

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a produkce



**Přírodní rostlinné látky a jejich potenciál zvyšovat
antimikrobiální účinek konvenčních potravinářských
konzervačních látek**

Bakalářská práce

Autor práce: Stanislav Rys

Vedoucí práce: Ing. Pavel Nový, Ph.D.

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Přírodní rostlinné látky a jejich potenciál zvyšovat antimikrobiální účinek konvenčních potravinářských konzervačních látek" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 17.4.2015

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Pavlu Novému, Ph.D. za odborné vedení a pomoc při zpracování mé bakalářské práce.

Přírodní rostlinné látky a jejich potenciál zvyšovat antimikrobiální účinek konvenčních potravinářských konzervačních látek

Plant-derived compounds and their potential to enhance the antimicrobial effect of conventional food preservatives

Souhrn

Rostliny jsou schopny téměř neomezeně vytvářet látky, pomocí kterých se brání proti chorobám, škůdcům, býložravcům a jiným nepříznivým faktorům. Tyto látky dávají rostlinám jejich specifickou barvu, vůni a chuť. Některé z nich mají antimikrobiální účinky. V dnešní době se klade čím dál tím větší důraz na zdravý životní styl, proto se neustále zvyšuje počet výzkumů zaměřených na využití rostlinných látek v praxi, například jako přírodních konzervantů. Některé přírodní látky jsou povolena potravinová aditiva, která (například u barviv) plně nahrazují látky chemické. U jiných rostlinných látek se testují jejich kombinace s konvenčními chemickými konzervanty. Některé rostlinné látky vykazují v testech synergický účinek s konvenčními konzervanty a díky této synergii by se časem mohla snížit dávka chemických látek v potravinách.

Klíčová slova: rostlinné extrakty, konzervace potravin, antimikrobiální aktivita, konvenční potravinářské konzervanty, synergismus

Summary

Plants are able to create almost limitless amounts of substances to resist diseases, pests, herbivores and other adverse factors. These substances give plants their specific color, smell and taste. Some of them have antimicrobial effects. Nowadays more and more emphasis is laid on healthy lifestyles. Therefore constantly increasing number of studies focused on the utilization of plant substances in praxis are created like those focused on natural preservative. Some natural substances (like colorants) are authorized as food additives which fully substitute chemical substances. Combinations of some plant substances with conventional chemical preservatives are tested. In tests some of the plant substances show synergistic effect with conventional preservatives. Owing to this synergy the amount of chemicals in food could be reduced eventually.

Keywords: plant ekstrakt, food preservation, antimikrobiale aktivitaet, konventionelle Nahrungsmittelkonservierungsstoffe, Synergismus

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Význam studia přírodních látek.....	10
3.2 Hlavní zdroje přírodních rostlinných látek.....	10
3.3 Mechanismus účinku rostlinných látek na mikroorganismy	10
3.3.1 Inhibice syntézy buněčné stěny	11
3.3.2 Poškození syntézy plazmatické membrány	11
3.3.3 Inhibice proteosyntézy	12
3.3.4 Porucha syntézy nukleových kyselin.....	12
3.3.5 Inhibitory intermediárního metabolismu (kompetitivní inhibice).....	12
3.4 Metody pro stanovení aktivity antimikrobiálních látek.....	12
3.4.1 Diluční metody	13
3.4.2 Difuzní metody	13
3.5 Charakteristika vybraných přírodních rostlinných látek	14
3.5.1 Glykosidy.....	14
3.5.2 Fenoly, polyfenoly a fenolové kyseliny.....	14
3.5.2.1 Katechol a pyrogallol	15
3.5.2.2 Třísloviny	15
3.5.2.3 Kumariny.....	16
3.5.2.4 Chinony	17
3.5.3 Flavony a flavonoidy	18
3.5.3.1 Katechiny.....	19
3.5.4 Esenciální oleje	20
3.5.5 Isoprenoidy	21
3.5.5.1 Terpeny a terpenoidy.....	21
3.5.5.1.1 Terpineny.....	22
3.5.5.1.2 Linalool.....	22
3.5.5.2 Rostlinné fytoncidy – silice	23
3.5.5.2.1 Allicin.....	24
3.5.5.2.2 Karvakrol a Thymol	25
3.5.5.2.3 Eugenol.....	27

3.5.5.2.4	Cinnamaldehyd.....	28
3.5.5.2.5	Trans-anethol.....	29
3.5.5.2.6	Estragol.....	29
3.5.6	Aromatické sloučeniny	30
3.5.7	Peptidy a proteiny	30
3.5.8	Alkaloidy	30
3.6	Charakteristika vybraných konvenčních konzervantů v potravinářství.....	31
3.6.1	Kyselina sorbová – E200	31
3.6.2	Sorban draselný – E202	32
3.6.3	Nisin – E234	32
3.6.4	Kyselina octová – E260	32
3.6.5	Kyselina mléčná – E270	33
3.6.6	Mléčnan sodný – E325	33
3.7	Kombinace konvenčních a přírodních rostlinných konzervantů	34
3.7.1	Synergie oregana a klikvy velkoplodé s kyselinou mléčnou (E270) a mléčnanem sodným (E325)	34
3.7.2	Antimikrobiální a synergické účinky nisinu (E234) a chitosanu s rostlinnými látkami	37
3.7.3	Kombinované účinky hořčičné mouky a kyseliny octové (E260).....	42
3.7.4	Kombinace sorbanu draselného (E202) a kyseliny sorbové (E200) s rostlinnými látkami	43
4	Závěr.....	45
5	Seznam použité literatury.....	46

1 Úvod

Především díky touze vést zdravý životní styl vzrostla v posledních letech spotřeba čerstvých potravin, jako jsou zahradnické produkty, mořské plody či maso. Avšak s vyšší spotřebou čerstvých potravin se do podvědomí lidí dostávají i problémy, které jsou s nimi neodmyslitelně spojeny a to je jejich omezená doba skladování a jejich spojitost s alimentárními onemocněními. Díky těmto důvodům stále pokračují komerční tlaky používat syntetické chemické látky jako konzervanty. Používání těchto chemických konzervantů je však spotřebiteli vnímáno stále negativněji. Aby se zabránilo kažení potravin a onemocněním, která způsobují bakterie, je v současnosti povolena široká škála chemických konzervačních látek a ačkoliv se jejich povolený druh a množství v jednotlivých zemích liší, základ zůstává stejný. Zejména kvůli „pohodlnosti trhu“ se zvyšuje množství čerstvého ovoce a zeleniny a tím se zvyšuje i jejich doba skladování, což koresponduje s nárůstem alimentárních onemocnění. Například z nařezaného salátu se uvolňují živiny podporující růst mikroorganismů. V prevenci proti růstu těchto potravinářských patogenů v čerstvých potravinách jsou tradiční metody konzervace méně účinné, proto je třeba nacházet nové a inovativní technologie. Jednou z nich by mohlo být použití rostlinných antimikrobiálních látek. Tyto látky přírodního charakteru, které jsou produkovány mikroorganismy nebo rostlinami, mají toxický účinek na mikroorganismy. Jejich použití by mohlo zvýšit bezpečnost potravin, prodloužit jejich trvanlivost a uspokojit tak spotřebitele.

2 Cíl práce

Cílem práce je najít přírodní rostlinné látky, které vykazují antimikrobiální aktivitu a zároveň mají synergický účinek s konvenčními potravinářskými konzervačními látkami, díky čemuž by se mohlo snížit množství chemických látek v potravinách.

3 Literární rešerše

3.1 Význam studia přírodních látek

Lidé již po staletí využívají přírodní látky a to zejména pro jejich antibakteriální, antimykotické, antivirové a antiparazitální účinky. U některých látek byly dokonce prokázány antikarcinogenní a antioxidantní účinky a mnohé z nich působí protizánětlivě. Tato fakta jsou podnětem pro stále se rozšiřující výzkum, který se zabývá využitím přírodních látek například v potravinářském průmyslu, kosmetice, farmakologii nebo v medicíně (Kalemba, Kunicka, 2003).

3.2 Hlavní zdroje přírodních rostlinných látek

Významným zdrojem přírodních látek jsou bezesporu rostliny. Rostliny mohou obsahovat účinné složky v nadzemních (nať, květy, listy, lodyha, pupen, semeno) i podzemních (kořen, oddenek, hlíza) částech. Někdy mohou být tyto látky obsaženy i v celé rostlině. (Moravcová, 2003; Dorman, Deans, 2000). Rostliny téměř neomezeně syntetizují aromatické sloučeniny, jako jsou například fenoly nebo jejich kyslíkaté deriváty. Díky některým těmto složkám mají rostliny typickou vůni, barvu nebo chuť (např.: třísloviny, chinony). Některé rostliny vytváří také sloučeniny, které mají léčivé účinky nebo se mohou pyšnit antimikrobiální aktivitou (Cowan, 1999). Tato aktivita byla prokázána mimo jiné u esenciálních olejů přírodních rostlinných látek, kde závisí na struktuře daných komponent, funkčních skupinách a možných synergických interakcích mezi komponentami (Dorman, Deans, 2000).

3.3 Mechanismus účinku rostlinných látek na mikroorganismy

Bylo prokázáno, že antimikrobiální účinky esenciálních olejů souvisejí s hydrofilními a lipofilními vlastnostmi daných komponent. Dále bylo prokázáno, že terpeny působí inhibičně na enzymy katalyzující v membráně bakteriální buňky. Celý složitý proces účinku rostlinných látek na mikroorganismy však nebyl dosud zcela objasněn. (Kalemba, Kunicka, 2003).

Některé složky esenciálních olejů interferují s translokací protonů přes membránové váčky a blokují tak fosforylaci adenosin-difosfátu jakožto primárního energetického metabolismu a mohou tak působit jako „vypínač“. Specifické terpeny s funkční skupinou, jako je fenolický

alkohol nebo aldehyd rozrušují membránu a potlačují enzymatickou aktivitu nebo úplně zastaví produkci enzymů, čímž mohou způsobit smrt bakteriální buňky.

Karvakrol a thymol způsobují rupturu vnější lipopolysacharidové vrstvy, což způsobuje částečnou dezintegraci vnější membrány. Tea tree oil zase denaturuje membránové proteiny, což má za následek částečný únik draselných iontů, poruchu buněčného dýchání a poté autolýza buňky (Kalemba, Kunicka, 2003).

3.3.1 Inhibice syntézy buněčné stěny

Buněčná stěna mikroorganismů má za úkol zajistit homeostázu nitrobuněčného prostředí a udržet tvar buňky. Její poškození nebo inhibice tvorby některé z jejích složek vede k poruše jejích funkcí a poté může dojít až k autolýze buňky. To je možné zejména u gram-pozitivních bakterií, protože na rozdíl od gram-negativních mikroorganismů nemají buněčnou stěnu obklopenou vnější membránou, tudíž jsou citlivější na působení inhibičních látek rostlinného původu (Burt, 2004).

Takto působí β -laktamová antibiotika (např.: peniciliny a cefalosporiny). Tyto látky se naváží na specifická vazebná místa a inhibují tak transpeptidázy, což jsou látky nutné k tvorbě peptidoglykanů v buněčné stěně bakterií. Vznikají tak buňky s defektní buněčnou stěnou. Tyto buňky pak nejsou schopné odolávat vysokému osmotickému tlaku uvnitř makroorganismů. Takto poškozené buňky se nakonec rozpadnou nebo jsou zlikvidovány buňkami hostitele. Antimikrobiální látky působící tímto mechanismem, působí sice jen v době růstu mikroorganismů, avšak mají baktericidní účinek (Lochmann, 1999).

3.3.2 Poškození syntézy plazmatické membrány

Plazmatická membrána je semipermeabilní a izoluje vnitřní prostředí buňky od vnějšího. Tvoří především osmotickou bariéru buňky, tudíž jsou díky ní uvnitř buňky koncentrovány ionty a metabolicky potřebné látky (např.: aminokyseliny, puriny, pyrimidiny atd.) (Lochmann, 1999). Takto působí antibiotika, která obsahují hydrofilní a lipofilní složky. Tato antibiotika poškozují syntézu plazmatické membrány tak, že se naváží na lipofilní části bakteriální buněčné membrány a vodou, kterou s sebou nesou, zvětšují povrch buňky, dokud se membrána nezhroutí. Tím mění její permeabilitu, čímž způsobují ztrátu její osmotické celistvosti. Jejich výsledný efekt závisí na množství fosfolipidů obsažených v buněčné membráně a jejich schopnosti pronikat buněčnou stěnou (Hynie, 2001). K látkám

poškozující plasmatickou membránu patří peptidy (polymyxicin, bacitracin) a antifugální polyenová antibiotika (amfotericin B, nystatin) (Zahradnický, 1982).

3.3.3 Inhibice proteosyntézy

Látky, které blokují syntézu buněčných proteinů, působí převážně bakteriostaticky. K těmto látkám patří aminoglykosidy, tetracykliny a makrolidy. Vznik mukopeptidáz inhibují tetracyklinová antibiotika. Díky tomu inhibují také odbourávání vnitřních vrstev bakteriální stěny. Pokud se však tyto látky kombinují nevhodně s peniciliny nebo cefalosporiny, neztrácí bakteriální buňky svoji pevnou stěnu a tím pádem nelyzují (Hynie, 2001).

3.3.4 Porucha syntézy nukleových kyselin

Některé láky mají schopnost narušit syntézu nukleových kyselin při replikaci nebo transkripci DNA (Hynie, 2001). Vzhledem k tomu, že tyto procesy jsou téměř totožné jak v buňkách bakterií, tak v buňkách vyšších organismů, mají tyto látky poměrně velkou toxicitu. Jejich zástupci jsou například kyselina nalidixová a oxolinová, fluorochinolony, trimetoprim, antivirové preparáty, protinádorová chemoterapeutika nebo rifampicin (Lochmann, 1999), který blokuje iniciaci transkripce tak, že se naváže na RNA - polymerázu (Čechová, Janalíková, 2007).

3.3.5 Inhibitory intermediárního metabolismu (kompetitivní inhibice)

Vyšší organismy jsou závislé na přísunu kyseliny listové, protože ji nedovedou samy syntetizovat. Naproti tomu bakterie si tuto kyselinu samy vytvářejí (Lochmann, 1999). Pomocí sulfonamidů se inhibuje tvorba kyseliny listové a dochází tak k pozastavení růstu a rozmnožování bakterií (Hynie, 2001). Bakterie, které si kyselinu listovou samy nesyntetizují, nejsou sulfonamidy inhibovány a jsou tudíž vůči nim rezistentní (Lochmann, 1999).

3.4 Metody pro stanovení aktivity antimikrobiálních látek

Na mikroorganismy působí celá škála chemických látek, které jsou jak anorganického, tak organického původu. Účinek antimikrobiálních látek závisí na jejich koncentraci. Při vyšších koncentracích jsou tyto látky toxické, avšak velmi nízké koncentrace mohou naopak stimulovat životní pochody v buňce. Účinek koncentrace jednotlivých látek s antimikrobiálním účinkem závisí na druhu použité látky a na mikroorganismu, na který látky

působí. Citlivost mikroorganismů k inhibičním látkám lze stanovit dilučními nebo difuzními metodami.

3.4.1 Diluční metody

Diluční metody mají za úkol prokázat míru rezistence testovaných mikroorganismů k antimikrobiálním látkám. Pomocí těchto metod se stanovuje hladina MIC (minimální inhibiční koncentrace, což je nejnižší koncentrace, která viditelně inhibuje růst testovaného mikroorganismu), jsou vhodné také pro kvantitativní stanovení stupně rezistence a lze je využít i pro taxonomické účely či pro laboratorní ověření inhibičních účinků nových přípravků. Diluční metody jsou vhodné i pro pomalu rostoucí mikroorganismy a mikroorganismy se speciálními nároky na kultivaci (např. anaerobní bakterie). Pro testování běžně rostoucích bakterií se využívá Mueller-Hinton agar. Sterilní mikrodiluční plastová destička v jednotlivých jamkách obsahuje bujón s různou koncentrací inhibičních látek. Agar je poté inokulován suspenzí testovaných bakterií a poté se inkubuje při optimální teplotě (Lochmann, 1999).

3.4.2 Difuzní metody

Mezi difuzní metody lze zařadit diskovou difuzní metodu, která je vhodná především ke stanovení rezistence u rychle rostoucích nenáročných bakterií. Na rozdíl od dilučních metod se však nedoporučuje pro pomalu rostoucí mikroorganismy nebo pro bakterie se speciálními kultivačními nároky.

Tato kvalitativní metoda, je založena na inokulaci mikroorganismů na povrch média (nejčastěji Mueller-Hinton agar). Na povrch Petriho misky se naočkuje rovnoměrně testovaný mikroorganismus, na povrch tohoto naočkovaného agaru se přiloží papírové disky, které jsou napuštěné známými koncentracemi antimikrobiálních látek. Z papíru poté tyto látky během inkubační doby difundují do agaru a jejich koncentrace ve směru od okraje disku postupně slábne. Účinné antimikrobiální látky vytvoří kolem disku zónu bez nárůstu buněk. Podané době kultivace je měřen průměr zón inhibice okolo každého disku. Tento výsledek je udáván v mm (Lochmann, 1999).

3.5 Charakteristika vybraných přírodních rostlinných látek

3.5.1 Glykosidy

Glykosidy jsou deriváty monosacharidů, které obsahují substituovanou glykosidickou hydroxylovou skupinu. Jedná se tedy o úplné acetaly. Glykosidy jsou sloučeniny obsahující jednu nebo více monosacharidových jednotek a alespoň jednu nesacharidovou část, tzv. aglykon nebo také genin. Struktura aglykonu může být sice rozmanitá, avšak na výsledné vlastnosti glykosidu má vliv zejména navázaný sacharid. Díky různorodosti aglykonů se glykosidy dělí do různých skupin: fenolové glykosidy, saponiny, kumariny a jejich deriváty nebo třeba flavonoidové glykosidy, což jsou deriváty fenylochromanu a odvozují se od tří základních skeletů: flavan, isoflavan a neoflavan.

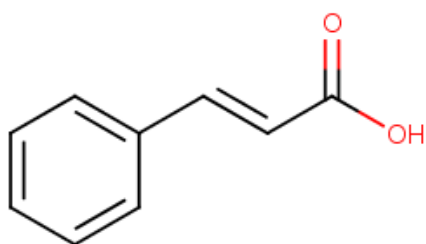
Flavonoidové glykosidy se vyskytují u rostlin v květech a plodech a patří mezi rostlinná barviva způsobující žluté, červené či modré zbarvení květů. Tyto glykosidy se účastní redoxních pochodů a mají detoxikační účinky, pročež jsou využívány v medicíně (Moravcová, 2003).

Glykosidy se vyskytují hojně v rostlinné říši, kde tvoří důležité obsahové látky rostlin, avšak některé mohou být syntetizovány i živočichy a mikroorganismy. Důležitou roli hrají i při detoxikaci látek ve vodě nerozpustných. Jsou to převážně bezbarvé látky, rozpustné ve vodě a v alkoholu, ale v éteru, petroléteru a chloroformu jsou prakticky nerozpustné a v octanu ethylnatém se rozpouštějí jen nepatrně.

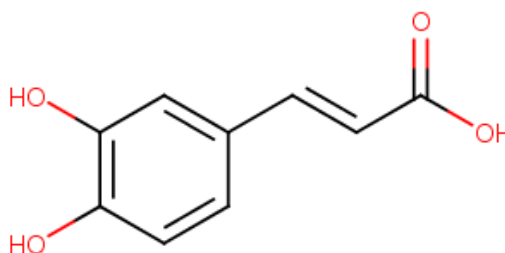
3.5.2 Fenoly, polyfenoly a fenolové kyseliny

Jednoduché fenoly, polyfenoly a fenolové kyseliny jsou jednodušší bioaktivní látky, které mají na aromatickém kruhu pouze jednu substanci. Skupina těchto látek je odvozena od fenylypropanu a jejími hlavními zástupci jsou kyselina skořicová a kyselina kávová. Tyto kyseliny vykazují antivirové, antibakteriální a antimykotické účinky a najdeme je například v estragonu nebo mateřídoušce (Cowan, 1999). K této skupině se řadí také kyselina ferulová. Tato kyselina je součástí buněčné stěny obilovin a přírodní estery této kyseliny mají antimikrobiální účinky. Například Feruloyloligosacharidový ester izolovaný z ananasu vykazuje vysoké inhibiční účinky na G⁺ a G⁻ bakteriích (Opletal, Šimerda, 2005). S antimikrobiální aktivitou souvisí také počet a poloha hydroxylových skupin ve fenolické struktuře. Cowan (1999) dokázal ve své studii, že zvýšená hydroxylace vede ke zvýšené

toxicitě a význam hydroxylových skupin i jejich umístění v molekule posléze potvrdili i Dorman a Deans (2000).



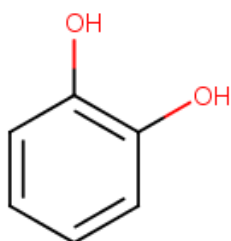
Obr. 1. Kyselina skořicová



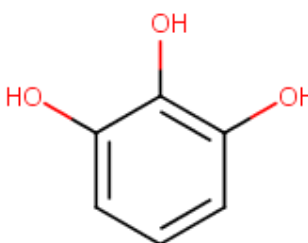
Obr. 2. Kyselina kávová

3.5.2.1 Katechol a pyrogallol

Katechol a pyrogallol jsou hydroxylované fenoly, které mají dvě (katechol) nebo tři (pyrogallol) OH skupiny. Počet jejich hydroxylových skupin souvisí s mírou toxických účinků na mikroorganismy. Mechanismy této toxicity jsou přisuzovány enzymové inhibici, případně reakcím se sulfydrylovými skupinami, či více nespecifikovaným reakcím s proteiny (Scalbert, 1991).



Obr. 3. Katechol



Obr. 4. Pyrogallol

3.5.2.2 Třísloviny

Pojem třísloviny (taniny) je obecný popisný název pro skupinu polymerních fenolických látek, které mají schopnost srážet proteiny a jsou známé pro svou svíravou, trpkou či hořkou chuť. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje od 500 do 3000 g/mol (Haslam, 1996).

Nacházejí se téměř v každé rostlinné části (kůra, dřevo, listy, plody a kořeny) (Scalbert, 1991). Jsou rozděleny do dvou skupin, hydrolyzovatelné taniny a kondenzované taniny. Hydrolyzovatelné taniny se skládají z d-glukózy, na kterou je esterifikací navázáno

několik monomerních skupin kyseliny gallové. Zatímco více rozšířené kondenzované taniny (často nazývané proanthocyanidiny) jsou polymery flavonoidů. Třísloviny mohou být vytvořeny kondenzací z flavonových derivátů, které jsou přepravovány dřevěnými tkáněmi rostlin, popřípadě mohou být vytvořeny polymerací chinonu (Geissman, 1963).

V posledních letech získaly třísloviny velkou pozornost. Odborníci dnes tvrdí, že spotřeba nápojů obsahujících tanin (např.: zelené čaje nebo červená vína) může vyléčit nejrůznější nemoci nebo dokonce zabránit jejich vzniku (Serafini et al., 1994). Jednou z jejich molekulárních činností je vytváření komplexu s proteiny pomocí tzv. nespecifické složky jako jsou vodíkové vazby, hydrofobní účinky či tvorba kovalentní vazby (Haslam, 1996). Způsob jejich antimikrobiálního působení může souviset s jejich schopností inaktivovat mikrobiální adheziny, enzymy, transportní proteiny buněčného obalu, atd. Třísloviny také inhibují růst hmyzu v rostlinách (Schultz, 1988) a narušují trávicí činnosti v batoru (Butler, 1988).

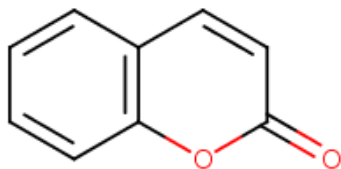
Scalbert (1991) přezkoumal antimikrobiální vlastnosti tříslovin. Uvedl 33 studií, které dokumentovaly inhibiční aktivity tříslovin. Podle těchto studií mohou být třísloviny toxické pro filamentární houby, kvasinky a bakterie. Ačkoliv je to stále spekulativní, taniny jsou považovány za látky, které jsou alespoň částečně zodpovědné za antibiotické aktivity methanolických extraktů z kůry *Arjuna alata* nalezeného v Nepálu (Taylor et al., 1996). Dále pak nejméně dvě studie prokázaly, že třísloviny inhibují virové reverzní transkriptázy (Nonaka et al., 1990).

3.5.2.3 Kumariny

Kumariny jsou fenolické látky, které existují ve volné formě (aurapten, cinchoriin, eskulin, herniarin, osthol...) nebo ve formě glykosidicky vázaných sloučenin (amiol, angelicin, bergaptol, obliquin, samidin...) (O'Kennedy et al., 1997). Jsou zodpovědné například za charakteristickou vůni sena. Od roku 1996 bylo identifikováno alespoň 1300 druhů kumarinů (Hoult, Paya, 1996). Jejich sláva pochází především z jejich antitrombotické, protizánětlivé (Piller, 1975) a vasodilatační (Namba et al., 1988) činnosti. Jeden z neznámějších kumarinů je warfarin, který se používá jako orální lék na ředění krve, tak jako rodenticid (Keating, O'Kennedy, 1997) a může mít také antivirové účinky.

Kumariny jsou známy jako vysoce toxické u hlodavců, proto s nimi lékaři zachází opatrně, nicméně, nedávné studie prokázaly výraznou závislost na druhu metabolismu, takže mnoho v in vivo studiích na zvířatech nelze extrapolovat na člověka. Zdá se, že toxické deriváty kumarinu můžou být u lidí bezpečně vylučovány močí (Weinmann, 1997).

Dále bylo zjištěno, že kumariny stimulují makrofágy, což by mohlo mít pozitivní vliv v léčbě infekcí. Přesněji řečeno, kumarin se používá, aby se zabránilo opakování oparů způsobené HSV -1 u lidí, nicméně je neúčinný proti malomocenství (Thornes, 1997).



Obr. 5. Kumarin

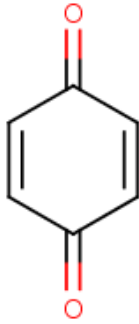
3.5.2.4 Chinony

Chinony jsou deriváty benzochinonů, naftochinonů, antrachinonu a dalších a tvoří nejrozšířenější skupinu přírodních barviv na Zemi (Moravcová, 2003). Mají zodpovědnost například za hnědnutí zeleniny či ovoce po jeho rozkrojení a jsou meziproduktem při syntéze melaninu v lidské kůži. Chinony jsou vysoce reaktivní aromatické sloučeniny, které obsahují dvě substituované karbonylové skupiny. Chinony s nukleofilními aminokyselinami tvoří v mikrobiální buňce ireverzibilní komplexy, což vede k inaktivaci proteinů a ztrátě jejich funkce.

Podle všeho reagují s povrchovými adheziny, polypeptidy buněčné stěny a enzymy vázanými na membránu (Cowan, 1999). Stejně jako u všech antimikrobiálních látek rostlinného původu musí být nadále důkladně zkoumány možné toxické účinky chinonů.

Kazmi et al. (1994) popsali antrachinon z pákistánského stromu *Cassia italica*, který byl bakteriostatický pro *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium pseudodiphthericum* a *Pseudomonas aeruginosa* a baktericidní pro *Pseudomonas pseudomalliae*. Antrachinon hypericin z třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*) získal v poslední době velkou pozornost v populárním tisku jako antidepresivum.

K přeměně mezi hydrochinonem (difenolem) a chinonem (diketonem) snadno dochází prostřednictvím oxidačních a redukčních reakcí. Individuální redoxní potenciál dvojice chinon - hydrochinon je velmi důležitý v mnoha biologických systémech (např.: ubiquinon (koenzym Q) v savčích elektronových transportních (systémech). Hydroxylované aminokyseliny mohou být přeměněny na chinony za přítomnosti vhodných enzymů, jako je například polyfenoloxidáza (Vamos – Vigyazo, 1981).



Obr. 6. Chinon

3.5.3 Flavony a flavonoidy

Flavonoidy jsou hydroxylované fenolické aromatické sloučeniny, které jsou odvozené od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu. Flavan je tvořen dvěma benzenovými kruhy spojenými heterocyklickým pyranem.

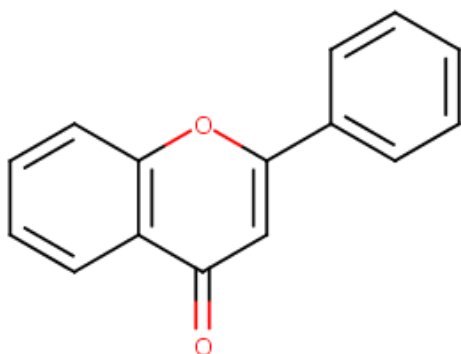
Flavony mají fenolickou strukturu, která obsahuje jednu karbonylovou skupinu, (na rozdíl od dvou karbonylů v chinonu).

Flavonoidy jsou syntetizovány rostlinami v reakci na mikrobiální infekci (Dixon et al., 1983), proto by nemělo být překvapující zjištění, že in vitro jsou to účinné antimikrobiální látky proti široké škále mikroorganismů. Tato antimikrobiální aktivita je s největší pravděpodobností založena na tvorbě komplexů s extracelulárními rozpustnými proteiny a sloučeninami v buněčné stěně mikroorganismu. Například lipofilní flavonoidy mohou narušovat cytoplazmatickou membránu (Cowan, 1999). Dále jsou známé například pro své antioxidační působení, které závisí na počtu a poloze hydroxylovaných skupin v molekule, či pro silný antivirový efekt (např.: glycyrrhizin, chrysin a swertiofranchetin jsou efektivní proti viru HIV).

Vymezení možného mechanismu účinku flavonů a flavonoidů brání rozporné závěry. Flavonoidy postrádají hydroxylové skupiny na β – kruzích, a díky tomu jsou účinnější proti mikroorganismům, které -OH skupinu mají (Chabot et al., 1992). Toto zjištění podporuje myšlenku, že jejich mikrobiální cíl je membrána. Nicméně, několik autorů zaznamenalo také opačný efekt tj. čím více hydroxylace, tím větší antimikrobiální aktivita (Sato et al., 1996). Můžeme tedy říci jen to, že u flavonoidů nemůžeme s jistotou předvídat daný stupeň hydroxylace a toxicity na mikroorganismech.

Sloučeniny flavonoidů vykazují inhibiční účinky proti mnoha virům. Četné studie dokumentují účinnost flavonoidů jako swertifrancheside, morin, kemferol, glycyrizin

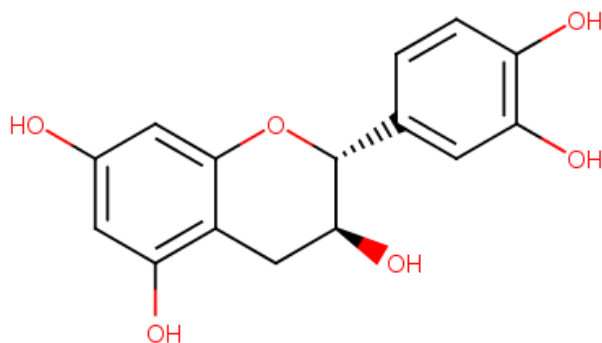
(z lékořice), chrysin (Critchfield et al., 1996) proti HIV nebo quercetin, u kterého byly zjištěny inhibiční účinky proti *Salmonella enteritidis* a *Bacillus cereus* (Opletal, Šimerda, 2005). Nejznámějším zástupcem flavonoidů je však rutin, který je netoxický a má význam v zažívacím traktu a katechiny nacházející se v zelených čajích a inhibující růst mikroorganismů (Cowan, 1999). Průměrná denní strava vyspělých civilizací obsahuje přibližně 1 g smíšených flavonoidů.



Obr. 7. Flavon

3.5.3.1 Katechiny

Katechiny jsou nejvíce redukována forma jednotky C_3 ve sloučeninách flavonoidů. Tyto flavonoidy byly rozsáhle zkoumány pro svůj výskyt v zelených čajích. Před nějakým časem se zjistilo, že čaje vykazují antimikrobiální aktivitu (Toda et al., 1989) a že obsahují sloučeninu katechin. Tato sloučenina inaktivuje in vitro *Vibrio cholerae O1* a inhibuje například bakterie *Shigella* či izolované bakteriální glukosyltransferáza *Streptococcus mutans* (Borris, 1996). Tato třetí aktivita byla potvrzena testy in vivo na potkanech. Když byli potkani krmení potravou obsahující 0,1 % čajových katechinů, puklinové kazy (způsobené *Streptococcus mutans*) byly sníženy o 40 % (Ooshima et al., 1993).



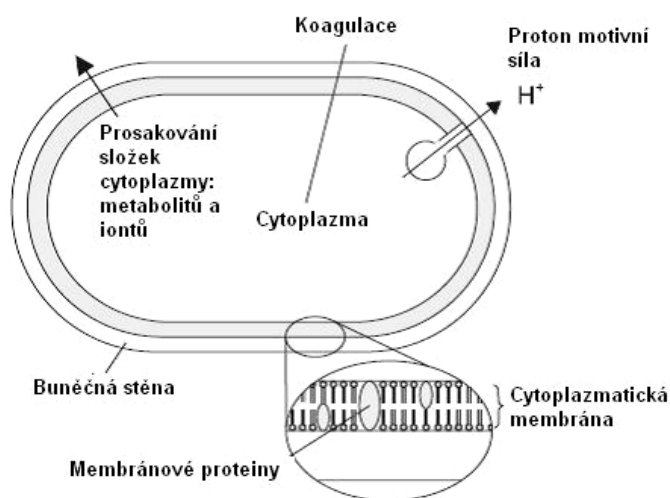
Obr. 8. Katechin

3.5.4 Esenciální oleje

Esenciální olej se může skládat z více než 60 jednotlivých složek, kdy hlavní složka může představovat až 85% podíl, zatímco ostatní látky mohou být přítomny jen ve stopovém množství. Avšak právě některé z těchto minoritních složek mohou sehrát důležitou roli v antibakteriálním působení daného esenciálního oleje a to zřejmě synergistickým působením s jeho dalšími složkami. Esenciální oleje s antimikrobiálními účinky se získávají například z šalvěje, některých druhů mateřídoušky nebo oregana (Burt, 2004). Je známo, že určité druhy koření a jejich esenciální oleje vykazují různé úrovně antimikrobiální činnosti.

Esenciální oleje jsou v potravinovém průmyslu užívány jako aroma a ačkoliv je většina z nich hodnocena jako GRAS látky, jejich používání jako konzervantů je omezeno kvůli narušení organoleptických vlastností potravin. (Raybaudi-Massilia, 2007)

Obecně se zdá, že při nižším pH potraviny, nižší skladovací teplotě nebo při nižším množství kyslíku přítomného v obalu se zvyšuje citlivost bakterií k antimikrobiálnímu účinku esenciálních olejů. Při nízkém pH se u esenciálních olejů zvyšuje hydrofóbnost, díky čemuž se snadněji rozptýlí v lipidech buněčné membrány cílových bakterií. Naopak snížení účinku esenciálních olejů způsobuje přítomnost tuků a bílkovin v potravinách. Části esenciálních olejů zřejmě působí na buněčné proteiny začleněné v cytoplazmatické membráně, kde bývají také lokalizovány enzymy jako *ATP-asa*. S největší pravděpodobností se lipofilní uhlovodíkové molekuly hromadí v lipidové dvojvrstvě a deformují vzájemnou vazbu lipidů a proteinu, v některých případech může nastat i přímá interakce lipofilních sloučenin s hydrofóbními částmi proteinu (Burt, 2004).



Obr. 9. Schéma působení esenciálních olejů na bakteriální buňku

Na obrázku 9 jsou znázorněny lokalizace a mechanismy v bakteriální buňce, které jsou zřejmě místem účinku složek esenciálních olejů: degradace buněčné stěny, poškození cytoplazmatické membrány, poškození membránových proteinů, vytékání obsahu buněk, koagulace cytoplazmy a ztráta protonmotivní síly (Burt, 2004).

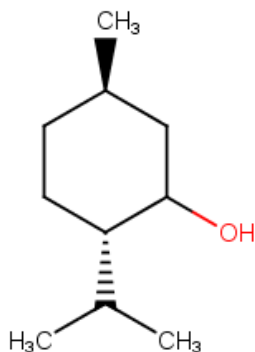
3.5.5 Isoprenoidy

Isoprenoidy jsou látky přírodního charakteru, které se vyskytují v rostlinných i živočišných organismech. Jejich základní strukturu tvoří isopren. Čistý isopren se v přírodě nevyskytuje, najdeme ho zde pouze ve formě isopentenylového zbytku ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}$). Isoprenoidy často obsahují deriváty (-OH, aldehydy, ketoskupiny, atd.) a dělí se na terpeny a steroidy.

3.5.5.1 Terpeny a terpenoidy

Terpeny tvoří izoprenová struktura, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$. Vyskytují se také jako diterpeny, triterpeny atd., stejně jako hemiterpeny a seskviterpeny. Pokud sloučeniny obsahují další prvky navíc (obvykle heterogenní molekula kyslíku), nazývají se terpenoidy a jsou to například kafr, farnesol a artemisin (sesquiterpenoidy).

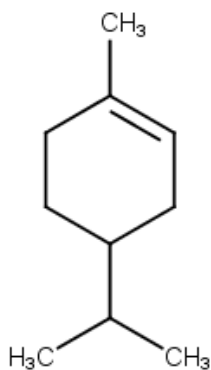
Terpeny a terpenoidy se v přírodě vyskytují převážně v rostlinných silicích a pryskyřicích. Potlačují růst bakterií, virů, prvoků a hub, a ačkoli mechanismus jejich inhibičního působení není zcela objasněn, předpokládá se, že narušují cytoplazmatickou membránu bakterií a plísní (Cowan, 1999). Triterpenoid betulinic inhibuje dokonce i virus HIV. Jejich toxicita na mikroorganismy je založena na lipofilních vlastnostech terpenů. Jde o vazbu na lipidy bakteriální membrány, narušení iontové rovnováhy a tím i o související poruchu funkce membránových proteinů a inhibici dýchání.



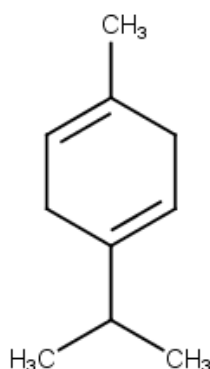
Obr. 10. Menthol

3.5.5.1.1 Terpineny

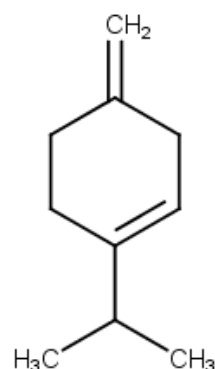
Terpineny jsou mononukleární terpeny. Jsou to tři izomery, které se vzájemně liší polohou dvojných vazeb. α -terpinen lze izolovat ze silic kardamonu, majoránky, γ -terpinen se nachází v silicích tymiánu, oregana a jiných přírodních zdrojích. β -terpinen byl vytvořen uměle a nemá žádný přírodní zdroj. α -terpinen vykazoval antimikrobiální účinnost při testech, které prováděli Dorman a Deans (2000). Zde byl schopen inhibovat růst 11 z 25 použitých mikroorganismů.



Obr. 11. α -terpinen



Obr. 12. γ -terpinen



Obr. 13. β -terpinen

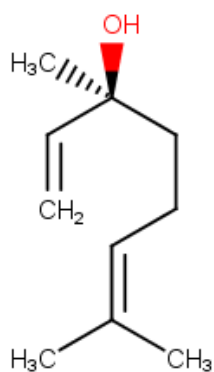
3.5.5.1.2 Linalool

Linalool je acyklický monoterpenoidní alkohol. Díky své výrazné vůni je linalool často používán v parfémtech a díky jeho alkalické stabilitě může být používán také v detergentech a mýdlech (Surburg et al., 2006). Linalool se v přírodě vyskytuje ve dvou formách – (S)-(+)-linalool a (R)-(-)-linalool, přičemž se tyto formy liší svým výskytem a svou vůní. (R)-(-)-linalool je obsažen například v levanduli lékařské (*Lavandula angustifolia*), bergamonu (*Citrus aurantium Bergamia*), tymiánu obecný (*Thymus vulgaris*) a bazalce pravé (*Ocimum basilicum*). Naproti tomu (S)-(+)-linalool je mimo jiné hlavní složkou esenciálního oleje koriandru setého (*Coriandrum sativum*) a pomerančovníku čínského (*Citrus sinensis*) (Rahman, 2003). Linalool je v Evropě v seznamu látek, které mohou být použity v potravinářství.

V jedné studii dokázal linalool potlačit růst u 23 mikroorganismů z 25. (Dorman, Deans, 2000). Esenciální olej z rostliny koriandru setého byl podroben sérii testů na vyhodnocení účinnosti tohoto oleje. Bylo zjištěno, že použití tohoto oleje pro potlačení růstu *Listeria monocytogenes* na vakuově balené šunce není vhodné, protože dochází ke snížení účinnosti tohoto oleje, (Gill et al., 2002) avšak na povrchu vařeného vepřového masa při

koncentraci $1250 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ byl koriandrový olej schopen výrazně potlačit růst psychrotrofní patogenní bakterie *Aeromonas hydrophila* (Burt, 2004).

Suppakul et al. (2008) se ve své studii jako první zaměřují na testování antimikrobiálních vlastností linaloolu a methyl chavicolu inkorporovaných na matrici polymeru. Po sledování inhibice růstu vybraných mikroorganismů osídlujících potraviny bylo prokázáno, že obě látky vykazovaly antimikrobiální aktivitu proti různým mikroorganismům. Dále zde byly zkoumány antimikrobiální vlastnosti kompozit linaloolu s methylchavicolem na sýru Cheddar, který byl naočkován bakteriemi *Escherichia coli* a *Listeria innocua* a následně zabalen do fólie s linaloolem a methylchavicolem a uložen do chladničky při $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a při $+12\text{ }^{\circ}\text{C}$. Byly zde sledovány počty mezofilních aerobních bakterií, koliformních bakterií, kvasinek, plísní a naočkovaných bakterií. Výsledky prokázaly inhibiční efekt těchto kompozit na růst mikroorganismů přirozeně kontaminujících sýr, i na růst *Escherichia coli* a *Listerie innocua*. Účinek inhibičního efektu u mikroorganismů byl však výrazně závislý na teplotě. LDPE (Low-density polyethylene – nízkohustotní polyethylen) s inkorporovaným linaloolem vykazoval nižší účinnost než LDPE obsahující methylchavicolem. Po uplynutí šesti týdnů bylo také provedeno senzorní hodnocení zkoumaného sýra pomocí trojúhelníkové metody kvůli možnému ovlivnění jeho organoleptických vlastností. Bylo prokázáno, že linalool ani methylchavicol nepředstavují v tomto směru žádné riziko, z čehož vyplývá, že tato kompozita mohou být použita do antimikrobiálních obalových systémů (Suppakul et al., 2008).



Obr. 14. Linalool

3.5.5.2 Rostlinné fytoncidy – silice

Fytoncidy jsou významnou součástí esenciálních olejů. Většina těchto látek je senzorně výrazná. Některé jsou dosti těkavé (např.: silice, éterické oleje), ale najdeme mezi nimi i látky

poměrně stabilní (Kyzlink, 1988). Z rostlinných materiálů jsou extrahovány především destilací s vodní parou, dále pak lisováním nebo fermentací.

Silice jsou tvořeny převážně monoterpenickými uhlovodíky, terpeny, aldehydy, ketony, alkoholy, kyselinami, estery nebo seskviterpeny. Některé pak obsahují i fenylypropanoidy. Jsou to prchavé lipofilní látky. Většina z nich má intenzivní vůni, kterou zpravidla podmiňují terpenické složky. Obvykle jsou silice bezbarvé, některé však mají přirozené zbarvení (např.: žlutou barvu má silice hřebíčková (*Oleum caryophylli*), zelenkavé až modravé jsou silice, které obsahují azuleny, což je třeba silice heřmánková (*Oleum chamomillae*). Většina je kapalná, ale například silice růžová (*Oleum rosae*) nebo anýzová (*Oleum anisi*) částečně tuhne. Jsou špatně rozpustné ve vodě, ale dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech.

Vyskytují se v určitých rostlinných pletivech, které v případě jehličnatých stromů prostupují celou rostlinou, nebo se koncentrují pouze v určitých rostlinných orgánech. Nejčastěji jsou silice izolovány z rostlinných materiálů destilací s vodní parou. Dalšími metodami jsou například extrakce těkavými rozpouštědly nebo lisování.

Využívají se nejčastěji ve farmacii, v kosmetickém a v potravinářském průmyslu. Silice a jejich složky jsou stále studovány pro svou antifungální, antioxidační a antibakteriální aktivitu, ve které vykazují nejlepší výsledky silice obsahující především carvacrol, cineol, eugenol a thymol. U některých složek silic byla objevena také antihelmintická a antivirová aktivita. (Opletal, Šimerda, 2005).

Nejnámější antimikrobiálně působící silice jsou allicin v česneku, eugenol v hřebíčku, cinnamaldehyd a eugenol ve skořici, karvakrol a thymol v oreganu i tymiánu a vanilin ve vanilkových luscích (Valero, Salmerón, 2003)

3.5.5.2.1 Allicin

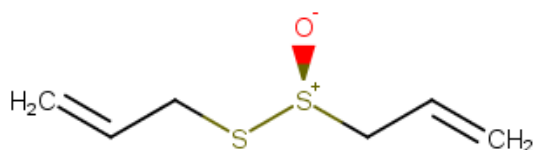
V česneku je v koncentraci do 1,8 % obsažena látka zvaná allin. Při mechanickém poškození česnekového stroužku přijde enzym alliinasa do kontaktu s cytosolickým allinem, načež se vytvoří mimo jiné nestabilní sulfid allicin. Allicin se rozkládá enzymaticky nebo termicky na těkavé látky jako diallydisulfid, diallytrisulfid, metylallydisulfid a metylallyltrisulfid. Allicin působí na mnohé patogenní i hnilobné mikroorganismy (např. *Bacillus subtilis*, *Salmonella paratyphi*) (Kyzlink, 1988).

Při pokusech vykazovaly zřetelnou antimikrobiální aktivitu všechny esenciální olejové extrakty rostlin rodu *Allium* (česnek, cibule). Byly použity různé koncentrace jednotlivých extraktů (50, 100, 200, 300 a 500 ml.l⁻¹) z tří typů cibulí (pór, žlutá a červená) a česneku proti bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Salmonella enteritidis* a třem plísním *Aspergillus niger*,

Penicillium cyclopiuma *Fusarium oxysporum*. Nejméně citlivá na dané extrakty byla plíseň *Fusarium oxysporum*, kdežto *Aspergillus niger* a *Penicillium cyclopium* byly i při nízkých koncentracích významně potlačeny. Nevyšší inhibiční účinnost při všech použitých koncentracích projevil česnek (Benkeblia, 2004).

V další studii byly zkoumány účinky ekvivalentních koncentrací čerstvého česneku, česnekového prášku a česnekového oleje proti oxidaci tuků a mikrobiálnímu růstu na syrovém kuřecím salámu během uskladnění při 3°C. Počáteční počet aerobních buněk podstatně snížil přídavek čerstvého česneku (30 g.kg⁻¹) nebo prášku (9 g.kg⁻¹), čímž došlo k prodloužení skladovatelnosti o několik dnů. Naopak přídavek česnekového oleje neměl na počty buněk ve srovnání s kontrolním vzorkem žádný zásadní vliv (Sallam et al., 2004)

Dále byly prokázány anti-listeriózní účinky česnekové šťávy v různých koncentracích (1, 2,5 a 5 %). 5% česneková šťáva výrazně snížila počet bakteriálních buněk ve srovnání s počátečním množstvím. Díky skenovací elektronové mikroskopii bylo u buněk *Listeria monocytogenes* pozorováno nabobtnání, částečně deformovaný tvar i vznik pórů (Kim et al., 2007).



Obr. 15. Allicin

3.5.5.2.2 Karvakrol a Thymol

Karvakrol a thymol tvoří základní esenciální oleje tymiánu a oregana. Obě sloučeniny jsou známé především pro svou schopnost činit cytoplazmatickou membránu zcela permeabilní pro ATP tím, že dezintegrují buněčné membrány gram-negativních bakterií uvolněním lipopolysacharidů. Studie provedená s bakterií *Bacillus cereus* ukázala, že se karvakrol interaguje s buněčnou membránou, kde se rozpustí ve fosfolipidové dvojvrstvě a je přijatý mezi řetězce mastných kyselin (Burt, 2004).

Další studie na bakterii *Bacillus cereus*, ukázala, že koncentrace 15 µl karvakrolu nebo 30 µl tymolu na 100 ml mrkvového bujónu úplně potlačila bakteriální růst po více než 60 dnů při 16°C (Valero, Giner, 2006).

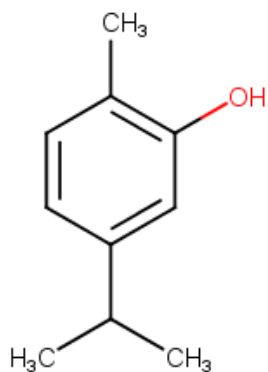
Přírodní antimikrobiální směs karvakrolu byla podrobena také testům týkajících se nejen jeho účinku na růst bakterií *Bacillus cereus*, ale i na jejich produkci toxinu. Kromě toho, že karvakrol při koncentraci 0,06 mg.ml⁻¹ snižoval počet životaschopných buněk, došlo i ke

snížení produkce toxinu o 80 %. Teoreticky tedy může být karvakrol přidáván do potravinářských výrobků pod hodnotou minimální inhibiční koncentrace, čímž se snižuje riziko produkce toxinu *Bacillus cereus* (Ultee, Smid, 2001).

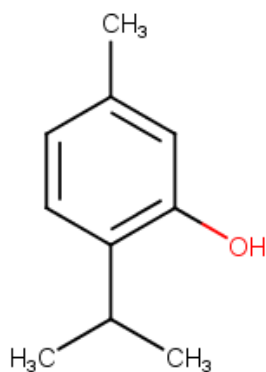
Bohužel, přes evidentní antimikrobiální působení při těchto koncentracích dochází k nepříznivému ovlivnění vůně a chuti. Avšak při nízkých koncentracích není chuť ani vůně výrobku tolik ovlivněna, tudíž by mohla být vytvořena přijatelná kombinace snížením přidávaného množství karvakrolu a spojením s překážkovou technologií (Valero, Giner, 2006; Ultee, Smid, 2001).

V několika dalších studiích byly esenciální oleje aplikovány na různé typy potravin. Tymiánový olej ve směsi s krájeným vepřovým masem při koncentraci $0,8 \mu\text{l.g}^{-1}$ oleje slabě potlačil růst *Listeria monocytogenes*. Při použití tymiánového oleje v mycí vodě (koncentrace $0,1-10 \text{ ml.l}^{-1}$) u salátu byl zaznamenán slabý až střední antimikrobiální účinek na bakterie *Escherichia coli* (Burt, 2004). Olej z oregana byl zase aplikován v kombinaci s modifikovanou atmosférou v koncentraci $8 \mu\text{l.g}^{-1}$ na plátky z hovězího masa. Zde byl pozorován výrazný inhibiční účinek na přírodní mikroflóru i na bakterie *Listeria monocytogenes* (Koutsoumanis et al., 1999). V koncentraci $0,5-10 \mu\text{l.g}^{-1}$ byl pak účinek oleje slabší. A zcela neúčinný byl olej z oregána na spory *Clostridium botulinum* naočkované do vakuově baleného krájeného vepřového masa (Burt, 2004). Na druhou stranu při inokulaci salátu z tresčích jiker bakteriemi *Salmonella enteritidis*, došlo při použití oleje z oregana ($5-20 \mu\text{l.g}^{-1}$) k výraznému snížení počtu buněk při všech použitých hodnotách pH i teplotě uskladnění (Koutsoumanis et al., 1999). Růst bakterií byl snížen rovněž při aplikaci tohoto oleje na *Escherichia coli* přítomné v salátu z lilku (Burt, 2004).

Karvakrol v kombinaci s *p*-cymenem, který je základní složkou oleje z tymiánu, oregána i kmínu, vykazoval synergické účinky proti bakterii *Bacillus cereus*. Při samostatném použití *p*-cymenu se antibakteriální účinky ztrácí. Zvýšení účinnosti při použití s karvakrolem pravděpodobně spočívá v začlenění *p*-cymenu do lipidových dvojvrstev, kde usnadní transport karvakrolu přes cytoplazmatickou membránu (Burt, 2004).



Obr. 16. Karvakrol

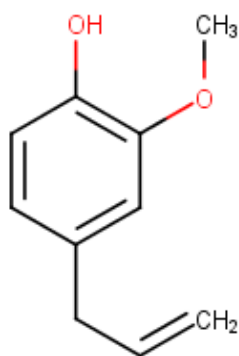


Obr. 17. Thymol

3.5.5.2.3 Eugenol

Eugenol je hlavní složkou hřebíčkové silice, kde tvoří cca 85 % obsahu. Dále se nachází v muškátovém oříšku, skořici a bobkovém listu. V jedné studii byla u 14 druhů koření zkoumána antimikrobiální aktivita pomocí jejich surových etanolových extraktů a esenciálních olejů pro potlačení bakterií rodu *Salmonella* v potravinách. Nejvíce účinný na potlačení růstu daných bakterií byl mezi ostatními etanolovými extrakty výtažek z hřebíčku. Účinnost esenciálních olejů z koření byla všeobecně vyšší v porovnání s odpovídajícími etanolovými výtažky. Nanasombat a Lohasupthawee (2005) shrnuli antibakteriální účinnost jednotlivých esenciálních olejů jednotlivých druhů koření následně: hřebíček > kůra citroníku > kmín > kardamon > koriandr > muškátový oříšek > muškátový květ > zázvor > česnek > bazalka > citroník.

V další studii byl hřebíčkový olej použit k ošetření masa a sýru v koncentraci 0,5 a 1 % při teplotě 30°C a 7°C. Při 1% koncentraci hřebíčkového oleje pak byla zaznamenána poměrně výrazná inhibiční aktivita proti *Listeria monocytogenes* (Menon, Garg, 2001). Dále pak prokázaly důrazný inhibiční účinek na dvě psychotrofní patogenní bakterie *Listeria monocytogenes* a *Aeromonas hydrophila*, na pečeném hovězím mase i na kouscích vařených kuřecích prsou alkoholové extrakty z hřebíčku (eugenol) a nového koření (Hao et al., 1998).

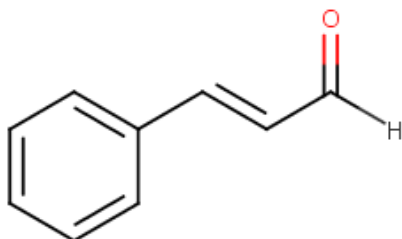


Obr. 18. Eugenol

3.5.5.2.4 Cinnamaldehyd

Ze skořicového oleje se Cinnamaldehyd extrahuje destilací s vodní parou. Nachází se v kůře stromů rodu *Cinnamomum*, tedy skořicovníku. Juneja a Friedman (2007) provedli studii, ve které hodnotili účinek karvakrolu, aldehydu skořicového a thymolu na vařeném mletém hovězím a kuřecím mase, které nebylo chlazeno vhodným způsobem. Spory *Clostridiumperfringens* sloužily jako testovaný mikroorganismus. I při nejnižší koncentraci 0,5 % byl skořicový aldehyd výrazně účinnější než ostatní. Na testech provedených in vitro se ukázalo, že buňky *Listeria monocytogenes* byly odolnější vůči účinkům cinnamaldehydu, než buňky *Escherichia coli*, nicméně jeho účinek byl znát na obou typech buněk (Gill, Holley, 2006).

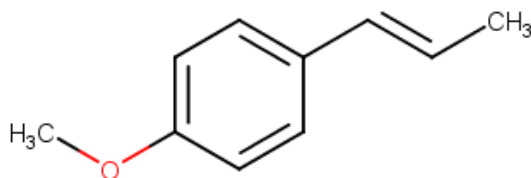
Při povrchovém ošetření vařených krevet směsí olejů z tymiánu a skořice byly znát inhibiční účinky na *Pseudomonas putida*, avšak použití těchto olejů mělo negativní vliv na organoleptické vlastnosti. U kyseliny skořicové se zase projevíly účinky na přirozenou mikroflóru krájeného kiwi a sladkého melounu. Bez nepříznivých sensorických důsledků zde došlo ke zpomalení kažení (Roller, Seeshar, 2002).



Obr. 19. Cinnamaldehyd

3.5.5.2.5 Trans-anethol

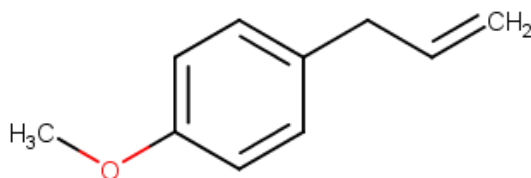
Trans-anethol je nenasycený ether, který se nejčastěji vyskytuje v esenciálních olejích anýzu, badyánu, fenyklu a estragonu. Tato kapalina je bezbarvá, případně se slabě žlutým nádechem. Trans-anethol je dobře rozpustný v etheru a chloroformu, ale ve vodě se téměř nedá rozpustit. Tato látka má silné antimikrobiální vlastnosti proti bakteriím, kvasinkám a plísním. Je přibližně 13x sladší než cukr a jeho sladká chuť je vnímána jako příjemná i ve vyšších koncentracích. Je uznán jako bezpečná látka, která se běžně využívá v potravinářském průmyslu do pekařských a cukrářských výrobků a alkoholických i nealkoholických nápojů. Kvůli své charakteristické vůni po anýzu jsou tyto výrobky poměrně oblíbené (Ashurst, 1999).



Obr. 20. Trans-anethol

3.5.5.2.6 Estragol

Estragolu nebo též methylchavicol. Je to bezbarvá aromatická kapalina ze skupiny etherů, která se vyskytuje v esenciálních olejích estragonu a několika dalších koření (např.: fenykl, bazalka, anýz, majoránka nebo badyán). Estragol je rozpustný ve vodě, ethanolu a chloroformu. Estragol byl uznán jako bezpečná látka a esenciální oleje obsahující estragol jsou široce používány v potravinářství jako aromatické látky. Estragol se používá také v kosmetickém průmyslu v parfémeh a mýdlech (De Vincenzi et al., 2000).



Obr. 21. Estragol

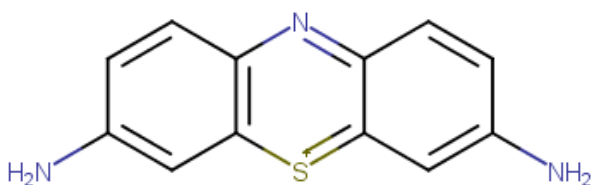
3.5.6 Aromatické sloučeniny

Aromatické sloučeniny jsou nenasycené uhlovodíky, obsahující jedno nebo více benzenových jader se speciální cyklickou nenasycenou strukturou, s plně delokalizovaným systémem π -vazeb. Dělí se na benzen a jeho deriváty (alkyl-, alkenyl-) a na vícejaderné uhlovodíky (např. naftalen, antracen, fenanthren).

3.5.7 Peptidy a proteiny

Peptidy, které mají inhibiční účinky na mikroorganismy, byly poprvé zaznamenány v roce 1942. Jsou často pozitivně nabitě a obsahují disulfidové vazby (Zhang et al. 1997). Jejich mechanismem účinku, může být tvorba iontových kanálů v mikrobiálních membránách (Terras et al., 1993) nebo kompetitivní inhibice adheze mikrobiálních proteinů (Zhang, et al., 1997).

Thioniny jsou peptidy obvykle se vyskytující v ječmeni a pšenici. Skládají se z 47 aminokyselinových zbytků. Jsou toxické pro kvasinky a gram-negativní a gram-pozitivní bakterie (Mendez et al., 1990). Thionins AX1, AX2 z cukrové řepy jsou účinné proti houbám, ale ne proti bakteriím. Fabatin, nově identifikovaný 47. zbytek peptidu z fazolí, se zdá být strukturálně související s γ -thioninem ze zrn a inhibuje *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus hiraea*, ale ne *Candida* nebo *Saccharomyces* (Zhang, et al. 1997).



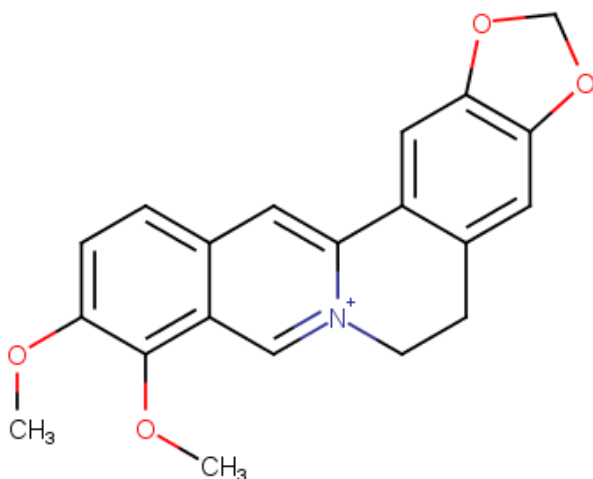
Obr. 22. Thionin

3.5.8 Alkaloidy

Alkaloidy se řadí do aromatických planárních kvartérních alkaloidů. Jsou to heterocyklické organické dusíkaté sloučeniny, které jsou díky svým farmakologickým účinkům hojně využívané v medicíně. Jako nejznámější z alkaloidů můžeme uvést morfin, který byl v 19. století izolovaný z máku *Papaver somniferum* (Cowan 1999). Dále pak jsou to například glykoalkaloid solamargin, který je používán u HIV infekce, či diterpenoidní alkaloidy pocházející z pryskyřníku a vykazující antibakteriální aktivitu. Dalším důležitým

představitelem skupiny alkaloidů je berberin, který má schopnosti vmezeřovat se do bakteriální DNA a také má potenciální účinky proti trypanozomám a plasmodiím.

Většina alkaloidů jsou bezbarvé pevné látky, bez zápachu, které jsou špatně rozpustné ve vodě, avšak dobře v etanolu chloroformu, éteru a ve směsi chloroformu s éterem (Cowan, 1999). V rostlinách jsou alkaloidy vázány jako soli organických kyselin (kyselina šťavelová, octová, mléčná, jablečná, vinná apod.).



Obr. 23. Berberin

3.6 Charakteristika vybraných konvenčních konzervantů v potravinářství

3.6.1 Kyselina sorbová – E200

Jedná se o jedno z nejpoužívanějších konzervačních činidel, která zabraňují růstu plísní, kvasinek a některých bakterií (Vrbová, 2001). Vyrábí se synteticky přidáním hydroxidu sodného do kyseliny mléčné nebo pomocí bakteriální fermentace škrobů nebo melasy.

Běžněji než samotná kyselina jsou díky vyšší rozpustnosti ve vodě a snadnější manipulaci používány její draselné, vápenaté a sodné soli (tzv.: sorbáty) (Cauvain, 2003). Najdeme ji například v čerstvých sýrech, mléčných a masných výrobcích, v dochucovadlech jako jsou zálivky na saláty, majonéza, kečup, hořčice a další dressingy, ve šťávách a sirupech, v sušeném ovoci nebo sterilizované zelenině atd. Používá se v koncentračním rozmezí 0,05-0,2 %. Její optimální pH je 5,5 až 6,5, ale i tak je poměrně nestabilní, proto závisí na pH potraviny. Použití kyseliny sorbové je zakázáno v salátech typu: pařížský salát, rybí salát a dalších. Dále pak v pečivu, protože by mohla maskovat přítomnost mikroorganismů způsobujících otravy z jídla (Vrbová, 2001).

Kyselina sorbová a její soli se v těle dobře metabolizují. Pokud je tělo normálně okysličováno, pak je poločas vstřebávání kyseliny sorbové v těle 40-110 min (Cauvain, 2003). V ČR je látka povolena pro omezené druhy potravin.

3.6.2 Sorban draselný – E202

Sorban draselný je draselná sůl kyseliny sorbové, která je dobře rozpustná ve vodě. Tento bílý krystalický prášek zpomaluje růst plísní a kvasinek. Používá se například při výrobě sirupů, nealkoholických nápojů, sýrů nebo pečiva. Pro potravinářské účely se vyrábí syntetickou cestou, přidáním hydroxidu draselného do kyseliny sorbové. Látka je ve většině případů bez nežádoucích účinků, ojediněle se však může vyskytnout alergická reakce, která se projevuje například podrážděním kůže či očí. V ČR je použití látky regulováno zákonem. (Vrbová, 2001)

3.6.3 Nisin – E234

Nisin je polypeptid, který má velmi nízkou molekulární hmotnost. Vyskytuje se ve formě krystalků. Je to konzervační látka vyráběná bakterií *Lactococcus lactis*. Používá se jako konzervační činidlo v sýrech a mléčných výrobcích, kde působí proti některým patogenním bakteriím. Bakterie vyrábějící nisin se používají při fermentačních procesech v mlékárenském průmyslu a samotný nisin se přirozeně nachází v některých fermentovaných mléčných výrobcích. Nejsou známy žádné nežádoucí účinky nisinu a látka má status GRAS (generally recognized as safe - tzn. že je látka považována za bezpečnou). Přijatelná denní dávka je 0 - 0,25 mg.kg⁻¹ tělesné hmotnosti. V České republice se v minulosti nisin jako přídatná látka nesměl používat, nyní ji však lze použít při výrobě pudinků a sýrů. (Vrbová, 2001).

3.6.4 Kyselina octová – E260

Tato karboxylová kyselina se běžně vyskytuje v přírodě například v jablkách, sýrech, kakau, vinných hroznech, odstředěném mléku, pomerančích, broskvích nebo jahodách. Je to viskózní, bezbarvá a ve vodě rozpustná kapalina ostrého zápachu. Pro potravinářské účely se vyrábí z lihu, ovocných vín či moštů. Využívá se především jako tradiční prostředek k okyselování a dochucování různých pokrmů. Vykazuje silné antimikrobiální účinky a přidává se do potravin jako konzervant k zamezení růstu bakterií a kvasinek. Díky svým vlastnostem se také používá jako rozpouštědlo (hlavně barviv) a upravuje pH (Vrbová 2001).

S klesajícím pH její účinnost roste. Koncentrace kyseliny octové vyšší než 4 – 6% působí zhoubně na mnoho druhů bakterií. Spory plísní však snášejí i 6% koncentraci octa velmi dlouho. Koncentraci kyseliny octové v potravinách však není možné libovolně zvyšovat, neboť obsah kyseliny má velký vliv na chuť potravin. Běžně se používají koncentrace od 1,5-3 % kyseliny octové, výjimečně pak 5% (Kyzlink, 1980). Kyselina octová má při výrobě potravin dlouhou tradici a je přirozenou složkou lidské potravy. Ve vyšších koncentracích může způsobovat poškození sliznic zažívacího ústrojí, které vede až ke krvácení a tvorbě vředů. I při 5% koncentraci může svědit či dráždit pokožku. (Vrbová 2001).

3.6.5 Kyselina mléčná – E270

Kyselina mléčná se vyskytuje v mase. Je to snadno rozpustná bezbarvá tekutina bez zápachu a s nakyslou chutí, často sirupovité konzistence. Používá se jako okyselující a ochucující látka, která zvýrazňuje chuť, zesiluje účinnost antioxidantů, ovlivňuje hodnotu pH a může být využita jako rozpouštědlo. Vytváří bezbarvé krystaly. Vzniká v těle z glykogenu ve svalech a vyplavuje se do krve. Účinkuje rovněž jako antimikrobiální látka a nosič. Používá se například v nealkoholických nápojích, kterým dodává příjemnou kyselou chuť, dále pak v cukrovinkách, olivách, margarínech, sušených vaječných bílcích, v některých druzích pečiva, mražených dezertech, máslech, džemech, kojeneckých výživách aj.. Přirozeně konzervuje potraviny jako kysané zelí, okurky, jogurty, smetana nebo sýry, ve kterých udržuje rovnováhu kyselosti již při jejich výrobě. Kyselina mléčná se vyskytuje ve dvou formách: D (negativní) a L (pozitivní). Obě tyto formy se přirozeně vyskytují v kvašených potravinách. D-forma způsobovala u kojenců překyselení, snížení váhy, dehydrataci, průjem a zvracení, avšak L-forma tyto nežádoucí účinky nevyvolává. U pokusných křečků způsobovalo pravidelné podávání vyšších dávek kyseliny mléčné odvápnování zubní skloviny. Jiné nežádoucí účinky nejsou známy, a jelikož se přirozeně vyskytuje ve všech živých organismech, je kyselina mléčná považována za bezpečnou látku (Vrbová, 2001).

3.6.6 Mléčnan sodný – E325

Mléčnan sodný je zvlhčující látka, která se používá pro zvýraznění chuti, úpravu pH a také jako emulgátor. Díky své schopnosti vázat a zadržovat vodu se užívá například u pečiva nebo v masném průmyslu. Dále pak při výrobě sýrů, zavařenin, zmrzlin, sušenek, bonbónů a dalších. E325 také zvyšuje účinky antioxidantů. Stejně jako kyselina mléčná i mléčnan sodný se vyskytuje ve variantě D (negativní) nebo L (pozitivní). D forma může u malých dětí způsobovat překyselení organismu, zvracení a průjemy, jiné nežádoucí účinky však nejsou

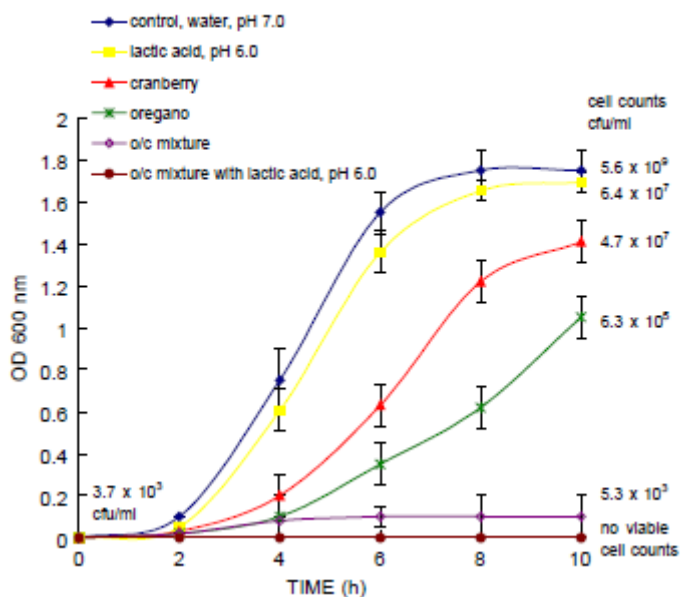
známy, protože se látka považuje za GRAS. V ČR je E325 povolen (v nezbytném množství) téměř ve všech potravinách. Výjimkou jsou například dětské příkrmy. (Vrbová, 2001)

3.7 Kombinace konvenčních a přírodních rostlinných konzervantů

3.7.1 Synergie oregana a klikvy velkoplodé s kyselinou mléčnou (E270) a mléčnanem sodným (E325)

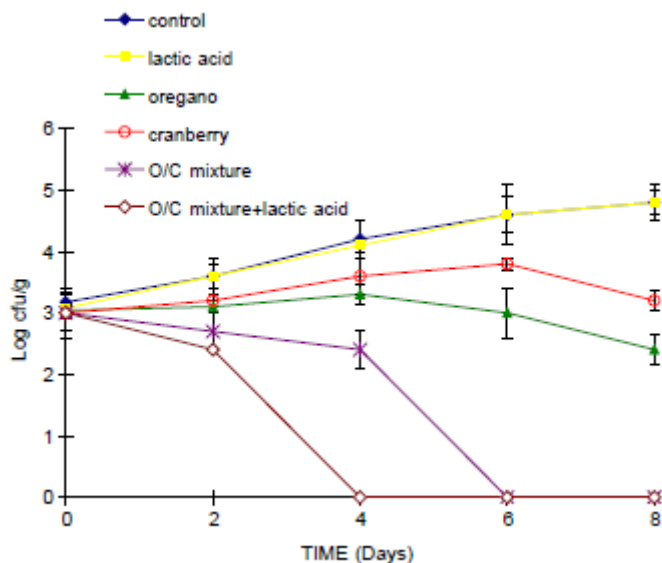
V roce 2005 se poprvé objevila studie, kde byla zkoumána antimikrobiální synergie mezi kyselinou mléčnou, extraktem z oregana (*Origanum vulgare*) a klikvou velkoplodou (*Vaccinium macrocarpon*) (Lin et al., 2005). Kyselina mléčná je známá jako konzervant E 270. Oregano a klikva jsou rostliny považované za GRAS (Generally Recognized as Safe) neboli všeobecně považované za bezpečné a používají se nejen pro ochucení potravin, ale někdy také jako potenciální funkční složky, které jsou známé svou antimikrobiální činností související s fenolovými skupinami. V této studii byla zkoumána jejich antimikrobiální aktivita na inhibici *Vibrio parahaemolyticus*, což je potenciaálně patogenní bakterie, která se často vyskytuje u ústí řek, poblíž moře a u živočichů, kteří toto prostředí obývají. Tato bakterie způsobuje gastroenteritidu a člověk se může nakazit konzumací kontaminovaných výrobků z ryb nebo mořských plodů (Bartošová, Hanulíková, 2014). Výzkum byl proveden na filetech z tresky a na krevetách.

Nejprve byl vliv oregana, klikvy a E270 na inhibici *Vibrio parahaemolyticus* zkoumán v TSB (Tryptic Soy Broth). Samotná kyselina mléčná neměla na bakterii téměř žádný vliv, extrakt z Oregana účinně snížil počty *Vibrio parahaemolyticus* a extrakt z klikvy měl o něco nižší, avšak ne nevýznamný vliv. Data ukázala, že antimikrobiální účinek extraktu z oregana může být ještě zvýšen přidáním klikvového extraktu (při přidání na rovnocenné fenolové bázi - 0,01 mg.ml⁻¹ fenolů, hmotnost 1:1). Antimikrobiální účinek této směsi se ještě významně zvýší v přítomnosti kyseliny mléčné (obrázek 24). Při použití E270 k úpravě pH na 6,0 byly životaschopné buňky bakterie téměř inhibovány.



Obr. 24. Inhibice *Vibrio parahaemolyticus* oreganem, klikvou a E270. Celková fenolová koncentrace byla 0,01 mg.ml⁻¹ (Lin et al., 2005).

Stejné studie byly také provedeny při koncentraci 0,1 mg.ml⁻¹ fenolů (hmotnost 1:1). Ukázalo se, že počet životaschopných buněk bakterie byl ještě nižší. Tyto studie zřetelně ukazují, že oregano-klikvová směs (při obsahu fenolických látek v množství 0,1 mg.ml⁻¹, koncentraci 1:1), v kombinaci s kyselinou mléčnou (pH 6,0), úplně inhibovala *Vibrio parahaemolyticus*. Stejně testy pak byly provedeny přímo na filetech z tresky a na krevetách, které byly inkubovány po dobu 8 dnů při teplotě 4°C. Výsledky byly obdobné jako u TSB. Samotné extrakty z klikvy nebo oregana snížily počet bakterií, jejich směs (0,1 mg.ml⁻¹, o koncentraci 1:1) pak byla výrazněji účinnější a při kombinaci s kyselinou mléčnou (pH 6,0) se už po čtyřech dnech podařilo bakterii inhibovat (viz obrázek 25).



Obr. 25. Synergický účinek směsi oregana a klikvy na inhibici *Vibrio parahaemolyticus* na rybách. Rybí řezy byly inkubovány při teplotě 4°C po 8 dnů. Celková fenolová koncentrace byla 0,1 mg / ml. Hodnota pH rybích plátek po použití kyseliny mléčné byla 6,0. O / C = oregano-klikvová směs 1:1. Kontrolou byly rybí plátky, ve kterých byly antibakteriální látky nahrazeny stejným objemem vody (Lin et al., 2005).

Buňky vystavené fenolickým látkám byly prokazatelně citlivější na nízké pH, ačkoliv existují studie naznačující, že *Vibrio parahaemolyticus* je dokonce více acidotolerantní než většina potravinových patogenů (Sorrells et al., 1989). Poškození buněčné membrány by mohlo vysvětlit pozorované efekty, jelikož fenoly mohou způsobovat buněčným membránám subletální poškození (tzn.: způsobují narušení protonmotivní síly (PMF)) (Shetty a Labbe, 1998).

Výsledky tedy ukázaly, že antimikrobiální aktivita směsi oregana a klikvového extraktu byla v inhibici *Vibrio parahaemolyticus* lepší než jednotlivé extrakty při stejné koncentraci. Ideální antimikrobiální aktivita směsi rostlinných extraktů proti *Vibrio parahaemolyticus* byla pozorována u směsi 50% (*Origanum vulgare*) a 50% (*Vaccinium macrocarpon*) při kombinaci s kyselinou mléčnou (pH 6,0).

Další studie zkoumala vliv oregano-klikvové směsi v kombinaci s mléčnanem sodným na *Listeria monocytogenes*. Výsledky ukázaly, že kombinace extraktů z oregana a klikvy v poměru 1:1 s 2 % mléčnanu sodného měla nejlepší inhibiční účinek u testovaného kmene. Studie byly prováděny s oregano-klikvovou směsí (1:1) v přítomnosti a nepřítomnosti E325 při teplotě 37 °C a 4 °C. Inhibice byla monitorována po dobu 72 hodin. Ukázalo se, že sama

oregano-klikvová směs měla inhibiční účinek, avšak přidáním 2% mléčnanu sodného se inhibice *Listeria monocytogenes* ještě zvýšila. V zájmu rozšíření hodnocení na delší dobu bylo sníženo množství laktátu sodného z 2% na 1% při zachování hodnoty pH 5,5. I za těchto podmínek byl pozorován poměrně výrazný inhibiční účinek. Již dříve bylo zjištěno, že antimikrobiální účinek mléčnanu je výraznější při nižších hodnotách pH, protože za těchto podmínek je mléčnan přítomen v méně disociované podobě. Nejvýraznější byla inhibice *Listeria monocytogenes* při pH 6 a při teplotě 4 °C za přítomnosti 2% mléčnanu sodného a oregano-klikvové směsi v poměru 1:1 při koncentraci 750 ppm (Apostolidis, 2008).

3.7.2 Antimikrobiální a synergické účinky nisinu (E234) a chitosanu s rostlinnými látkami

Saei-Dehkordi et al. (2012) testovali antimikrobiální a antioxidační aktivitu esenciálního oleje z *Echinophora platyloba* v kombinaci s chitosanem, nisinem, monolaurinem a amfotericinem B. Antimikrobiální aktivita byla testována na *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Rhodotorula rubra* a *Rhodotorula mucilaginosa*. Nejhojnějšími sloučeninami obsaženými v esenciálním oleji z *Echinophora platyloba* byly thymol (27,19%), trans-ocimene (20,89%), karvakrol (7,22%), (E)-sesli-lavandulol (5,59%), limonen (4,46%) a geraniol (3%).

Sám olej z *Echinophora platyloba* vykazoval antioxidační aktivitu. Tato aktivita byla hodnocena za použití bělicích testů β -karotenu. Antioxidační složky v esenciálních olejích zbrzdí rozsah bělení β -karotenu. Tento postup vede k udržování β -karotenových molekul v prostředí za účelem neutralizace volných radikálů, které jsou škodlivé pro uchování a zpracování potravin vzhledem k jejich oxidačním vlastnostem (Kulisic et al. 2004).

Výsledky studie ukázaly, že olej z *Echinophora platyloba* má účinnou antimikrobiální aktivitu proti mikroorganismům (Obrázek 26). Zdá se, že nejvíce citlivé mikroorganismy byly kvasinky, zejména *Rhodotorula mucilaginosa* a *Rhodotorula rubra*. V případě kvasinky *Candida albicans*, byla MIC (Minimal Inhibitory Concentration) podobná gram-pozitivním bakteriím. Nejmenší náchylnost na tento esenciální olej vykazovaly gram-negativní bakterie. Konkrétně nejméně náchylná byla bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Resistence gram-negativních bakterií může být vysvětlena jejich hydrofilní povahou nepropustné vnější membrány proti lipofilním sloučeninám, jako jsou esenciální oleje (Ozturk a Ercisli, 2006). Nicméně přítomnost 2 velkých fenolových složek, jako je thymol a karvakrol, které mají

oxidačně-redukční potenciál, by mohla být považována za velmi účinný faktor (co se antimikrobiálních vlastností oleje týče).

Jak je ukázáno na obrázku 26, gram-negativní bakterie byly odolné vůči nisinu a obdobně vůči monolaurinu. Gram-pozitivní bakterie naopak nebyly proti nisinu a monolaurinu odolné. Tyto výsledky jsou v souladu s předchozím studiem Branen a Davidson (2004). Podle El-Sharifa a Hussaina (2011), chitosan jako látka rozpustná v kyselině octové může inhibovat gram pozitivní a gram-negativní bakterie a také *Candida albicans*. Jejich studie ukázala, že je zapotřebí vyšší koncentrace chitosanu pro inhibici gram-negativních bakterií ve srovnání s koncentrací potřebnou pro inhibici gram-pozitivních bakterií (jako je *Staphylococcus aureus*) nebo *Candida albicans*. Bylo zjištěno, že chitosany s nižší molekulovou hmotností mají silnější antimikrobiální aktivitu než nativní chitosany. Potvrzují to studie prováděné na různých mikroorganismech, jako je například *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Bacillus subtilis*, a *Listeria monocytogenes* (Goy et al. 2009).

Table 3–Antimicrobial activity of *Echinophora platyloba* DC. essential oil, nisin, chitosan, and monolaurin used alone against the selected organisms.

Organism	Essential oil MIC ^a	Nisin MIC	Chitosan MIC	Monolaurin MIC	Amphotericin B MIC
Gram negative					
<i>Salmonella typhimurium</i>	896	>113.60	960	>496	NT ^b
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	896	>113.60	720	>496	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1344	>113.60	1440	>496	NT
Gram positive					
<i>Listeria monocytogenes</i>	336	7.20	720	24	NT
<i>Staphylococcus aureus</i>	448	28.40	360	32	NT
<i>Bacillus cereus</i>	672	43.20	1440	64	NT
<i>Bacillus subtilis</i>	672	56.80	960	48	NT
Yeast					
<i>Candida albicans</i>	448	NT	480	NT	1.80
<i>Candida tropicalis</i>	448	NT	720	NT	2.40
<i>Rhodotorula rubra</i>	336	NT	360	NT	1.20
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	224	NT	240	NT	0.90

^aMinimum inhibitory concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

^bNot tested.

Obr. 26. MIC (minimální inhibiční koncentrace) nisinu, chitosanu a dalších látek na mikroorganismy (Saei-Dehkordi et al., 2012); NT - netestováno

Synergismus oleje s nisinem a chitosanem proti gram-negativním bakteriím, je účinnější než proti gram-pozitivním bakteriím. Naopak, kombinace oleje s monolaurinem vykazovala mírně silnější synergismus v případě gram-pozitivních bakterií (obrázek 27).

Organism	Essential oil of <i>E. platyloba</i> DC. +						Chitosan +		
	Nisin		Chitosan		Monolaurin		Amphotericin B		
	FICI	Int. ^h	FICI	Int.	FICI	Int.	FICI	Int.	
Gram negative									
<i>Salmonella typhimurium</i>	<0.31	Syn. ⁱ	0.38	Syn.	<0.50	Syn.	NT	NT	
	<0.19	Syn.	0.38	Syn.					
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<0.38	Syn.	0.31	Syn.	<0.75	Add.	NT	NT	
	<0.31	Syn.	0.38	Syn.					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<0.31	Syn.	0.50	Syn.	<0.38	Syn.	NT	NT	
	<0.28	Syn.			<0.31	Syn.			
Gram positive									
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.50	Syn.	0.50	Syn.	0.50	Syn.	NT	NT	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.38	Syn.	0.50	Syn.	0.50	Syn.	NT	NT	
	0.38	Syn.							
<i>Bacillus cereus</i>	0.63	Add. ^j	0.50	Syn.	0.28	Syn.	NT	NT	
	0.56	Add.			0.31	Syn.			
<i>Bacillus subtilis</i>	0.50	Syn.	0.31	Syn.	0.31	Syn.	NT	NT	
			0.38	Syn.	0.31	Syn.			
Yeast									
<i>Candida albicans</i>	NT		0.50	Syn.	NT		0.28	Syn.	0.28
							0.25	Syn.	0.38
<i>Candida tropicalis</i>	NT		0.38	Syn.	NT		0.28	Syn.	0.31
							0.38	Syn.	0.38
<i>Rhodotomila nibra</i>	NT		0.75	Add.	NT		0.28	Syn.	0.31
			0.63	Add.			0.38	Syn.	0.31
<i>Rhodotomila mucilaginoso</i>	NT		0.63	Add.	NT		0.31	Syn.	0.31
			0.63	Add.			0.38	Syn.	0.31

Obr. 27. Shrnutí antimikrobiální interakce stanovené FIC indexy gram-pozitivních bakterií, gram-negativních bakterií, a kvasinek (Saei-Dehkordi et al., 2012); NT – netestováno, Syn. – synergie, Add. - aditiva

Používání antimikrobiálních kombinací, které mají synergické nebo aditivní účinky, může být strategické pro inhibici nebo kontrolu potravinových patogenů nebo organismů kazících potraviny. Tento koncept je v podstatě čerpán z výskytu rezistentních mikrobiálních kmenů, oproti konzervačním (antimikrobiálním) látkám jako je nisin (Singh et al., 2001). Ve skutečnosti může vést synergický jev mezi esenciálními oleji, potravinářskými aditivami a konzervačními látkami k použití nižšího množství esenciálního oleje a konzervačních prostředků. Nižší použité množství dvou antimikrobiálních látek ve vzájemné kombinaci přináší dvě výhody: (1.) nepřítomnost silného nežádoucího aromatického zápachu charakteristického při použití esenciálního oleje a snížení množství požadovaného potravinového konzervantu; a (2.), přístup k významnějším antimikrobiálním aktivitám (Kalemba a Kunicka 2003).

Synergický antimikrobiální jev mezi nisinem a složkou esenciálního oleje (jako je thymol a karvakrol) na *Bacillus cereus* byl (při nižších hodnotách pH a nízkém tepelném zpracování)

hlášen již dříve (Periago a Moezelaar 2001). V souladu s Ettayebiem et al. (2000), byl pozorován synergický efekt pro kombinaci thymolu a nisinu proti *Listeria monocytogenes* a *Bacillus subtilis*.

Dos Santos et al. (2012) testovali na stolních hroznech antimikrobiální aktivitu chitosanu v kombinaci s výtažkem z dobromysli obecné (*Origanum vulgare*) proti *Rhizopus stolonifer* a *Aspergillus niger*.

Studie hodnotila účinnost použití kombinace chitosanu (CHI) a esenciálního oleje z *Origanum vulgare* (OV) na inhibici *Rhizopus stolonifer* a *Aspergillus niger* na laboratorních médiích a na hroznech (*Vitis labrusca*) a její vliv na fyzikální, fyzikálně-chemické a senzorické vlastnosti plodů při skladování (25°C po dobu 12 dní a 12°C po 24 dní).

CHI a OV vykazovaly hodnoty MIC ve výši 10 mg.ml⁻¹ a 10 ml / µl, respektive, jak proti *Rhizopus stolonifer*, tak proti *Aspergillus niger*. Na základě těchto MIC hodnot CHI a OV byly použity jejich kombinace v různých sub-inhibičních a inhibičních koncentracích v testech, které měří dopad na růst mycelia. Během 7 dnů inkubace směs CHI a OV silně inhibovala (88-100%) růst testovacích houbových kmenů v porovnání s kontrolními testy (Obrázek 28.).

Analýzy spor *Rhizopus stolonifer*, vystavených různým CHI a OV koncentracím, odhalily změny ve tvaru a struktuře, se zvýšeným vadnutím a prohloubením typických hřebenů. Stejně tak u *Aspergillus niger* směs způsobila ostré morfologické změny spor a rozrušení jejich struktury.

Inhibition (%)	Days of exposure		
	Combinations		
	3	5	7
<i>Rhizopus stolonifer</i> URM 3728			
CHI (10 mg/mL) + OV (5 µL/mL)	97%	98%	99%
CHI (10 mg/mL) + OV (2.5 µL/mL)	95%	96%	98%
CHI (10 mg/mL) + OV (1.25 µL/mL)	94%	96%	97%
CHI (5 mg/mL) + OV (5 µL/mL)	92%	94%	96%
CHI (5 mg/mL) + OV (2.5 µL/mL)	90%	92%	94%
CHI (5 mg/mL) + OV (1.25 µL/mL)	89%	91%	92%
<i>Aspergillus niger</i> URM 5842			
CHI (10 mg/mL) + OV (5 µL/mL)	99%	99%	100%
CHI (10 mg/mL) + OV (2.5 µL/mL)	97%	98%	99%
CHI (10 mg/mL) + OV (1.25 µL/mL)	95%	97%	99%
CHI (5 mg/mL) + OV (5 µL/mL)	92%	96%	98%
CHI (5 mg/mL) + OV (2.5 µL/mL)	89%	94%	97%
CHI (5 mg/mL) + OV (1.25 µL/mL)	88%	90%	95%

Obr. 28. Inhibice růstu *Rhizopus stolonifer* a *Aspergillus niger* v kapalině po 7 dnů od vystavení různé koncentrace CHI a OV (dos Santos et al., 2012); CHI – chitosan, OV – esenciální olej z dobromysli obecné

Plody potažené CHIOV5 (CHI 5 mg.ml⁻¹ + OV 5 ml / μl) CHIOV2.5 (CHI 5 mg.ml⁻¹ + OV 2,5 ml / μl), skladované při nízké teplotě a kontaminované *Rhizopus stolonifer* neprokázaly viditelný růst plísně po celou dobu skladování. Hrozny uložené při pokojové teplotě (25° C) a potažené CHIOV2.5 ukázal viditelný růst *Rhizopus stolonifer* teprve po 12 dnech skladování (25% infikovaných plodů). CHIOV5 byl schopen inhibovat růst hub po celou dobu skladování jak při pokojové, tak při nízké teplotě. V kontrolní skupině bylo na konci doby skladování při pokojové teplotě infikováno 80% plodů a 100% bylo infikováno při nízkých teplotách. Růst *Aspergillus niger* na ovoci potaženém CHIOV5 a CHIOV2.5 a skladovaném při nízkých teplotách byl viditelný od 10. dne skladování (25% infikovaných plodů), a 33% plodů bylo infikováno 12. den skladování. Růst *Aspergillus niger* na ovoci potaženém CHIOV2.5 a skladovaném při pokojové teplotě, byl viditelný od 4. dne skladování (25% infikovaného ovoce), a 12. den skladování dosáhl 35%. Míra infekce *Aspergillus niger* na kontrolním vzorku byla na konci skladování vyšší než 65%.

Sánchez-González et al. (2010) uvádí, že chitosanové nátěry (1g.100 ml⁻¹), nebyly účinné při inhibici *Penicillium italicum*, zatímco kombinované použití chitosanu (1 g.100ml⁻¹) a esenciálního oleje bergamotu (0,5-3 ml.100ml⁻¹) bylo účinné při inhibici růstu této houby po celých 12 dnů skladování při teplotě 20° C. Obecně platí, že studie ukázaly, že molekula CHI vykazuje více konzistentní antimikrobiální aktivitu proti bakteriím, zatímco vliv na vláknité houby a kvasinky je variabilní (Tharanathan a Kittur, 2003; Sánchez-González et al, 2010). Kombinace CHI a OV v sub-inhibiční koncentraci způsobily značné morfologické změny u spor (vadnutí, narušení, ztráta buněčného materiálu, prohloubení hřebenů) a mycelia (probírka, zvrásnění a ztráta cytoplazmatického materiálu) z *Rhizopus stolonifer* a *Aspergillus niger*. Tyto změny naznačují, že mechanismus, kterým CHI a OV brání klíčení, vychází z jejich interakce s buněčnou stěnou spor (Sharma a Tripathi 2008).

Kombinované použití testovaných sloučenin navíc nemělo negativní vliv na fyzické a fyzikálně-chemické aspekty hroznů a jejich sensorické vlastnosti po dobu skladování. Tato zjištění ukazují potenciál kombinovaného použití CHI a OV v sub-inhibičních koncentracích pro regulaci růstu a přežití patogenní plísně v ovoci, zejména *Rhizopus stolonifer* a *Aspergillus niger* v hroznech. Směs testovaných látek by mohla být alternativou syntetických antimykotik, které jsou v současné době využívány ke snížení posklizňové ztráty z tohoto biologického znečištění.

Sivarooban et al. (2007) testovali kombinaci nisinu a extraktu z hroznových jader (GSE) na inhibici *Listeria monocytogenes*. Studie proběhla na TSB s 0,6% kvasinkovým extraktem (TSBYE) a na povrchu krutých párků. TSBYE bylo inkubováno při 37 °C po dobu 72 h a krutý párky při 4 nebo 10 °C po dobu 28 dnů. Ve všech případech vykazovala kombinace nisinu a extraktu z hroznových jader vyšší inhibiční aktivitu na růst *Listeria monocytogenes*, než samotný nisin (který nevykazoval dokonce žádnou inhibiční aktivitu) nebo samotný GSE. Při kombinaci těchto dvou látek došlo ke snížení počtu *Listeria monocytogenes* na nedetekovatelnou hladinu již po 15 hodinách.

3.7.3 Kombinované účinky hořčičné mouky a kyseliny octové (E260)

Rhee et al. (2003) zkoumali jednotlivé a kombinované účinky hořčičné mouky a kyseliny octové v inaktivaci s patogenními bakteriemi z potravin uložených v 5°C a 22 °C. Vzorky byly připraveny pro dosažení různých koncentrací přidáním kyseliny octové (0, 0,5, nebo 1%) spolu s hořčičnou moukou (0, 10, nebo 20%) a 2% roztoku chloridu sodného.

Testovanými mikroorganismy byly: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica serovaru typhimurium*.

Zkoumalo se přežití potravinových patogenů skladovaných v různých roztocích obsahujících hořčičnou mouku a kyselinu octovou při teplotě 5 °C. *Salmonella enterica serovaru typhimurium* byla potlačena ve všech kombinovaných ošetřeních s výjimkou kontroly. Po 1 dni skladování, *Salmonella enterica serovaru typhimurium* nebyla detekována. *Escherichia coli* O157: H7, byla inhibována pomaleji ve srovnání s *Salmonella enterica serovaru typhimurium* a nedetekovatelná po 5 dnech. *Listeria monocytogenes* byla z testovaných mikroorganismů za těchto podmínek nejodolnější. Zcela inhibována byla až po 9 dnech. Bohužel se ale ukázalo se, že kombinace 10 či 20 % hořčice a 0,5% kyseliny octové mělo antagonistický účinek a bakterie byly inhibovány pomaleji než při použití samotné hořčičné mouky či kyseliny octové.

Při 22 °C vykazovaly mikroorganismy větší citlivost oproti testům při 5 °C. *Salmonella enterica serovaru Typhimurium* byl inhibován již po 12 hodinách. Také počet *Escherichia coli* O157: H7 a *Listeria monocytogenes* byly sníženy mnohem rychleji při teplotě 22 °C, než při teplotě 5 °C.

Předchozí studie ukázaly, že gram-negativní bakterie byly citlivější než gram-positivním bakterie za podobných podmínek (Lin et al. 2000). Někteří výzkumníci zkoumali přežití potravinových patogenů v hořčici a souvisejících produktech. Tsai a Ingham (1997) zjistili, že všechny kmeny *Escherichia coli* O157: H7 a *Salmonella enterica serovaru Typhimurium*

zemřely po 1 hodině v hořčici o (pH 3,1), bez ohledu na teplotu skladování (5 a 23 °C). Také uvádí, že kmeny *Escherichia coli* O157: H7 a *Salmonella enterica* serovaru *Typhimurium* se lépe adaptují na kyseliny a přežívají déle v kečupu o (pH 3.6) než v hořčici o (pH 2,8).

Nicméně se ukázalo, že hořčičná mouka (10 nebo 20%) v kombinaci s 0,5% kyselinou octovou má menší baktericidní účinek proti *Escherichia coli* O157: H7 a *Listeria monocytogenes*, než hořčice samotná. Kromě toho, se v dalším experimentu zjistilo, že kombinace malých množství kyseliny octové (0,25, 0,50, a 0,75%) s 10% hořčice neprojevila žádný synergický nebo aditivní účinek na inhibici *Escherichia coli* O157: H7 (Rhee et al. 2003).

Je však obtížné pochopit, proč hořčice s vyšším pH (> 5.0) měli lepší antimikrobiální účinky než hořčice s kyselinou octovou s pH (<4,0). První hlavní předpoklad pro nedostatek synergického nebo aditivního efektu u kombinace hořčice a malého množství kyseliny octové v inhibici *Escherichia coli* O157: H7 a *Listeria monocytogenes* se týká stability AITC ve vodných médiích.

Tsao et al. (2000) uvádí, že čistý sinigrin (glukosinolat nalézající se v částech některých rostlin z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) nepřímo zodpovědný za charakteristicky pálivou chuť těchto plodin.) a AITC byli relativně stabilní ve vodě pufrované na pH 5,0 až 7,0. V kombinaci s kyselinou octovou, může být AITC méně stabilní v prostředí s nižším pH. Stabilizace AITC může přispět k efektivnějšímu ničení potravin obsahujících patogenní bakterie. Druhý předpoklad se týká neznámých složek v komerčním octu. Komerční ocet může obsahovat některé ethylestery, které mu dávají něco ze svého aroma, a jiné inhibiční sloučeniny, než je kyselina octová. Třetí předpoklad se týká zmenšeného antibakteriálního účinku přípravku (obsahujícího malé množství kyseliny octové), který by mohl být způsoben zvýšením pH spojeným s přidáním hořčičné mouky. Antimikrobiální aktivita kyseliny octové je založena především na její schopnosti snižovat pH. Nicméně se pak nedá vysvětlit skutečnost, že nebyl detekován žádný rozdíl v antimikrobiální síle mezi 10% hořčicí s 0,5% kyseliny octové (pH 3,84) a 20% hořčice s 0,5% kyseliny octové (pH 3,96) (Rhee et al., 2003).

3.7.4 Kombinace sorbanu draselného (E202) a kyseliny sorbové (E200) s rostlinnými látkami

Azzouz a Bullerman (1982) uvádí, že účinným antimykotikem proti *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* a *Aspergillus ochraceus* a čtyřem kmenům *Penicillium* je hřebíček, který oddálil růst plísní o více než 21 dnů. Tito autoři našli aditivní a synergické efekty

kombinující 0,1% hřebíčku s 0,1% až 0,3% sorbanu draselného (E202). Tyto kombinace pak oddálili klíčení plísní. Sebti a Tantaoui-Elaraki (1994) uvádí, že kombinace kyseliny sorbové ($0,75 \text{ g.kg}^{-1}$) a extraktu ze skořice (20 g.kg^{-1}) byla účinná pro inhibici růstu plísní a kvasinek izolovaných z marockého pekárenského produktu, zatímco samotné kyseliny sorbové bylo k inhibici studovaných mikroorganismů zapotřebí 2000 ppm. Matamoros-León et al. (1999) hodnotili jednotlivě účinky sorbanu draselného a vanilinu a poté i jejich kombinace na růst *Penicillium digitatum*, *Penicillium glabrum* a *Penicillium italicum*. Jejich kombinace, vykazovali FIC hodnoty 0,60-0,84. Kombinace E 202 a vanilinu tedy měla synergické účinky na inhibici zmíněných plísní (Vigil et al., 2005).

Také kombinace sorbanu draselného s antioxidanty jako je butylovaný hydroxyanisol (BHA), butylovaný hydroxytoluen (BHT), terciární butylhydrochinon (TBHQ), a propylgalát (PG), měli vyšší antimikrobiální aktivitu ve srovnání s jednotlivými složkami (Klindworth et al., 1979).

Tyto antioxidantní látky zpomalují proces lipidové oxidace, což je jednou z hlavních příčin kažení potravin. Aby se zabránilo takovému znehodnocení, používá potravinářský průmysl některé antioxidanty. Nejčastěji používanými antioxidanty jsou výše zmiňované BHT (E231), BHA (E320) a PG (E310), nicméně, vzhledem k jejich syntetickému původu, je jejich bezpečnost a účinnost často zpochybňována. Výsledkem těchto pochybností je rostoucí zájem o látky rostlinného původu, které vykazují antioxidantní potenciál a mohly by tedy nahradit syntetické antioxidanty. (Viuda-Martos, 2011)

4 Závěr

Využívání synergického účinku mezi rostlinnými látkami a konvenčními konzervanty může být do budoucna velkým přínosem. Díky synergismu těchto látek by se mohlo snížit množství používaných chemických konzervantů a přitom zvýšit jejich konzervační účinky. Konvenční konzervanty mohou u některých lidí vyvolávat alergie a snížením jejich množství v potravě by došlo i ke snížení jejich nežádoucích účinků.

V dnešní době vzrůstá touha lidí vést zdravý životní styl, tudíž je snižování chemikálií v potravě žádoucí nejen ze zdravotních důvodů, ale i z hlediska poptávky na trhu.

Podářilo se najít rostlinné látky, které vykazují v kombinaci s konvenčními konzervanty synergické účinky a mohou tak být použity k lepší konzervaci potravin. Ukázalo se však, že kombinace těchto látek může mít také antagonistický účinek a vést naopak ke snížení antimikrobiálního efektu. A dále pak některé rostlinné látky použité ke konzervaci potravin mají za následek narušení sensorických vlastností a nejsou tedy pro konzervaci vhodné. Existuje nepřeberné množství kombinací těchto látek, které nejsou doposud prozkoumané, proto je nanejvýš vhodné tyto interakce nadále zkoumat.

5 Seznam použité literatury

Apostolidis, E., Kwon, Y.-I., Shetty, K. 2008. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in broth and cooked ground beef systems and likely mode of action through proline metabolism. *Journal of Food Microbiology*. 128 (2). 317-324.

Ashurst, P. R. 1999. *Food flavorings*. 3rd ed. Aspen Publishers. Gaithersburg. p. 460. ISBN 08-342-1621-3.

Azzous, M. A., Bullerman, L. B. 1982. Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components a commercial antifungal agents. *Journal of Food Protection*. 45 (14). 1298–1301.

Bartošová, L. a Hanulíková, A. Mikrobiální původci alimentárních onemocnění [online]. SZPI. 11. Prosince 2014. [cit. 2015-03-19]. Dostupné z <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?nid=11325&docid=1000167&chnum=3>

Benkeblia, N. 2004. Antimicrobial activity of essential oils extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 37 (2). 263-268

Borris, R. P. 1996. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *Journal of Ethnopharmacol*. 51 (1-3). 29-38.

BURT, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential application in fous. *International Journal of Food Microbiology*. 94 (3). 223-253.

Butler L G. 1988. Effects of condensed tannin on animal nutrition. In: Hemingway, R. W., Karchesy, J. J., editors. *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. New York. p. 553.

- Branen, J. K., Davidson, P. M. 2004. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology*. 90 (1). 63–74.
- Cauvain, S. P. 2003. *Bread Making: Improving Quality*. 1. Vyd. Woodhead Publishing and CRC Press LLC. Cambridge. p. 502. ISBN 1 85573 553 9.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as microbial agents, *Clinical Microbiology Reviews*. 12 (4). 564 – 582.
- Critchfield, J. W., Butera, S. T., Folks T. M. 1996. Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 12 (1). 39-46.
- Čechová, L. Janalíková, M. 2007. *Obecná mikrobiologie*. 1.vyd. Univerzita TomášeBati ve Zlíně. Zlín. 190 s. ISBN 978-80-7318-516-9
- De Vincenzi, M., Silano, M., Maialetti, F., Scazzocchio B. 2000. Constituents of aromatic plants: II. Estragole. *Fitoterapia*. 71 (6). 725-729.
- Dixon R. A., Dey P. M., Lamb C. J. 1983. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. In: Meister, A., editor. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. John Wiley & Sons. New York. 480 p.
- Dorman, H. J., Deans, S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Jouurnal of Applied Microbiology*. 88 (2). 308-316.
- Dos Santos, N. S. T., Athayde Aguiar, A. J. A., de Oliveira, C. E. V., Veríssimo de Sales C., Silvanda de Melo e Silva, Rosana Sousa da Silva, Thayza Christina Montenegro Stamford, Evandro Leite de Souza. 2012. Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare L.* essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca L.*). *Food Microbiology*. 32(2). 345-353.

- El-Sharif, A. A., Hussain, M. H. M. 2011. Chitosan–EDTA new combination is a promising candidate for treatment of bacterial and fungal infections. *Current Microbiology*. 62 (3). 739-45.
- Ettayebi, K., Yamani, J. E., Rossi-Hassani, B. 2000. Synergistic effects of nisin and tymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*. 183 (1). 191-195.
- Geissman, T. A. 1963. Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds. In: Florkin, M., Stotz, E. H., editors. *Pyrrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant constituents*. Elsevier. New York. p. 265.
- Gill, A. O., Delaquis, P., Russo, P., Holley, R. A. 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73 (1). 83-92.
- Gill, A. O., Holley, R. A. 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics, *International Journal of Food Microbiology*. 108 (1). 1-9.
- Goy, R. C., Britto, D., Assis, O. B. G. 2009. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 19(3). 241–247.
- Hao, Y. Y., Bracket, R. E., Doyle, M. P. 1998. Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated, cooked poultry. *Food Microbiology*, 15 (4). 367-378.
- Haslam, E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*. 59 (2). 205–215.
- Hoult, J. R. S., Paya, M. 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *General Pharmacology*. 27 (4). 713-722.

- Hynie, S. 2001. Farmakologie v kostce. 2. vyd. Triton. Praha. 520 s. ISBN 80-7254-181-1.
- Chabot, S., Bel-Rhliid, R., Chenevert, R., Piche, Y. 1992. Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker and Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂-enriched conditions. *New Phytologist*. 122 (3). 461–467.
- Juneja, V., Friedman, M. 2007. Carvacrol, cinnamaldehyde, oregano oil, and thymol inhibit *Clostridium perfringens* spore germination and outgrowth in ground turkey during shilling. *Journal Food Protection*. 70 (1). 218-222.
- Kalemba, D., Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10 (10). 813—829.
- Kazmi, M. H., Malik, A., Hameed, S., Akhtar, N., Noor Ali, S. 1994. An anthraquinone derivative from *Cassia italica*. *Phytochemistry*. 36 (3). 761–763.
- Keating G. J., O’Kennedy R. 1997. The chemistry and occurrence of coumarins. In: O’Kennedy, R., Thornes, R. D., editors. *Coumarins: biology, applications and mode of action*. John Wiley & Sons. New York. p. 348.
- Kim, JE., Choi, NH., Kang, SCH. 2007. Anti-listerial properties of garlic shoot juice at growth and morphology of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 18 (10). 1198-1203.
- Klindworth, K.J., Davidson, P. M., Brekke, C. J., Branen, A. L. 2006. Inhibition of *Clostridium perfringens* by butylated hydroxyanisole. *Journal of Food Protection*. 43 (2). 564-567.
- Koutsoumanis, K., Lambropoulou, K., Nychas, G-J. E. 1999. A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in food model system supplemented with a natural antimicrobial. *International Journal of Food Microbiology*, 49 (1-2). 63-74.
- Kuliscic, T., Radonic A, Katalinic V, Milos M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*. 85 (4). 633–40.

- Kyzlink, V. 1988. Teoretické základy konzervace potravin. 1. vyd. SNTL. Praha. 511 s.
- Kyzlink, V. 1980. Základy konzervace potravin. 1. vyd. SNTL. Praha. 516 s.
- Lin, C. M., Preston, J. F., Wei, C. I. 2000. Antibacterial mechanism of allyl isothiocyanate. *Journal of Food Protection*. 63 (6). 727–734.
- Lin, Y. T., Labbe, R. G., Shetty K. 2005. Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood systems using oregano and cranberry phytochemical synergies and lactic acid. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 6 (4). 453–458.
- Lochmann, O. 1999. Základy antimikrobní terapie. 2. vyd. TRITON, Praha. 127 s. ISBN 80-7254-005.
- Matamoros-León, B., Argai, A., López-Malo, A. 1999. Individual and combined effects of vanillin and potassium sorbate on *Penicillium digitatum*, *P. glabrum* and *P. italicum* growth. *Journal of Food Protection*. 62 (5). 540–542.
- Mendez, E., Moreno, A., Colilla, F., Pelaez, F., Limas, G. G., Mendez, R., Soriano, F., Salinas, M., De Haro, C. 1990. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gamma-horothionin, from barley endosperm. *European Journal of Biochemistry*. 194 (2). 533–539.
- Menon, K. V., Garg, S. R. 2001. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. *Food Microbiology*. 18 (6). 647-650.
- Moravcová, J. 2003. Biologicky aktivní přírodní látky. VŠCHT Praha. 11-91.
- Namba, T., Morita, O., Huang, S.L., Goshima, K., Hattori, M., Kakiuchi, N. 1988. Studies on cardio-active crude drugs. I. Effect of coumarins on cultured myocardial cells. *Planta Medica*. 54 (4). 277-282.

Nanasombat, S., Lohasupthawee, P. 2005. Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against *Salmonella* and other enterobacteria. *KMITL Science and Technology Journal*. 5 (3). 527-538.

Nonaka, GI., Nishioka, I., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Kashiwada, Y., Dutschman G. E., Bodner, A. J., Kilkuskie, R. E., Cheng, YC., Lee, KH. 1990. Anti-AIDS agents. 2. Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells. *Journal of Natural Products*. 53 (3). 587–595.

O’Kennedy R, Thornes R D, editors. *Coumarins: biology, applications and mode of action*. John Wiley & Sons. New York. 1997. 348 p. ISBN 0471969974.

Ooshima, T., Minami, T., Aono, W., Izumitani, A., Sobue, S., Fujiwara, T., Kawabata, S., Hamada, S. 1993. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. *Caries Research*. 27 (2). 124–129.

Opletal, L., Šimerda, B. 2005. Antiinvazivní látky přírodního původu jako aditiva do krmiv. Ministerstvo zemědělství ČR – Vědecký výbor pro výživu zvířat. Výzkumný ústav pro výživu zvířat. 27 – 37.

Ozturk, S., Ercisli, S. 2006. The chemical composition of essential oil and in vitro antibacterial activities of essential oil and methanol extract of *Ziziphora persica* Bunge. *Journal of Ethnopharmacology*. 106 (3). 372–376.

Periago, P. M., Moezelaar, R. 2001. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the variability of different strains of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*. 68 (1-2). 141–8.

Piller, N. B. 1975. A comparison of the effectiveness of some anti-inflammatory drugs on thermal oedema. *The British Journal of Experimental Pathology*. 56 (6). 554–559.

Rahman, A. 2003. *Studies in natural products chemistry*. Elsevier. New York. 2003. p. 916. ISBN 0444515100.

- Rhee, MS., Lee SY., Dougherty, R. H., Kang, DH. 2003. Antimicrobial Effects of Mustard Flour and Acetic Acid against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Applied and environmental microbiology*. 69 (5). 2959–2963.
- Roller, S., Seeshar, P. 2002. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4°C and 8°C. *Letters in Applied Microbiology*. 35 (5). 390-394.
- Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. 2007. Control of Pathogenic and Spoilage Microorganisms in Fresh-cut Fruits and Fruit Juices by Traditional and Alternative Natural Antimicrobials. *Journal of Food Protection*. 70 (4). 1017-20.
- Saei-Dehkordi, S. S., Fallah, A. A., Kousha, S. 2012. Chemical Composition and Antioxidative Activity of *Echinophora platyloba* DC. Essential Oil, and Its Interaction with Natural Antimicrobials against Food-Borne Pathogens and Spoilage Organisms. *Journal of Food Science*. 77(11). 631-637.
- Sallam, K., Ishioroshi, M., Samejima, K. 2004. Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 37 (8). 849-855.
- Sánchez-González, L., Chafer, M., Chiralt, A., González-Martínez, C., 2010. Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and the inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate Polymers*. 82 (2). 277-283.
- Sato, M., Fujiwara, S., Tsuchiya, H., Fujii, T., Iinuma, M., Tosa, H., Ohkawa, Y. 1996. Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*. 54 (2-3). 171–176.
- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30 (12). 3875–3883.
- Sebti, F., Tantaoui-Elaraki, A. 1994. In vitro inhibition of fungi isolated from "pastilla" papers by organic acids and cinnamon. *Lebensmittel -Wissenschaft und Technologie*. 27 (4). 370-374.

- Serafini, M., Ghiselli, A., Ferro-Luzzi, A. 1994. Red wine, tea and anti-oxidants. *Lancet*. 344 (8922). 626.
- Sharma, N., Tripathi, A., 2008. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp Essentials oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*. 163 (3). 337-344.
- Shetty, K., Labbe, R. G. 1998. Food borne pathogens, health and role of dietary phytochemicals. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 7 (3/4). 270– 276.
- Schultz, J. C. 1988. Tannin-insect interactions. In: Hemingway, R. W., Karchesy, J. J., editors. *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press. New York. p. 553.
- Singh, B., Falahee, M. B., Adams, M. R. 2001. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin and garlic extract. *Food Microbiology*. 18 (2). 133–139.
- Sivarooan, T., Hettiarachchy, N. S., Johnson, M. G. 2007. Inhibition of *Listeria monocytogenes* using nisin with grape seed extract on turkey frankfurters stored at 4 and 10 degrees C. *Journal of Food Protection*. 70 (4). 1017-1020.
- Sorrells, K. M., Enigl, D. C., Hatfield, J. R. 1989. Effect of pH, acidulant, time and temperature on the growth and survival of *Listeria Monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 52 (8). 571–573.
- Suppakul, P., Sonneveld, K., Stephen W. B., Miltz, J. 2008. Efficacy of polyethylene-based antimicrobial films containing principal constituents of basil. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 41 (5). 779-788.
- Surburg, H., Panten, J., Bauer, K. 2006. *Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses*. Wiley. p. 330. ISBN 35-273-1315-X.

- Taylor, R. S. L., Edel, F., Manandhar, N. P., Towers, G. H. N. 1996. Antimicrobial activities of southern Nepalese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacol.* 50 (2). 97–102.
- Terras, F. R. G., Schoofs, H. M. E., Thevissen, H. M. E., Osborn, R. W., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A., Broekaert, W. F. 1993. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. *Plant Physiology.* 103 (4). 1311–1319.
- Tharanathan, R. N., Kittur, F. S., 2003. Chitin - the undisputed biomolecule of great potential. *Critical Review in Food Science and Nutrition.* 43 (1). 61-87.
- Thornes, R. D. 1997. Clinical and biological observations associated with coumarins. In: O’Kennedy R, Thornes R D, editors. *Coumarins: biology, applications and mode of action.* John Wiley & Sons. New York. p. 348. ISBN 0471969974.
- Toda, M., Okubo, S., Ohnishi, R., Shimamura, T. 1989. Antibacterial and bactericidal activities of Japanese green tea. *Japanese Journal of Bacteriology.* 44 (4). 669–672.
- Tsai, Y. W., Ingham, S. C. 1997. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in acidic condiments. *Journal of Food Protection.* 60 (7). 751–755.
- Tsao, R., Yu, Q., Friesen, I., Potter, J., Chiba, M. 2000. Factors affecting the dissolution and degradation of oriental mustard-derived sinigrin and allyl isothiocyanate in aqueous media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 48 (5). 1898–1902.
- Ultee, A., Smid, E. J. 2001. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*, *International Journal of Food Microbiology.* 64 (3). 373-378.
- Valero, M., Giner, M. J. 2006. Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in the sensory qualities of carrot broth. *International Journal of Food Microbiology.* 106 (1). 90-94.
- Valero, M., Salmerón, M. C. 2003. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndalized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology.* 85 (1-2). 73-81.

Vamos-Vigyazo L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 15 (1). 49–127.

Vigil, A. L.-M., Palou, E., Alzamora, S. M. 2005. Naturally occurring compounds - plant sources. In: Davidson, P. M., Sofos, J. N., Branen, A. L., editors. *Antimicrobials in Food*. 3. edition. CRC Press. New York. p. 720.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez J. A. 2011. Spices as Functional Food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51 (1). 13–28.

Vrbová, T. 2001. Víme, co jíme? Aneb Průvodce „Éčky“ v potravinách. 1. vyd. EcoHouse. Praha. 276 s. ISBN 80-238-7504-3.

Weinmann I. 1997. History of the development and applications of coumarin and coumarin-related compounds. In: O’Kennedy R, Thornes R D, editors. *Coumarins: biology, applications and mode of action*. John Wiley & Sons. New York. p. 348. ISBN 0471969974.

Zahradnický, J. 1982. *Základy racionální terapie antibiotiky a chemoterapeutiky*. 1.vyd. Avicenum. Praha. 247 s.

Zhang, Y., Lewis, K. 1997. Fabatins: new antimicrobial plant peptides. *FEMS Microbiol Letters*. 149 (1). 59–64.