

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality a bezpečnosti potravin**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Využití technologií enkapsulace pro efektivní aplikaci  
silic proti skládkovým chorobám česneku**

**Diplomová práce**

**Kateřina Novotná**

**Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů**

**doc. Ing. Pavel Klouček, Ph.D.**

**© 2022 ČZU v Praze**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Využití technologií enkapsulace pro efektivní aplikaci silic proti skládkovým chorobám česneku" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4. 2022

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Pavlu Kloučkovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, vstřícnost a ochotu při konzultacích a poskytnutí zajímavých informací k tématu během zpracování praktické části.

# Využití technologií enkapsulace pro efektivní aplikaci silic proti skládkovým chorobám česneku

## Souhrn

Česnek setý je oblíbenou plodinou, která našla své místo jak v gastronomii, jako koření a součást různých pokrmů, tak i díky obsahu mnoha účinných látek jako přírodní léčivo na problémy spojené především s kardiovaskulárními chorobami. I přesto, že i sám česnek obsahuje antimikrobiální látky, je často napadán patogenními mikroorganismy, které způsobují producentům vysoké ztráty. Nejčastějším rodem hub kontaminujících česnek, je rod *Fusarium*. Napadá cibule česneku často již na poli a napadení není ihned rozeznatelné zvnějšku, dokud nedojde k větším ztrátám při skladování. Pokud se příznaky napadení, jako změkklé stroužky, hnědé skvrny, růst bílého mycelia, zasychání nebo hniloba kořenů, objeví včas, musí se ihned odstranit. Jelikož se skladovací ztráty česneku mohou pohybovat až v řádech desítek procent, je nutné hledat řešení ochrany a tím i snížení ekonomických dopadů. Vhodným řešením by mohly být silice, jejichž obliba v použití, jako ochranných přírodních látek, je v posledních letech na vzestupu.

Cílem této práce bylo nejprve izolovat patogenní mikroorganismy ze získaných cibulí česneku vykazujících znaky poškození, a následně vybrané houbové patogeny otestovat na citlivost vůči silicím skořicové kůry, oregana, tymiánu, hřebíčku, máty rolní a citronové trávy. Pomocí in vitro testování byla zjištěna minimální inhibiční koncentrace všech šesti silic, kdy nejnižší hodnota 64 mg/l byla zaznamenána u skořicové kůry. Tři nejaktivnější silice, skořicové kůry, oregana a tymiánu, byly následně enkapsulovány do bentonitu a otestovány přímo na stroužcích česneku. U všech tří silic byla prokázána inhibice patogenních mikroorganismů na povrchu stroužků po celou dobu testování v délce jednoho měsíce, kdežto u kontrolních vzorků započal nárůst patogenů již po týdnu od inokulace. Silice oregana a tymiánu nedokázaly zabránit vnitřnímu poškození, a byly pravděpodobně i jeho původcem, u skořicové kůry bylo pozorované poškození v menší míře. Bylo tak prokázáno, že je možné potlačit růst houbových patogenů na povrchu, ale k zabránění vnitřního poškození bude nutný další výzkum.

**Klíčová slova:** *Allium sativum* L., česnek, enkapsulace, mikroorganismy, silice, skladování

# Use of encapsulation technologies for effective application of essential oils against storage microorganisms of garlic

## Summary

Garlic is a popular crop that has found its place in gastronomy, as a spice and part of various dishes, as well as due to the content of many active ingredients, as a natural remedy for problems associated primarily with cardiovascular disease. Although garlic itself contains antimicrobials, it's often attacked by pathogenic microorganisms that cause high losses to producers. The most common genus of fungi contaminating garlic is *Fusarium*. Garlic bulbs are often attacked in the field and the infestation is'nt immediately recognizable from the outside until greater storage losses occur. If signs of infestation, such as soft cloves, brown spots, white mycelium growth, drying or root rot, appear early, these pieces must be removed immediately. As storage losses in garlic can be in the tens of percent, it's necessary to seek solutions to protect and thus reduce the economic impact. A suitable solution could be essential oils, whose popularity in use as natural preservatives, has been on the rise in recent years.

The aim of this work was first to isolate pathogenic microorganisms from the obtained garlic bulbs showing signs of damage, and then to test selected fungal pathogens for sensitivity to cinnamon bark, oregano, thyme, cloves, mint and lemongrass. In vitro testing showed the minimum inhibitory concentration of all six essential oils, with the lowest value of 64 mg / l recorded in cinnamon bark. The three most active essential oils, cinnamon bark, oregano and thyme, were then encapsulated in bentonite and tested directly on garlic cloves. All three essential oils showed inhibition of pathogenic microorganisms on the clove surface throughout the one-month testing period, whereas in the control samples, pathogen growth began as early as one week after inoculation. Oregano and thyme essential oils could'nt prevent internal damage, and were probably its cause, with less damage being observed with the cinnamon bark. It has thus been shown that it's possible to suppress the growth of fungal pathogens on the surface, but further research will be needed to prevent internal damage.

**Keywords:** *Allium sativum* L., garlic, encapsulation, microorganisms, essential oils, storage

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce.....</b>	<b>9</b>
2.1	Cíle práce .....	9
2.2	Hypotézy .....	9
<b>3</b>	<b>Literární rešerše .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1</b>	<b>Česnek .....</b>	<b>10</b>
3.1.1	Základní informace .....	10
3.1.2	Pěstování česneku .....	11
3.1.3	Význam česneku .....	13
3.1.4	Pěstování česneku v ČR.....	14
3.1.5	Sklizeň a skladování .....	14
3.1.5.1	Sklizeň .....	15
3.1.5.2	Skladování .....	15
3.1.5.3	Problémy při skladování .....	16
3.1.5.4	Patogenní houbové mikroorganismy .....	17
<b>3.2</b>	<b>Silice.....</b>	<b>18</b>
3.2.1	Antimikrobiální účinky silic .....	20
3.2.2	Formulace silic.....	22
3.2.2.1	Enkapsulace .....	22
3.2.2.2	Jílové minerály.....	25
<b>4</b>	<b>Metodika.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>Testování in vitro .....</b>	<b>26</b>
4.1.1	Médium .....	26
4.1.2	Izolace houbových patogenů.....	26
4.1.2.1	Určení izolovaných mikroorganismů.....	27
4.1.3	Silice .....	27
4.1.4	Stanovení minimální inhibiční koncentrace.....	28
<b>4.2</b>	<b>Testování formulace.....</b>	<b>29</b>
4.2.1	Materiály .....	29
4.2.2	Jílové částice .....	30
4.2.3	Stanovení účinnosti enkapsulovaných silic .....	30

<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>31</b>
5.1	Izolace mikroorganismů .....	31
5.2	Stanovení minimální inhibiční koncentrace .....	33
5.3	Účinnost enkapsulovaných silic na česneku.....	36
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>38</b>
6.1	Izolace mikroorganismů a testování citlivosti .....	38
6.2	Testování na stroužcích česneku .....	39
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>43</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů.....</b>	<b>50</b>
<b>10</b>	<b>Samostatné přílohy .....</b>	<b>I</b>

# 1 Úvod

Česnek je nedílnou součástí gastronomie, především jako koření, a jistě se s ním každý běžně setkává ve svém domově. Česnek ale hraje i významnou roli v přírodní medicíně, díky obsahu zdraví prospěšných látek, především známých jako siriné sloučeniny (Keusgen 2002; Velát & Ovesná 2020). Těmito dvěma hlavními způsoby se česnek využívá již po staletí a vzhledem ke směřování dnešního světa k širšímu využívání přírodních látek, je snaha známých vlastností česneku nadále využívat a rozšiřovat možnosti použití.

Problém s širším a efektivním využitím česneku jako potraviny, koření a léčiva, nastává při jeho skladování. Česnek, ač sám obsahuje antimikrobiální, antifungální, antioxidační a další prospěšné látky, je sám o sobě velmi náchylný na způsob sklizně a následně na správné skladování. I přes dodržení všech správných postupů a podmínek, může docházet k častým kontaminacím především houbovými patogeny a ke ztrátám v důsledku hnilob, které dokáží znehodnotit až 40 % skladovaného česneku při běžném skladování při pokojové teplotě (de Santis et al. 2021). Možností jak snížit skladovací ztráty může být využití nižších teplot, kdy je ale nutné vybírat odrůdy česneku, které jsou k chladu méně náchylné a jsou i po několika měsících vhodné k vysazení či konzumaci bez větších změn (Volk et al. 2004).

Jako vhodné řešení skladovacích ztrát se mohou nabízet ale i silice. Tyto přírodní látky, známé také jako éterické oleje, a jejich stále širší využití, je v dnešním světě velmi aktuálním tématem a hledají se cesty, jak maximalizovat jejich potenciál v potravinářství. Silice mají prokazatelné antimikrobiální, antifungální, antioxidační vlastnosti a mohou tak prodloužit dobu skladovaných potravin, či udržet jejich kvalitu a nezávadnost. U silic je ale nutné řešit jejich nestálost. Snadno se znehodnotí při vystavení vnějším podmínkám (teplo, světlo, vzduch), a proto je řešena jejich ochrana metodami enkapsulace. Existuje několik metod, jako sprejové sušení, emulzifikace, extruze, sprejové mražení, ale pro využití při skladování nebalených potravin nebo surovin, jako je česnek, se jeví vhodnější využití jílových materiálů. Poskytují lepší možnost manipulace a rozdělení k potravíně, stejně jako méně nákladnou techniku.

Začlenění enkapsulovaných silic do potravinářského řetězce je na vzestupu a je možné nalézt využití především u balených potravin podléhajících rychlé zkáze, jako jsou rajčata, jahody a maso (Campos-Requena et al. 2015; Rajaei et al. 2017; Buendía–Moreno et al. 2020). Menší využití je zatím u skladování většího množství potravin, jako je česnek či další zelenina, která ještě není určena pro konečného spotřebitele.



## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

### **2.1 Cíle práce**

Cílem práce bylo izolovat mikroorganismy a nalézt silice a jejich technologie aplikace, které by inhibovaly mikroorganismy zhoršující kvalitu skladovaného česneku.

### **2.2 Hypotézy**

Podaří se nalézt silice, které budou aktivní a potlačí růst mikroorganismů a prodlouží dobu skladování česneku.

Podaří se nalézt technologii formulace, která bude mít určité lepší vlastnosti než samotná silice.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Česnek

#### 3.1.1 Základní informace

Česnek setý (*Allium sativum* L.), známý také jako česnek kuchyňský, je všestranná zelenina z čeledi amarylkovitých. Pochází z oblasti střední Asie a severovýchodního Íránu. Přesné místo původu bylo dlouho neznámé, jelikož nebyl přesně určený předchůdce dnes již známého česneku. Na základě mnoha studií se došlo k závěru, že primitivním předchůdcem byl patrně planý druh *A. sativum* var. *longicuspis*. Zmínky o česneku, pocházející od Sumerů, Číňanů a Egyptanů, jsou až 6000 let staré. V České republice jsou první nálezy doloženy z období Velkomoravské říše (Etoh & Simon 2002; Velát & Ovesná 2020).

Česnek je celosvětově známá zelenina, která se pěstuje ve všech mírných oblastech až po oblasti subtropické. To je možné díky jeho schopnosti se přizpůsobit různorodým klimatickým podmínkám (Velát & Ovesná 2020). Přes 80 % světové produkce česneku pochází z Asie kde jsou největšími producenty Čína, Indie, Jižní Korea. V Evropě je největším producentem Španělsko a v Africe Egypt (“FAOSTAT” 2022; Diriba-Shiferaw 2016).

Díky charakteristické chuti a vůni je česnek široce používán v gastronomii již po dlouhá staletí (Fritsch & Friesen 2002). Jde o jednu z nejstarších pěstovaných zelenin a je druhá nejrozšířenější pěstovaná zelenina z rodu *Allium*, vedle cibule (*Allium cepa* L.) (Diriba-Shiferaw 2016).

Jedná se o jednoděložnou rostlinu, která je tvořena cibulí složenou z menších částí, stroužků. Tyto stroužky představují hlavní produkt pěstování česneku, ale lidé konzumují i čerstvé listy, pseudostonky a pacibulky (Fritsch & Friesen 2002; Netzel 2020). Česnek během svého vývoje přišel o schopnost se reprodukovat pomocí semen, tudíž uplatňuje jen nepohlavní rozmnožování, při kterém jsou ale zároveň vyvinuty pohlavní orgány (květ, pestíky), ale nedochází ke skutečnému oplození. Takovýto druh je nazýván apomiktický. Tento stav vede i k mnohým mutacím, a tak má česnek jako druh širokou škálu rozmanitostí ve své morfologii i adaptibilitě. Morfologicky je česnek dělen na dva základní typy – paličák a nepaličák. V České republice je oblíbenější morfotyp paličák, který vytváří květní stvol a květenství s pacibulkami. Morfotyp nepaličák květní stvol nevytváří a mimo Českou republiku se díky jednoduššímu pěstování, lepším výnosům a vyšší skladovatelnosti, stal oblíbenějším. Existují další rozšíření těchto typů, jako česnek úzkolistý a širokolistý a formy ozimé a jarní (Velát & Ovesná 2020).

Česnek je oblíbený i jako zdroj léčivých látek. Obsahuje velké množství biologicky aktivních látek. Jednou z nejméně významných látek je alliin, který se nachází ve všech částech rostliny a jeho obsah může být až 1,4 % čerstvé hmotnosti. Alliin se při poškození přemění činností alliinázy na thiosulfínát allicin a má antibakteriální a antifungální vlastnosti (Fritsch & Friesen 2002; Keusgen 2002; Velát & Ovesná 2020). Další účinné látky jsou allicin, diallyl sulfid, diallyl disulfid, diallyl trisulfid, a S-allyl-cystein (látky obecně známé také jako siriné aminokyseliny a jejich deriváty) (Keusgen 2002; Velát & Ovesná 2020). Tyto složky dohromady jsou zodpovědné za silné aroma a výraznou chuť česneku a mají zdraví prospěšné účinky (Diriba-Shiferaw 2016). Působí zároveň antioxidačně a mnohé studie prokazují, že v souvislosti s jejich příjmem může dojít i k významnému snížení rizika vzniku různých chronických onemocnění, např. kardiovaskulárních, rakoviny, obezity, cukrovky a vysokého krevního tlaku (Fritsch & Friesen 2002; Netzel 2020). Česnek navíc obsahuje značné množství minerálů jako Ca, P, K a jeho listy jsou zdrojem bílkovin, vitamínů A a C (Diriba-Shiferaw 2016).

Díky všem těmto vlastnostem je česnek nedílnou součástí gastronomie i zemědělské produkce a je tak významným předmětem výzkumu aplikace jako funkční potraviny nebo nutraceutika pro prevenci a léčbu výše zmíněných onemocnění (Velát & Ovesná 2020; Netzel 2020).

### **3.1.2 Pěstování česneku**

Česnek se vysazuje na podzim nebo na jaře, podle odolnosti a typu vybraných odrůd. Výnos produkce a kvalita česneku závisí na agronomickém hospodaření, fyziologických a hygienických vlastnostech sadby používané při setí a ekonomických zdrojích (Jimenez-Vazquez et al. 2014). U ozimých odrůd výrazně ovlivňuje pozdější kvalitu česneku výběr správné doby sázení. Celkové výnosy také ovlivňuje hustota sadby, která má vliv na správný vývin fotosyntetického aparátu. V ČR se nejčastěji vysazuje v hustotě 200 000 – 300 000 kusů/ha (Jimenez-Vazquez et al. 2014; Velát & Ovesná 2020).

Jelikož je česnek vysoce hodnotná a výnosná, ale zároveň velmi citlivá plodina, je dobré zajistit k pěstování co nejlepší půdní podmínky. Půda by měla být drobivá, nejlépe tedy písčité či hlinitopísčité, až velmi jemně hlinitopísčité, s vysokým obsahem organické hmoty, která zajišťuje zvýšenou retenci vody a živin. Vždy ale musí být zajištěn velmi dobrý odvod přebytečné vody (Diriba-Shiferaw 2016). K růstu česnek také potřebuje dostatek slunce a celou škálu dostupných živin. Ideální je proto pH půdy 6,8 - 7,2, jelikož mnoho živin je vázáno

v půdách, které jsou spíše zásaditější nebo kyselější. Příprava půdy pro pěstování česneku je doporučována ideálně po dobu 1- 2 let (Bachmann Janet 2008; Diriba-Shiferaw 2016).

Česnek se typicky množí prostřednictvím jednotlivých stroužků, a proto je velmi důležité, aby tyto sadbové materiály zůstaly zdravé, bez patogenů a poškození, aby nedocházelo k pozdějšímu rozšíření případných onemocnění a patogenů (Mondani et al. 2021a). Dugan et al. (2019) ve své studii pozorovali, že až u 77 % viditelně zdravých cibulí česneku při sklizni, se po 9 - 16 měsících skladování vyvinuly příznaky napadení patogeny, což naznačuje, že i zdánlivě zdravé stroužky používané jako sadba, mohou být infikovány, nejčastěji rodem *Fusarium*. Pro stroužky bez patogenů je pěstiteli proto často používáno moření různými přípravky k tomu určenými (Gálvez & Palmero 2021). Účelné je moření stroužků těsně před výsadbou, případně je lze osušit a při co nejnižší teplotě skladovat maximálně týden. Moření se provádí namáčením ihned po rozloupání v takovém množství jíchy v litrech, jako je mořené sadby v kilogramech. Fungicidní moření je významné hlavně proti celosvětově rozšířené fusariové hnilobě česnekovitých, která napadá cibule, šalotky a především česnek (Kocourek et al. 2014).

Stroužky se sází nejčastěji do hloubky v rozmezí 6 - 15 cm. Vlastní hloubku sázení si určí pěstitel individuálně podle půdních a klimatických podmínek, vlastního agrotechnického postupu či vybavenosti technikou. Nejběžněji je vhodná hloubka 8-10 cm, kdy máme veškerou sadbu zakrytou dostatečnou vrstvou zeminy a tím zajištěnu izolaci před vymrznutím při obvyklém průběhu zimy (Velát & Ovesná 2020). Česnek se také může vysazovat do vyvýšených hrůbků, podobně jako brambory nebo jiná zelenina, pro lepší okopávání, dobrou drenáž půdy a snížení zhutnění půdy (Bachmann Janet 2008).

U jarní výsadby je vhodná mělká sadba, která zajistí rychlejší počáteční růst, zem se dříve prohřeje a vegetační vrchol je na světle také dříve (Velát & Ovesná 2020). Častější je ovšem sadba na podzim, kdy rostliny výrazně zakořeňují ještě před zmrznutím půdy. Na jaře pak rostlina svou energii směřuje do rašení, růstu listů, a nakonec rozvoje cibule. Sadba nesmí však proběhnout příliš pozdě, jelikož česnekové stroužky nestihnou dostatečně zakořenit, a to nakonec vede k menšímu vzrůstu česnekových cibulí v následujícím roce. Růst cibule česneku je závislý na prodloužení dnů, a proto na podzim zasazený česnek začíná na jaře rapidně růst při oteplení. V severnějších oblastech většina pěstitelů sází česnek v říjnu, před prvními mrazy. To dá rostlině dostatek času pro rozvoj kořenů, ale nedojde k růstu listů (Bachmann Janet 2008).

### 3.1.3 Význam česneku

Česneku je připisován široký rozsah biologických funkcí a vlastností, včetně antioxidačního účinku, protizánětlivé aktivity, antimikrobiální aktivity, modulace imunního systému, kardiovaskulární ochrany, protirakovinné aktivity, hepatoprotektivní aktivity, ochrany trávicího systému, antidiabetické aktivity, aktivity proti obezitě a také neuro a renální ochrany (Imaizumi et al. 2022).

Použití česneku bylo dobře zdokumentováno již Egypťany, Řeky a Římany. Egyptský papyrus Ebers zmiňoval 22 léků obsahujících česnek, které se aplikovaly proti srdečním problémům, bolestem hlavy, kousnutím, červům a nádorům, nebo jako prevence nemocí, či léčba zranění. V lidové medicíně se česnek používá také jako lék pro prevenci mrtvice a ateroskleróze. Kardiovaskulární účinky česneku patří mezi nejlépe prozkoumané z léčivých rostlin. Pro získání těchto terapeutických účinků je doporučený denní příjem 2,5 g až 4 g česneku (Keusgen 2002).

Bylo provedeno i několik klinických studií zabývajících se účinky česneku hlavně na kardiovaskulární onemocnění nebo onemocnění s vyšším rizikem kardiovaskulárních problémů. Ve studiích Ashraf R. et al. (2011) a Sobenin I.A. et al. (2008) byl prokázán pozitivní účinek česnekového doplňku podávaným společně se standardní antidiabetickou léčbou na hladinu cukru v krvi u pacientů s diabetem typu II.. Příznivý efekt česnekového doplňku (nejčastěji vyzrálého česnekového extraktu) byl prokázán na snížení zvýšeného krevního tlaku, jak zjistili ve studiích Sobenin I.A. et al. (2009), Ried K. et al. (2010, 2013) a Ashraf R. et al. (2013). Česnekový extrakt také pomáhá pacientům s aterosklerózou snižovat riziko kardiovaskulárních příhod díky vlivu na lepší mikrovaskulární průtok krve a cévní elasticitu (Wlosinska M. et al. 2019; Lindstedt S. et al. 2021).

Na základě dostupné literatury a tradičního využití, lze česnek a jeho bioaktivní sloučeniny považovat za perspektivní ingredience pro funkční potraviny, ale i jako významnou potravinu ve zdravé dietě (Netzel 2020). Mnohé studie se snaží najít využití extraktů z česneku jako moderního léčiva, ale je nutný další výzkum.

### 3.1.4 Pěstování česneku v ČR

Pěstováním a šlechtěním česneku se zabývají šlechtitelské, zelinářské a semenářské pracoviště. Pro získání odolnějších druhů jsou zkoumány různé genotypy a charakterizace je velmi významná. Česneky využívané v pásmu, ve kterém je i Česká republika, tedy dlouhodobní typy, vyžadují krátkou noc v létě. Pro šlechtění těchto odrůd funguje Banka genetických zdrojů VÚRV v.v.i. na pracovišti v Olomouci (Velát & Ovesná 2020).

Pěstování česneku se v České republice stále rozšiřuje. V roce byla osevní plocha 129 hektarů, kdyžto podle zprávy Ministerstva zemědělství to bylo v roce 2020 již 536 ha. Velikost osevních ploch ale každoročně ovlivňuje počasí, a proto mohou meziročně kolísat. Sklizeň se v letech 2018 – 2020 pohybovala v rozmezí 2 300 – 2 600 t. Hektarový výnos činil průměrně 4,5 t/ha. Pozdější nástup jara a vysoká vlhkost zapříčiní zpožděný růst a drobné rostlinky jsou náchylnější na napadení houbovými chorobami. Cibulky česneku také méně narostou a výnosy jsou nižší (Němcová Veronika & Buchtová Irena 2021). Podle zprávy Ministerstva zemědělství (2019) je průměrná spotřeba česneku 0,8 kg/obyvatele/rok (2017) a tato hodnota zůstává v posledních letech dle zpráv do roku 2020 téměř neměnná, oproti rostoucím číslům u další cibulové zeleniny (Němcová Veronika & Buchtová Irena 2021)

Do České republiky je čerstvý česnek také dovážěn, ale jeho dovoz ze zemí EU, tedy hlavně největšího producenta Číny podléhá licenční povinnosti. V letech 2018 a 2019 byly vydány 2, respektive 4 licence na dovoz 66 389 kg, respektive 190 239 kg čerstvého česneku z Číny. V roce 2020 byly vydány 3 licence pro dovoz čerstvého česneku. Ze zemí EU je největším dovozcem Španělsko a dovoz čerstvého česneku se pohybuje v řádech tisíců tun. Oproti tomu vývoz čerstvého česneku z ČR se v roce 2020 pohyboval jen kolem 450 t. Nákupní ceny čerstvého česneku pro zpracování v ČR byly v roce 2019 v rozmezí 49,08 až 60,03 Kč/kg bez DPH.(Němcová Veronika & Buchtová Irena 2021).

### 3.1.5 Sklizeň a skladování

Sklizeň a skladování jsou rozhodujícími faktory ovlivňující kvalitu česneku, týkající se jeho chuti i obsahu zdraví prospěšných látek (Velát & Ovesná 2020). Čerstvý česnek obsahuje kolem 65 % vody, a proto je náchylný na špatně provedenou sklizeň či nesprávné skladování (Keusgen 2002). Opatrná a správná manipulace je základem pro uchování kvalitativních znaků, jako je obsah sušiny, štiplavost, celkový obsah rozpustných pevných látek, cukry, barva slupky a celistvost. Musí se dbát na včasné zavlažování a vhodně zařazené hnojení a následně po

sklizni na správné parametry sušení a skladování. Mezi tyto parametry patří dostatečná ventilace, teplota, relativní vlhkost, zvolený obalový materiál, pokud je používán a v neposlední řadě manipulace (Velát & Ovesná 2020).

Používané fungicidy a další biologická ochrana může snížit infekce houbovými patogeny, ale bezpečnostní periody společně s dlouhým posklizňovými obdobími, snižují jejich účinnost (Gálvez & Palmero 2021). Jako jedna z jiných možností proti posklizňové hnilobě se dle studie de Santis et al. (2021) jeví úprava plynným ozonem při posklizňovém skladování.

V sušárnách česneku nebo ve skladech, kde se česnek přebírá, včasné odhalení napadených kusů houbami je nezbytné pro odstranění původce onemocnění z potravního řetězce. Napadení houbami není obvykle viditelné, a proto není zjištěno při prvním manipulačním kroku. Posklizňové choroby postupují během přepravy a skladování a jsou hlavním důvodem, proč může být česnek při mezinárodní přepravě při kontrole odmítán. Je tak nutné zavádět účinné kontrolní strategie, kdy jsou příznaky především houbového napadení včas odhaleny (Gálvez & Palmero 2021).

#### 3.1.5.1 Sklizeň

Sklizeň česneku se provádí dvojím způsobem, na zeleno nebo po usušení. První způsob je méně častý a začíná již v květnu, kdy nejsou stroužky česneku ještě plně vyvinuté. Na tento způsob se hodí rané odrůdy s výrazným počátečním nárůstem, pocházející především z Francie. Tyto odrůdy jsou ale náchylnější na vymrznutí a je potřeba je chránit. Pokud je ale vše dodrženo, jsou již v květnu připraveny ke sklizni. Musí se ale dbát na šetrné zacházení, jelikož jsou takto sklizené česneky náchylné na mechanické poškození.

Naopak druhý způsob, kdy probíhá sklizeň česneku v plné zralosti je častější. Sklizené česneky se v případě dobrého počasí mohou nechat na poli doschnout nebo jsou ve většině případech svázané do svazků a zavěšeny v dobře větratelných prostorách. Sušení probíhá po dobu 4-6 týdnů, následně je nať česneků zkrácena a cibule se očistí do prodejní kvality. Sklizeň může být prováděna strojově, vyšší výkonnost je ale vykoupena vyššími ztrátami než při ruční manipulaci (Velát & Ovesná 2020).

#### 3.1.5.2 Skladování

Velké množství světové produkce česneku je skladováno kvůli celoročním dodávkám spotřebitelům. Obvykle se česnek skladuje při pokojové teplotě 20 - 30°C pokud je na trh uveden během krátké doby. Při nutnosti delšího skladování je uložen při nižších teplotách

0 - 1°C a relativní vlhkosti 60-70 %. Náklady na skladování v chladu jsou ale vysoké a hledají se vhodné kombinace moderních a tradičních postupů (Valdez et al. 2009). Doba a teplota skladování mají také vliv na změny chuti, štiplavosti a kvality. Tyto změny závisí také na odrůdě. Pro správné skladování by měl být česnek dostatečně vyzrálý, bez chorob a vysušený. Klimatické podmínky skladovacího prostoru výrazně ovlivňují dobu a kvalitu skladování a trvanlivosti. Dostatečná ventilace a nízká vlhkost jsou základními parametry. Dýchání česneku je oproti jiným druhům zeleniny poměrně nízké, ale zvyšuje se exponenciálně s teplotou. Relativní vlhkost má velký vliv na skladovatelnost a může mít větší vliv než teplota. Relativní vlhkost při skladování česneku by měla být 50 - 60 %. Při této vlhkosti a teplotě 0-5°C může být doba skladování v závislosti na kultivaru 6 až 9 měsíců (Diriba-Shiferaw 2016).

Po usušení je česnek během skladování vystaven největšímu riziku poškození, ať chorobami tak škůdci. Vhodným skladováním můžeme česnek ochránit (Velát & Ovesná 2020).

### 3.1.5.3 Problémy při skladování

Tradiční způsoby skladování česneku ne vždy zaručují vysoce kvalitní produkty. Celkové ztráty během skladování česneku za pokojových podmínek se pohybují od 25 do 40 %, s následkem zvýšení ceny a snížení místní dostupnosti (de Santis et al. 2021).

Ztráty jsou spojeny především s fyziologickými poruchami a patogenními mikroorganismy. Mezi nejvýznamnější patogeny patří houby, zahrnující nejčastěji rody *Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *Botrytis alli*, *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum*, *Penicillium purpurogenum*, *Rhizopus stolonifer* a *Stemphylium botryosum* (Valdez et al. 2009). Jednou z hlavních příčin ztrát česneku během skladování je posklizňová hniloba. Její incidence přímo souvisí s přítomností patogenů na sklizeném česneku a je značně ovlivněna posklizňovými manipulačními procesy, včetně sušení, skladování, přepravy a prodeje. Mnoho patogenů však iniciuje svou infekci během vývoje rostlin už na poli a nemoc pak postupuje během posklizňového období. Některé mikroorganismy mohou zůstat nečinné a pak se aktivují v období po sklizni, což způsobuje ztráty ekonomického významu při skladování. Mohou působit také jako inokulum k infekci stroužků určených k setí (Gálvez & Palmero 2021).

Při skladování česneku při nižších teplotách může docházet k nežádoucím změnám v chuti a štiplavosti, schopnosti růstu kořínků a křehkosti dužniny (Diriba-Shiferaw 2016).



#### 3.1.5.4 Patogenní houbové mikroorganismy

Ačkoliv má česnek skvělé antimikrobiální vlastnosti, paradoxně je často napadán několika houbovými chorobami (rez, bílá hniloba, fusariová hniloba a další). Nejčastěji je v poslední době hlášena a popisována právě fusariová hniloba česneku. Toto onemocnění se projevuje při skladování, kdy se uvnitř propadlých cibulí objevuje hnědé zbarvení na stroužcích a rozvíjí se bílá nebo růžová mycelia. Takto napadené cibule česneku již nemohou být prodány a dochází k významným ztrátám (Chrétien et al. 2021).

Nejdůležitější houbové patogeny, o kterých je známo, že způsobují hnilobu česneku, jsou *Sclerotium cepivorum*, *Penicillium* spp. a *Fusarium* spp., které způsobují bílou hnilobu, zelenou hnilobu a suchou hnilobu. Další houbová onemocnění mohou být způsobena rody *Embellisia allii*, *Botrytis porri* a *Aspergillus niger*, které vedou k povrchovým skvrnám a černé houbové chorobě na česneku. Navíc je o mnoha z těchto hub známo, že produkují řadu toxinů, včetně fumonisinů, moniliforminů, beauvericinů, fusaproliferinů a kyseliny fusarové. Většina mykotoxinů je chemicky stabilní a přežívají běžné zpracování potravin. Představují proto velké riziko pro zdraví lidí a hospodářských zvířat (Gálvez & Palmero 2021).

Fusariová hniloba česnekovitých je celosvětově rozšířenou chorobou převážně česneku kuchyňského, ale i cibule kuchyňské, cibule šalotky a dalších druhů. Je způsobována houbou *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, která je nejčastějším důvodem úhynu již mladých semenáčků. Napadá nejprve kořeny a může se rozšířit až na celou rostlinu. Zasychání listů a zpomalení růstu může být zaměněno s abiotickou poruchou. Při kontaminaci až v poslední fázi vegetace nedojde k úplnému rozvoji a hniloba se projeví až při skladování. Zdrojem infekce tak může být nejen půda, ale i infikovaná sadba. Proto se musí dbát na její zdraví a případně použít patřičné ošetření mořidly před výsadbou (Kocourek et al. 2014).

Bílá hniloba česnekovitých je druhým častým onemocněním napadajícím česnek kuchyňský. Na všech podzemních částech se vytváří mnoho malých sklerocií, jejichž původcem je houba *Sclerotium cepivorum*. Problémem jsou půdy zamořené sklerocii, která v ní přetrvávají. Proto se nedoporučuje pěstovat česnek vždy na stejném stanovišti. Při výskytu není možné pozemek použít i 10 let. Na tuto houbu neexistuje účinná ochrana, ale testují se antagonistické efekty jiných mikroorganismů nebo biologická ochrana v podobě silic (Kocourek et al. 2014; Velát & Ovesná 2020).

## 3.2 Silice

Silice, (někdy označované jako esenciální oleje) jsou nestálé látky získané z rostlinných materiálů (květy, semena, plody, listy, větvičky, stonky či kořeny) pomocí fermentace, extrakce, suché destilace a nejčastěji komerčně využívané destilace parou (Burt 2004; Schmidt 2015; Čabalová et al. 2019).

Silice se staly během staletí nedílnou součástí každodenního života. Používají se jako potravinové přísady, doplňkové látky zlepšující vlastnosti produktů, jako přísady v tabákovém průmyslu či při míchání kosmetiky a parfémů. Kromě toho se používají v osvěžovačích a deodorizátorech vzduchu, a v některých oborech zabývajících se lidským zdravím, jako je farmacie, lázeňství, masáže a homeopatie. Specializovanější oblastí je oblast aromaterapie a aromachologie. V posledních letech vedlo používání silic jako důležitých biocidů a repelentů proti hmyzu k podrobnějšímu studiu jejich antimikrobiálního potenciálu (Baser & Buchbauer 2015) a tak k rozšíření jejich použití i v jiných oblastech.

Studium a využití těchto látek sahá až do 16. století, ale aromatické rostliny se využívaly v dobách dávno před používáním samotných silic, protože byly rozpoznány jejich příznivé účinky na zdraví (Baser & Buchbauer 2015) a dnes se těší přírodní látky opět větší a větší oblibě, a to z důvodu nadbytečného používání syntetických látek, které je snaha nahradit právě těmito přírodními (Burt 2004). Syntetické látky byly výrobci dlouho používány, ale postupem času bylo prokázáno, že konzumace některých z nich může vést k intoxikacím, rakovině a mnohým dalším onemocněním. Proto se více začínají používat právě extrakty z rostlin, které mají schopnost zastavit růst patogenních mikroorganismů (Bhavaniramy et al. 2019).

Silice nejsou jednoduché směsi a často se skládají z mnoha sloučenin. Mezi hlavní složky jsou řazeny terpeny a terpenové deriváty (mono-, di-, seskviterpeny), fenolpropeny (Schmidt 2015), kyseliny, uhlovodíky (limonen), deriváty alkoholů (mentol), aldehydů (citrál), ketonů (karvon) a další (Smith et al. 2005; Čabalová et al. 2019). Tyto složky jsou nalézány v různých částích rostlin a ve speciálních buňkách, jako jsou žláznaté trichomy, olejové žlázy, lyzogenní dutiny nebo schizogenní kanálky. Produkce těchto specifických látek se různí druh od druhu a stejnou látku můžou produkovat blízké, ale i více vzdálené druhy. Například monoterpeny jsou typické pro rod *Mentha*, ale mentol je charakteristický jen pro *Mentha piperita* a *Mentha arvensis* a je možné ho tak nalézt v poměrně blízkých druzích. Ale na druhou stranu například fenypropenoid eugenol, typický pro hřebíček (*Syzygium aromaticum*), lze také

nalézt ve velkém množství vzdálených druhů jako je pro příklad skořice (*Cinnamomum zeylanicum*, *Lauraceae*) nebo bazalka (*Ocimum basilicum*, *Lamiaceae*). Posledním specifickým příkladem je eukalyptol (1,8 - cineol), který byl pojmenován po svém výskytu v *Eukalyptus* sp. (*Myrtaceae*), který může být součástí silic vavřínu (*Laurus nobilis*, *Lauraceae*), japonského pepře (*Zanthoxylum piperitum*, *Rutaceae*), šalvěže (*Salvia officinalis*, *S. fruticosa*, *S. lavandulifolia*), rozmarýnu (*Rosmarinus officinalis*) a máty (*Mentha* sp.) (Baser & Buchbauer 2015).

V dnešní době známe na 3000 silic a z toho asi 300 silic nebo jejich chemických složek nachází své využití v komerčním průmyslu. V Evropské unii jde především o potravinářský, farmaceutický, parfumářský a kosmetický průmysl (Bhavaniramy, S. 2019). Zvýšený zájem o silice se projevil nejen proto, že jde o přírodní látky, ale také je prokázáno, že mají určité antimikrobiální účinky. Pokud jsou správně aplikovány, dají se tak využít pro konzervaci potravin a skladovaných produktů. Vedle antimikrobiálních účinků mají také antioxidační, antimykotické, antiparazitické nebo insekticidní účinky. Tyto vlastnosti mají pravděpodobně podle toho, jaká byla funkce těchto látek v rostlině, ze které pochází (ochranné látky proti hmyzu a býložravcům nebo naopak lákání hmyzu k rostlině) (Burt 2004; Baser & Buchbauer 2015; Schmidt 2015).

Kvalita silice závisí nejen na skladování a správném použití, ale také na konkrétní rostlině, ze které pochází a na místě kde se pěstuje. Důležitý je správný druh, který je použit k získání silic, protože každá rostlina se liší obsahem účinných látek v silicích. Neméně nutné je i správné období sklizně a šetrný odběr silice. Podle výzkumů je nejvyšší obsah silic s antimikrobiálními účinky v rostlinách při sklizni při nebo těsně po květu (Burt 2004).

Silice jsou těkavé látky, a proto se musí skladovat v dobře uzavřených nádobách, aby se rychle nevypařovaly, ale i při aplikaci je nutné dbát na to, aby se nezneškodily. K tomu se nejčastěji používají procesy enkapsulace a nanoenkapsulace (Zanetti et al. 2018). Tyto procesy jsou důležité, aby těkavé silice neunikly dříve, než je žádoucí a uvolňovaly se nejlépe postupně a rovnoměrně (Burt 2004). Enkapsulované silice se dají použít při skladování nejen jednotlivých složek potravin ve velkých skladech, ale i hotových výrobků. Nejčastěji je snaha je využívat u rychle se kazících potravin jako je ovoce, zelenina, ale i maso a obilí, kde je největší problém právě s mikroby a houbami a dochází k velkým ztrátám již při skladování, kterým je snaha předcházet právě enkapsulovanými rostlinnými silicemi (Burt 2004).

Dobrym příkladem je také využití při skladování masa. Tučky podléhají rychlé oxidaci, maso může brzy začít zapáchat, je napadáno bakteriemi a nezůstává tak dlouho čerstvé a následně může být až nebezpečné pro konzumaci z důvodu přemnožení bakterií nebo hub. Proto se začíná více využívat enkapsulovaných silic z rostlin s antimikrobiálními a antioxidantními účinky (Gómez et al. 2018; Kumar & Lorenzo 2020).

Nejčastěji se používají silice z tymiánu, skořice, rozmarýnu, oregana, máty, česneku a dalších výrazně aromatických rostlin. U těchto jmenovaných jsou prokázány příznivé účinky silic (Burt 2004). Například silice ze skořice, oregana a tymiánu vykazují prokazatelné účinky proti různým mikroorganismům včetně rozšířených *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* a *Listeria monocytogenes* (Fernández-Pan et al. 2013; Yildirim et al. 2018; Bhavanirama et al. 2019).

### 3.2.1 Antimikrobiální účinky silic

Protože se spotřebitelé v dnešní době častěji zajímají o kvalitu a znepokojuje je rozsáhlé využití umělých chemických aditiv, potraviny ošetřené přírodními látkami se stávají oblíbenějšími a vyhledávanějšími. To vede vědce a výrobce k hledání a zkoumání přírodních látek s širokým spektrem antimikrobiální aktivity (Holley & Patel 2005).

Antimikrobiální látky se mohou objevit jak v produktech živočišného původu, tak i rostlinného. Hlavně řada bylin a koření je známá pro tuto vlastnost, která je důsledkem jejich chemického složení. Již v minulosti byly byliny i koření využívány mnoha kulturami pro vylepšení chuti a aromatu potravin (Durance 2002). Silice mají díky své antimikrobiální aktivitě potenciál vystřídat konvenční konzervační látky. Relativně vysoké dávky silic nezbytné pro inhibici mikrobiálního růstu naznačují, že by měly být použity spíše v kombinaci s jinými konzervačními technikami, případně upraveny nějakou technologií formulace (Frankova et al. 2014).

Pokud jde o aplikaci silic na potraviny nebo do obalů, doporučuje se proto vybrat silice na základě toho, jaký smyslový profil má mít výsledný produkt. Silice se složkami s nízkými inhibičními koncentracemi se považují za výhodné k dosažení antimikrobiálních účinků, aniž by byly ovlivněny sensorické vlastnosti potraviny (Thielmann et al. 2019). Mezi tyto složky se řadí například karvakrol, tymol, eugenol, kyselina skořicová, perillaldehyd a cinamaldehyd (Burt 2004).

Silice a jejich sekundární složky, hlavně fenolické látky (Burt 2004) hrají zásadní roli v uplatnění antimikrobiální aktivity. Nejvíce aktivní složky silic se dají rozdělit do čtyř skupin, dle jejich chemického složení: terpeny (např. p-cymen, limonen), terpenoidy (např. tymol, karvakrol), fenypropeny (např. eugenol, vanilín) a další složky jako allicin nebo isothiocyany (Zanetti et al. 2018).

Složení silic umožňuje zaměřit se v buňce bakterie, která je na potravině, na několik cílů, zejména na cytoplasmu a buněčnou membránu, kterou vlastním včleněním rozrušují a způsobují tak její větší propustnost a destabilizaci, která vede k úniku iontů a dalších buněčných materiálů nebo dokonce zcela mění morfologii buněk. Výsledkem je pak buněčná smrt (Burt 2004; Zanetti et al. 2018; Bhavaniramy et al. 2019) nebo zastavení růstu bakterií (Swamy et al. 2016).

Obecně bylo zjištěno, že gram-negativní bakterie jsou více rezistentní vůči účinkům silic než gram-pozitivní bakterie (Zanetti et al. 2018). (López et al. 2005) studovali antimikrobiální aktivitu silic skořice (*Cinnamom zeylanicum*), hřebíčku (*Syzygium aromaticum*), bazalky (*Ocimum basilicum*), rozmarýnu (*Rosmarinus officinalis*), koprů (*Anethum graveolens*) a zázvoru (*Zingiber officinalis*) v různém rozsahu koncentrací ve dvou kontaktních typech testů (v kapalně a plynné fázi). Tyto silice byly testovány proti čtyřem gram-pozitivním bakteriím (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*), čtyřem gram-negativním bakteriím (*Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*), proti houbám (kvasinky, *Candida albicans*) a dvěma houbám (*Penicillium islandicum* a *Aspergillus flavus*). Nejcitlivější byly právě houbové mikroorganismy, druhé nejcitlivější byly gram-pozitivní bakterie. Gram-negativní kmeny bakterií byly nejméně citlivé (Zanetti et al. 2018)

## 3.2.2 Formulace silic

### 3.2.2.1 Enkapsulace

Enkapsulace přírodní nebo syntetické látky se dá definovat jako proces zachycení aktivní látky do jiné, která, jako kapsle, zajišťuje ochranu před vnějším prostředím a zároveň zabráňuje jejímu uvolnění do prostředí. Enkapsulovanou látku můžeme označit také jako jádro nebo výplň. S jinými názvy se můžeme setkat také u obalového materiálu, například matrix, kapsle nebo schránka (Nedovic et al. 2011).

Enkapsulace bioaktivních látek chrání jejich aktivní molekuly před degradačním procesem a zlepšuje jejich fyzikální a chemickou stabilitu a rozpustnost v potravinách (například rozpustnost hydrofilních částí a hydrofobních matric a naopak) (Zanetti et al. 2018).

Enkapsulace jako technologie se může používat v mnoha případech. Jelikož je enkapsulovaná silice velmi dobře chráněná před nežádoucími reakcemi s okolním prostředím, je možné kontrolovat její místo působení, často hlavně na povrchu potraviny, pozvolné, přesné uvolňování a působení jen za určitých podmínek. Velikost molekul enkapsulovaných silic se může lišit od několika nm až po několik mm. Díky těmto výhodám se enkapsulované látky využívají hlavně v potravinářském průmyslu, ale původně se užívaly nejvíce ve farmacii (Nedovic et al. 2011).

V minulosti byla enkapsulace vyvinuta hlavně pro zefektivnění některých výrobních procesů při přenosu buněk a metabolitů nebo vakcín. S postupem času však nabylo na významu i využití v potravinářském průmyslu. Díky stabilitě matrixu a variabilitě aktivní látky je dnes používána enkapsulace pro přenos funkčních doplňků potravin, ale i pro zajištění dlouhotrvající čerstvosti a skladovatelnosti potravin díky prodloužení doby uvolňování účinné látky a zabránění těkání aromatických silic a tím způsobených nežádoucích sensorických vlastností (Nedovic et al. 2011; Schmidt 2015).

Aby byla enkapsulace výhodná a fungovala tak jak je potřeba, je nutné správně zvolit materiály a látky, které budou použity jak pro obalovou látku, matrix, tak pro aktivní jádro. Tato volba závisí na oblasti využití, jelikož ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu platí mírně odlišná pravidla a požadavky. Pokud se zaměříme na potravinářství, je důležitá neškodnost látek vůči organismu, aby nedošlo k nežádoucím účinkům a byla splněna všechna stanovená pravidla bezpečnosti potravin. Dále musí látky vyhovovat požadavkům, které na ně máme, jako je například chuť či vůně, aby bylo dosaženo chtěného finálního produktu. Používané látky pro vybudování ochranného obalu musí být v první řadě schopny vytvořit

funkční bariéru mezi prostředím a aktivní látkou, dále musí být biodegradovatelné a splňovat určité potravinářské třídy. Také musí být z přírodního materiálu a nesmí reagovat s aktivní enkapsulovanou látkou. V potravinářství se nejčastěji používají polysacharidy, jako škrob a jeho deriváty – amyulóza, maltodextriny, dextriny. Kromě těchto látek se dají použít i proteiny a lipidy (Nedovic et al. 2011).

Cílem techniky enkapsulace je tedy ochrana silice nebo jiné látky před předčasnou degradací, nežádoucími reakcemi s prostředím a produktem a prodloužení životnosti látky, ale také zvýšení její antimikrobiální aktivity, zlepšení kvality a chuti produktu, jednodušší manipulace s aktivní látkou, poskytnutí vhodného množství této látky a její kontrolované uvolňování (Nedovic et al. 2011; Froiio et al. 2019).

Ve studii (Janatova et al. 2015) bylo prokázáno, že enkapsulované silice byly efektivnější než čisté silice a také zůstávaly aktivní i v době, kdy čisté silice již nedokázaly zabránit nárůstu patogenních mikroorganismů. Antifungální aktivita enkapsulovaného tymolu byla například až osmkrát vyšší než u čisté silice. Větší povrchová plocha materiálu použitého k enkapsulaci tak zdánlivě funguje k snížení rychlosti odpařování silice a tak prodloužení doby její efektivity. Ta také závisí na složení silice, kdy fenoly (eugenol, karvakrol, tymol) se zdají mít více antifungální efekt než kyseliny (skořicová, hydroskořicová)

Nejčastěji a nejdéle se v potravinářském průmyslu využívá metoda sprejového sušení (80 % - 90 %) (Risch 1995; Nedovic et al. 2011). Jedná se o nejekonomičtější a nejrozšířenější používaný způsob, jelikož potřebná zařízení jsou snadno dostupná a výrobní procesy jsou levnější než u ostatních metod (Risch 1995). Sušení rozprašováním účinné látky se běžně dosahuje rozpuštěním, emulgací nebo dispergováním účinné látky ve vodném roztoku nosného materiálu a následně se směs rozpráší do horké komory. Během tohoto procesu se na povrchu kapek utvoří film a větší aktivní molekuly se tak zpomalí a menší molekuly vody se odpaří (Zuidam & Shimoni 2010). Tím se vytvoří vysušená pórovitá částice, kterou je nosič tvořící film na povrchu kapky obsahující aktivní látku. Tyto částice padají do spodní části sušárny, kde jsou shromažďovány (Risch 1995; Zuidam & Shimoni 2010). Tato metoda dává vzniknout částicím o velikosti asi 40  $\mu\text{m}$  (Nedovic et al. 2011). Velikost rozprašovaných kapiček závisí na povrchovém napětí a viskozitě kapaliny, poklesu tlaku přes trysku a rychlosti rozprašovaných částic. Velikost atomizovaných kapiček také určuje dobu sušení a velikost částic (Zuidam & Shimoni 2010).

Produkty této metody mají dobré povrchové i senzorické vlastnosti, ale i tato poměrně výhodná metoda má své nedostatky. Je zapotřebí mít vhodné přístroje na rozprašování, aby byly vytvořeny co nejrovnoměrnější částice, které ale právě často nedosahují stejných rozměrů,

protože je těžké kontrolovat měnící se podmínky v místech postřiku a tak i požadovanou velikost částic (Nedovic et al. 2011). Důležité je také zvolit správnou teplotu přiváděného vzduchu (Zuidam & Shimoni 2010).

Dalšími často používanými metodami enkapsulace je emulzifikace, která se používá u vodorozpustných látek za použití dvou typů emulzí: voda v oleji a olej ve vodě ((Zuidam & Shimoni 2010), extruze, jejíž principem je vytlačování kapek vodného roztoku polymeru a aktivní látky do gelové lázně (Nedovic et al. 2011), sprejové mražení a sprejové chlazení, kde není přítomná voda na rozdíl od sprejového sušení (Risch 1995), tvorba polymerních kapslí, nejčastěji za použití alginátu (Simó et al. 2017), fluidní vrstva, kdy jsou aktivní částice suspendovány a proudem vzduchu a postřikovány povlakovým materiálem, lyofilizace, při které se nejprve ve vodě rozpuštěný materiál s aktivní látkou zmrazí a následně se rozpouštědlo odstraní při nízkém tlaku sublimací (Zuidam & Shimoni 2010), koacervace, která spočívá v rozdělení vodného polymeru na nesmíselné fáze (Martins et al. 2008), a nakonec nejnověji zkoumaná nanoenkapsulace.

Použití nanokapslí za účelem ochrany a kontrolovaného uvolňování bioaktivních složek potravin je rostoucí oblastí v potravinářské a technologické komunitě. Důvodem je především to, že nanočástice mohou být snadno začleněny do potravinářských výrobků a do obalů se zvýšenou biologickou dostupností (Zuidam & Shimoni 2010).

Reakce silic s potravinami ztěžuje jejich využití. Nanoenkapsulace silic ale představuje účinnou strategii k překonání těchto překážek. Tato technologie by totiž mohla maskovat výraznou chuť, snížit těkavost a interakci s potravinovými složkami, zvýšit rozpustnost a fyzikální stabilitu a zlepšit biologickou dostupnost silic. Ve srovnání s velkými kapslemi, nabízejí nanokapsle výhody subcelulární velikosti (díky které se mohou zvýšit pasivní buněčné absorpční mechanismy, čímž se sníží odpory přenosu hmoty a zvýší se antimikrobiální aktivita), většího povrchu na jednotku objemu a potenciálního zvýšení koncentrace silic v oblastech potravin, kde jsou mikroorganismy soustředěny, jako jsou fáze bohaté na vodu nebo pevné a kapalné rozhraní. Nanokapsle mohou působit jako rezervoár a systém řízeného uvolňování aktivních látek, který by mohl upřednostňovat jejich dodání do bakteriální buňky. Jejich příprava by mohla být založena na zmenšování enkapsulátů připravených klasickými technologiemi nebo použitím technologií nových (Zuidam & Shimoni 2010).

Existuje několik konceptů použití nanoenkapsulace, které se dělí na lipidové, proteinové, polysacharidové a anorganické systémy. Pro příklad nanoenkapsulační lipidové systémy patří mezi nejrychleji se rozvíjející oblasti nanotechnologických aplikací



v potravinářství. Mají několik výhod, včetně schopnosti zachycovat materiál s různými rozpustnostmi a použití přírodních složek v průmyslovém měřítku (Zuidam & Shimoni 2010).

### 3.2.2.2 Jílové minerály

Nanokompozity na bázi jílu a hydrofilních polymerů přitahují celosvětovou pozornost díky své všestrannosti, z akademického i průmyslového hlediska. Tyto systémy obvykle vykazují významná vylepšení ve svých vlastnostech, mezi které patří zajímavé zlepšení mechanických a reologických vlastností, tepelné stability, bariérových vlastností, rozpustnosti ve vodě a vlastností řízeného dodávání léčiva či aktivní látky, ve srovnání s polymerní maticí nebo konvenčními mikro a makro kompozity (Santos et al. 2020). Jílové minerály jsou v přírodě dobře dostupné, netoxické, biokompatibilní a dispergovatelné ve vodě (de Oliveira et al. 2022). Jílové minerály lze použít k enkapsulaci silic, které chrání před odpařováním a oxidací, poskytují stabilní základ pro interakci, a zároveň umožňují řízené uvolňování silic, které účinně omezují mikrobiální růst (Santos et al. 2020). Kombinace jílu a silic představují nové možnosti pro různé aplikace, včetně antibakteriálních, antifungálních, či repelentních (Buendía–Moreno et al. 2020).

Jíly jsou používány v různých oblastech, jako je keramika, papír, barvy, adsorbenty, katalyzátory, patří mezi jedny z nejdůležitějších surovin. Tyto využívané jílové minerály jsou složeny z minerálů obecně patřících do skupin jílových kamenů. Používají se buď v přírodním stavu, nebo se upravují různými metodami ke zlepšení některých jejich vlastností (Mohamed El Miz et al. 2013).

Bentonit je keramický materiál (plastický jíl) získaný ze sopečného popela a tvořený převážně montmorillonitem, což je druh přírodního jílu ze skupiny smektitů (Santos et al. 2020). Dělí se do tří kategorií podle podílu výměnných kationtů sodíku a vápníku, které obsahují, podle indexu bobtnání a podle pH. Těmito kategoriemi jsou přírodní bentonit sodný, přírodní bentonit vápenatý a aktivovaný bentonit vápenatý (sodno-vápenatý) (Juan Moreno & Rafael Peinado 2012).

## 4 Metodika

Mikroorganismy byly izolovány přímo z kontaminovaného česneku klasickými mikrobiologickými metodami. Takto získané kmeny se otestovaly na citlivost vůči vybraným silicím, případně jejich obsahovým látkám, pomocí vhodných in vitro metod. U nejaktivnějších silic nebo jejich komponent byly otestovány vhodné druhy formulací – enkapsulace do vybraného typů částic.

### 4.1 Testování in vitro

#### 4.1.1 Médium

Před izolací houbových patogenů byl v předstihu připraven agar pro kultivaci a přeočkování mikroorganismů.

PDA agar (Potato Dextrose Agar) byl pro toto testování vybrán na základě studií Oh et al. (2016); Gálvez et al. (2017 a Mondani et al. (2021b), kde byl PDA agar zvolen jako nejvhodnější médium pro izolaci hub. Konkrétní PDA agar, který byl použit pro tuto práci, byl od značky OXOID (kód CM0139, Basingstoke, UK, 500 g). Médium bylo připraveno dle pokynů na obale a poté rozléváno do Petriho misek.

Do Petriho misek o velikosti 50 mm, které byly používány k inokulaci a přeočkování houbových kmenů, bylo nalito 5 ml PDA agaru. Do dělených Petriho misek o velikosti 90 mm bylo do každé čtvrtiny a na vnitřní stranu víčka rozlito vždy 5 ml PDA agaru.

Po nalití se Petriho misky s PDA agarem nechaly vychladnout. Poté bylo možné na médium nanést mikroorganismy.

#### 4.1.2 Izolace houbových patogenů

Kontaminovaný materiál, cibule česneku setého (*Allium sativum* L.), ze kterého byly následně izolovány houbové patogeny, byl získán z Demonstračního a experimentálního pracoviště ČZU v Praze, kde bylo s dovolením vedoucího pracoviště doc. Ing. Miroslava Jursíka, Ph.D., vybráno ze skladu se sníženou teplotou pět cibulí česneku setého s viditelnými náznaky poškození houbovými patogeny (změkklé stroužky, hnědé skvrny, růst bílého mycelia, zasychání nebo hniloba kořenů (Horáková et al. 2021)).

Těchto pět kontaminovaných vzorků cibulí česneku bylo jednotlivě umístěno do sklenic (500 ml) s víčkem, v kterém byly otvory pro přístup vzduchu. Do jednotlivých různých sklenic

bylo postupně přidáno 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml destilované vody pro zvýšení vlhkosti k rychlejšímu nárůstu hub na cibulích česneku. Uzavřené sklenice se cibulemi česneku a vodou byly umístěny na stinném místě po dobu jednoho týdne při pokojové teplotě  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Po týdnu byly z cibulí s nejvyšším nárůstem na povrchu odebrány vzorky hub a přeneseny sterilními nástroji na připravené 50 mm Petriho misky s PDA agarem a byly kultivovány v termoboxu při  $25^{\circ}\text{C}$ .

Následovala izolace jednotlivých houbových patogenů opakovaným přeočkováním po pěti dnech na nové 50 mm Petriho misky s PDA agarem. Přeočkování bylo opakováno celkem třikrát po třech opakováních, dokud nebyly získány čisté jednotlivé kmeny izolovaných hub. Inokulum houby bylo vždy nanášeno na střed Petriho misky, aby byl zajištěn rovnoměrný nárůst.

Takto izolované kmeny byly kultivovány a skladovány v termoboxu při  $25^{\circ}\text{C}$  a vždy po dvou týdnech byly přeočovány na novou 50 mm Petriho misku s PDA agarem, aby byla zachována čerstvost a vitalita hub pro další testování. Pro testování inhibice růstu silicemi byly použita inokula houbových patogenů ne starší než 5 dní.

Manipulace s kontaminovaným materiálem probíhala vždy ve flowboxu s laminárním prouděním, aby se zabránilo riziku kontaminace v laboratoři.

Pro následné testování inhibice růstu hub silicemi byly vybrány tři kmeny, které byly od sebe co nejvíce odlišné, aby bylo dosaženo vyšší variability možné účinnosti na nárůst mikroorganismů po aplikaci silice. Jednotlivé kmeny jsou zobrazeny na Obrázku 3 ve výsledcích.

#### 4.1.2.1 Určení izolovaných mikroorganismů

Izolované houbové patogeny z česneku byly odeslány na určení do Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i.. Celkově bylo určeno 8 houbových patogenů. Jejich určení proběhlo metodou PCR s porovnáním DNA sekvencí s databází NCBI (National Center for Biotechnology Information).

#### 4.1.3 Silice

Pro testování inhibice růstu mikroorganismů bylo vybráno šest silic (viz Tabulka 1) na základě dostupnosti v laboratoři a předpokládané účinnosti. Tři silice, skořicové z kůry, oregana a hřebíčku, byly od výrobce Biomedica spol. s r.o. (Praha, Česká republika), silice tymiánu

a máty rolní (Cornmint oil) byly od výrobce SAFC (Spojené státy americké) a silice citronové trávy (Lemongrass oil) byla od výrobce Sigma-Aldrich (St.Louis, Spojené státy americké). Zkratky v Tabulce 1 uvádí označení použité při rozlišování testovaných Petriho misek (viz Obrázek 4 a 5).

Tabulka 1 Vybrané silice k testování inhibice

Silice	Zkratka	Výrobce	Hlavní složky
<b>Skořicová kůra</b> ( <i>Cinnamomum cassia</i> )	S	Biomedica spol. s r.o.	cinnamaldehyd
<b>Oregano</b> ( <i>Origanum vulgare</i> )	O	Biomedica spol. s r.o.	karvakrol, limonen, $\alpha$ -pinen, $\beta$ -pinen,
<b>Tymián</b> ( <i>Thymus vulgaris</i> )	T	SAFC (Spojené státy americké)	tymol, karvakrol, linalool, limonen
<b>Hřebíček</b> ( <i>Syzygium aromaticum</i> )	Cl	Biomedica spol. s r.o.	eugenol
<b>Citronová tráva</b> ( <i>Cymbopogon citratus</i> )	L	Sigma-Aldrich (Spojené státy americké)	citral, geraniol, limonen
<b>Máta rolní</b> ( <i>Mentha arvensis</i> )	CM	SAFC (Spojené státy americké)	mentol, menthon

#### 4.1.4 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

Za minimální inhibiční koncentraci (MIC) byla považována nejnižší koncentrace použité silice, při které nedošlo k žádnému viditelnému nárůstu zaočkovaných mikroorganismů.

Pro stanovení MIC šesti vybraných silic (viz Tabulka 1) na třech kmenech houbových patogenů, bylo provedeno mikrobiologické testování citlivosti. Všechny testy byly provedeny ve třech opakováních. Manipulace s houbami probíhala vždy v prostředí laminárního boxu.

Podle práce autorů Klouček et al. (2012) byly zkoušky provedeny v 90 mm Petriho miskách dělených na čtyři části. Do každé z těchto sekcí a do víčka bylo nalito 5 ml PDA agaru. Po ztuhnutí byly tři části naočkovány odlišnými houbami, čtvrtý byl ponechán jako kontrola kontaminace. Houbové patogeny byly nanесeny bodově sterilním jednorázovým očkem do středu každé části Petriho misky. Silice byly zředěny v ethylacetátu (Penta, Česká republika) způsobem dvojnásobného ředění, aby se získal konečný objem 250  $\mu$ l. Takto připravený roztok byl rozdělen pomocí mikropipety na 85 mm kulatý filtrační papír, který byl vysterilizován UV zářením. Po nanесení roztoku se filtrační papír nechal po dobu 1 minuty sušit, aby se odpařil ethylacetát. Následně byl filtrační papír položen na dělenou Petriho misku tak, aby ležel uprostřed, na stěny rozdělujících přihrádkách. Petriho miska byla ihned hermeticky uzavřena víčkem s agarem.

Petriho misky byly inkubovány při 25°C po dobu 5 dní. Silice byly nejprve testovány v nejvyšší koncentraci 512 mg/l a poté byla tato hodnota snižována podle přítomnosti nebo nepřítomnosti nárůstů hub. Při druhém testování se použila koncentrace silic 128 mg/l, při třetím 64 mg/l a následně 32 mg/l. U tří méně aktivních silic byla otestována koncentrace 256 mg/l. Filtrační papíry pouze s ethylesterem byly použity jako kontrola.

Po inkubaci byly zaznamenány MIC jednotlivých silic. Nakonec byly vybrány tři neaktivnější silice, které byly použity při testování technologie formulace přímo na stroužcích česneku.

## **4.2 Testování formulace**

### **4.2.1 Materiály**

K účelu testování účinnosti silic na potlačení růstu houbových patogenů byl zakoupen v lokálním supermarketu česnek odrůdy Morado (Bony Garlic, Španělsko). Cibule česneku byly pro testování rozděleny na jednotlivé stroužky tak, aby nebyla narušena slupka jednotlivých stroužků a nebyly nijak obnaženy. Vizualně byly vybrány zdravé stroužky bez viditelných známek poškození. Dále byly připraveny sterilní erlenmeyerovy baňky o objemu 100 ml. Do každé baňky bylo přidáno 0,5 ml destilované vody pro zvýšení vlhkosti k inkubaci hub.

## 4.2.2 Jílové částice

Pro testování účinnosti formulace byl zvolen bílý bentonit Superbenton DC (ZAN-AROMI, spol. s r.o., Česká republika). Pro enkapsulaci byly smíchány čtyři díly bentonitu (8 g) s jedním dílem silice (2 g). Toto bylo opakováno pro tři různé silice s nejnižší MIC. Silice a bentonit byly smíchány ve 100 ml erlenmeyerových baňkách, hermeticky uzavřených alobalem a parafilmem, umístěné na třepačce po dobu 24 h při teplotě 37°C.

Následně byly enkapsulované silice na bentonitu naváženy podle zvolené nejnižší MIC (mg/l) v přepočtu na 100 ml erlenmeyerovu baňku do čajových sáčků.

## 4.2.3 Stanovení účinnosti enkapsulovaných silic

Do připravených 100 ml erlenmeyerových baněk s 0,5 ml destilované vody byly vloženy naočkované jednotlivé stroužky česneku. Ty byly naočkovány inokulem tak, že bylo sterilním jednorázovým očkem nanášeno malé množství připravené izolované houby přímo na povrch slupky stroužku ve spodní části u kořínků (viz Obrázek 1). Poté byl kontaminovaný stroužek vložen do erlenmeyerovy baňky s vodou. Následně byl do baňky s česnekem přidán čajový sáček s naváženou enkapsulovanou silicí tak, aby nebyl namočen. Baňky byly uzavřeny alobalem a parafilmem a uloženy do tmavé krabice uložené v pokojové teplotě.

Pro tři testované silice byla připravena celkem tři opakování od každého ze tří vybraných houbových patogenů. Tři kontrolní vzorky byly bez přidané enkapsulované silice.

Kontrola nárůstu hub se prováděla vizuálně po jednom týdnu, dvou týdnech a měsíci. Po měsíci byly česneky z baněk vyndány a byla zkontrolována případná vnitřní poškození rozkrojením a sloupnutím slupky.



Obrázek 1 Místo zaočkování houbovým patogenem

## 5 Výsledky

### 5.1 Izolace mikroorganismů

Houbové patogeny byly odebrány z kontaminovaných cibulí česneku po týdnu od inokulace ve sklenicích se zvýšenou vlhkostí přidavkem destilované vody. Pro následnou izolaci byly vybrány dvě cibule česneku s nejvyšším nárustem hub na povrchu (viz Obrázek 2), tedy ze sklenic, kam byly přidány 4 ml a 5 ml destilované vody. Z těchto česneků se podařilo izolovat 8 čistých kmenů houbových patogenů (viz Obrázek 7 v příloze I), které byly dále přeočkovávány.

Jednotlivé kmeny 8 houbových patogenů, které byly určeny, jsou uvedeny v Tabulce 2. Tučně vyznačené kmeny hub byly využity pro další testování inhibice růstu mikroorganismů pomocí enkapsulovaných silic. Tyto tři kmeny jsou zachyceny na Obrázku 3.

Tabulka 2 Kmeny izolovaných houbových patogenů

Číslo	Kmen	Kódové označení
<b>1</b>	<i>Fusarium annulatum</i>	<b>5,308, BLVL 1.dr. A2</b>
<b>2</b>	<i>Penicillium</i> sp.	<b>5,308, BLVL 1.dr.</b>
<b>3</b>	<i>Fusarium curvatum</i>	<b>4,308, BLVL 1.dr.</b>
4	<i>Fusarium</i> sp.	4,308, BLVL 2.dr.
5	<i>Penicillium</i> sp.	5,308, TMV 2.dr
6	<i>Penicillium</i> sp.	5,308, BL 3.dr.
7	<i>Penicillium</i> sp.	5,308, BLVL 2.dr.
8	<i>Fusarium</i> sp.	5,308, BLVL 1.dr. A1



Obrázek 2 Poškození na cibulích česneku ve sklenicích s přidavkem destilované vody 4 ml a 5 ml



Obrázek 3 Tři kmeny houbových patogenů vybrané k testování na citlivost vůči silicím *Fusarium annulatum*, *Penicillium sp.*, *Fusarium curvatum*



## 5.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

Silice byly nejprve testovány v nejvyšší koncentraci 512 mg/l, poté byla tato hodnota při dalším testování citlivosti snižována podle toho, jestli došlo k nárůstům houbových patogenů.

Při testování silic v nejvyšší koncentraci nebyl zaznamenán žádný nárůst hub na povrchu agaru. Po snížení koncentrace na jednu čtvrtinu této hodnoty na 128 mg/l, došlo k inhibici nárůstů u tří silic (skořicová kůra, oregano, tymián) tak, jak je zobrazeno v Tabulce 3.

Tabulka 3 Nárůst houbových patogenů při koncentrace silic 128 mg/L

Silice	<i>Fusarium annulatum</i>	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Fusarium curvatum</i>
<b>Skořicová kůra</b>	Ne	Ne	Ne
<b>Oregano</b>	Ne	Ne	Ne
<b>Tymián</b>	Ne	Ne	Ne
<b>Hřebíček</b>	Ano	Ano	Ano
<b>Máta rolní</b>	Ano	Ano	Ano
<b>Citronová tráva</b>	Ano	Ano	Ano

Ano = byl zaznamenán nárůst, Ne = nebyl zaznamenán nárůst

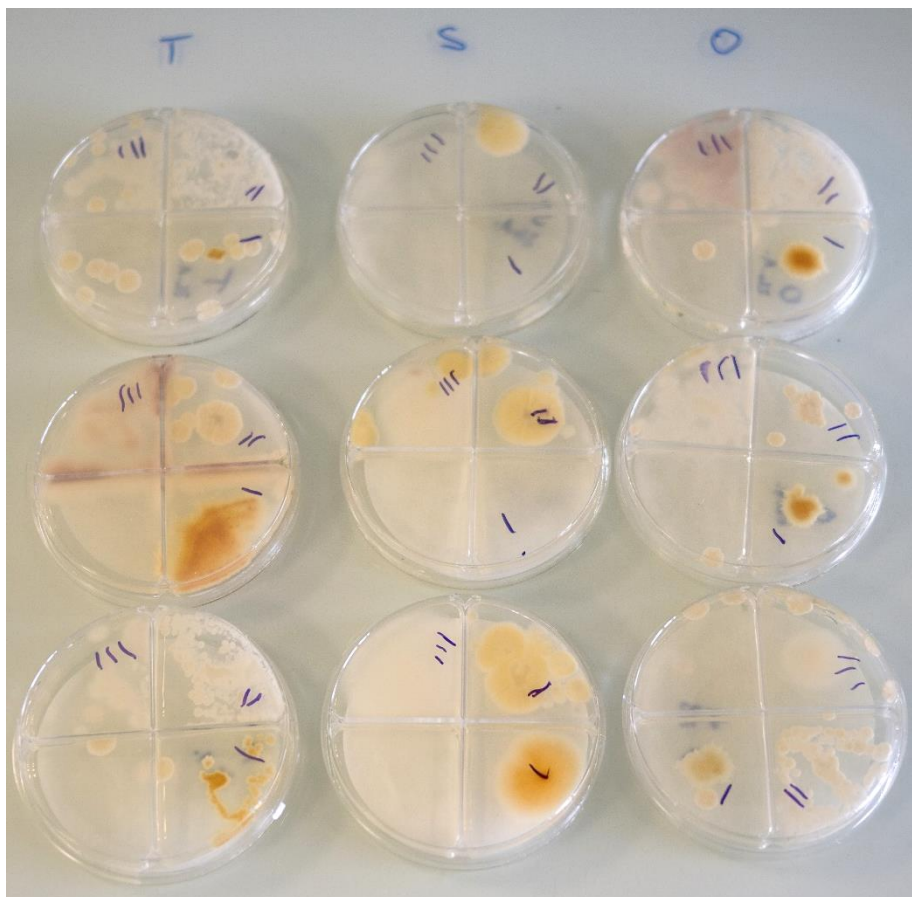
U silic hřebíčku, máty a citronové trávy bylo přistoupeno ke zvýšení koncentrace na 256 mg/l. Při této koncentraci již nedošlo k žádnému nárůstu a byla tím tak tato koncentrace určena jako jejich MIC.

Koncentrace silic skořicové kůry, oregana a tymiánu se nejprve snížila na 32 mg/l (jedna čtvrtina z 128 mg/l). Při této nižší koncentraci došlo k nárůstu u všech testovaných hub (Obrázek 4), v následujícím testu účinnosti silic byla koncentrace zvýšena na 64 mg/l. Výsledek nárůstů hub při této koncentraci je zaznamenán v Tabulce 4 a na Obrázku 5 níže.

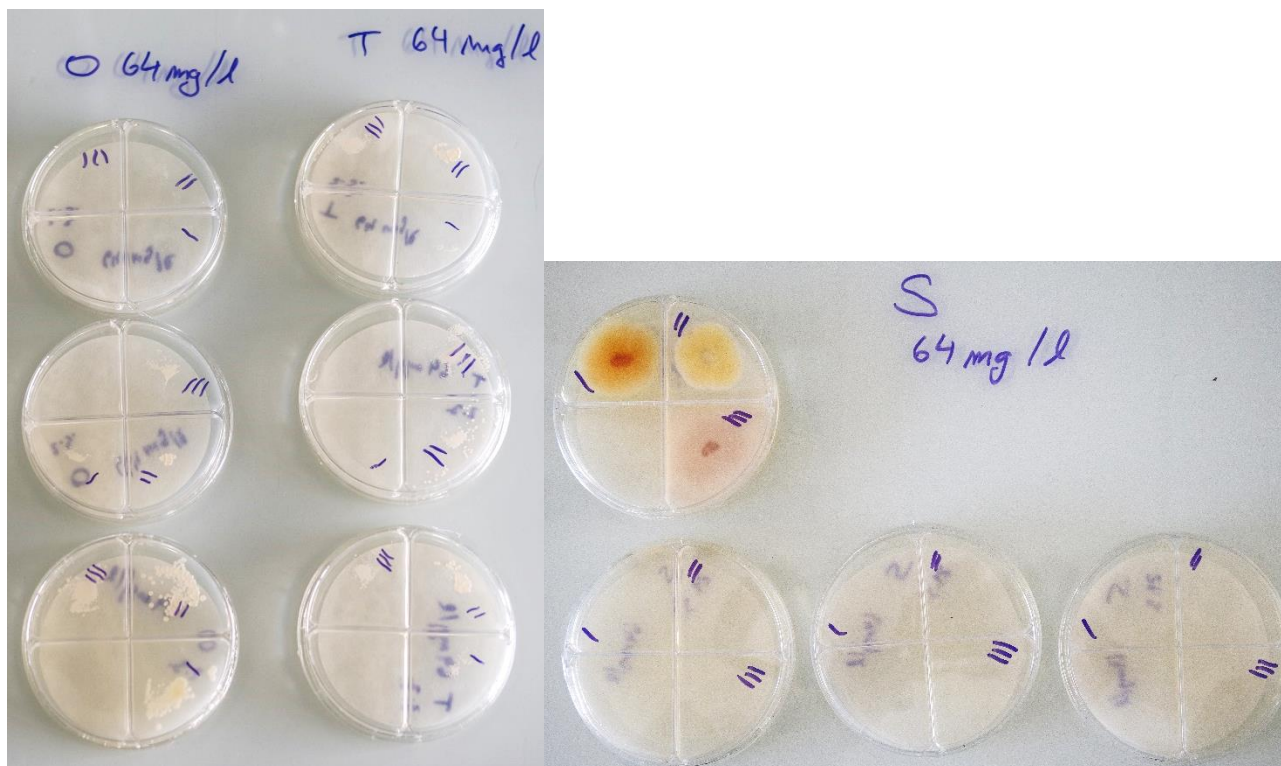
Tabulka 4 Nárůst houbových patogenů při koncentrace silic 64 mg/L

Silice	<i>Fusarium annulatum</i>	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Fusarium curvatum</i>
<b>Skořicová kůra</b>	Ne	Ne	Ne
<b>Oregano</b>	Ano	Ano	Ano
<b>Tymián</b>	Ano	Ano	Ano

Ano = byl zaznamenán nárůst, Ne = nebyl zaznamenán nárůst



Obrázek 4 Nárůst hub při koncentraci silic 32 mg/l



Obrázek 5 Nárůst hub při koncentraci silic 64 mg/l

Díky těmto výsledkům byla stanovena MIC u silice ze skořicové kůry 64 mg/l, protože nedošlo k žádnému nárůstu a u silic oregana a tymiánu byla MIC 128 mg/l stanovena na základě zaznamenaných nárůstů dle Tabulky 3, jelikož při koncentraci 64 mg/l sice nedošlo k plnému nárůstu mycelia, ale počátek nárůstu patrný byl díky drobným bílým koloniím v místech inokulace patogenů na agar.

Výsledkem testování minimální inhibiční koncentrace vybraných šesti silic proti třem kmenům hub byla nejnižší MIC u silice ze skořicové kůry a následně u oregana a tymiánu. Souhrn MIC pro každou testovanou silici byl zaznamenán v Tabulce 5.

*Tabulka 5 Souhrn minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro jednotlivé silice*

<b>Silice</b>	<b>MIC (mg/l)</b>
Skořicová kůra	64
Oregano	128
Tymián	128
Hřebíček	256
Máta rolní	256
Citronová tráva	256

### 5.3 Účinnost enkapsulovaných silic na česneku

Jako materiál pro formulaci vybraných silic byl zvolen bentonit. Navázání silic na něj proběhlo úspěšně za vzniku homogenního prášku bez hrudek a takto enkapsulované silice vykazovaly účinnost při testování na stroužcích česneku i měsíc po kontaminaci.

Koncentrace silice pro testování přímo na stroužcích česneku byla zvolena podle MIC z první části pokusu 128 mg/l.

Při vizuální kontrole kontaminovaných česneků po prvním týdnu od inokulace houbovými patogeny, nebyl zaznamenán žádný nárůst povrchového mycelia. Na kontrolních vzorcích, bez enkapsulovaných silic, byl pozorován nárůst povrchového mycelia již po prvním týdnu od zaočkování. Nárůst mycelia na povrchu stroužků nebyl zaznamenán ani při kontrole pod dvou týdnech a ani po měsíci. Po vyndání stroužků z baněk a jejich kontrole sloupnutím slupky a rozkrojením, byly zaznamenány příznaky vnitřního poškození jako hnědnutí a měknutí vrchní části, a hlavně klíčku stroužku, skvrny na povrchu, prasknutí vnější vrstvy a vyhřeznutí ze slupky a změna barvy do oranžova. Příznaky byly zaznamenány u všech stroužků, u kterých byly použity silice oregana a tymiánu. U skořicové kůry bylo 44 % stroužků bez příznaků, případně vykazovaly jen velmi mírné zaschnutí kořínků. Nejčastějším příznakem bylo zahnědnutí a změknutí vrchní části a klíčku stroužku a prasknutí vnější vrstvy a to v 78 % případů. Ve dvou případech došlo k změně barvy dužniny do oranžova a ve třech případech byla pozorována skvrnitost na povrchu. Výsledky tohoto pozorování jsou zaznamenány v Tabulce 6 a nejčastější příznaky na Obrázku 6.

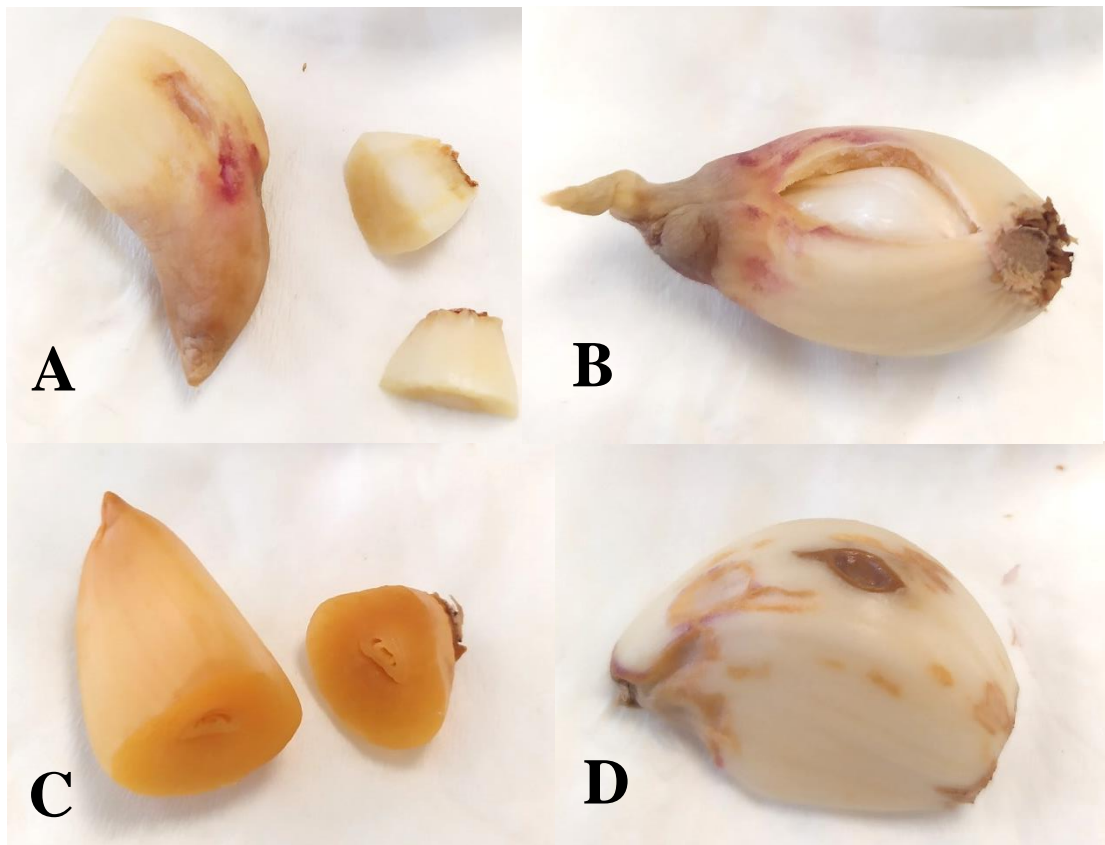
Tabulka 6 Výskyt vnitřního poškození na stroužcích česneku po měsíci od inokulace

Silice	<i>Fusarium annulatum</i>	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Fusarium curvatum</i>
Skořicová kůra	Ne	Ne	Ano*
	Ne	Ne	Ano**
	Ano*	Ano*	Ano***
Tymián	Ano*	Ano*	Ano*
	Ano*	Ano***	Ano***
	Ano*	Ano*	Ano*
Oregano	Ano*	Ano*	Ano*
	Ano*	Ano*	Ano*
	Ano*	Ano**	Ano*

\* hnědnutí od špičky a klíčku až prasknutí vnější vrstvy

\*\* oranžové zbarvení dužniny stroužku

\*\*\* skvrnitost na povrchu dužniny



Obrázek 6 Nejčastější pozorované příznaky na stroužcích po měsíci,  
 A,B) Hnědnutí od špičky a klíčku až prasknutí vnější vrstvy,  
 C) oranžové zbarvení dužniny stroužku,  
 D) skvrnitost jen na povrchu dužniny

## 6 Diskuze

### 6.1 Izolace mikroorganismů a testování citlivosti

Ze získaných kontaminovaných cibulí česneku byly úspěšně izolovány patogenní mikroorganismy. Podařilo se izolovat a opakovaným přeočkováním vyčistit celkem osm hub. Vizuálně byly vybrány tři rozdílné houbové patogeny rodů *Fusarium* (*F. curvatum* a *F. annulatum*) a *Penicillium* sp. (Obrázek 3). Ty byly pro další testování vybrány proto, že jedna vykazovala tvorbu spór (*Penicillium* sp.) a také byla v průběhu nejčastějším problémem kontaminace a představovala tak vhodného zástupce agresivní a snadno se šířící houbové kontaminace. Další dvě houby rodu *Fusarium* vykazovaly růst výrazného bílého mycelia. Tyto rody hub, především *Fusarium* sp., jsou podle Gálvez & Palmero (2021), Kocourek et al. (2014), Horáková et al. (2021) a Velát & Ovesná (2020) nejčastějším zdrojem houbové kontaminace česneku. Izolované mikroorganismy v této práci tedy představují vzorové rody a je možné výsledky považovat za aplikovatelné i při případném dalším využití, jelikož je pravděpodobné, že půjde o stejné či příbuzné často kontaminující rody.

Testováním inhibice mikroorganismů vybraných šesti silic (skořicová kůra, oregano, tymián, hřebíček, máta rolní, citronová tráva) byla zjištěna vyšší aktivita u silic skořicové kůry, oregana a tymiánu. Zbylé silice (hřebíček, máta rolní a citronová tráva) měly horší aktivitu a jejich minimální inhibiční koncentrace byla 256 mg/l oproti nejnižší 64 mg/l u skořicové kůry a nižší 128 mg/l u oregana a tymiánu. Na základě tohoto výsledku byly zvoleny silice skořicové kůry, oregana a tymiánu pro testování přímo na stroužcích česneku.

Testování účinnosti silic v různých koncentracích proti různým houbovým patogenům včetně *Fusarium* sp. a *Penicillium* sp. in vitro se zabýval Benkeblia (2004), kdy testoval silice česneku a několika druhů cibulí v koncentracích od 50 do 300 ml/l. Bylo zjištěno, že právě rod *Fusarium* sp. byl nejméně citlivý k silicím z testovaných houbových patogenů, kdyžto zástupce rodu *Penicillium* sp. byl inhibován již při nižších koncentracích. Rozhodující pro výběr a schopnost inhibice silice byla správná volba druhu a její koncentrace vůči danému houbovému patogenu.

## 6.2 Testování na stroužcích česneku

Inokulace houbových patogenů na jednotlivé stroužky česneku byla provedena obdobně jako v předchozí studii (Horáková et al. 2021), ale bez narušení povrchu samotného stroužku, aby byla alespoň částečně simulována nenarušená celá cibule česneku. Mycelium všech tří vybraných houbových patogenů (*Fusarium curvatum*, *Fusarium annulatum* a *Penicillium* sp.) narostlo u kontrol na neporušené slupce stroužku bez problémů již po týdnu, jak je možné vidět na Obrázku 8 (A,B,C) v příloze I. Oproti tomu bylo jasně zřetelné, že na stroužcích, které byly v erlenmeyerových baňkách uzavřeny s enkapsulovanými silicemi, k žádnému nárůstu povrchového mycelia nedošlo po celou dobu testování (viz Obrázek 8, D).

U vzorků ale byly po kontrole stroužků pozorovány vnitřní změny pod slupkou, které nebyla vždy na první pohled zřetelné. Z celkem 27 vzorků byly jen 4 bez jakýchkoliv vnitřních příznaků, a to všechny při použití silice skořicové kůry. U ostatních vzorků byly pozorovány různé příznaky od změny barvy do oranžova (u 2 vzorků), která byla ale nejspíše způsobena fyziologickou poruchou nazývanou "waxy breakdown" (Madhu et al. 2019), skvrnitost (u 3 vzorků), až po praskání a výrazné hnědnutí a změknutí vrchní části stroužku (u 18 vzorků). Takto velké množství vzorků s podobnými příznaky by bylo možné vysvětlit absencí sterilizace stroužků před testováním nebo fyto toxicitou silic. Právě fyto toxicitu silic je nutné dle Camiletti et al. (2016) brát při jejich využití v potaz, aby nebyla použita silice, která během skladování místo ochrany způsobí nežádoucí poškození. Ve zmíněné studii bylo popsáno, že hlavní složky silic oregana a tymiánu, karvakrol a tymol, byly pravděpodobně původci zastavení růstu kořínků a klíčku, a tudíž mají jistý fyto toxický efekt, který by se mohl projevit i jako hnědnutí a změknutí klíčků stroužků česneku, nejvíce pozorovaném při testování u silic oregana a tymiánu v této diplomové práci. Naopak u skořicové kůry, se tyto vnitřní příznaky hnědnutí vyskytly jen ve třech případech z celkových 18 pozorování. Je tedy pravděpodobné, že nešlo o fusariovou hnilobu způsobenou prorůstáním nainokulovaných houbových patogenů skrz slupku, protože nebyly zaznamenány její příznaky v oblasti spodní části stroužku a kořínků, když byly na povrchu bez výjimky inhibovány silicemi, ale o formu poškození fyto toxickými účinky silic.

Fusariovou hnilobu česnekovitých typicky způsobují rody *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*, *F. proliferatum* a *F. solani* (Kocourek et al. 2014; Gálvez & Palmero 2021). Naopak ale skvrnitost na stroužcích by po porovnání pozorování v této práci a autorů Horáková et al. (2021) mohla odpovídat napadení *Fusarium* sp.

Koncentrace silic byla do testování přímo na česneku se zvolena o polovinu vyšší (128 mg/l) než u testů in vitro (64 mg/l) z toho důvodu, že tato MIC byla stanovena pouze u silice ze skořicové kůry, kdyžto u oregana a tymiánu byla MIC 128 mg/l. Druhým důvodem volby vyšší koncentrace byly odlišné podmínky než při pokusu v Petriho miskách, kdy šlo o větší objem nádoby, vyšší riziko vytěkání části silice, vyšší riziko kontaminace z česneku a navozené vyšší vlhkosti. Tyto simulované podmínky jsou stále ale velmi uměle vytvořené a nemusí odpovídat reálným podmínkám při skladování česneku ve větším množství.

Na česnek je používáno velké množství chemických prostředků, a proto je žádoucí hledat alternativy pro jejich snížení. Camiletti et al. (2016) provedli pokus s kombinací fungicidu a vybraných silic a prokázali, že je možné snižovat množství chemické zátěže na přírodu použitím silic jako ochrany před patogeny. Tu by bylo možné snížit úplným vyloučením chemického fungicidu a použitím pouze silice. S její stabilitou a delší účinností může pomoci právě i v této práci testovaná enkapsulace, která nebyla v dříve zmíněné studii použita. Snížení používání chemických prostředků je také žádoucí z hlediska vzniku rezistence houbových patogenů vůči nim a nebezpečí kontaminace životního prostředí. El-Mougy et al. (2009) prokázali účinnost silic česneku a cibule při použití společně s aditivou sorbanem draselným a benzoanem sodným na stroužcích česneku ve formě postřiku aplikovaném před skladováním, k inhibici růstu mycelia způsobeném dalším častým houbovým patogenem, *Aspergillus niger*. Ve studii Ji et al. (2018) testovali účinek silice tymolu na prodloužení skladování cibule při snížené teplotě, jako alternativy ke konvenčním fungicidním přípravkům. Bylo prokázáno, že sprejování tymolu o koncentraci 10 - 20 mg/l na cibule, výrazně snížilo výskyt houbových patogenů na skladovaných cibulích po dobu několika měsíců. Při této studii bylo také zjištěno, že v cibulích ošetřených roztokem tymolu nebyly detekovány rezidua silice po 10 měsících skladování.

Problémem pro efektivní využití silic v komerčním měřítku může být nejen jejich nestabilita, ale také skutečnost, kterou uvedla Jobling (2000), že silice jsou často spíše fungistatické než fungicidní. To znamená, že sice zastaví růst hub, ale jakmile jsou odstraněny nebo přirozeně vyprchají, dojde znovu k nárůstu. To představuje problém v komerčním využití silic u zemědělských komodit jako je právě česnek nebo cibule a další zelenina, která se neskládá v jednotlivých baleních, jako například rajčata (Kwon et al. 2017; Buendía–Moreno et al. 2020) či drobné ovoce - jahody (Campos-Requena et al. 2015; Sangsuwan et al. 2016), kde je v balení možné silici udržet stabilnějším déle.



Na základě výsledků stanovení účinnosti enkapsulovaných silic lze říct, že především silice skořicové kůry, enkapsulovaná v bentonitu, má potenciál pro další testování v reálnějších podmínkách skladování česneku, kdy může být potlačen růst fytopatogenních mikroorganismů a tím prodloužena doba skladování a zamezení nechtěných ztrát, ale k dosažení chtěných výsledků je nutný další výzkum v této oblasti.

## 7 Závěr

Tato diplomová práce potvrdila, že využití silic, ve spojení s vhodnou technologií enkapsulace do bentonitu, může být funkčním způsobem ochrany skladovaných cibulí česneku vůči houbovým patogenům především na povrchu. Konkrétním zjištěním byla nejlepší účinnost silice ze skořicové kůry vůči vybraným houbám při testech na Petriho miskách, oproti dalším testovaným silicím tymiánu, oregana, citronové trávy, hřebíčku a máty rolní.

Při využití silic skořicové kůry, oregana a tymiánu přímo na stroužcích česneku, již nebyla ochrana silic tak prokazatelná. Pouze u silice ze skořicové kůry byly pozorovány vzorky bez jakéhokoliv vnitřního poškození. Naopak u silic oregana a tymiánu byly pozorováno vnitřní poškození od oranžového zbarvení po hnědnutí klíčku a skvrnitost. U všech tří testovaných silic na česneku ale došlo k úplné inhibici růstu patogenů na povrchu.

Problémem s použitím silic by mohla být jejich aromaticnost a fytoxicita. S těmito faktory je nutné počítat při dalších pokusech a v případném běžném využití, aby nebyly pozměněny typické senzorické vlastnosti česneku a jeho samotná kvalita, jelikož je důležitý správný výběr silice, která nebude mít negativní účinky.

Enkapsulované silice se jeví být skvělým pomocníkem v ochraně skladovaného česneku a dalších potravin, ale je zapotřebí dalšího podrobného výzkumu, aby bylo možné vyhodnotit jejich účinnost a upravit způsob aplikace, aby bylo dosaženo co nejlepších výsledků v praktickém využití, jelikož laboratorní podmínky nedokážou naplno simulovat problematické nechráněné prostředí skladovacích prostor.

## 8 Literatura

- Ashraf R., Khan R.A., Ashraf I. 2011. Garlic (*Allium sativum*) supplementation with standard antidiabetic agent provides better diabetic control in type 2 diabetes patients. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*:565–570.
- Ashraf R., Khan R.A., Ashraf I., Quereshi A.A. 2013, September. Effects of *Allium sativum* (Garlic) on systolic and diastolic blood pressure in patients with essential hypertension.
- Bachmann Janet. 2008. Garlic: Organic Production. Available from <https://attra.ncat.org/wp-content/uploads/2019/05/garlic.pdf?>
- Baser K, Buchbauer G. 2015. Handbook of essential oils: science, technology, and applications.
- Benkeblia N. 2004. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT - Food Science and Technology* **37**:263–268. Academic Press.
- Bhavaniramya S, Vishnupriya S, Al-Aboody MS, Vijayakumar R, Baskaran D. 2019. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology* **2**:49–55. Elsevier B.V.
- Buendía–Moreno L, Sánchez–Martínez MJ, Antolinos V, Ros–Chumillas M, Navarro–Segura L, Soto–Jover S, Martínez–Hernández GB, López–Gómez A. 2020. Active cardboard box with a coating including essential oils entrapped within cyclodextrins and/or hallosyte nanotubes. A case study for fresh tomato storage. *Food Control* **107**:106763. Elsevier Ltd.
- Burt S. 2004, August 1. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review.
- Čabalová I, Češek B, Mikala O, Gojny J, Kačík F, Tribulová T. 2019. The influence of selected efficient compounds of essential oils for paper protection. *Journal of Cultural Heritage* **37**:148–154. Elsevier Masson SAS.
- Camiletti BX, Asensio CM, Gadban LC, Pecci M de la PG, Conles MY, Lucini EI. 2016. Essential oils and their combinations with iprodione fungicide as potential antifungal agents against withe rot (*Sclerotium cepivorum Berk*) in garlic (*Allium sativum* L.) crops. *Industrial Crops and Products* **85**:117–124. Elsevier.

- Campos-Requena VH, Rivas BL, Pérez MA, Figueroa CR, Sanfuentes EA. 2015. The synergistic antimicrobial effect of carvacrol and thymol in clay/polymer nanocomposite films over strawberry gray mold. *LWT - Food Science and Technology* **64**:390–396. Academic Press.
- Chrétien PL, Morris CE, Duffaud M, Leyronas C. 2021. Aetiology of garlic rot, an emerging disease in France. *Plant Pathology* **70**:1276–1291. John Wiley & Sons, Ltd.
- de Oliveira LH, Trigueiro P, Souza JSN, de Carvalho MS, Osajima JA, da Silva-Filho EC, Fonseca MG. 2022. Montmorillonite with essential oils as antimicrobial agents, packaging, repellents, and insecticides: an overview. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **209**:112186. Elsevier.
- de Santis D, Garzoli S, Vettrai AM. 2021. Effect of gaseous ozone treatment on the aroma and clove rot by *Fusarium proliferatum* during garlic postharvest storage. *Heliyon* **7**. Elsevier Ltd.
- Diriba-Shiferaw G. 2016. Review of Management Strategies of Constraints in Garlic (*Allium sativum* L.) Production. *The Journal of Agricultural Sciences*. 10.4038/jas.v11i3.8172.
- Dugan FM, Lupien SL, Hellier BC. 2019. Infection by *Fusarium proliferatum* in aerial garlic bulbils is strongly reduced compared to rates in seed cloves when both originate from infected bulbs. *Crop Protection* **116**:43–48. Elsevier.
- Durance T. 2002. *Handbook of Food Preservation*. Page Food Research International.
- El-Mougy NS, El-Gamal NG, Abdel-Kader MM. 2009. Pre-storage application of some essential oils and food preservatives against black mould incidence of garlic cloves during storage. <http://dx.doi.org/10.1080/03235400701621933> **42**:1059–1068. Taylor & Francis.
- Etoh T, Simon PW. 2002. *Diversity, Fertility and Seed Production of Garlic*.
- FAOSTAT. (2020). Available from <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Fernández-Pan I, Mendoza M, Maté JI. 2013. Whey protein isolate edible films with essential oils incorporated to improve the microbial quality of poultry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **93**:2986–2994.
- Frankova A, Smid J, Kloucek P, Pulkrabek J. 2014. Enhanced antibacterial effectiveness of essential oils vapors in low pressure environment. *Food Control* **35**:14–17. Elsevier.
- Fritsch RM, Friesen N. 2002. *Evolution, Domestication and Taxonomy*.

- Froio F, Ginot L, Paolino D, Lebaz N, Bentaher A, Fessi H, Elaissari A. 2019. Essential Oils-Loaded Polymer Particles: Preparation, Characterization and Antimicrobial Property. *Polymers* **11**:1017. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Gálvez L, Palmero D. 2021. Incidence and etiology of postharvest fungal diseases associated with bulb rot in garlic (*Allium sativum*) in Spain. *Foods* **10**. MDPI AG.
- Gálvez L, Urbaniak M, Waśkiewicz A, Stępień Ł, Palmero D. 2017. *Fusarium proliferatum* – Causal agent of garlic bulb rot in Spain: Genetic variability and mycotoxin production. *Food Microbiology* **67**:41–48. Academic Press.
- Gómez B, Barba FJ, Domínguez R, Putnik P, Bursać Kovačević D, Pateiro M, Toldrá F, Lorenzo JM. 2018, December 1. Microencapsulation of antioxidant compounds through innovative technologies and its specific application in meat processing. Elsevier Ltd.
- Holley RA, Patel D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* **22**:273–292.
- Horáková MK, Tancik J, Barta M. 2021. *Fusarium proliferatum* causing dry rot of stored garlic in Slovakia. *Journal of Plant Pathology* **103**:997–1002. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH.
- Imaizumi VM et al. 2022. Garlic: A systematic review of the effects on cardiovascular diseases. <https://doi-org.infozdroje.czu.cz/10.1080/10408398.2022.2043821:1–23>. Taylor & Francis.
- Janatova A, Bernardos A, Smid J, Frankova A, Lhotka M, Kourimská L, Pulkrabek J, Kloucek P. 2015. Long-term antifungal activity of volatile essential oil components released from mesoporous silica materials. *Industrial Crops and Products* **67**:216–220. Elsevier.
- Ji SH, Kim TK, Keum YS, Chun S-C. 2018. The Major Postharvest Disease of Onion and Its Control with Thymol Fumigation During Low-Temperature Storage. *Mycobiology* **46**:242–253. Available from <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1505245>
- Jimenez-Vazquez P, Rangel-Lucio JA, Mendoza-Elos M, ervantes-Ortiz F. 2014. Effect of propagule size and plant density on seedling emergence, yield and quality of garlic (*Allium sativum* L.).
- Jobling J. 2000. Essential Oils: A new idea for postharvest disease control. *Good and Vegetables Magazine*:11–50.

- Juan Moreno, Rafael Peinado. 2012. Wine Colloids. *Enological Chemistry*:323–354. Academic Press.
- Keusgen M. 2002. Health and Alliums. *Allium Crop Science: Recent Advances*.
- 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**:161–165. Elsevier.
- Kocourek F, Holý Kamil, Stará Jitka. 2014. Optimalizace používání pesticidů proti škůdcům a chorobám v systému integrované produkce cibulové a kořenové zeleniny a salátu. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
- Kumar P, Lorenzo JM. 2020. Edible films / coating with tailored properties for active packaging of meat , fish and derived products. *Trends in Food Science & Technology* 10.1016/j.tifs.2020.01.032. Elsevier Ltd.
- Kwon SJ, Chang Y, Han J. 2017. Oregano essential oil-based natural antimicrobial packaging film to inactivate Salmonella enterica and yeasts/molds in the atmosphere surrounding cherry tomatoes. *Food Microbiology* **65**:114–121. Academic Press.
- Lindstedt S., Wlosinska M., Nilsson A.-C., Hlebowicz J., Fakhro M., Sheikh R. 2021, October. Successful improved peripheral tissue perfusion was seen in patients with atherosclerosis after 12 months of treatment with aged garlic extract.
- López P, Sánchez C, Batlle R, Nerín 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**:6939–6946.
- Madhu B, Mudgal VD, Champawat PS. 2019. Storage of garlic bulbs (*Allium sativum* L.): A review. *Journal of Food Process Engineering* **42**:e13177. John Wiley & Sons, Ltd.
- Martins IM, Barreiro F, Rodrigues AE. 2008. Microencapsulation of thyme oil by coacervation.
- Ministerstvo zemědělství. 2019. Zprávy z Ministerstva zemědělství **6**.
- Mohamed El Miz, Samira Salhi, Ali El Bachcari, Jean Paul Wathelet, Abdesselam Tahani. 2013. Adsorption study of tymol on Na-bentonite | EL MIZ |.
- Mondani L, Chiusa G, Battilani P. 2021a. Chemical and biological control of Fusarium species involved in garlic dry rot at early crop stages. *European Journal of Plant Pathology* **160**:575–587. Springer Science and Business Media B.V.

- Mondani L, Chiusa G, Pietri A, Battilani P. 2021b. Monitoring the incidence of dry rot caused by *Fusarium proliferatum* in garlic at harvest and during storage. *Postharvest Biology and Technology* **173**:111407. Elsevier.
- Nedovic V, Kalusevic A, Manojlovic V, Levic S, Bugarski B. 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* **1**:1806–1815. Elsevier.
- Němcová Veronika, Buchtová Irena. 2021, December. Ministerstvo zemědělství: Situační a výhledová zpráva zelenina.  
[https://eagri.cz/public/web/file/692977/Zelenina\\_2021\\_web.pdf](https://eagri.cz/public/web/file/692977/Zelenina_2021_web.pdf)
- Netzel ME. 2020. Garlic: Much more than a common spice. *Foods* **9**. MDPI AG.
- Oh JY, Manna M, Han GD, Chun SC, Kim KD. 2016. First report of *Aspergillus awamori* as a fungal pathogen of garlic (*Allium sativum* L.). *Crop Protection* **85**:65–70. Elsevier.
- Rajaei A, Hadian M, Mohsenifar A, Rahmani-Cherati T. 2017. A coating based on clove essential oils encapsulated by chitosan-myristic acid nanogel efficiently enhanced the shelf-life of beef cutlets 10.1016/j.fpsl.2017.10.005.
- Ried K., Frank O.R., Stocks N.P. 2010, October. Aged garlic extract lowers blood pressure in patients with treated but uncontrolled hypertension: A randomised controlled trial.
- Ried K., Frank O.R., Stocks N.P. 2013, January. Aged garlic extract reduces blood pressure in hypertensives: A dose-response trial.
- Risch SJ. 1995. Encapsulation: Overview of Uses and Techniques. Pages 2–7.
- Sangsuwan J, Pongsapakworawat T, Bangmo P, Sutthasupa S. 2016. Effect of chitosan beads incorporated with lavender or red thyme essential oils in inhibiting *Botrytis cinerea* and their application in strawberry packaging system. *LWT - Food Science and Technology* **74**:14–20. Academic Press.
- Santos AJ et al. 2020. Clay/PVP nanocomposites enriched with *Syzygium aromaticum* essential oil as a safe formulation against *Aedes aegypti* larvae. *Applied Clay Science* **185**:105394. Elsevier.
- Schmidt E. 2015. Production of essential oils. *Page Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, Second Edition*.

- Simó G, Fernández-Fernández E, Vila-Crespo J, Ruipérez V, Rodríguez-Nogales JM. 2017, August 15. Research progress in coating techniques of alginate gel polymer for cell encapsulation. Elsevier Ltd.
- Smith RL et al. 2005, March 1. A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: Essential oils. Pergamon.
- Sobenin I.A., Andrianova I.V., Fomchenkov I.V., Gorchakova T.V., Orekhov A.N. 2009. Time-released garlic powder tablets lower systolic and diastolic blood pressure in men with mild and moderate arterial hypertension.
- Sobenin I.A., Nedosugova L.V., Filatova L.V., Balabolkin M.I., Gorchakova T.V., Orekhov A.N. 2008. Metabolic effects of time-released garlic powder tablets in type 2 diabetes mellitus: The results of double-blinded placebo-controlled study.
- Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. 2016. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. Hindawi Publishing Corporation.
- Thielmann J, Muranyi P, Kazman P. 2019. Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Heliyon* **5**:e01860. Elsevier Ltd.
- Valdez JG, Makuch MA, Ordovini AF, Frisvad JC, Overy DP, Masuelli RW, Piccolo RJ. 2009. Identification, pathogenicity and distribution of *Penicillium* spp. isolated from garlic in two regions in Argentina. *Plant Pathology* **58**:352–361. John Wiley & Sons, Ltd.
- Velát, Ovesná. 2020. ČESNEK. [http://www.akcr.cz/data\\_ak/21/p/Cesnek.pdf](http://www.akcr.cz/data_ak/21/p/Cesnek.pdf)
- Volk GM, Rotindo KE, Lyons W. 2004. Low-temperature storage of garlic for spring planting. *HortScience* **39**:571–573. American Society for Horticultural Science.
- Wlosinska M., Nilsson A.-C., Hlebowicz J., Malmsjö M., Fakhro M., Lindstedt S. 2019, December. Aged garlic extract preserves cutaneous microcirculation in patients with increased risk for cardiovascular diseases: A double-blinded placebo-controlled study.
- Yildirim S, Röcker B, Pettersen MK, Nilsen-Nygaard J, Ayhan Z, Rutkaite R, Radusin T, Suminska P, Marcos B, Coma V. 2018, January 1. Active packaging applications for food. Blackwell Publishing Inc.

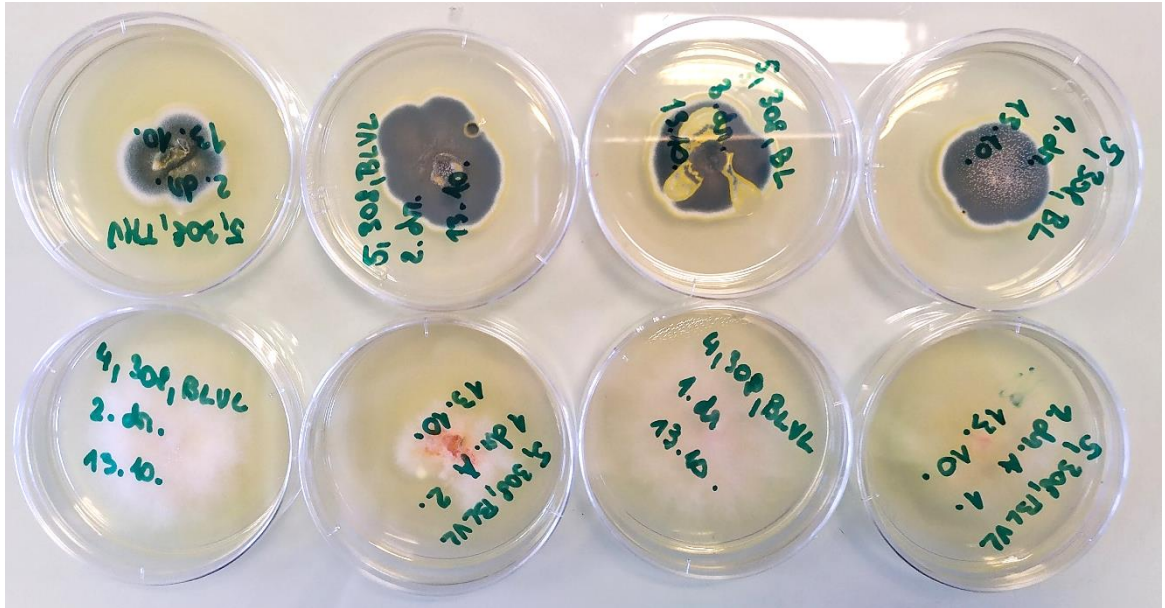


- Zanetti M, Carniel TK, Dalcanton F, dos Anjos RS, Gracher Riella H, de Araújo PHH, de Oliveira D, Antônio Fiori M. 2018, November 1. Use of encapsulated natural compounds as antimicrobial additives in food packaging: A brief review. Elsevier Ltd.
- Zuidam NJ, Shimoni E. 2010. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. Pages 3–29 Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. Springer New York.

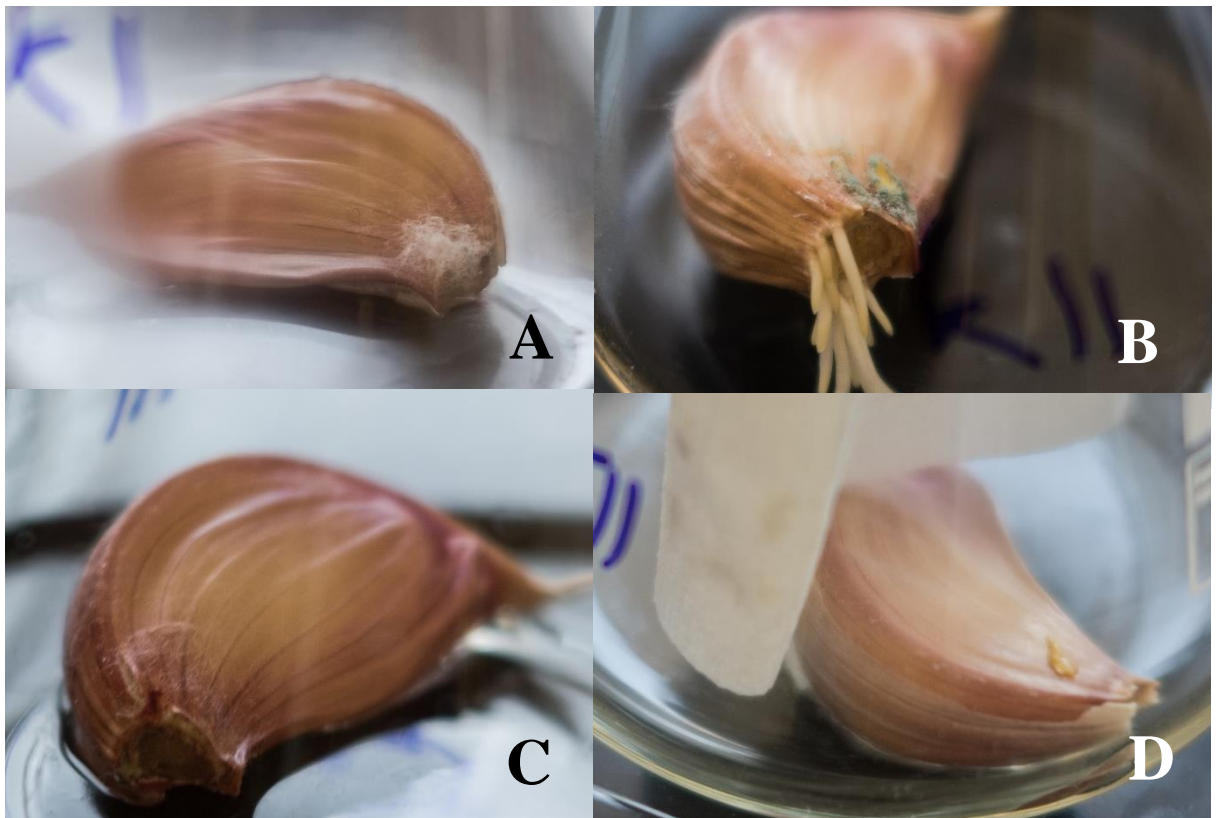
## 9 Seznam použitých zkratk a symbolů

ČR	Česká republika
ČZU	Česká zemědělská univerzita
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DPH	Daň z přidané hodnoty
EU	Evropská unie
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
NCBI	Národní centrum pro biotechnologické informace
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
PDA	Bramborový dextrosový agar (Potato dextrose agar)
UV	Ultrafialové záření
VÚRV	Výzkumný ústav rostlinné výroby

## 10 Samostatné přílohy



Obrázek 7 Osm izolovaných hub z poškozených cibulí česneku



Obrázek 8 Porovnání nárůstů houbových patogenů po inokulaci na kontrolních vzorcích (A,B,C) a na vzorku ošetřeném enkapsulovanou silicí skořicové kůry (D) (Na vzorcích B a D je stejný patogen rodu *Penicillium* sp.)