			64	60
lemongrass	*E. coli*	>512	512	240
oregano	*S. enteritidis*	64	32	30
			32	60
	E. coli	64	32	30
			32	60

MIT = minimální inhibiční čas; MIC = minimální inhibiční koncentrace určená po 24hod. působení silice v atm. tlaku; atmosférický tlak = 101.3 kPa, podtlak = 1.7 kPa

MIC byly podobné jako u jiných testovaných patogenních mikroorganismů (Tyagi a Malik, 2012; Fraňková et al., 2014).

Mechanismus účinku silic v kombinaci s nízkým tlakem nebyl dosud uspokojivě vysvětlen. Z dostupných pramenů není známo, že by měl nízký tlak vliv např. na strukturální změny v buněčné membráně, jako je tomu např. u vysokého tlaku (Pagan, 2000). Dále je také známo, že mikroorganismy jsou schopné přežít i při působení vysokého vakua (Portner et al., 1961).

Jedna z dosud publikovaných hypotéz předpokládá, že zvýšený účinek silic v podtlaku je dán jednak menšími změnami ve složení silic v důsledku jejich nižší oxidace a dále tím, že fakultativně anaerobní mikroorganismy získávající energii pomocí anaerobního metabolismu jsou k účinku silic citlivější (Paster et al., 1995).

Jako nejpravděpodobnější se jeví hypotéza, že v důsledku nízkého tlaku dochází k lepší difuzi silice do prostředí, a tím se i zvyšuje šance, že se dostane do kontaktu s cílovým mikroorganismem (Arras a Usai, 2001).

Výše uvedené výsledky a také fakt, že se vakuum využívá v některých provozech k ochlazování ovoce a zeleniny (Arras a Usai, 2001), vedl k hypotéze, že by se kombinace podtlaku a silice dala použít jako nová konzervační technika pro minimálně zpracované produkty. Tato kombinace proto byla testována v další části experimentů.

Výsledky experimentu byly publikovány ve Food Control, Volume 35, Issue 1, January 2014, Pages 14–17, kde jsou také podrobně diskutovány (příloha 2).

5.4 Výsledky a diskuse testování plynné fáze silic proti *S. enetritidis* na naklíčených semenech mungo (*Vigna radiata*)

5.4.1 Ošetření klíčků mungo silicí oregana

Výsledky snížení počtu mikroorganismů v klíčcích mungo po ošetření plynnou fází oreganové silice udává tabulka 15. V porovnání s kontrolami došlo bezprostředně po ošetření ke statisticky významnému ($p < 0,05$) snížení **CPM** ve většině ošetřených variant, nejúčinnější bylo ošetření variantou B (snížení o 3,1 log KTJ/g), nejméně účinné pak ošetření C a M (snížení o 1 log KTJ/g). Po čtyřech dnech skladování došlo jak v kontrole, tak v ošetřených variantách k dalšímu poklesu CPM, signifikantně pak pouze variant B a D. U varianty M došlo naopak ke zvýšení CPM. Pokles CPM po dobu skladování byl pravděpodobně způsoben synergistickým účinkem nízké skladovací teploty (4 °C) a silice.

Tabulka 15: Snížení CPM a *S. enteritidis* (KTJ/g) na klíčcích ošetřených oreganovou silicí

	Den sledování							
	1.				4.			
	CPM [log KTJ/g]		SE [log KTJ/g]		CPM [log KTJ/g]		SE log [KTJ/g]	
Varianta	x	σ	x	σ	x	σ	x	σ
Testy bez podpory evaporace silice								
Kabcd (0 µl/ml, 60 min.)	9,62	0,55 [abcd]	9,51	0,74	7,94	0,10 [bd]	7,50	0,33
A (atm, 1µl/ml, 60 min.)	8,20	0,50	7,62	1,65	7,11	na	6,53	0,49
B (↓, 1µl/ml, 60 min.)	6,53	0,04 [a]	7,57	1,20	6,99	0,02	6,53	0,04 [k]
C (atm, 1µl/ml, 15 min.)	8,53	0,47 [b]	7,79	na	7,62	0,31	6,86	0,36
D (↓, 1µl/ml,15 min.)	7,98	0,57 [b]	7,39	2,25	7,21	0,11	7,04	0,24 [k]
Testy s podporou evaporace silice								
Kzlmn (0 µl/ml, 5 min.)	8,95	0,32 [m]	8,79	0,45 [k]	9,19	0,73	8,49	0,15
L (atm, 1µl/ml, 5 min.)	7,16	1,34 [m]	6,88	0,99 [k]	7,73	na	6,59	0,98 [k]
M (↓, 1µl/ml, 5 min.)	7,90	0,48	7,01	1,17 [k]	10,36	na	6,51	na
N (atm, 0,1µl/ml, 5 min.)	7,37	0,71 [m]	6,88	0,70 [k]	8,92	2,26	7,07	0,79
Z (↓, 0,1µl/ml, 5 min.)	6,71	1,14 [m]	6,11	1,35 [k]	8,93	0,93	6,61	1,26 [k]

*x – průměr; σ – směrodatná odchylka; CPM – celkový počet mikroorganismů, SE – *Salmonella enteritidis*, KTJ – kolonie tvořící jednotka, na – hodnota není k dispozici, písmena uvedená ve sloupcích označují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi testovanými variantami

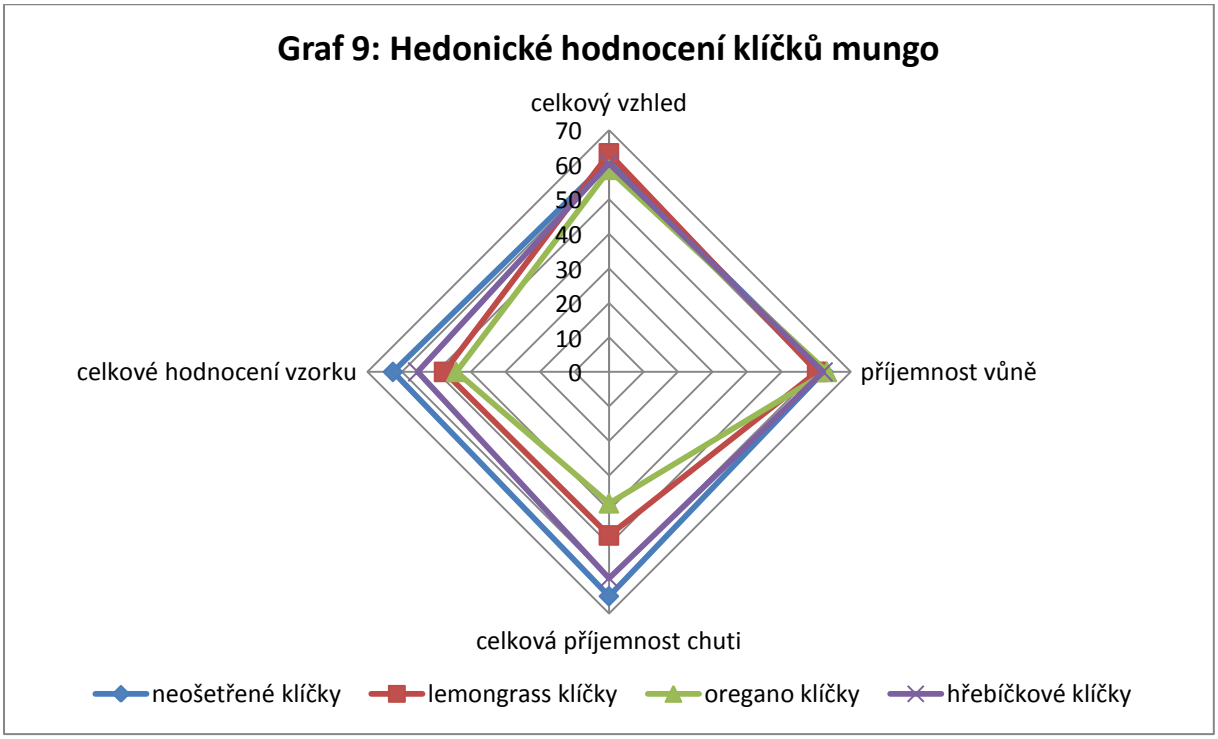
Bezprostředně po ošetření klíčků oreganovou silicí došlo ke snížení počtu ***S. enteritidis*** o 1,7–2,7 log KTJ/g, statisticky významné bylo pouze pro varianty L, M, N a Z (tab. 15).

Čtvrtý den po ošetření došlo k dalšímu poklesu *S. enteritidis*, a sice o 0,5–2 log KTJ/g oproti kontrole. Za nejúčinnější lze považovat variantu Z (1µl/l silice, podtlak, 5min. ošetření., podpora evaporace silice) a B (1µl/l silice, podtlak, 60min. ošetření).

5.4.2 Senzorický profil klíčků

Hodnotitelé posuzovali senzorické vlastnosti klíčků ošetřených silicí oregana, lemongrass a hřebíčku v koncentraci 226 µl/l vzduchu. Výsledky hodnocení přijatelnosti ošetřených klíčků jsou uvedeny v grafu 9, výsledky hodnocení intenzity vybraných deskriptorů jsou uvedeny v grafu 10.

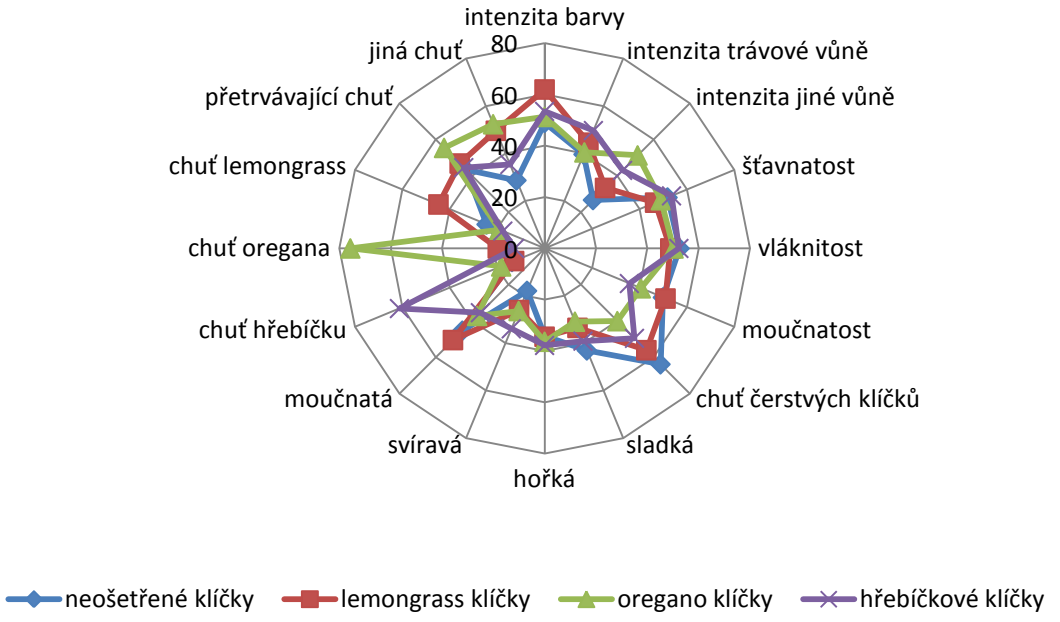
Z hlediska přijatelnosti byla ve všech deskriptorech (graf 9) nelépe hodnocena neošetřená kontrola. Ošetření silicemi se statisticky významně ($p < 0,005$) projevilo pouze na „celkové příjemnosti chuti“ klíčků ošetřených oreganovou silicí oproti neošetřené kontrole. Oreganové klíčky byly z hlediska příjemnosti chuti a také celkového hodnocení hodnoceny jako nejvíce odporné a pravděpodobně by nebyly zákazníky dobře přijímány. Přijatelněji z hodnocení vyšel vzorek ošetřený hřebíčkovou a lemongrass silicí (graf 9). Tyto silice však v souběžně prováděných *in vitro* testech prokázaly výrazně nižší účinnost oproti *S. enteritidis*, od jejich dalšího testování na klíčcích bylo proto upuštěno.



Hodnocení intenzity vybraných deskriptorů (graf 10) ukázalo, že ošetření silicemi nemá statisticky průkazný vliv na texturu ani vnímání základních chutí výsledného produktu.

Statisticky průkazně hodnotitelé rozeznali intenzitu dílčích chutí aplikovaných silic ($p < 0{,}0001$ pro oregano a hřebíček a $p < 0{,}02$ pro lemongrass)

Graf 10: Hodnocení intenzity vybraných deskriptorů klíčků mungo



5.4.3 Diskuse antimikrobiální aktivita silice oregana na ošetřovaných klíčcích, senzorické zhodnocení výsledných produktů

Studie zabývající se zdravotní nezávadností klíčků se zaměřují spíše na způsoby dezinfekce semen před klíčením než na klíčky samotné. Dezinfekce semen je vzhledem k jejich jednotnému povrchu a vyšší odolnosti vůči různým fyzikálním a chemickým vlivům jednodušší (BIOHAZ, 2013; Ding et al., 2013). V průběhu klíčení dále může docházet k internalizaci nežádoucích mikroorganismů do tkání (Deering et al., 2012). Ty jsou následně chráněny proti vlivu sanitačních prostředků.

Pro ilustraci lze porovnat například konvenční metodu ošetření semen před klíčením chlornanem vápenatým ($Ca(ClO)_2$) v koncentraci 20 000 ppm a chlorem v koncentraci max 200 ppm. Tyto prostředky zajišťují snížení počtu mikroorganismů na **semenech** o 1–3 KTJ/g (Sikin et al., 2013). Zatímco experimentální ošetření **klíčků mungo** chlorem v koncentraci 170 ppm vedlo ke snížení CPM pouze o 0,9 a *S. enteritidis* o 1,5 log KTJg (Neo et al., 2013), což je o polovinu méně v porovnání s ošetřením nenaklíčených semen.

K ošetření klíčků mungo byla dále v různých experimentech použita elektrolyzovaná voda (75 ppm dostupného Cl_2, oxidačně-redukční potenciál – ORP = 1150 mV, pH 2.8, 180 s), kyselý chlornan sodný (1200 ppm, pH 2.3, 180 s), cetylpyridinium chlorid (2%, 180 s), ozonizovaná voda (2 ppm, 180 s), fosforečnan sodný (10%, pH 12.6, 180 s) a horká voda (70 °C, 20 s) (Phua et al., 2014). Nejúčinnější variantou se ukázala být horká voda, která redukovala CPM a *S. enteritidis* o 4.81 a 4.37 log KTJ/g, avšak tato metoda měla negativní vliv na barvu a texturu klíčků. Ostatní uvedené metody ošetření snížily množství mikroorganismů o méně než 2 log KTJ/g.

Podobných výsledků jako v našem experimentu bylo dosaženo aplikací kyseliny peroxioctové v koncentraci 70 ppm (snížení *S.enteritidis* o 2,1 a CPM o 1,1 log KTJ/g) (Neo et al., 2013). Vliv ošetření na organoleptické vlastnosti produktu nebyl uveden.

Testování antimikrobiálních látek v plynné fázi na klíčcích není příliš prozkoumané. V současnosti je autorovi známa pouze jedna studie, kdy byla v plynné fázi testována kyselina octová a allylisothiokyanát v koncentracích 200 a 500 mg/l vzduchu oproti *S. enteritidis* na klíčcích vojtěšky (Weissinger et al., 2001). Látky v testovaných koncentracích významně snížily množství patogenu na klíčcích (allylisothiokyanát pod mez detekce metody), avšak výsledný produkt nebyl poživatelný. Zatímco v námi provedených testech bylo dosaženo významného snížení mikroorganismů za použití až 5x nižší koncentrace silice a výsledný produkt byl konzumovatelný.

Weissinger (2001) zkoumal i možné ošetření semen vojtěšky plynnou fází tymolu, karvakrolu, cinnamaldehydu a octové kys. v koncentraci 1,000 mg/l vzduchu po dobu 1, 3, 7 h při 60 °C. K významnému snížení salmonely >3log KTJ/g došlo po 7 hodinách odpařování tymolu, cinnamaldehydu a octové kys. Karvakrol přítomný v silici oregana byl neúčinný, v našich testech prokázal vysokou účinnost.

Porovnáním výsledků experimentu s dostupnými daty lze konstatovat, že i krátkou aplikací plynné fáze silice oregana je možné docílit srovnatelného snížení nežádoucích mikroorganismů na klíčcích mungo a částečně zachovat původní organoleptické vlastnosti produktu. Předpoklad, že plynná fáze silic lépe prostoupí produktem, a zlepší tak antimikrobiální účinnost, nebyl potvrzen. Podtlak, který v *in vitro* testech snížil MIC a dobu ošetření, neměl ve srovnání s ošetřením v atmosférickém tlaku významný vliv na snížení počtu mikroorganismů.

Plynnou fázi silic by pravděpodobně nebylo možné zařadit přímo do výrobního procesu klíčků. Bylo by však možné uvažovat o její inkorporaci do obalových materiálů, kdy by jako

součást modifikované atmosféry napomáhala udržovat, případně snižovat množství mikroorganismů na klíčcích.

Z hlediska výrobní praxe se stále jako nejlepší prevence výskytu a množení nežádoucích mikroorganismů jeví ošetření semen před klíčením a dodržování správné výrobní praxe a zajištění a následný monitoring nezávadné pitné vody, která je hlavním zdrojem kontaminace a přenosu mikroorganismů během klíčení (Sikin, 2014).

5.5 Výsledky a diskuse testování plynné fáze silice oregana, saturejky a zavinutky proti *E. coli* na listech polníčku (*Valerianella locusta*) a špenátu (*Spinacia*)

5.5.1 Ošetření polníčku silicí oregana

Výsledky ošetření listů polníčku různými koncentracemi silice oregana jsou uvedeny v tabulce 16. Průměrné množství *E. coli* na uměle inokulovaných neošetřených listech polníčku bylo 4,9 log KTJ/g bezprostředně po ošetření. Po čtyřech dnech skladování při 4 °C za chladírenské teploty došlo ke spontánním poklesu množství *E. coli* v průměru o 1,8 log KTJ/g. Ošetřením inokulovaných listů v podtlaku a atmosférickém tlaku bez použití silice bylo ověřeno, že samotná změna tlaku nemá na množství mikroorganismů vliv (varianta 0 µl/l, tab. 16). Celkové počty mikroorganismů zůstávaly stabilní v obou dnech sledování. Koncentrace par oregana pohybující se v rozmezí 128–8 µl/l vzduchu dokázala zcela eliminovat *E. coli* na polníčku, bez rozdílu způsobu její aplikace. Koncentrace oregana 8 µl/l byla stanovena jako MIC.

Podobně jako v *in vitro* testech bylo následně zjišťováno, zda nízký tlak zkrátí dobu ošetření nutnou k inhibici mikroorganismů. Čas ošetření salátu byl zkrácen na 30 min., silice byla testována v nalezené MIC (8 µl/l) vzduchu. Toto ošetření však nevedlo k inhibici sledovaných mikroorganismů oproti kontrole (data nejsou uvedena).

V průměru tedy na uměle inokulovaném polníčku došlo ke snížení počtu *E. coli* o 3–4 log KTJ/g (s ohledem na mez detekce metody 2 log KTJ/g). Silice v koncentraci 128 a 64 µl/l dále významně ($p < 0,05$) snížila CPM oproti sledované kontrole, nižší koncentrace silice neměly na CPM vliv.

5.5.2 Výsledky ošetření špenátu silicí saturejky a zavinutky

Výsledky ošetření špenátu silicí saturejky a zavinutky udává tabulka 17. Množství *E. coli* se bezprostředně po inokulaci pohybovalo v průměru od 3,5 do 4,6 log KTJ/g, po čtyřech dnech skladování došlo stejně jako u polníčku ke spontánnímu poklesu *E. coli* na špenátu (v průměru o 0,7 log KTJ/g). Celkový počet mikroorganismů se ve většině sledovaných případů pohyboval okolo 6 a >7 log KTJ/g.

Ošetřením inokulovaného špenátu pouze za nízkého a atmosférického tlaku bez použití silic bylo stejně jako v případě polníčku prokázáno, že samotná změna tlaku nemá na množství E. *coli* vliv (varianta 0µl/l v tab. 17). Silice saturejky do koncentrace 8 µl/l vzduchu zcela inhibovala *E. coli*, o polovinu nižší koncentrace (4 µl/l) nebyla účinná. Silice zavinutky byla vzhledem k podobnému složení silice testována pouze ve 4 a 8 µl/l, výsledky

byly shodné se saturejkou. MIC pro *E. coli* byla tedy pro obě silice stanovena na 8 µl/l vzduchu. Silice saturejky aplikovaná v podtlaku snížila ve vyšších koncentracích množství CPM, avšak tento výsledek nebyl statisticky průkazný, v nižších koncentracích nedocházelo

Tabulka 16: Snížení CPM a *E. coli* na polníčku ošetřeném silicí oregana

c_{silice} [µl/l vzduchu]	***E. coli* [log KTJ/g]**				**CPM [log KTJ/g]**			
	1. den		**4. den**		**1. den**		**4. den**	
128	**x**	**σ**	**x**	**σ**	**x**	**σ**	**x**	**σ**
Atm.tlak	nd ±		nd ±		4,19 ±	0,57	4,87 ±	0,76
Podtlak	nd ±		nd ±		3,42 ±	0,39	4,73 ±	0,54
Kontrola	5,37 ±	0,10	3,62 ±	2,14	5,28 ±	0,39	>5 ±	
64								
Atm.tlak	nd ±		nd ±		3,64 ±	0,67	3,18 ±	0,38
Podtlak	nd ±		nd ±		3,22 ±	0,18	3,22 ±	0,37
Kontrola	5,70 ±		2,31 ±		5,87 ±		5,87 ±	
32								
Atm.tlak	2,15 ±	0,34	nd ±		4,92 ±	0,11	4,88 ±	0,17
Podtlak	2,15 ±	0,09	nd ±		4,76 ±	0,34	5,53 ±	0,58
Kontrola	5,87 ±		4,94 ±		>5 ±		>5 ±	
16								
Atm.tlak	nd ±		nd ±		±		5,20 ±	0,29
Podtlak	nd ±		nd ±		3,78 ±	0,24	4,27 ±	0,45
Kontrola	4,07 ±		2,09 ±		±		5,56 ±	
8								
Atm.tlak	nd ±		nd ±		5,39 ±	0,63	5,86 ±	0,82
Podtlak	nd ±		nd ±		5,39 ±	0,72	5,03 ±	1,20
Kontrola	5,33 ±	0,96	3,31 ±	0,73	6,03 ±	1,19	5,82 ±	0,95
4								
Atm.tlak	4,28 ±	0,65	nd ±		>5 ±		>5 ±	
Podtlak	4,45 ±	1,10	2,42 ±	1,03	>5 ±		>5 ±	
Kontrola	6,05 ±	0,52	3,13 ±	1,01	>5 ±		>5 ±	
0								
Atm.tlak	5,47 ±	0,01	nd ±	0,00	4,65 ±		5,30 ±	0,75
Podtlak	5,33 ±	0,46	nd ±	0,00	±		5,09 ±	0,04
Kontrola	5,85 ±		4,96 ±		>5 ±		5,82 ±	

*x – průměr; σ – směrodatná odchylka; CPM – celkový počet mikroorganismů, KTJ – kolonie tvořící jednotka, nd – mikroorganismus nebyl detekován; hodnota „>5“ zahrnuje případy, kdy mirkoorganismy na Petriho miskách v odpovídajícím ředění utvořily souvislý povrch a nebylo možné počítat jednotlivé kolonie. Chybějící hodnoty σ – byly počitatelné pouze 2 Petriho misky. Chybějící hodnoty x – kolonie nebylo možné spočítat.

k významnému snížení CPM oproti sledované kontrole. Oproti tomu silice zavinutky aplikovaná v podtlaku bezprostředně po ošetření snížila CPM na mez detekce metody, při aplikaci za atmosférického tlaku došlo ke snížení CPM o 3 log KTJ/g. Po čtyřech dnech

sledování však došlo k opětovnému nárůstu mikroorganismů na úroveň neošetřené kontroly (tab. 17).

Tabulka 17: Snížení CPM a *E. coli* na špenátových listech ošetřených silicí saturejky a zavinutky

	***E. coli* [log KTJ/g]**						**CPM [log KTJ/g]**					
	1. den			**4. den**			**1. den**			**4. den**		
c_{silice} [µl/l vzduchu]	**x**		**σ**	**x**		**σ**	**x**		**σ**	**x**		**σ**
ošetření silicí saturejky												
128												
Atm.tlak	nd	±		nd	±		6,72	±	0,39	6,19	±	1,15
Podtlak	nd	±		nd	±		3,69	±	2,39	4,72	±	
Kontrola	3,79	±	0,45	2,60	±	0,01	6,34	±	0,93	>7,00	±	
64												
Atm.tlak	2,90	±	1,27		±		5,15	±	0,28	7,00	±	
Podtlak	nd	±			±		5,13	±	1,90	3,49	±	
Kontrola	3,56	±	0,71		±		>7,00	±		>7,00	±	
32												
Atm.tlak	nd	±		nd	±		6,10	±		4,84	±	
Podtlak	nd	±		nd	±		5,47	±		nd	±	
Kontrola	4,62	±		3,30	±		>7,00	±		>7,00	±	
16												
Atm.tlak	nd	±		nd	±		5,27	±	1,43	5,80	±	1,69
Podtlak	nd	±		nd	±		3,12	±		5,55	±	2,05
Kontrola	4,26	±	0,21	3,59	±	0,52	6,10	±	0,06	6,59	±	0,59
8												
Atm.tlak	nd	±		nd	±		5,02	±	0,19	5,89	±	1,57
Podtlak	nd	±		nd	±		5,16	±	0,78	6,56	±	0,63
Kontrola	3,48	±	0,67	3,15	±		6,15	±	0,07	>7,00	±	
0												
Atm.tlak	3,63	±	0,59	2,34	±	0,47	7,10	±	0,18	7,01	±	0,03
Podtlak	3,76	±	0,88	2,27	±	0,38	>7,00	±		6,63	±	0,48
Kontrola	4,12	±	0,71	2,72	±	1,02	>7,00	±		7,10	±	0,17
ošetření silicí zavinutky 8												
Atm.tlak	nd	±		nd	±		3,12	±	0,97	6,14	±	
Podtlak	nd	±		nd	±		nd	±		6,30	±	
Kontrola	3,81	±	0,72	3,84	±	1,19	6,14	±	0,76	6,95	±	

* x – průměr; σ – směrodatná odchylka;, CPM – celkový počet mikroorganismů, KTJ – kolonie tvořící jednotka, nd – mikroorganismus nebyl detekován; hodnota „>7“ zahrnuje případy, kdy mirkoorganismy na Petriho miskách v odpovídajícím ředění utvořily souvislý povrch a nebylo možné počítat jednotlivé kolonie. Chybějící hodnoty σ – byly počitatelné pouze 2 Petriho misky. Chybějící hodnoty x – kolonie nebylo možné spočítat.

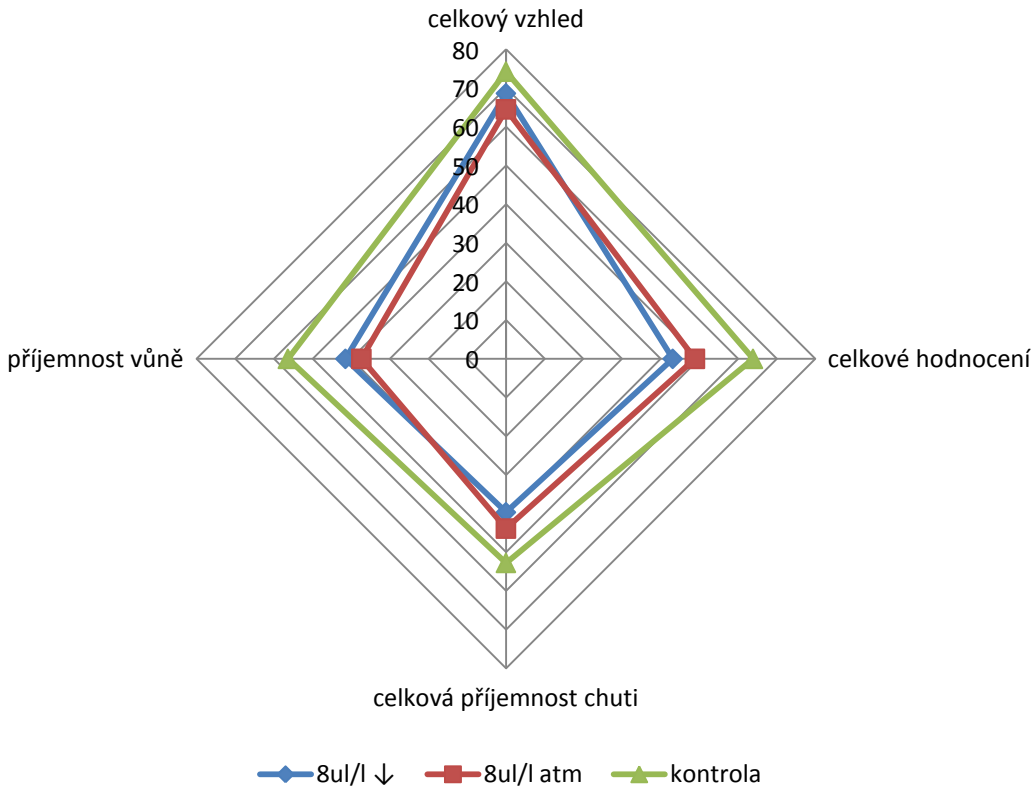
5.5.3 Výsledky a diskuse senzorického hodnocení polníčku a špenátu

V rámci senzorického hodnocení byl hodnocen polníček a špenát ošetřený nalezenými MIC daných silic. Listy polníčku a špenátu byly ošetřeny stejným způsobem jako při zkoumání antimikrobiální aktivity silic. Dvě hodiny po ošetření a skladování byly předány k senzorickému hodnocení (kap. 4.4.1). Výsledky hedonického hodnocení polníčku a špenátu udávají grafy 11 a 13, hodnocení intenzity vybraných deskriptorů je uvedeno v grafech 12 a 14.

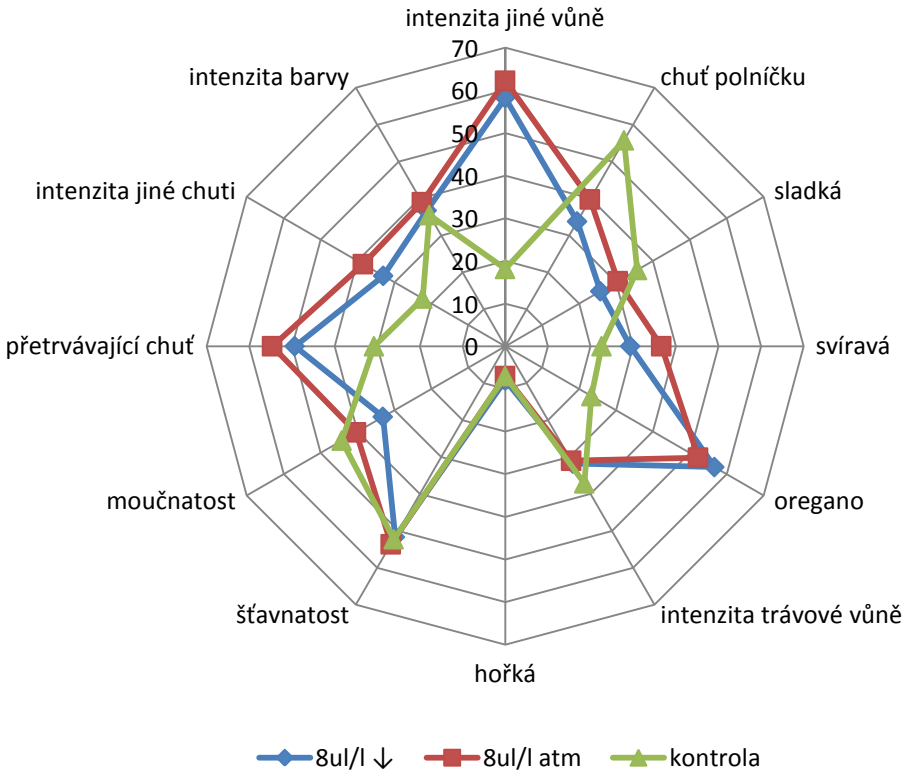
Z hlediska příjemnosti byla ve všech deskriptorech (graf 11) hodnotiteli nejlépe hodnocena neošetřená varianta polníčku, ošetření silicí oregana v atmosférickém tlaku a podtlaku bylo hodnoceno velice podobně, avšak jako nejméně příjemná byla hodnocena varianta ošetřená v podtlaku. Nejvíce se ošetření polníčku silicí projevilo na „příjemnosti chuti“ a „příjemnosti vůně“. Tyto rozdíly však nebyly oproti neošetřené kontrole statisticky významné.

Hodnocení intenzity vybraných deskriptorů ukázalo, že u listů ošetřených silicí hodnotitelé více vnímají svíravou chuť (graf 12). Statisticky průkazně se ošetření silicí v porovnání s neošetřenou kontrolou projevilo pouze u dvou dílčích deskriptorů – „intenzita jiné vůně“ ($p < 0{,}0008$) a „intenzita vůně oregana“ ($p < 0{,}0008$), kdy respondenti zcela jasně identifikovali vůni oregana, která měla vliv i na potlačení přirozené chuti polníčku (graf 12).

Graf 11: Hedonické hodnocení polníčku



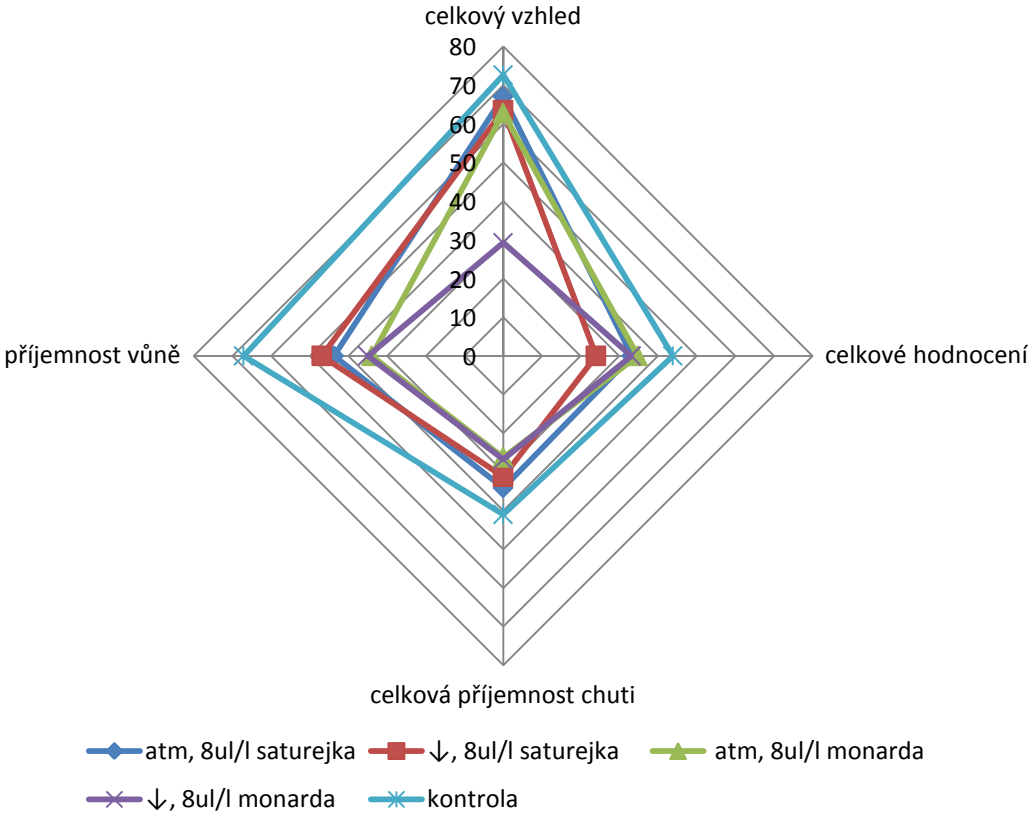
Graf 12: Hodnocení intenzity vybraných deskriptorů polníčku



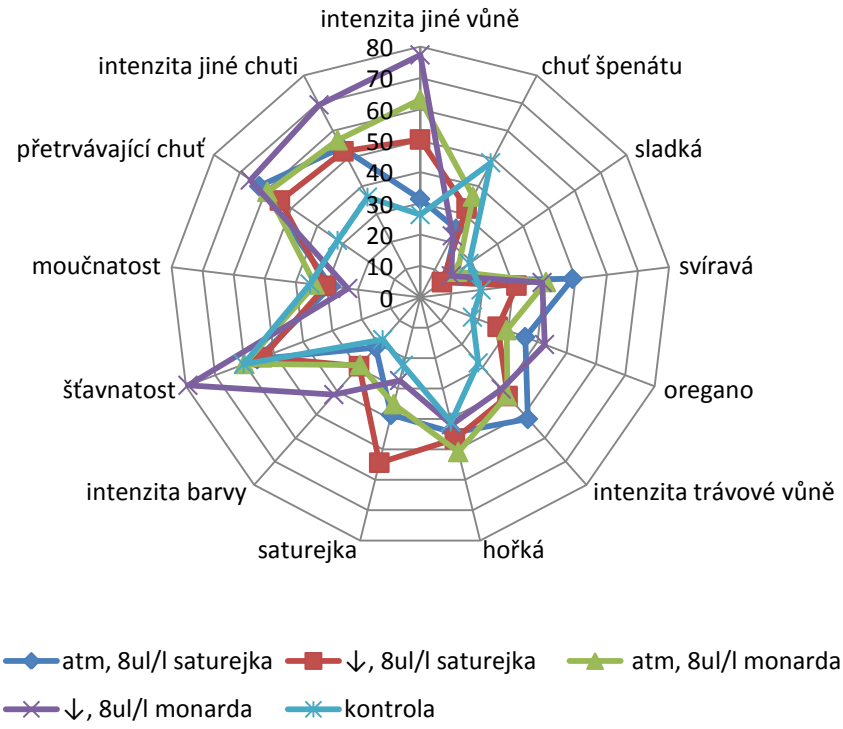
Při hodnocení špenátu byla opět z hlediska přijatelnosti ve všech deskriptorech nejlépe hodnocena neošetřená kontrolní varianta (graf 13), je však nutné poznamenat, že i tato varianta byla hodnocena z hlediska „příjemnosti chuti“ a „celkového hodnocení“ spíše jako odporná. Tyto deskriptory získaly méně než 50% skóre (graf 13), oproti tomu neošetřený polníček získal v těchto parametrech více než 60% skóre (graf 11).

Nejhůře z hlediska hédonického hodnocení dopadla varianta ošetřená silicí zavinutky za nízkého tlaku, jeden z respondentů dokonce v rámci slovního hodnocení tuto variantu označil jako nepoživatelnou a zdůrazňoval její štiplavou chuť. Nejvíce se u všech ošetřených variant v porovnání s kontrolou lišilo skóre u „přetrvávající chuti“ a „intenzita jiné chuti“ (graf 14). Statisticky průkazně ($p < 0,009$) byli respondenti schopni rozeznat v ošetřených vzorcích chuť saturejky oproti ostatním variantám ošetření.

Graf 13: Hedonické hodnocení špenátu



Graf 14:Hodnocení intenzity vybraných deskriptorů špenátu



5.5.4 Diskuse antimikrobiální aktivita silic na ošetřovaných salátech, senzorické zhodnocení výsledných produktů

Spontánní pokles množství *E. coli* ve vzorcích špenátu a polníčku byl pravděpodobně způsoben nízkou skladovací teplotou (4 °C). Podobný pokles *E. coli* (0,89 log KTJ/g) při této teplotě byl pozorován na fresh-cut salátu po 15 dnech skladování, při vyšší skladovací teplotě (8–16 °C) naopak docházelo ke zvýšení počtu *E. coli* (Posada-Izquierdo et al., 2013). Autor dále uvádí vysokou variabilitu přežívání *E. coli* na salátu během doby skladování. Tato variabilita pravděpodobně souvisí s mírou poškození zeleniny během zpracování, kdy více poškozené produkty poskytují přítomným mikroorganismům více živin pro růst a množení (Mercier a Lindow, 2000). Nárůst počtu mikroorganismů na baby špenátu po zpracovatelských krocích popsal i Ilic (2008). Tuto variabilitu lze pozorovat i v případě pokusů s polníčkem a špenátem (tab. 16 a 17).

Studií věnujících se snížení mikroorganismů na fresh-cut produkci je celá řada. Problematika ošetření fresh-cut produkce byla shrnuta v několika přehledových článcích (Sapers, 2001; Parish et al., 2003; Rico et al., 2007; Gomez-Lopez et al., 2008). Výsledky jsou však vzhledem k různým metodikám ošetření, stupňům inokulace mikroorganismy a druhy ovoce a zeleniny těžko srovnatelné.

Ve skupině „fresh-cut zelenina“ je nejčastěji sledováno snížení CPM, *E. coli, S. enteritidis* a *Listeria monocytogenes* v ledovém a hlávkovém salátu, případně salátovém mixu (tab. 1b). Experimentálně je ověřováno především působení komerčně dostupných alternativ k běžně používanému chloru, který smí být používán v koncentraci max. 50–200 ppm po dobu 1 min. (Parish et al., 2003).

Mezi testované látky/prostředky patří především chlornan sodný a vápenatý, citronová kys., peroxid vodíku UV, radiace, ozonová voda a jejich různé kombinace. Koncentrace testovaných látek se ve většině případů pohybuje do 200 mg/l (ppm), ve výjimečných případech jsou látky testovány i v g/l (ppt) (Gil et al., 2009). Účinnost těchto prostředků se ve studiích vztahuje jednak ke snížení mikroorganismů v oplachové vodě, což je důležité z hlediska možné křížové kontaminace výsledného produktu (López-Gálvez et al., 2009). Sleduje se tedy sanitační účinek. Ve druhém případě je sledována účinnost těchto látek jako dezinfekce daného produktu. Výsledky studií shodně uvádějí redukci počtu sledovaných mikroorganismů o 1–3 log KTJ/g (v závislosti na dané metodě) (Gil et al., 2009). Výzkumy se většinou nezabývají senzorickým hodnocením výsledného produktu (tab. 1b).

Studie zabývající se snížením výše uvedených mikroorganismů na listové zelenině pomocí silic udávají tabulky 1a a 1b. Je třeba zdůraznit, že všechny zde uvedené experimenty

zkoumají účinky silic v roztoku především na hlávkovém a ledovém salátu. Na polníčku dosud nebyly prováděny žádné studie a na baby špenátu pouze minimální množství. V experimentech je převážně zkoumána účinnost ošetření proti patogenní *E. coli* H7:O157. V našem případě byl vzhledem k omezeným možnostem laboratoře testován nepatogenní kmen *E. coli*. Na základě *in vitro* studií (Cosentino et al., 1999; Friedman et al., 2002; Lopez et al., 2005) lze předpokládat, že účinek silic bude proti oběma kmenům *E. coli* podobný.

Silice oregana, saturejky a zavinutky dokázaly ve své MIC (8 µl/l) inhibovat *E. coli* až na mez detekce metody a ani po 4 dnech skladování nedošlo k jejímu opětovnému nárůstu. V jiných experimentech (tab 18) byl růst *E. coli* až na mez detekce metody popsán pouze v případě ošetření hlávkového salátu silicí máty v koncentraci 80 µl/l (Karagozlu et al., 2011), tedy v 10x vyšší koncentraci v porovnání s našimi testy.

V ostatních případech (tab. 18) docházelo k potlačení *E. coli* v rozmezí 1–3,5 log KTJ/g (Singh et al., 2002; Yossa et al., 2013), přičemž koncentrace silic se pohybovaly v rozmezí od 0,1 do 10 %, opět tedy byly několikanásobně vyšší oproti našemu experimentu (0,008 %). Na druhou stranu je třeba poznamenat, že doba ošetření v případě vyšších koncentrací byla výrazně kratší (1–10 min.). Oregano v plynné fázi se jeví daleko účinnější v porovnání s jeho použitím v kapalné fázi. V 10% koncentraci se snížilo množství *E. coli* pouze o 0,5 log KTJ/g po 9denním skladování (Azizkhani et al., 2013).

Pro srovnání komerčně používaný chlor použitý v koncentraci 150 ppm snížil počty *E. coli* pouze o 1,23 log KTJ/g (Posada-Izquierdo et al., 2013). Plynná fáze ClO_2 (0,004%) snížila množství *E. coli* maximálně o 1,58 log KTJ/g, výsledný produkt byl nepoživatelný (Sy et al., 2005).

CPM, na který neměly silice oregana a saturejky v našem testu v nízkých koncentracích vliv, v testech (tab. 1b) bezprostředně po ošetření klesal maximálně o 1,2 log KTJ/g, po několika dnech skladování se však opět dostal na hladinu srovnatelnou s kontrolní variantou (Gutierrez et al., 2009; De Azeredo et al., 2011; Yossa et al., 2013). Nárůst CPM po čtyřech dnech skladování byl pozorován i v případě ošetření salátů silicí zavinutky. Při ošetření produktů dochází v případě CPM pravděpodobně k částečnému usmrcení a poškození buněk mikroorganismů, přeživší buňky jsou však schopny regenerovat a dorůst do původního množství (Zagory, 1999).

Senzorické hodnocení ošetřených salátů (tab.1b) nebylo ani v jednom z uvedených případů pozitivní. Obecně měly různé druhy ošetření nejmenší vliv na „celkový vzhled“ listové zeleniny. Nejvíce se ve shodě s naším výzkumem vliv ošetření projevil na hodnocení aromatu a chuti daného produktu.

Krátkodobé ošetření listové zeleniny silicemi v průběhu zpracovatelského procesu se i přes jejich lepší účinnost v porovnání s ošetřením chlorem nejeví jako perspektivní, a to vzhledem k jejich negativnímu účinku na organoleptické vlastnosti produktu i při použití v nízkých koncentracích. V úvahu by mohlo přicházet jejich využití jako součást modifikované atmosféry balení produktu v koncentracích nižších než MIC, potvrzení tohoto faktu vyžaduje další zkoumání. Výsledky dosud uveřejněných studií (tab. 1b) však naznačují, že i dlouhodobé působení nízké koncentrace silic by pravděpodobně mělo vliv na chuť a texturu produktu.

Jako perspektivnější se jeví inkorporace silic do jedlých obalů, které se používají k udržení lepší textury a omezení hnědnutí fresh-cut produktů s pevnější tkání, jako je např. krájené ovoce, a ze zeleniny by se mohlo jednat např. o mrkev. Kromě toho mají tyto produkty zpravidla výraznější chuť v porovnání se saláty. Bude tedy pravděpodobně i jednodušší nalézt vhodnou kombinaci silice a fresh-cut produktu (Rojas-Grau et al., 2009). Rozsáhlé shrnutí dosavadních výsledků v oblasti kombinace jedlých filmů a silic naznačuje jejich možné využití při skladování masných a mléčných výrobků (Sadaka et al., 2014).

6. Závěr a doporučení

Hlavním cílem práce byla optimalizace metody aplikace plynné fáze silice na minimálně zpracované ovoce a zeleninu a posouzení jejího možného využití v běžné potravinářské praxi.

Na základě uvedených výsledků lze konstatovat, že byla optimalizována metoda ošetření polníčku a špenátu plynnou fází silic v laboratorních podmínkách. Aplikace silice byla testována v atmosférickém a nízkém tlaku. Pokusy s nízkým tlakem byly zařazeny z důvodu jeho využívání v potravinářském průmyslu při např. vakuovém sušení zeleniny a vakuové impregnaci zeleniny.

Bylo zjištěno, že koncentrace 8 µl silice na 1 litr vzduchu dokáže zcela eliminovat *E. coli* na výše uvedených produktech. Z hlediska využití této metody v praxi je nutné připustit, že krátkodobé ošetření listové zeleniny silicemi v průběhu zpracovatelského procesu se i přes jeho lepší účinnost v porovnání s ošetřením chlorem nejeví jako perspektivní, a to vzhledem k smíšenému účinku na organoleptické vlastnosti produktu i při použití v nízkých koncentracích.

Dále bylo zjištěno, že krátkou aplikací plynné fáze silice oregana lze docílit významného snížení *S. enteritidis* na klíčcích mungo a zároveň zachovat pro konzumenty přijatelné organoleptické vlastnosti produktu. V porovnání s jinými studiemi byly v našich pokusech použity výrazně nižší koncentrace silic, zároveň bylo dosaženo srovnatelného snížení počtu mikroorganismů. Lze tedy předpokládat, že plynná fáze silic v porovnání s kapalnými přípravky lépe prostoupí produktem.

Podtlak, který v *in vitro* testech významně snížil MIC a dobu ošetření silicemi, měl ve srovnání s ošetřením v atmosférickém tlaku významný, avšak krátkodobý vliv na snížení CPM, a to převážně při použití vyšších koncentrací silic.

Z hlediska praktického využití plynné fáze silic při výrobě fresh-cut produktů by byla spíše než krátkodobá vhodná dlouhodobější aplikace silic v koncentracích nižších než nalezené MIC. Silice by mohly být např. inkorporovány do obalových materiálů, kde by jako součást modifikované atmosféry v subletálních koncentracích napomáhaly udržovat stabilní množství, případně snižovat množství mikroorganismů na fresh-cut produktech. Koncentrace nižší než nalezené MIC by pravděpodobně neměly tak výrazný vliv na organoleptické vlastnosti produktu.

Z dostupných výzkumů se jako další perspektivní možnost jeví inkorporace silic do jedlých obalů, které se používají k udržení lepší textury a omezení hnědnutí fresh-cut produktů s pevnější tkání, jako je např. krájené ovoce, ze zeleniny by se mohlo jednat např. o mrkev.

Kromě toho mají tyto produkty zpravidla výraznější chuť v porovnání se saláty. Bude tedy pravděpodobně i jednodušší nalézt vhodnou kombinaci silice a fresh-cut produktu.

Jedním z dílčích cílů práce bylo vybrat vhodné odrůdy rostlin z čeledi *Lamiaceae* z hlediska kvantitativních (výnos) a kvalitativních (složení silice, antimikrobiální aktivita) vlastností jejich silic. Za nejvhodnější pro pěstování v polních podmínkách ČR lze na základě uvedených výsledků považovat saturejky, především pak saturejku zahradní od firmy Pharmasaat a Semo, které měly vysoké výnosy, dobrou vzcházivost a vhodné složení silice, z tymiánů pak ten od firmy Pharmasaat. Naopak bazalky se ukázaly jako nevyhovující z hlediska složení silic a výnosu, oregana pak nevyhovovaly z hlediska vzcházivosti a výnosu.

V rámci práce tedy byla potvrzena hypotéza, že silice v plynné fázi lze úspěšně využít k potlačení výskytu patogenních mikroorganismů v minimálně zpracované zelenině.

Hypotézu o pozitivním nebo neutrálním působení silic na organoleptické vlastnosti testovaných potravin nelze na základě dosažených výsledků zcela potvrdit, ani vyvrátit. Všechny ošetřené produkty získaly v některých hodnocených deskriptorech horší bodové skóre, avšak rozdíly nebyly ve většině případů statisticky průkazné. Výjimku tvoří silice zavinutky, jejíž vliv na organoleptické vlastnosti byl respondenty hodnocen velice negativně, a ukazuje se být proto k ošetření produktů jako nevhodná.

Třetí hypotézu o aplikaci silic v potravinářském průmyslu (viz str. 2) nelze, pokud budeme uvažovat o krátkodobém ošetření plynnou fází silic, potvrdit.

Z dílčích cílů bylo splněno nalezení vhodné odrůdy rostliny z čeledi *Lamiaceae*, byla určena vhodná metoda aplikace silic a ve většině případů byla nalezena i MIC použitých silic oproti testovaným mikroorgansimům. Určit vhodnou kombinaci „silice-potravina“ s ohledem na výsledné organoleptické vlastnosti produktů se podařilo jen částečně.

Využití silic pří výrobě fresh-cut produktů vyžaduje další zkoumání. Dle mého názoru by bylo vhodné další experimenty se silicemi zaměřit na fresh-cut produkty s pevnou tkání (viz výše), kdy by silice mohla být součástí modifikované atmosféry a jedlých filmů.

Z hlediska výrobní praxe se stále jako nejlepší prevence výskytu a množení nežádoucích mikroorganismů jeví dodržování správné výrobní praxe a zajištění a následný monitoring nezávadné pitné vody.

7. Seznam zkratek

ANOVA	Analýza rozptylu
ATP	Adenosintrifosfát
C	Koncentrace
$Ca(ClO)_2$	Chlornan vápenatý
Cl_2	Chlor
CPM	Celkový počet mikroorganismů
ČR	Česká republika
ECDC	European Centre for Disease and Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
EHEC	Enterohemoragická *E. coli*
EIEC	Enteroinvazivní *E. coli*
EPEC	Enteropatogenní *E. coli*
ETEC	Enterotoxikogenní *E. coli*
EU	Evropská unie
FAO	Food and Agricultural Organization
FDA	Food and Drug Administration
G-	Gram negativní
G+	Gram pozitivní
GAP	Správná zemědělská praxe
GC/FID	Plynový chromatogram s plamenově ionizačním detektorem
GC/MS	Plynový chromatogram s hmotnostním detektorem
GHP	Správná hygienická praxe
GMP	Správná výrobní praxe
GRAS	Generally Recognized as Safe
ha	Hektar
HOCl	Hypochlorová kyselina
IFPA	International Fresh-Cut Produce Association
K	Draslík
kPa	Kilopascal
KTJ	Kolonie tvořící jednotka
MAP	Modifikovaná atmosféra
MBC	Minimální baktericidní koncentrace

MHB	Mueller-Hinton bujón
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MIT	Minimální inhibiční čas
md	Mez detekce
N	Dusík
NIST	National Institute of Standards and Technology
OM	*Origanum majorana*
ORP	Oxido-redukční potenciál
OV	*Origanum vulgare*
P	Fosfor
PCA	Plate count agar
ppm	Parts per milion
ppt	Parts per thousand
SH	*Satureja hortensis*
TV	*Thymus vulgarit*
UV	Ultrafialové záření
VTEC	Verotoxin produkující *E. coli*
WHO	World Health Organization
VS Uhříněves	Výzkumná stanice Uhříněves

8. Použitá literatura

Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solson, C., Vinas, I. 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. International Journal of Food Microbiology. 123 (1-2).121-129.

Adams, M. R., Moss, M. O. 2008. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. 978-0-85404-284-5.

Adams, M. R., Hartley, A. D., Cox, L. J. 1989. Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads. Food Microbiology. 6 (2).69-77.

Adorjan, B., Buchbauer, G. 2010. Biological properties of essential oils: an updated review. Flavour and Fragrance Journal. 25 (6).407-426.

Aguilar, N., Pham Truong Thi Tho & Oyen, L.P.A. *Ocimum basilicum* In: Guzman, C. C. a Siemonsma, J. S. Proseabase [on line].1999. [cit. 2013-08-16]. Dostupné z [http://www.proseanet.org].

Ahvenainen, R. 1996. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. Trends in Food Science & Technology. 7 (6).179-187.

Alizadeh, A., Alizadeh, O., Sharafzadeh, S., Mansoori, S. 2011. Effect of different ecological environments on growth and active substances of garden thyme. Adv Envir Bio. 5 780-783.

Antunes, M. D. C., Cavaco, A. M. 2010. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. Flavour and Fragrance Journal. 25 (5).351-366.

Artes, F., Gomez, P. A., Artes-Hernandez, F. 2007. Physical, Physiological and Microbial Deterioration of Minimally Fresh Processed Fruits and Vegetables. Food Science and Technology International. 13 (3).177-188.

Atlasrostlin.cz. skořicovník cejlonský (*Cinnamomum zeylanicum*) [on line]. Atlas rostlin.cz. [cit. 2013-08-10]. Dostupné z [http://listnate-stromy.atlasrostlin.cz/skoricovnik-cejlonsky].

Ayala-Zavala, J. F., Gustavo, A. G. l.-A. 2010. In: Soliva-Fortuny, R. (ed.). Use of Additives to Preserve the Quality of Fresh-Cut Fruits and Vegetables. CRC Press. Boca Raton. 978-1-4200-7121-4.

Azizkhani, M., Elizaquível, P., Sánchez, G., Selma, M. V., Aznar, R. 2013. Comparative efficacy of *Zataria multiflora* Boiss., *Origanum compactum* and *Eugenia caryophyllus* essential oils against *E. coli* O157: H7, feline calicivirus and endogenous microbiota in commercial baby-leaf salads. International Journal of Food Microbiology. 166 (2).249-255.

Bajpai, V. K., Baek, K.-H., Kang, S. C. 2012. Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. Food Research International. 45 (2).722-734.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Waomar, M. 2008. Biological effects of essential oils - A review. Food and Chemical Toxicology. 46 (2).446-475.

Baranauskiene, R., Venskutonis, P. R., Viskelis, P., Dambrauskiene, E. 2003. Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51 (26).7751-7758.

Barnes, J., Anderson, L. A., Phillipson, J. D. 2007. Herbal Medicines. Pharmaceutical Press. London. 085369656X:

Beuchat, L. R., Nail, B. V., Adler, B. B., Clavero, M. R. S. 1998. Efficacy of Spray Application of Chlorinated Water in Killing Pathogenic Bacteria on Raw Apples, Tomatoes, and Lettuce. Journal of Food Protection. 61 (10).1305-1311.

Beuchat, L. R., Ryu, J. H. 1997. Produce handling and processing practices. Emerging Infectious Diseases. 3 (4).459-465.

Beuchat, L. R. 1999. Survival of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Bovine Feces Applied to Lettuce and the Effectiveness of Chlorinated Water as a Disinfectant. Journal of Food Protection. 62 (8).845-849.

BIOHAZ, E. P. o. B. H. Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). [on line]. EFSA Journal. 2013 [cit. Dostupné z [www.efsa.europa.eu/efsajournal].

Brackett, R. E. 1999. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. Postharvest Biology and Technology. 15 (3).305-311.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International Journal of Food Microbiology. 94 (3).223-253.

Carson, C. F., Cookson, B. D., Farrelly, H. D., Riley, T. V. 1995. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 35 (3).421-424.

Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F. 1999. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. Letters in Applied Microbiology. 29 (2).130-135.

Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Micieli, D., Venuti, V., Bisignano, G., Saija, A., Trombetta, D. 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55 (15).6300-6308.

Stanovení silic v rostlinných drogách. Český lékopis 2009. Grada. ISBN 978-80-247-2994-7

D'Antuono, L. F., Galletti, G. C., Bocchini, P. 2000. Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. populations from a North Mediterranean area (Liguria region, Northern Italy). Annals of Botany. 86 (3).471-478.

De Azeredo, G. A., Stamford, T. M., Nunes, P. C., Gomes Neto, N. J., De Oliveira, M. E. G., De Souza, E. L. 2011. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and

Rosmarinus officinalis L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. Food Research International. 44 (5).1541-1548.

de Guzman, C. C., Jansen, P. C. M. *Origanum* L. In: Proseabase [on line].1999. [cit. 2013-08-17]. Dostupné z [http://www.proseanet.org].

Deering, A. J., Mauer, L. J., Pruitt, R. E. 2012. Internalization of *E. coli* O157:H7 and Salmonella spp. in plants: A review. Food Research International. 45 (2).567-575.

Di Pasqua, R., Mamone, G., Ferranti, P., Ercolini, D., Mauriello, G. 2010. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. Proteomics. 10 (5).1040-1049.

Ding, H., Fu, T. J., Smith, M. A. 2013. Microbial contamination in sprouts: how effective is seed disinfection treatment? Journal of Food Science. 78 (4).R495-R501.

Djenane, D., Yanguela, J., Montanes, L., Djerbal, M., Roncaés, P. 2011. Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. Food Control. 22 (7).1046-1053.

Dzuong Duc Huyen & Brink, M. *Satureja hortensis* L. In: de Guzman, C. C. a. S., J.S. Proseabase [online].1999. [cit. 2013-08-16]. Dostupné z [http://www.proseanet.org].

EC. 2002. Commission Decision of 23 January 2002 amending Commission Decision 1999/217/EC as regards the register of flavouring substances used in or on foodstuffs. 2002/113/EC: Official Journal. L49 20/02/2002 (Issue).1-160.

ECDC. Annual epidemiological report Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data 2012 [on line]. European Centre for Disease Prevention and Control. 2013 Dostupné z [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Annual-Epidemiological-Report-2012.pdf].

Edris, A. E. 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. Phytotherapy Research. 21 (4).308-323.

EFSA. Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). [on line]. EFSA Journal. 2013 [cit. 2013-08-05]. Dostupné z [www.efsa.europa.eu/efsajournal].

Egler, F. E. 1973. The Hybrid Nature of" *Monarda media* Willd". Castanea. 209-214.

Flach, M. S., J.S. Plant Resources of South-East Asia No. 13: Spices. In: de Guzman, C. C. a. S., J.S. . Proseabase [on line].1999. [cit. 2013-08-16]. Dostupné z [http://www.proseanet.org].

Foods, M. s. e. a. r. o. s. s. N. A. C. o. M. C. f. 1999. International Journal of Food Microbiology. 52 (3).123-153.

Francis, G. A., Thomas, C., O'Beirne, D. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. International Journal of Food Science & Technology. 34 (1).1-22.

Frankova, A., Smid, J., Kloucek, P., Pulkrabek, J. 2014. Enhanced antibacterial effectiveness of essential oils vapors in low pressure environment. Food Control. 35 (1).14-17.

Fraňková, A., Marounek, M., Mozrová, V., Weber, J., Klouček, P., Lukešová, D. 2014. Antibacterial Activities of Plant-Derived Compounds and Essential Oils Toward *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus*. Foodborne Pathogens and Disease.

Freshfel. Comparison of different guidelines and practices for sprout production [on line]. The European Fresh Produce Association. 2011 [cit. 2013-09-02]. Dostupné z [http://www.efsa.europa.eu/fr/search/doc/203eax1.pdf].

Friedman, M., Henika, P. R., Mandrell, R. E. 2002. Bactericidal Activities of Plant Essential Oils and Some of Their Isolated Constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogene*s and *Salmonella enterica*. Journal of Food Protection. 65 (10).1545-1560.

Gil, M. I., Selma, M. V., López-Gálvez, F., Allende, A. 2009. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. International Journal of Food Microbiology. 134 (1).37-45.

Gill, A. O., Holley, R. A. 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. Int J Food Microbiol. 108 (1).1-9.

Gomes, C., Moreira, R. G., Castell-Perez, E. 2011. Microencapsulated antimicrobial compounds as a means to enhance electron beam irradiation treatment for inactivation of pathogens on fresh spinach leaves. Journal of Food Science. 76 (6).E479-E488.

Gomez-Lopez, V. M., Ragaert, P., Debevere, J., Devlieghere, F. 2008. Decontamination methods to prolong the shelf-life of minimally processed vegetables, state-of-the-art. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 48 (6).487-495.

Gulluce, M., Sokmen, M., Daferera, D., Agar, G., Ozkan, H., Kartal, N., Polissiou, M., Sokmen, A., Sahin, F. 2003. In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51 (14).3958-3965.

Gunduz, G. T., Gundul, S. A., Karapinar, M. 2009. Efficacy of myrtle oil against *Salmonella* Typhimurium on fresh produce. International Journal of Food Microbiology. 130 (2).147-150.

Gunduz, G. T., Gundul, S. A., Karapinar, M. 2010. Efficacy of sumac and oregano in the inactivation of *Salmonella* Typhimurium on tomatoes. International Journal of Food Microbiology. 141 (1-2).39-44.

Gutierrez, J., Bourke, P., Lonchamp, J., Barry-Ryan, C. 2009. Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic and quality markers of minimally processed vegetables. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 10 (2).195-202.
Gwinn, K. D., Ownley, B. H., Greene, S. E., Clark, M. M., Taylor, C. L., Springfield, T. N., Trently, D. J., Green, J. F., Reed, A., Hamilton, S. L. 2010. Role of essential oils in control of

Rhizoctonia damping-off in tomato with bioactive monarda herbage. Phytopathology. 100 (5).493-501.

Harris, J. L. 1997. Microbial Pathogens Associated with Produce. Perishables Handling. (91).2-3.

Harris, L. J., Farber, J. N., Beuchat, L. R., Parish, M. E., Suslow, T. V., Garrett, E. H., Busta, F. F. 2003. Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2 78-141.

Hay, R. K. M., Waterman, P. G. 1993. Volatile Oil Crops: Their Biology, Biochemistry and Production. Longman Scientific & Technical. Harlow. 0-582-00557-4.

Heaton, J. C., Jones, K. 2008. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. Journal of Applied Microbiology. 104 (3).613-626.

Holley, R. A., Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiology. 22 (4).273-292.

Hussain, A. I., Anwar, F., Hussain Sherazi, S. T., Przybylski, R. 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil *Ocimum basilicum* essential oils depends on seasonal variations. Food Chemistry. 108 (3).986-995.

Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R. L. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. Front Microbiol. 3 12.

IFPA. The convenience, nutritional value and safety of fresh-cut produce [on line]. International Fresh-cut Produce Assoiciation. 2005 [cit. 2013-08-12]. Dostupné z [http://www.docstoc.com/docs/30981105/The-Safety-and-Nutritional-Value-of-Fresh-Cut-Produce].

Ilic, S., Odomeru, J., LeJeune, J. T. 2008. Coliforms and prevalence of *Escherichia coli* and foodborne pathogens on minimally processed spinach in two packing plants. Journal of Food Protection. 71 (12).2398-2403.

ISO 8589:1998, Sensory analysis – General guidance for the design of test rooms.

Jacobsen, C. S., Bech, T. B. 2012. Soil survival of *Salmonella* and transfer to freshwater and fresh produce. Food Research International. 45 (2).557-566.

Jordán, M. J., Martínez, R. M., Goodner, K. L., Baldwin, E. A., Sotomayor, J. A. 2006. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. Industrial Crops and Products. 24 (3).253-263.

Karagozlu, N., Ergonul, B., Ozcan, D. 2011. Determination of antimicrobial effect of mint and basil essential oils on survival of *E. coli* O157: H7 and *S. typhimurium* in fresh-cut lettuce and purslane. Food Control. 22 (12).1851-1855.

Kloucek, P., Flesar, J., Kokoska, L., Nedorostova, L., Titera, D. 2008. Activity of essential oils in vapour phase against Paenibacillus larvae. Planta Medica. 74 (9).1138-1138.

Kloucek, P., Smid, J., Frankova, A., Kokoska, L., Valterova, I., Pavela, R. 2012. Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. Food Research International. 47 (2).161-165.

Kresánek, J., Kresánek, J. m. 2008. Atlas liečivých rastlín a lesných plodov Osveta. 424. 978-80-8063-292-2.

Kustrak, D., Kuftinec, J., Blazevic, N., Maffei, M. 1996. Comparison of the essential oil composition of two subspecies of Satureja montana. Journal of Essential Oil Research. 8 (1).7-13.

Laird, K., Phillips, C. 2012. Vapour phase a potential future use for essential oils as antimicrobials? Letters in Applied Microbiology. 54 (3).169-174.

Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., Nychas, G. J. E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology. 91 (3).453-462.

Lamikanra, O. 2002. Fresh-Cut Fruits and Vegetables: Science, Technology, and Market. CRC Press. London. 1587160307.

Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M. E., Gardini, F. 2004. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. Trends in Food Science & Technology. 15 (3-4).201-208.

Lang, G. R., Buchbauer, G. 2012. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. Flavour and Fragrance Journal. 27 (1).13-39.

López-Gálvez, F., Allende, A., Selma, M. V., Gil, M. I. 2009. Prevention of *Escherichia coli* cross-contamination by different commercial sanitizers during washing of fresh-cut lettuce. International Journal of Food Microbiology. 133 (1-2).167-171.

Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R., Nerin, C. 2005. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53 (17).6939-6946.

Mattson, T. E., Johny, A. K., Amalaradjou, M. A. R., More, K., Schreiber, D. T., Patel, J., Venkitanarayanan, K. 2011. Inactivation of *Salmonella* spp. on tomatoes by plant molecules. International Journal of Food Microbiology. 144 (3).464-468.

Mercier, J., Lindow, S. E. 2000. Role of Leaf Surface Sugars in Colonization of Plants by Bacterial Epiphytes. Applied and Environmental Microbiology. 66 (1).369-374.
Mikešová, M. L. a. I. 2004. Léčivé rostliny, O sběru a pěstování. Dokořán. Praha. 80-86569-68-3.

Moore-Neibel, K., Gerber, C., Patel, J., Friedman, M., Ravishankar, S. 2011. Antimicrobial activity of lemongrass oil against *Salmonella enterica* on organic leafy greens. Journal of Applied Microbiology. 112 (3).485-492.

Moreira, M. R., Ponce, A. G., del Valle, C. E., Roura, S. I. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. Lwt-Food Science and Technology. 38 (5).565-570.

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V. 2013. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. Pharmaceuticals. 6 (12).1451-1474.

Nedorostova, L., Kloucek, P., Urbanova, K., Kokoska, L., Smid, J., Urban, J., Valterova, I., Stolcova, M. 2011. Antibacterial effect of essential oil vapours against different strains of *Staphylococcus aureus*, including MRSA. Flavour and Fragrance Journal.

Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M. 2008. Comparison of antimicrobial properties of essential oils in vapour and liquid phase against foodborne pathogens. Planta Medica. 74 (9).1190-1190.

Neo, S. Y., Lim, P. Y., Phua, L. K., Khoo, G. H., Kim, S.-J., Lee, S.-C., Yuk, H.-G. 2013. Efficacy of chlorine and peroxyacetic acid on reduction of natural microflora *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocyotgenes* and *Salmonella* spp. on mung bean sprouts. Food Microbiology. 36 (2).475-480.

Nguyen-the, C., Carlin, F. 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 34 (4).371-401.

Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol Mol Biol Rev. 67 (4).593-656.

Nikolič, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C., Calhelha, R. C., Fernandes, Ă. n., Markovič, T., Markovič, D., Giweli, A., Sokovič, M. 2014. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L.,*Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. Industrial Crops and Products. 52 183-190.

Nyachuba, D. G. 2010. Foodborne illness: is it on the rise? Nutrition reviews. 68 (5).257-269.

Olaimat, A. N., Holley, R. A. 2012. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. Food Microbiology. 32 (1).1-19.

Parish, M. E., Beuchat, L. R., Suslow, T. V., Harris, L. J., Garrett, E. H., Farber, J. N., Busta, F. F. 2003. Methods to Reduce/Eliminate Pathogens from Fresh and Fresh-Cut Produce. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2 161-173.

Parish, M. E. 2008. In: (ed.). Food Safety Issues and the Microbiology of Fruit Beverages and Bottled Water. John Wiley & Sons, Inc. 9780470439074.

Parke, D. V., Lewis, D. F. 1992. Safety aspects of food preservatives. Food Additives and Contaminants. 9 (5).561-577.

Paster, N., Menasherov, M., Ravid, U., Juven, B. 1995. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. Journal of Food Protection. 58 (1).81–85.

Pavela, R., Bárnet, M. 2011. Alternativní plodina saturejka zahradní (*Satureja hortensis* L.) pěstování, význam, využitív ochraně rostlin Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha. 978-80-7427-083-3.

Phua, L. K., Neo, S. Y., Khoo, G. H., Yuk, H.-G. 2014. Comparison of the efficacy of various sanitizers and hot water treatment in inactivating inoculated foodborne pathogens and natural microflora on mung bean sprouts. Food Control. 42 270-276.

Ponce, A. G., Fritz, R., del Valle, C., Roura, S. I. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology. 36 (7).679-684.

Portner, D. M., Spiner, D. R., Hoffman, R. K., Phillips, C. R. 1961. Effect of ultrahigh vacuum on viability of microorganisms. Science. 134 (3495).2047.

Posada-Izquierdo, G. D., Pérez-Rodríguez, F., López-Gálvez, F., Allende, A., Selma, M. V., Gil, M. I., Zurera, G. 2013. Modelling growth of *Escherichia coli* O157: H7 in fresh-cut lettuce submitted to commercial process conditions: Chlorine washing and modified atmosphere packaging. Food Microbiology. 33 (2).131-138.

Ragaert, P., Jacxsens, L., Vandekinderen, I., Baert, L., Devlieghere, F. 2010. In: Soliva-Fortuny, R. (ed.). Microbiological and Safety Aspects of Fresh-Cut Fruits and Vegetables. CRC Press. Boca Raton. 978-1-4200-7121-4.

Ragaert, P., Devlieghere, F., Debevere, J. 2007. Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. Postharvest Biology and Technology. 44 (3).185-194.

Ravishankar, S., Zhu, L., Reyna-Granados, Javier, Law, B., Joens, L., Friedman, M. 2010. Carvacrol and Cinnamaldehyde Inactivate Antibiotic-Resistant *Salmonella enterica* in Buffer and on Celery and Oysters. Journal of Food Protection. 73 (2).234-240.

Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Mart, n-Belloso, O. 2006. Antimicrobial Activity of Essential Oils on *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli*, and *Listeria innocua* in Fruit Juices. Journal of Food Protection. 69 (7).1579-1586.

Restaino, L., Frampton, E. W., Hemphill, J. B., Palnikar, P. 1995. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. Applied and Environmental Microbiology. 61 (9).3471-3475.

Rico, D., Martin-Diana, A. B., Barat, J., Barry-Ryan, C. 2007. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. Trends in Food Science & Technology. 18 (7).373-386.

Rojas-Grau, M. A., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. 2009. Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. Trends in Food Science & Technology. 20 (10).438-447.

Rojas-Grau, M. A., Garner, E., Martin-Belloso, O. 2010. In: Soliva-Fortuny, R. (ed.). The Fresh-Cut Fruit and Vegetables Industry. CRC Press. Boca Raton. 978-1-4200-7121-4.
Roller, S., Seedhar, P. 2002. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4 and 8 °C. Letters in Applied Microbiology. 35 (5).390-394.

Rosnes, J., Sivertsvik, M., Skara, T., Ahvenainen, R. 2003. Combining MAP with other preservation techniques. Novel foodpackaging techniques. Finland: CRC Press. p. 287-304.

Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A., Jordán, M. J. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. Food Control. 19 (7).681-687.

Sadaka, F., Nguimjeu, C., Brachais, C., Vroman, I., Tighzert, L., Couvercelle, J.-P. 2014. Review on antimicrobial packaging containing essential oils and their active biomolecules. Innovative Food Science & Emerging Technologies.

Sahin, F., Gulluce, M., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M., Agar, G., Ozer, H. 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. Food Control. 15 (7).549-557.

Sandhya. 2010. Modified atmosphere packaging of fresh produce: current status and future needs. Lwt-Food Science and Technology. 43 (3).381-392.

Sangwan, N. S., Farooqi, A. H. A., Shabih, F., Sangwan, R. S. 2001. Regulation of essential oil production in plants. Plant Growth Regulation. 34 (1).3-21.

Sapers, G. M. 2001. Efficacy of Washing and Sanitizing Methods for Disinfection of Fresh Fruit and Vegetable Products Food Technology and Biotechnology. 39 (4).305-311.

Sikin, A. M., Zoellner, C., Rizvi, S. S. 2013. Current Intervention Strategies for the Microbial Safety of Sprouts. Journal of Food Protection. 76 (12).2099-2123.

Simon, J. E., Quinn, J., Murray, R. G. Basil: A Source of Essential Oils. In: Janick, J. a Simon, J. E. Advances in new crops [on line].1990. [cit. 16-Aug-2013]. Dostupné z [http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1990/v1-484.html].

Singh, N., Singh, R. K., Bhunia, A. K., Stroshine, R. L. 2002. Efficacy of Chlorine Dioxide, Ozone, and Thyme Essential Oil or a Sequential Washing in Killing *Escherichia coli* O157:H7 on Lettuce and Baby Carrots. LWT - Food Science and Technology. 35 (8).720-729.

Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Fasseas, K., Nychas, G.-J. E. 2001. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. Italian Journal of Food Science. 13 65-67.

Skočibušič, M., Bezič, N. 2004. Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of two Satureja species essential oils. Phytotherapy Research. 18 (12).967-970.

Sy, K. V., McWatters, K. H., Beuchat, L. R. 2005. Efficacy of gaseous chlorine dioxide as a sanitizer for killing *Salmonella*, yeasts, and molds on blueberries, strawberries, and raspberries. Journal of Food Protection. 68 (6).1165-1175.

Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., Cliver, D. O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control. 21 (9).1199-1218.

Tassou, C. C., Drosinos, E. H., Nychas, G. J. E. 1996. Inhibition of resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fish fillets in olive oil, oregano, and lemon juice under modified atmosphere or air. Journal of Food Protection. 59 (1).31-34.

Telci, I., Bayram, E., Yilmaz, G., Avci, B. 2006. Variability in essential oil composition of Turkish basils *Ocimum basilicum* L. Biochemical Systematics and Ecology. 34 (6).489-497.

Thompson, J. D., Chalchat, J.-C., Michet, A., Linhart, Y. B., Ehlers, B. 2003. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. Journal of Chemical Ecology. 29 (4).859-880.

Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., Cullen, P. J. 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57 (14).5987-6000.

Tournas, V. H., Heeres, J., Burgess, L. 2006. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. Food Microbiology. 23 (7).684-688.

Tournas, V. H. 2005. Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. International Journal of Food Microbiology. 99 (1).71-77.

Troszynska, A., Wolejszo, A., Narolewska, O. 2006. Effect of germination time on the content of phenolic compounds and sensory quality of mung bean (Vigma radiata L.) sprouts. Polish journal of food and nutrition sciences. 15 (4).453-459.

Tyagi, A. K., Malik, A., Gottardi, D., Guerzoni, M. E. 2012. Essential oil vapour and negative air ions: A novel tool for food preservation. Trends in Food Science & Technology. 26 (2).99-113.

Tyagi, A. K., Malik, A. 2012. Bactericidal action of lemon grass oil vapors and negative air ions. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 13 169-177.

Ultee, A., Bennik, M., Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology. 68 (4).1561-1568.

Vaara, M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiol Rev. 56 (3).395-411.

Valero, M., Salmeron, M. C. 2003. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. International Journal of Food Microbiology. 85 (1-2).73-81.

Wan, Wilcock, Coventry. 1998. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Applied Microbiology. 84 (2).152-158.

Watada, A. E., Qi, L. 1999. Quality of fresh-cut produce. Postharvest Biology and Technology. 15 (3).201-205.

Weissinger, W. R., McWatters, K. H., Beuchat, L. R. 2001. Evaluation of volatile chemical treatments for lethality to Salmonella on alfalfa seeds and sprouts. Journal of Food Protection. 64 (4).442-450.

Widodo, S. H. *Thymus vulgaris* L. In: de Guzman, C. C. a. S., J.S. Proseabase [on line].1999. [cit. 2013-08-16]. Dostupné z [http://www.proseanet.org].

Yossa, N., Patel, J., Millner, P., Ravishankar, S., Lo, Y. M. 2013. Antimicrobial activity of plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* on lettuce. Foodborne Pathogens and Disease. 10 (1).87-96.

Zagory, D. 1999. Effects of post-processing handling and packaging on microbial populations. Postharvest Biology and Technology. 15 (3).313-321.

9. Seznam příloh

Příloha 1: článek „Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase“

Příloha 2: článek „Enhanced antibacterial effectiveness of essential oils vapors in lowpressure environment“

Příloha 3: článek „Antibacterial Activities of Plant-Derived Compounds and Essential Oils toward *Cronobacter Sakazakii* and *Cronobacter Malonaticus“*

Příloha 4: Přehled klimatických podmínek VS Uhříněves v letech 2011–2013

Příloha 5: Formulář senzorického profilu klíčků mungo

Příloha 6: Formulář senzorického profilu baby špenátu

Příloha 7: Formulář senzorického profilu polníčku

10. Seznam tabulek, grafů a obrázků

Obrázky

Obrázek 1: Struktura buněčné stěny G+ a G- bakterií
Obrázek 2: Možné cesty kontaminace fresh-cut produktů patogenními mikroorganismy
Obrázek 3: Obecné schéma výroby fresh-cut ovoce a zeleniny
Obrázek 4: Obecné schéma výroby naklíčených semen
Obrázek 5 uspořádání pěstebních pokusů v roce 2013
Obrázek 6: Schéma ošetření klíčků
Obrázek 7: Schéma ošetření baby špenátu

Tabulky

Tabulka 1a: Příklady experimentální aplikace silic na minimálně zpracované produkty
Tabulka 1b: Přehled testovaných silic na fresh-cut salátech
Tabulka 2: Počty mikroorganismů na fresh-cut produkci v obchodech v porovnání s nezpracovaným ovocem a zeleninou
Tabulka 3: Rostliny vybrané pro první rok polních pokusů (2011)
Tabulka 4: Rostliny vybrané pro druhý rok polních pokusů (2012)
Tabulka 5: Rostliny vybrané pro pěstební pokusy ve třetím roce (2013)
Tabulka 6: Podmínky analýzy silic
Tabulka 7: Varianty ošetření naklíčených semen mungo
Tabulka 8: Výběr sledovaných charakteristik pěstovaných rostlin v roce 2011
Tabulka 9: Průměrná výtěžnost silic pěstovaných v roce 2012
Tabulka 10: Výtěžnost silic rostlin pěstovaných v roce 2013
Tabulka 11: Statisticky významné rozdíly ve výtěžnosti pěstovaných saturejek
Tabulka 12: Statisticky významné rozdíly v množství p-cymenu v saturejkách
Tabulka 13: Minimální inhibiční časy (MIT) plynné fáze silic za atmosférického a nízkého tlaku
Tabulka 14: Rozdílné MIC plynné fáze silic v podtlaku a atmosferickém tlaku.
Tabulka 15: Snížení CPM a *S. enteritidis* (KTJ/g) na klíčcích ošetřených oreganovou silicí
Tabulka 16: Snížení CPM a *E. coli* na polníčku ošetřeném silicí oregana
Tabulka 17: Snížení CPM a *E. coli* na špenátových listech ošetřených silicí saturejky a zavinutky

Grafy

Graf 1: Průměrné zastoupení sledovaných látek [%] v saturejce zahradní od různých dodavatelů

Graf 2: Průměrné zastoupení sledovaných látek [%] v dobromysli a majoránce od různých dodavatelů

Graf 3: Průměrné zastoupení [%] sledovaných látek v tymiánech

Graf 4: Průměrné zastoupení [%] sledovaných látek v bazalce

Graf 5: Průměrné zastoupení [%] sledovaných látek v tymiánu od různých dodavatelů

Graf 6: Průměrný počet rostlin na m^2 u jednotlivých pěstovaných druhů

Graf 7: Průměrné zastoupení [%] sledovaných látek v saturejkách od různých dodavatelů

Graf 8: Průměrné zastoupení [%] sledovaných látek v dobromysli a tymiánu od různých dodavatelů

Graf 9: Hedonické hodnocení klíčků mungo

Graf 10: Hodnocení intenzity vybraných deskriptorů klíčků mungo

Graf 11: Hedonické hodnocení polníčku

Graf 12: Hodnocení intenzity vybraných deskriptorů polníčku

Graf 13: Hedonické hodnocení špenátu

Graf 14: Hodnocení intenzity vybraných deskriptorů špenátu

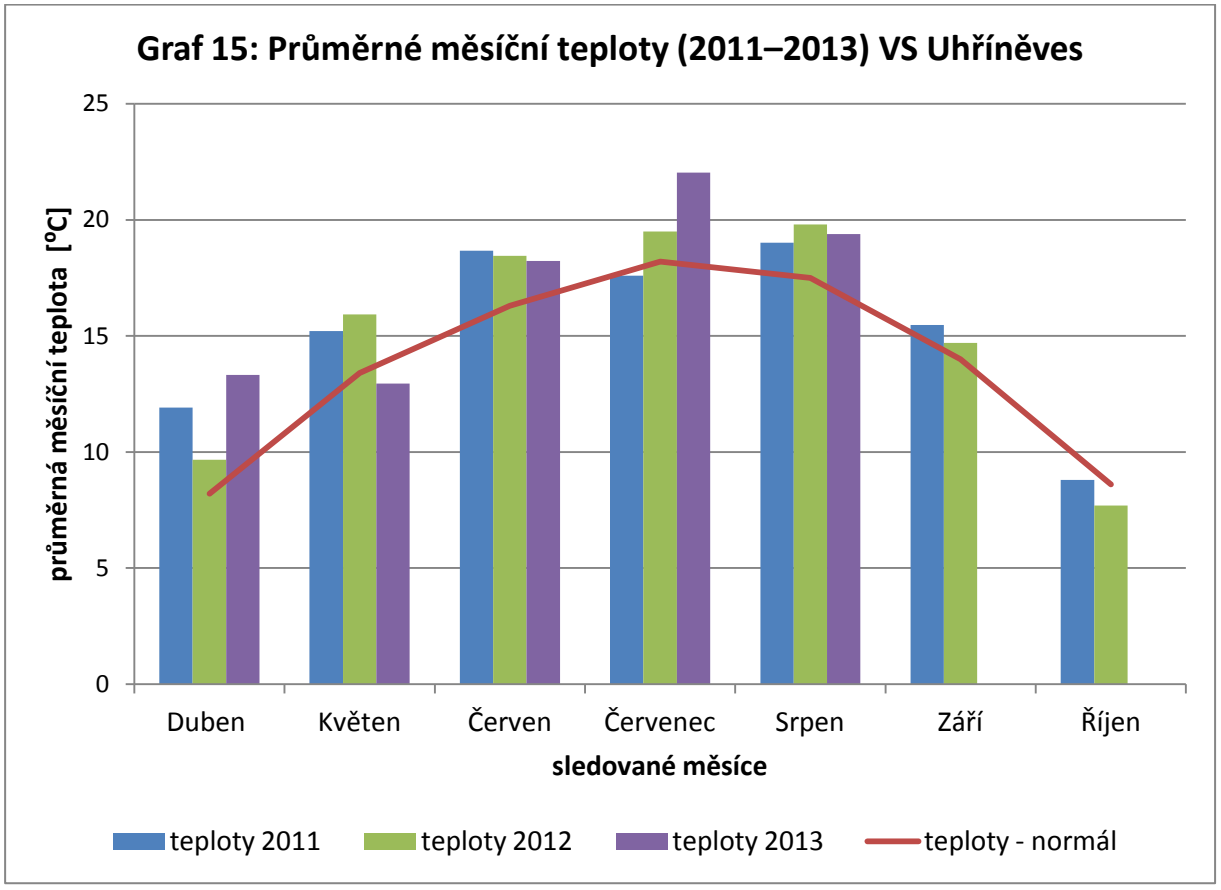
Graf 15: Průměrné měsíční teploty (2011–2013) VS Uhříněves

Graf 16: Měsíční úhrny srážek (2011 –2013) VS Uhříněves

Příloha 4

Klimatické podmínky na VS Uhříněves v letech 2011–2013

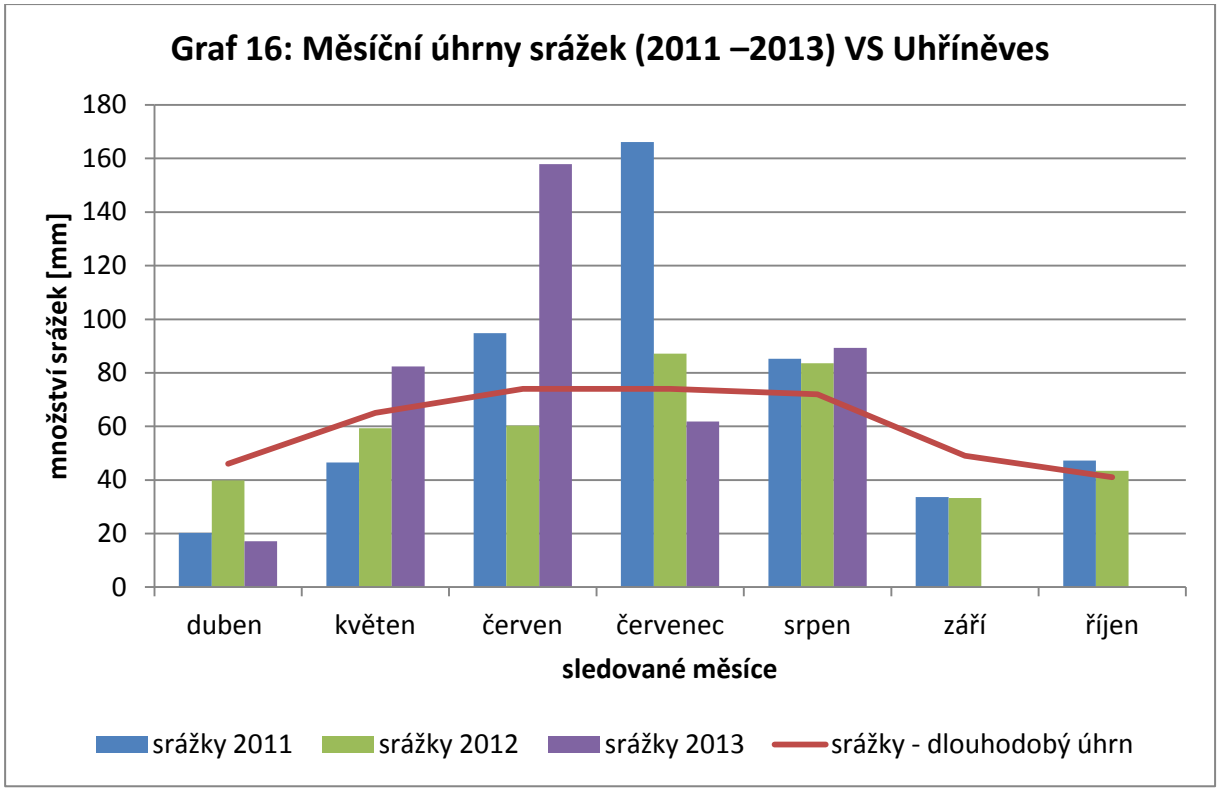
V letech 2011–2013 se teploty od dubna do května pohybovaly o 1,5–3,7 °C nad dlouhodobým normálem, pouze červenec roku 2011 a květen roku 2013 byly mírně podprůměrné. Říjnové teploty byly v těchto letech mírně pod dlouhodobým normálem (graf 15).



* data za září a říjen 2013 nejsou k dispozici

Měsíční úhrny srážek se ve sledovaných obdobích značně lišily, pouze v srpnu byl úhrn srážek vyrovnaný. Množství srážek se ve sledovaném období pohybovalo mírně pod hodnotami dlouhodobého úhrnu. Extrémními měsíci byly červen 2013 a červenec 2011, kdy množství srážek bylo o polovinu vyšší oproti dlouhodobému úhrnu (Graf 16).

Příloha 4



* data za září a říjen 2013 nejsou k dispozici

Příloha 5

Hodnocení senzorického profilu klíčků mungo

Jméno:..... Příjmení: .....Č. vzorku: .....

Zdravotní stav: ..... Datum a hodina: .....

Úkol: Ochutnejte předložený vzorek klíčků mungo a soustřeďte se na hodnocení vzhledu, vůně, chuti a konzistence. K hodnocení použijte grafické stupnice.

VZHLED

CELKOVÝ VZHLED: _____

velmi špatný — vynikající

BARVA

INTENZITA BARVY: _____

bílá — lehce krémová

VŮNĚ

PŘÍJEMNOST VŮNĚ: _____

odporná — velmi příjemná

INTENZITA TRÁVOVÉ VŮNĚ: _____
(vůně čerstvě posečené trávy) neznatelná — velmi silná

INTENZITA JINÉ VŮNĚ: _____

neznatelná — velmi silná

TEXTURA (vše po 10. „rozžvýknutí")

ŠŤAVNATOST: _____

suchý — šťavnatý

VLÁKNITOST: _____

nevláknitý — vláknitý

MOUČNATOST: _____

nemoučnatý — moučnatý

CHUŤ

CELKOVÁ PŘÍJEMNOST CHUTI: _____

odporná — velmi příjemná

INTENZITA DÍLČÍCH CHUTÍ

Příloha 5

INTENZITA CHUTI ČERSTVÝCH KLÍČKŮ (HRÁŠKOVÁ): neznatelná velmi silná

SLADKÁ: neznatelná velmi silná

HOŘKÁ: neznatelná velmi silná

SVÍRAVÁ: neznatelná velmi silná

MOUČNATÁ: neznatelná velmi silná

INTENZITA CHUTI HŘEBÍČKU: neznatelná velmi silná

INTENZITA CHUTI OREGANA: neznatelná velmi silná

INTENZITA CHUTI CITRONOVÉ TRÁVY: neznatelná velmi silná

PŘETRVÁVAJÍCÍ CHUŤ: neznatelná velmi silná

INTENZITA JINÉ CHUTI: neznatelná velmi silná

CELKOVÉ HODNOCENÍ VZORKŮ KLÍČKŮ MUNGO:

odporný **velmi příjemný**

ZAPIŠTE NALEZENÉ VADY VZHLEDU, VŮNĚ, CHUTI ČI KONZISTENCE:

……

……

…….....

Příloha 6

Hodnocení senzorického profilu baby špenátu

Jméno:..... Příjmení: .....Č. vzorku: ……

Zdravotní stav: ..... Datum a hodina: ……

Úkol: Ochutnejte předložený vzorek baby špenátu a soustřeďte se na hodnocení vzhledu, vůně, chuti a konzistence. K hodnocení použijte grafické stupnice.

VZHLED

CELKOVÝ VZHLED: _____

velmi špatný — vynikající

BARVA

INTENZITA BARVY: _____

svěže zelená — našedlá

VŮNĚ

PŘÍJEMNOST VŮNĚ: _____

odporná — velmi příjemná

INTENZITA TRÁVOVÉ VŮNĚ: _____
(vůně čerstvě posečené trávy) neznatelná — velmi silná

INTENZITA JINÉ VŮNĚ: _____

neznatelná — velmi silná

TEXTURA (vše po 10. „rozžvýknutí“)

ŠŤAVNATOST: _____

suchý — šťavnatý

MOUČNATOST: _____

nemoučnatý — moučnatý

CHUŤ

CELKOVÁ PŘÍJEMNOST CHUTI: _____

odporná — velmi příjemná

Příloha 6

INTENZITA DÍLČÍCH CHUTÍ

INTENZITA ŠPENÁTOVÉ CHUTI: neznatelná — velmi silná

SLADKÁ: neznatelná — velmi silná

HOŘKÁ: neznatelná — velmi silná

SVÍRAVÁ: neznatelná — velmi silná

INTENZITA CHUTI SATUREJKY: neznatelná — velmi silná

INTENZITA CHUTI OREGANA: neznatelná — velmi silná

PŘETRVÁVAJÍCÍ CHUŤ: neznatelná — velmi silná

INTENZITA JINÉ CHUTI: neznatelná — velmi silná

CELKOVÉ HODNOCENÍ VZORKŮ BABY ŠPENÁTU:

odporný — velmi příjemný

ZAPIŠTE NALEZENÉ VADY VZHLEDU, VŮNĚ, CHUTI ČI KONZISTENCE:

……

……

…….....

Příloha 7

Hodnocení senzorického profilu polníčku

Jméno:..... Příjmení: .....Č. vzorku: .....

Zdravotní stav: ..... Datum a hodina: .....

Úkol: Ochutnejte předložený vzorek polníčku a soustřeďte se na hodnocení vzhledu, vůně, chuti a konzistence. K hodnocení použijte grafické stupnice.

VZHLED

CELKOVÝ VZHLED: _____

velmi špatný — vynikající

BARVA

INTENZITA BARVY: _____

svěže zelená — našedlá

VŮNĚ

PŘÍJEMNOST VŮNĚ: _____

odporná — velmi příjemná

INTENZITA TRÁVOVÉ VŮNĚ: _____
(vůně čerstvě posečené trávy) neznatelná — velmi silná

INTENZITA JINÉ VŮNĚ: _____

neznatelná — velmi silná

TEXTURA (vše po 10. „rozžvýknutí")

ŠŤAVNATOST: _____

suchý — šťavnatý

MOUČNATOST: _____

nemoučnatý — moučnatý

CHUŤ

CELKOVÁ PŘÍJEMNOST CHUTI: _____

odporná — velmi příjemná

INTENZITA DÍLČÍCH CHUTÍ

INTENZITA ŠPENÁTOVÉ: _____

neznatelná — velmi silná

Příloha 7

CHUTI

SLADKÁ:

neznatelná velmi silná

HOŘKÁ:

neznatelná velmi silná

SVÍRAVÁ:

neznatelná velmi silná

INTENZITA CHUTI OREGANA:

neznatelná velmi silná

PŘETRVÁVAJÍCÍ CHUŤ:

neznatelná velmi silná

INTENZITA JINÉ CHUTI:

neznatelná velmi silná

CELKOVÉ HODNOCENÍ VZORKŮ POLNÍČKU:

odporný **velmi příjemný**

ZAPIŠTE NALEZENÉ VADY VZHLEDU, VŮNĚ, CHUTI ČI KONZISTENCE:

……

……

…….....