

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



**Prodloužení trvanlivosti jablečno-řepného moštu pomocí
kombinace záhřevu a silic**

Diplomová práce

Autor práce: Marek Mazal

Obor studia: Kvalita a zpracování zemědělských produktů

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

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Prodloužení trvanlivosti jablečno-řepného moštu pomocí kombinace záhřevu a silic" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12. dubna 2018

Poděkování

Rád bych zde poděkoval doc. Ing. Pavlu Kloučkovi, Ph.D. za odborné vedení, podporu a čas, které mi při psaní této práce věnoval. Dále děkuji Ing. Matěji Božikovi za cenné rady a vstřícnost při realizaci experimentu a při zpracování práce.

Prodloužení trvanlivosti jablečno-řepného moštu pomocí kombinace záhřevu a silic

Souhrn

Silice jsou směsi chemických látek pocházejících z rostlin, jež jsou známé pro své antibakteriální a antifungální účinky. V současnosti je řešena problematika čerstvých ovocných šťáv a jejich údržnosti, která je dlouhá pouze v rámci několika týdnů, z tohoto důvodu jsou hledána alternativní ošetření, která by zachovala čerstvost šťáv a přítomnost zdraví prospěšných látek. V posledních letech navíc dochází k nárůstu zájmu o produkty, které byly ošetřeny na přírodní bázi tak, aby nedošlo ke snížení obsahu pozitivně působících látek.

Cílem této diplomové práce bylo otestovat účinnost vybraných druhů silic v kombinaci s tepelným záhřevem pro prodloužení trvanlivosti jablečno-řepného moštu, za účelem snížení teploty použité pro účinné ošetření.

Pro testování antimikrobiálních účinků byly vybrány silice: Skořice, lemongrass, oregano, eukalyptus, máta a hřebíček. Jablečno-řepný mošt byl ošetřen těmito silicemi spolu s tepelným záhřevem a následně byl testován nárůst mikroorganismů měřením turbidity vzorků pomocí spektrofotometrie. Během testování byly jako nejefektivnější identifikovány silice skořice a lemongrass, které byly dále podrobeny dalšímu testování v jablečno-řepném moštu a to v kombinaci s různými koncentracemi a tepelnými ošetřeními. Současně bylo v průběhu testování turbidity vzorků ošetřených silicemi lemongrass a skořice prováděno stanovení celkového počtu mikroorganismů, jež bylo provedeno 1; 7; 14; 31 dní po přípravě a ošetření vzorků.

Silice lemongrass a skořice vykazovaly podobnou inhibiční aktivitu, nicméně byla identifikována závislost účinku silic na jejich koncentraci. Nejefektivnější se ukázala ošetření silicí lemongrass, skořice a teplotami 60 °C a 64 °C, kdy nedošlo v průběhu 29 dní testování k nárůstu KTJ (kolonie tvořící jednotky) a v porovnání s kontrolou bez ošetření tak bylo dosaženo ve dnech 1; 7; 14; 31 celkové redukce o 5,89; 7,29; 8,44; 8,44 log KTJ/g. Rovněž byly prokázány statisticky významné rozdíly mezi touto sadou vzorků a neošetřenou kontrolou a kontrolou ošetřenou pouze teplotu 60 °C.

Klíčová slova: silice, mošty, konzervace, tepelné ošetření, prodloužení údržnosti

Shelf-life extension of apple-red beet juice by combination of temperature and essential oils

Summary

Essential oils are mixtures of chemical substances which derive from plants and they are known for their antibacterial and antifungal effects. At present, there is an issue of fresh juices and their shelf life, which is only few weeks long. Therefore there are researched alternative treatments to preserve freshness of juices and presence of health beneficial components. In addition, there is an increased interest in products, that have been treated naturally, for purpose to not reduce the content of positively acting substances.

The aim of this diploma thesis was to test the efficiency of selected types of essential oils with the combination of thermal heating to prolong the shelf life of apple-red beet juice in order to reduce the temperature for effective treatment.

For testing of antimicrobial effects following essential oils were selected: Cinnamon, lemongrass, oregano, eucalyptus, mint and clove. The apple-red beet juice was treated with these oils and in combination with thermal treatment, then the growth of microorganisms was tracked by measuring turbidity of the samples by spectrophotometric method. During testing, the cinnamon and lemongrass essential oils were identified as the most effective and they were tested further in apple-red beet juice. Different concentrations of essential oils and heat treatments were tested. At the same time during measurement of turbidity, the samples treated with lemongrass and cinnamon essential oils were tested by determination of total number of microorganisms. The determination of total number of microorganisms was performed 1; 7; 14; 31 days after the preparation and treatment of the samples.

Lemongrass and cinnamon essential oils have shown similar inhibitory activity, but there was identified dependence of the essential oils at used concentration. The most effective treatments were lemongrass and cinnamon with temperatures of 60 °C and 64 °C, where no CFU (colony forming units) during 29 days of measuring were observed. In comparison with untreated control total reduction by 5,89; 7,29; 8,44; 8,44 log CFU/g on days 1; 7; 14; 31 was achieved. There were found statistically significant differences between treated samples and untreated controls and control treated at 60 °C.

Keywords: Essential oils, juice, preserving, heat treatment, extended shelf life

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce	2
3	Vědecká hypotéza	2
4	Literární rešerše	3
4.1	Historie silic	3
4.2	Definice silic	3
4.3	Přítomnost a funkce silic v rostlinné říši	4
4.4	Získávání silic z rostlin	5
4.5	Chemické složení silic	5
4.5.1	Terpeny	6
4.5.2	Fenoly	8
4.5.3	Ostatní složky	9
4.6	Konvenční metody získávání silic	10
4.6.1	Lisování za studena	10
4.6.2	Extrakce rozpouštědly	10
4.6.3	Metoda enfleurage	11
4.6.4	Destilace	11
4.6.5	Superkritická fluidní extrakce	12
4.7	Antimikrobiální účinky silic	13
4.7.1	Skořicová silice	13
4.7.2	Silice lemongrass	15
4.7.3	Mechanismus antimikrobiálního účinku silic	17
4.7.4	Synergický efekt silic a tepelného záhřevu	18
4.8	Údržnost ovocných šťáv	19
4.8.1	Mikroorganismy kontaminující ovocné šťávy	19
4.8.2	Prevence mikrobiální kontaminace ovocných šťáv	22
5	Materiál a metody	25
5.1	Mošt	25
5.2	Chemikálie	25
5.3	Screening	25
5.3.1	Příprava vzorků	25
5.3.2	Odběr a příprava vzorků pro analýzu	26
5.3.3	Měření turbidity pomocí spektrofotometrie	27
5.4	Analýza účinnosti ošetření kombinací silic a tepelného záhřevu	27
5.4.1	Příprava vzorků	27

5.4.2	Odběr vzorků a příprava vzorků pro analýzu	29
5.4.3	Měření turbidity pomocí spektrofotometrie	29
5.5	Stanovení celkového počtu mikroorganismů.....	30
5.5.1	Odběr vzorků a příprava vzorků	30
5.6	Výpočty a statistické zpracování dat	31
6	Výsledky	33
6.1	Screening antimikrobiální aktivity silic.....	33
6.1.1	Výsledky měření turbidity	33
6.2	Výsledky analýzy účinnosti ošetření kombinací silic skořice, lemongrass a tepelného záhřevu	37
6.3	Výsledky stanovení celkového počtu mikroorganismů	41
7	Diskuze	46
8	Závěr	49
9	Seznam literatury.....	50

1 Úvod

Ovocné mošty jsou v současnosti vnímány a propagovány jako nápoje které jsou nejen chutné, ale i zdravé, přírodní a výživné (Dennison, 1996). V důsledku zvyšující se poptávky konzumentů po produktech, které jsou svou chutí a nutriční hodnotou podobné neošetřeným surovým rostlinným materiálům, byla v posledních letech zvýšena konzumace takzvaných čerstvých (fresh) šťáv skladovaných za chladírenských podmínek (Esteve et Frígola, 2007). Nicméně tento požadavek představuje výzvu pro potravinářský průmysl, protože neošetřené produkty čelí vyšším ztrátám vzhledem k jejich životnosti a dopravním nákladům pro zajištění bezpečnosti těchto produktů, které rychleji podléhají zkáze (Espina, et al. 2012).

V současnosti se díky zvyšujícímu povědomí spotřebitelů o zdraví, se použití přírodních látek s antimikrobiálními vlastnostmi (jako jsou bakteriociny nebo silice) stává vzrůstajícím trendem (Tiwari et al., 2009). Ve spojitosti se silicemi nebo jejich složkami prokázalo několik studií účinnější inaktivaci potravinových patogenů při kombinaci těchto přírodních antimikrobiálních látek spolu s mírným zahřevem, díky synergickému účinku tak byla celková inaktivace patogenů efektivnější, než použití těchto ošetření samostatně (Ait-Ouazzou et al., 2011, Burt, 2004, Espina et al., 2010, Somolinos et al., 2010).

2 Cíl práce

Cílem této práce je otestovat účinek vybraných druhů rostlinných silic v kombinaci s tepelným ošetřením na konzervaci jablečno-řepného moštu, která by umožnila delší životnost produktu spolu se zdravotní nezávadností a přijatelnou senzoricou jakostí.

3 Vědecká hypotéza

Pomocí rostlinných silic spolu s tepelným ošetřením lze prodloužit trvanlivost jablečno-řepného moštu.

4 Literární rešerše

4.1 Historie silic

Silice nebo také esenciální oleje jsou aromatické a těkavé kapaliny získané z rostlinného materiálu zahrnující květy, kořeny, kůru, listy, semena a plody (Hyldgaard et al., 2012). V průběhu historie se silice těšily velkému zájmu, ačkoli mnoho z jejich tradičních použití bylo postupem času ztraceno. Obecně je uznáváno tvrzení, že lidé extrahovali silice z rostlin již od úsvitu lidstva. Použití silic pro různé účely jsou rozmanitá a zahrnují nejen jejich užití při vaření pro zvýšení chuti a zvýšení zdravotních přínosů potravin, ale také jejich aplikace ve výrobě parfémů a kosmetiky (Preedy, 2016).

Starověcí Egypťané používali silice v medicíně, parfumerii a v umění balzamování a přípravy těl při pohřbívání mumifikací. Po pádu římské říše a s příchodem křesťanské a muslimské civilizace, umění a věda vůní byla převezena do arabského světa, kde dosáhla vysoké úrovně sofistikovanosti. Ve středověku tyto znalosti vůní přivezli zpět do Evropy křižáci, kteří se vraceli ze Svaté země a zde byly dále rozvíjeny alchymisty a mnichy v kláštorech. Alchymisté se snažili vytvořit „elixír života“, aby mohli žít po neomezenou dobu a kláštery používaly silice k získání různých léčivých přípravků pro léčení nejrůznějších onemocnění nebo k tvorbě aromatických derivátů, jako je mýdlo a parfém. Během renesance bylo použití silic v parfumerii a kosmetice rozšířeno po celém světě (Sonwa, 2001).

4.2 Definice silic

Esenciální oleje neboli silice jsou vonné, vysoce těkavé látky přítomné v rostlinách. Díky své volatilitě mohou být tyto látky získány např. pomocí parní destilace z aromatických rostlin jednoho botanického druhu a poté mohou být detekovány podle vůně a chuti. Jednotlivé silice jsou značeny jménem rostliny, ze kterého jsou odvozeny, a také dle vůně, která je specifická dané části rostliny (Preedy, 2016).

Existují různé definice silic, ale pravděpodobně nejpřesnější je definice, kterou navrhl Sonwa (2001): Silice jsou produkty nebo směsi produktů, které se tvoří v cytoplazmě a jsou obvykle přítomny ve formě malých kapiček mezi buňkami. Jsou těkavé a aromatické. Jsou složeny ze směsí vonných látek nebo směsí vonných látek a látek bez zápachu, kdy je aromatická látka definována jako chemicky čistá látka, která je při normálních podmínkách těkavá a jejíž vůně může být pro společnost užitečná.

Bylo popsáno téměř 3000 různých silic. Z nich se asi 300 používá komerčně v aromatických přípravcích a na trhu s vonnými látkami (Burt, 2004). Mezinárodní organizace pro standardizaci (ISO) definuje silice jako produkt získaný z přírodní suroviny rostlinného původu, parní destilací, mechanickými procesy z epikarpu citrusových plodů nebo suchou destilací po oddělení vodní fáze. Pokud jde o fyzikální zpracování ISO uvádí, že silice mohou být podrobeny fyzikálnímu ošetření, které nevede k žádné podstatné změně jejich složení (ISO catalog, 2013).

Jak je uvedeno výše, silice jsou složité směsi, obvykle tvořené četnými složkami, obecně tekutými, ale někdy i pevnými. Při pokojové teplotě se tyto směsi obvykle pohybují od bezbarvé až po slabě nažloutlé, když jsou čerstvě destilované. Rovněž se vyznačují aromatickou vůní a snadno jsou absorbovány kůží. Kromě toho mají silice obvykle nízkou hustotu, s výjimkou případů, jako jsou silice skořice, hřebíčku a sassafras, které mají větší hustotu než voda. Mezi jejich vlastnosti patří špatná rozpustnost ve vodě, ale jsou rozpustné ve většině běžných organických rozpouštědlech, včetně etanolu a diethyletheru, a dobře se mísí s rostlinnými oleji, tuky a vosky. Silice mají vysoký index lomu a rotační sílu, které mohou být užitečné pro jejich identifikaci a kontrolu kvality pomocí optických metod (Burt, 2004).

4.3 Přítomnost a funkce silic v rostlinné říši

Silice se obvykle tvoří jako sekundární metabolity. V mnoha případech jsou uloženy v nediferenciovaných buňkách (*Lauraceae*) nebo sekretovaných orgánech, jako jsou žlaznaté trichomy (*Lamiaceae* a *Asteraceae*), sekreční kanály (schizogenní u *Myrtaceae* a schizolyzygenní u *Rutaceae*), nebo v dutinách (*Pinopsida*). Někdy se v rostlině nevytváří samotná silice, ale je vyráběna hydrolýzou některých sloučenin přítomných v rostlině, jako je tomu v případě kozlíku lékařského nebo česneku kuchyňského (Evans, 2009).

S ohledem na jejich lokalizaci mohou být silice ve všech částech rostlin, včetně nadzemních částí. Obvykle jsou silice vytvářeny květy, listy a stonky (heřmánek, máta, levandule), kůra (skořice), plody (anýz), semeny (muškátový oříšek), stejně jako v kořenu a oddencích (kurkuma a zázvor). Role silic v se dané rostlině liší: V některých případech slouží jako atraktant při opylování, v jiných případech slouží jako obranný mechanismus, často jako odpuzující nebo dráždivý proti predátorům. Kromě toho existují různé teorie použití silic jako antioxidantů díky jejich schopnosti darovat vodík v oxidačních reakcích, zejména v přítomnosti světla. Jsou také významné pro své antifungální a antibakteriální účinky, chránící rostlinu před potenciálními patogeny (Evans, 2009).

4.4 Získávání silic z rostlin

Silice lze získat pomocí destilace, a to destilace vodou a vodní párou nebo samotnou parní destilací. V současnosti, jde o nejčastější metody získávání silic. Pokud je rozpustnost silice ve vodě vysoká, jako je tomu v případě růžové, pelargoniové nebo levandulové silice, může být použit jiný proces, konkrétně kohobace, kdy je použita tzv. redestilace. V tomto případě, je cílem zabránění ztráty vodorozpustných sloučenin, tudíž je kondenzovaná voda vrácena ze separátoru zpět do destilační kolony. Jiné procesy získávání silic zahrnují maceraci a enfleurage či moderní techniky, jako je extrakce s rozpouštědly nebo superkritickými kapalinami. Macerace může být použita, pokud je výtěžek z destilace nízký, zatímco enfleurage a Extrakce rozpouštědly jsou vhodné pro drahé, jemné a tepelně nestálé materiály (Chamorro et al., 2011)

Rostliny pro získání silice mohou být čerstvé, částečně sušené nebo sušené, ale v případě květů musí být čerstvé (Preedy, 2016).

4.5 Chemické složení silic

Silice se skládají z lipofilních a vysoce těkavých sekundárních metabolitů rostlin, které dosahují molekulové hmotnosti nižší než 300. V prvních definicích silic byly tyto látky identifikovány hlavně jako terpeny, především monoterpeny a seskviterpeny. Později však byly identifikovány i jiné typy sloučenin zejména fenoly. V silicích se vyskytují také terpeny s vyšším počtem uhlíků, zejména diterpeny (Sell, 2010).

Odlíšné látky byly získány i podle způsobu získání silic například při destilaci. Tento rozdíl je způsoben skutečností, že mnoho dalších metabolitů rostlin, jako jsou tuky, kumariny, antrachinony a některé alkaloidy jsou destilovatelné v nezměněné podobě, zatímco některé sloučeniny jako jsou deriváty glykosidů, se během destilačního procesu transformují. Obecně však platí, že hlavní složky silic jsou tvořeny monoterpeny a seskviterpeny. V některých případech jsou hlavní deriváty uhlovodíky (např. terpentýn tvořený α - a β -pinenem), zatímco v některých silicích jsou hlavní složky v oxidované podobě (např. hřebíčková silice, tvořená eugenolem). U menšího počtu druhů silic jsou převládajícími složkami fenoly a jejich deriváty, mezi něž patří tymiánová silice s thymolem a karvakolem, mátová silice s mentolem a anýzová silice s anetholem (Bakkali et al., 2008).

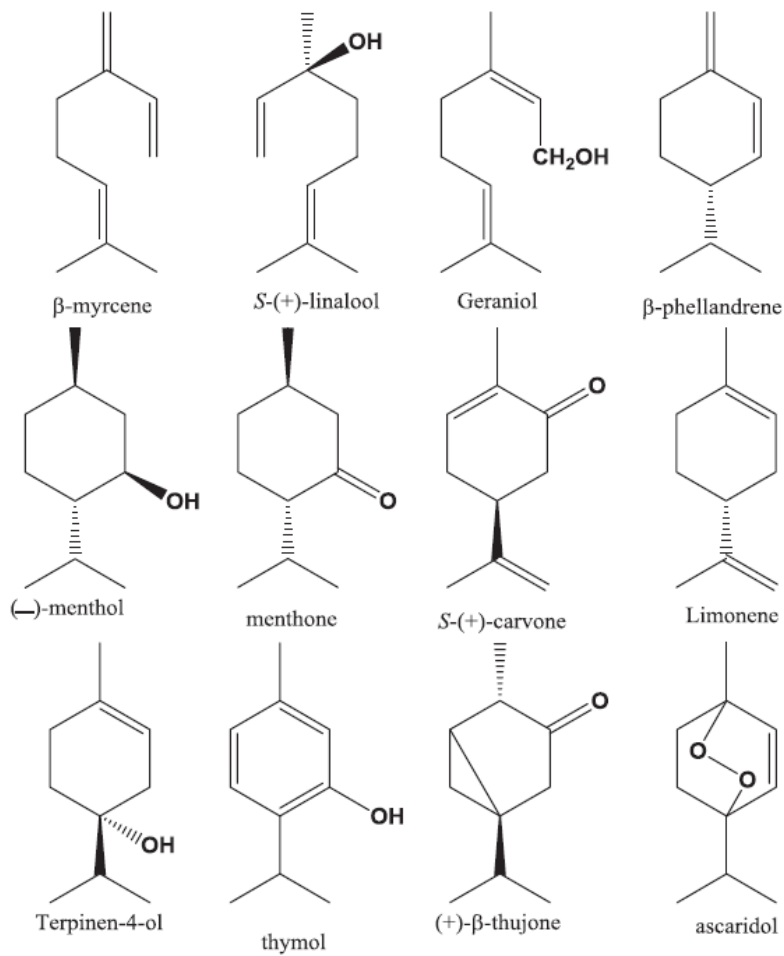
4.5.1 Terpeny

Terpeny se skládají z kombinace pětiuhlíkatých základních (C5) jednotek nazývaných isopren. Hlavní terpeny jsou monoterpeny (C10) a sesquiterpeny (C15), ale vyskytují se i hemiterpeny (C5), diterpeny (C20), triterpeny (C30) a tetraterpeny (C40). Monoterpeny jsou tvořeny ze spojení dvou izoprenových jednotek (C10) a jedná se tak o nejreprezentativnější molekuly, jež tvoří asi 90 % silic, které se vyskytují v široké škále struktur (Bakkali et al., 2008).

Silice tvořené terpenovými deriváty jsou obvykle složeny z monoterpenů a seskviterpenů, které se mohou vyskytovat jako uhlovodíky nebo mohou být oxidované. Vyskytují se však také silice odvozené od alifatických nebo alicyklických uhlovodíků a některé mohou mít aromatické struktury. Mezi příklady silic z této rozsáhlé skupiny patří terpentýn (*Pinus* spp.) s terpeny α - a β -pinen, geraniol z damažské růže (*Rosa damascena*), silice z kajeputu (*Melaleuca alternifolia*) s terpinen-4-ol, koriandrová silice (*Coriandrum sativum*) s linalolem, mátová silice (*Mentha piperita*) s mentholem, citronová silice (*Citrus limon*) s limonenem, kmínová silice (*Carum carvi*) s karvionem, pelyňková silice (*Artemisia absinthium*) s thujonem, eukalyptová silice (*Eucalyptus globulus*) s cineolem a chenopodiová silice (*Chenopodium ambrosioides*) s ascaridolem jako příklady monoterpenů (Obrázek 1) (Preedy. 2016).

Obrázek 1

Příklady alifatických monoterpenů a bicyklických uhlovodíkových a oxidovaných monoterpenů.

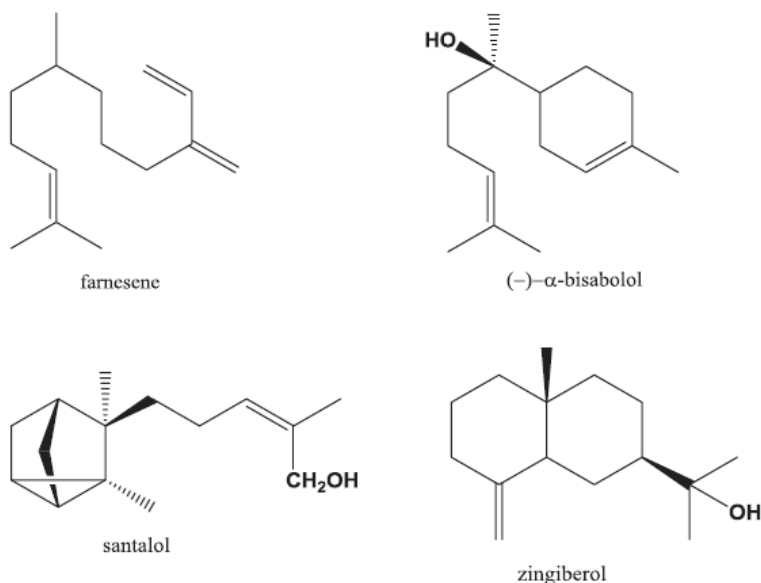


(Preedy, 2016)

Příklady seskviterpenů zahrnují silici santalového dřeva (*Santalum album*) se santalolem, heřmánkovou silici (*Matricaria recutita*) s bisabololem a zázvorovou silici (*Zingiber officinale*) se zingiberolem (Obrázek 2).

Obrázek 2

Příklady alifatických, mono- a bicyckých, uhlovodíkových a oxidovaných seskviterpenů



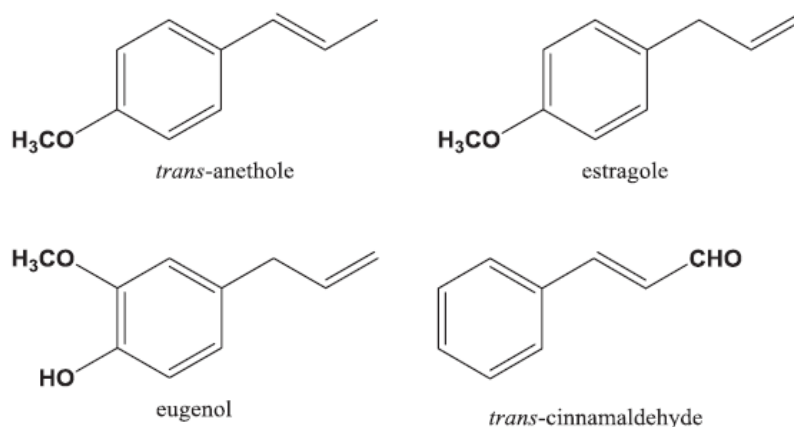
(Preedy, 2016)

4.5.2 Fenoly

Některé aromatické rostliny obsahují silice, které jsou tvořeny hlavně aromatickými deriváty odvozenými od fenylypropanu, aromatické sloučeniny vyskytující se méně často než terpeny. Rostliny obsahující aromatické sloučeniny jsou vzácnější než ty, které obsahují terpeny, což může posloužit k rozlišení původu silic dle druhu rostliny. Některé relevantní příklady silic s těmito typy sloučenin jsou anýz (*Pimpinella anisum*), badyáník (*Illicium verum*) a fenykl (*Foeniculum vulgare*), kde tvoří hlavní složku silice trans-anethol, skořice (*Cinnamomum verum*) s trans-cinnamaldehydem, a hřebíček (*Syzygium aromaticum*) s eugenolem (Bakkali et al., 2008).

Obrázek 3

Příklady fenolických složek silic.



(Preedy, 2016)

4.5.3 Ostatní složky

V silicích mohou být přítomny i jiné těkavé sloučeniny než výše uvedené, navíc se mohou v silici objevit i látky netěkavé. Jiné složky mohou být v silicích přítomny především v případě použití jiných způsobů získání silic, než je destilace. Příkladem mohou být způsoby enfleurage, extrakce rozpouštědly nebo lisováním, kdy se mohou uvolňovat i netěkavé sloučeniny. V mnoha případech jsou to prekurzory známých derivátů, jako jsou seskviterpenové laktony nebo glykosidy, které jsou v některých případech hydrolyzovány nebo přeměněny na těkavé sloučeniny během destilačního procesu, zatímco v tomto případě mohou být v extraktu přítomny v původní podobě (Preedy, 2016).

Mezi další sloučeniny nalezené v silicích patří ligustilid z libečku (*Ligusticum levisticum*) a kumariny, které mohou být zjištěny v malých množstvích v některých významných aromatických rostlinách nebo druzích, jako jsou levandule (*Lavandula* spp.), které mohou obsahovat až 0,3 % kumarinu. Dalšími příklady jsou furanokumarin v bergamotové silici (*Citrus bergamia*), která často obsahuje bergapten, sinalbosid (glukosinolát) z bílé hořčice (*Brassica alba*), salicyláty v Libavkce poléhavé (*Gaultheria procumbens*) a amygdalin z Mandloně obecné (*Prunus dulcis*), který uvolňuje benzaldehyd a kyanovodík (Preedy, 2016).

4.6 Konvenční metody získávání silic

4.6.1 Lisování za studena

Lisování za studena je nejstarší metoda extrakce a používá se téměř výhradně k získávání silic z citrusů. Tato metoda se vztahuje k jakémukoli fyzikálnímu procesu, při kterém jsou žláznaté buňky v kůře a pokožce porušeny tak, že dojde k uvolnění silic. Tento proces vede k uvolnění vodné emulze z matrice a následně je emulze centrifugována, čímž dojde k separaci silice od vodné fáze. (Bousbia et al., 2009).

Důvod pro získávání silic z citrusů pomocí mechanických metod je tepelná nestabilita přítomných aldehydů. Silice, které nepocházejí z citrusového ovoce, jako jsou bobule, se obvykle touto metodou neextrahují (Preedy, 2016).

4.6.2 Extrakce rozpouštědly

Extrakce rozpouštědlem může být použita k extrahování silic, které jsou tepelně labilní (např. z květů). Během této metody, je rostlinný materiál umístěn do rozpouštědlové lázně, která ho rozpouští. Po extrakci kapalná směs, která obsahuje silici (spolu s dalšími sloučeninami), prochází filtračním procesem a dále destilací. Pro extrakci jsou obvykle používány následující rozpouštědla: hexan, ethanol, petrolether a methanol (Preedy, 2016).

Hlavní výhoda extrakce rozpouštědlem oproti destilací spočívá v použití nižší teploty během procesu extrakce, čímž se snižuje riziko vzniku chemických změn silice způsobené vysokými teplotami, které se používají při vodní destilaci. Extrakce rozpouštědly je levná a relativně rychlá, a protože rychlost difúze je ovlivněna teplotou, je možné zvýšit rychlost procesu extrakce použitím zahřátých rozpouštědel. Získaná silice bude obsahovat malé množství rozpouštědla jako zbytku, a proto její použití pro potravinářské účely není možné. Je-li však použitým rozpouštědlem ethanol, je použití silice v potravinách bezpečné. Tato metoda se běžně používá v parfémovém průmyslu (Preedy, 2016).

4.6.3 Metoda enfleurage

Enfleurage je další konvenční metoda extrakce, jejíž první použití se datuje do starověku. Používá se především pro extrakci silic z květů (např. jasmínu). Během této metody se na rostlinném materiálu rozprostře čistý studený tuk bez zápachu. Vonné látky jsou uvolňovány z květů a následně jsou rozpuštěny v tuku. Poté jsou extrahované květy vyměněny za nové a extrakce se takto opakuje až do nasycení tuku, kdy již nedochází k další extrakci. Následně je tuk shromažďován a silice je z tukové fáze extrahována ethanolem. Podle dnešních standardů je však tato metoda časově náročná a nákladná (Preedy, 2016).

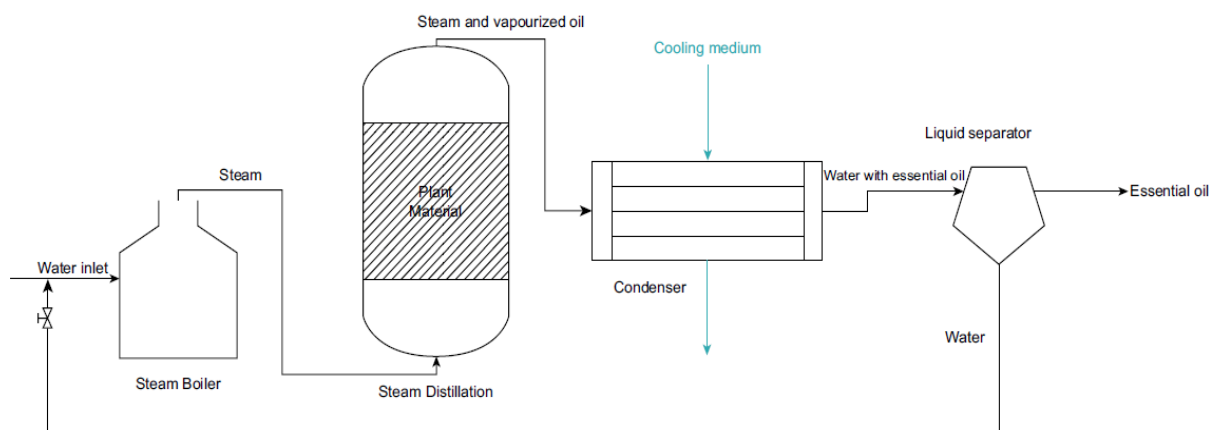
4.6.4 Destilace

Nejčastěji používanou metodou extrakce je metoda destilace, a to buď vodní destilace (Obrázek č. 4) nebo parní. Tento proces extrakce může trvat od 1 do 10 hodin. Množství získané silice závisí na délce doby destilace, teplotě, tlaku a typu rostlinného materiálu. Při destilaci jsou rostlinné materiály vystaveny varu vody nebo páry, aby se z nich mohla být uvolněna silice. Pára a silice jsou následně kondenzovány, shromažďovány a odděleny (Dugo et Di Giacomo, 2002).

I když se extrakce silic destilací jeví jako přímý proces, má mnoho nevýhod. Jelikož jsou silice vystaveny vroucí vodě po dlouhou dobu, mohou se vlivem vysoké teploty nebo kyselosti vody, začít formovat artefakty, které se původně v rostlinném materiálu nevyskytují. To může vést k rozdílům ve složení silic, které jsou extrahovány. Při destilaci může proběhnout hydrolýza esterů na alkoholy a kyseliny což může mít vážné důsledky ve složení v případě silic s vysokým obsahem esterů. Navíc, některé silice vyžadují rektifikaci. Tento proces zahrnuje opakovanou destilaci silice tak, aby se eliminovaly nežádoucí nečistoty (např. vosky), jakož i složky, které mohou vyvolat nepříjemný zápach (Cassel et al., 2009).

Obrázek 4

Schéma průmyslové destilační jednotky pro extrakci silic.



(Masango, 2005).

4.6.5 Superkritická fluidní extrakce

Obvykle jsou používány konvenční metody extrakce, jako je parní destilace a extrakce rozpouštědlem, nicméně, tyto způsoby mají nevýhody, jako je nízký výtěžek, ztráta těkavých sloučenin, dlouhé doby extrakce a zbytky toxických rozpouštědel (Khajeh et al., 2005).

Uvedené problémy vedly k vývoji alternativních technik extrakce, které mohou překonat tyto problémy. Alternativou těchto konvenčních metod je extrakce pomocí superkritické fluidní extrakce (SFE). Při této extrakci je pevný materiál vložen do nádoby, přes kterou proudí superkritická kapalina s danou průtokovou rychlostí. Pro úspěšné SFE je třeba vzít v úvahu několik faktorů. Tyto faktory zahrnují typ vzorku, přípravu vzorků, typ superkritické kapaliny, výběr modifikátorů, způsob dávkování tekutin a podmínky extrakce včetně tlaku, teploty, průtoku superkritické kapaliny a extrakčního času (Lang et al., 2001).

V praxi se SFE provádí obvykle s použitím CO_2 kvůli nízké kritické teplotě, nízké ceně, netoxičtější, jeho absenci zápachu, chuti a jednoduchosti odstraňování bez zbytkových reziduí. Změnou podmínek procesu (např. teplota a tlak CO_2) během extrakce, může být selektivně extrahován olej požadovaného složení (Khajeh et al., 2005).

4.7 Antimikrobiální účinky silic

Burt (2004) uvádí, že za konzervační účinek silic jsou zodpovědné především jejich fenolické složky z důvodu jejich antimikrobiálních vlastností.

Tyto fenolické sloučeniny jsou definovány jako součást důležité skupiny sekundárních metabolitů, které jsou produkovány rostlinami a jsou charakterizovány alespoň jedním aromatickým kruhem (C6), který nese jednu nebo více hydroxylových skupin (Michalak, 2006).

Antimikrobiální účinky tymiánové silice jsou založeny na přítomnosti molekul thymolu a karvakrolu, které jsou řazeny mezi fenolické komponenty obsažené v tymiánové silici. Thymol, který je strukturně velmi podobný karvakrolu, má hydroxylovou skupinu na jiném místě benzenového jádra. U obou substancí dochází k narušování buněčné membrány, čímž způsobují její propustnost (Lambert et al., 2001).

Karvakrol a thymol jsou schopny rozložit vnější membránu gramnegativních bakterií, uvolňovat lipopolysacharidy a zvyšovat permeabilitu cytoplazmatické membrány vůči adenosintrifosfátu (Helander a kol., 1998).

Důkazy ukazují, že minoritní složky silic mají důležitou úlohu v biologických účincích silic, a to prostřednictvím působení synergického efektu mezi ostatními komponenty. Ve studiích bylo zjištěno, že fenolické komponenty hrají rozhodující roli v antimikrobiální aktivitě silic. Fenoly terpenového charakteru jsou poutány amino a hydroxyamino skupinami k proteinům, které jsou lokalizované v bakteriální membráně, čímž se změní jejich propustnost a výsledkem je smrt bakterií (Juven et al., 1994).

Goñi et al. (2009) prokázali antimikrobiální aktivitu par vytvářeného kombinací silic skořice a hřebíčku proti růstu čtyř gramnegativních bakterií (*Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Salmonella choleraesuis*) a čtyřem gram-pozitivním bakteriím (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* a *Enterococcus faecalis*). Tato studie poprvé ukazuje, že kombinace silic v plynné fázi má konzervační účinek proti množení mikroorganismů.

4.7.1 Skořicová silice

Skořice patří mezi nejstarší a nejoblíbenější koření, které lidstvo používá. Se skořicí se obchoduje především v podobě sušené vnitřní kůry stromu nebo s mletou kůrou. Kůrový olej, výtazek kůry a listový olej ze skořice jsou důležitými produkty s přidanou hodnotou. Olej z

kůry se používá v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Olej z listů je levnější než olej z kůry a používá se především jako aroma. Skořicový extrakt, získaný z kůry extrakcí rozpouštědly se používá hlavně k aromatizaci potravinářských výrobků jako koláče a cukrovinky, nealkoholické nápoje a jiné nápoje (Leela, 2008).

Cheng et al., 2006 uvádí, že mezi nejvíce zastoupené sloučeniny přítomné ve skořicové silici jsou cinnamaldehyd, kafr, cinnamyl-acetát, karyofylen, trans α -bergamoten, karyofylen oxid, linalool, geraniol, bornyl acetát, α -cubeben, γ -elemen, α -copaen, guaiol a eugenol.

4.7.1.1 Antifungální účinky

Silná antimykotická aktivita přírodních produktů obsahujících fenolické sloučeniny, jako je linalool, eugenol, menthol, cinnam-aldehyd, thymol a karvarkrol, a zároveň i nadměrné používání toxických fungicidů zvyšujících znečištění životního prostředí vedlo ke zvýšení zájmu o používání silic z bylin a koření v potravinářském průmyslu jako aditiv (Lee et al., 2005). López-Malo et al. (2007), zjistili in vitro a in vivo silnou antifungální aktivitu extraktů ze skořice proti *Aspergillus flavus*. Xing et al. (2010) zhodnotil in vitro a in vivo antifungální aktivitu skořicové silice proti *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* a *Penicillium expansum*. Minimální inhibiční koncentrace skořicové silice proti testovaným plísním byly 0,64 %, 0,16 % a 0,16 % (v/v) pro *R. nigricans*, *A. flavus* a *P. expansum*. Protože cinnamaldehyd byl hlavní sloučeninou detekovanou ve skořicové silici použité v tomto experimentu (76,34%), autoři přiřadili silnou antifungální účinnost silice především této sloučenině.

Lee et al. (2005) ve své studii také zjistili silnou antifungální aktivitu cinnamaldehydu, při porovnání chemického složení silic *Cinnamomum osmophleum* různých zeměpisných původů. Byla objevena antifungální aktivita proti některým stromovým patogenním houbám u silice s převládající složkou cinnamaldehydu a použití dávky 100 $\mu\text{g/ml}$ vykazovalo inhibiční účinek 85,7 % proti plísni *Rhizoctonia solani*, 100,0% inhibiční účinek proti kořenovým plísním *Ganoderma australe* a *Fusarium solani* a 85,8% inhibiční účinek proti listovým plísním *Collectotrichum gloeosporioides*.

Cheng et al. (2006) ve své studii pozorovali antifungální aktivitu skořicové silice z *Cinnamomum osmophleum* z devíti různých zeměpisných oblastí. Výsledky také ukázaly, že hlavní složky cinnamaldehyd a cinnamyl acetát měly nejsilnější antifungální aktivitu s úplnou inhibicí *Trametes versicolor*, *Lenzites betulina* a *Laetiporus sulphureus* v koncentraci 200 $\mu\text{g/ml}$.

4.7.1.2 Antibakteriální účinky

Patogenní bakterie jsou jedním z největších problémů při výrobě, manipulaci a zpracování potravin. Antibakteriální účinek skořicové silice proti *Escherichia coli* O157: H7 a *Salmonella enterica* v jahodové šťávě byl testován a porovnán s antibakteriální aktivitou silice lemongrass a bazalky (Duan et Zhao 2009).

Byly testovány čtyři koncentrace silice: 0, 1, 3, 5 a 10 $\mu\text{l/ml}$ šťávy. Mezi třemi zkoušenými silicemi, vykazuje skořicová silice nejlepší antibakteriální aktivitu, která inaktivuje růst *Escherichia coli* O157: H7 a *Salmonella enterica* s použitím nejnižší koncentrace (1 $\mu\text{l/ml}$) v in vitro testu. Na druhou stranu, testy antimikrobiální aktivity skořicové silice v jahodové šťávě ukázaly, že rychlejší inaktivace *E. coli* O157: H7 byla dosažena s koncentrací 0,5 $\mu\text{l/ml}$ nebo vyšší. Nicméně, na rozdíl od zjištění, které uvedly jiné výzkumy, v této studii antimikrobiální aktivita skořicové silice byla přiřazena eugenolu, který tvořil hlavní složku silice (Duan et Zhao 2009).

Bouhdid et al. (2010) zjistili, že silice s hlavní složkou cinnamaldehydu působí baktericidně proti *Staphylococcus aureus* prostřednictvím mechanismu, kdy dojde k úniku intracelulárního draselného iontu z buněk bakterií, čímž dochází ke značnému snížení metabolické aktivity bakterie a její schopnosti se rozmnožovat.

Mello et al., (2012) ve své studii testovali minimální inhibiční koncentraci (MIC) a minimální baktericidní koncentraci (MBC) skořicové silice proti šesti vybraným patogenním bakteriím potravin.

Yersinia enterocolitica byla nejcitlivější bakterií na přítomnost skořicové silice s hodnotami MIC a MBC 0,075 a 1,25 mg/ml, následované *Listeria monocytogenes* a *Bacillus cereus*, které vykazovaly stejné hodnoty MIC a MBC 2,5 a 5 mg/ml. Nakonec nejvyšší hodnoty MIC a MBC byly získány pro *S. aureus*, *E. coli* a *Salmonella typhimurium*: 5,0 a 10,0 mg/ml. Nicméně v této studii autoři uvedli, že antibakteriální aktivita skořicové silice byla způsobena oxidovanými sloučeninami jako jsou linalool, 1,8-cineol, neral a geranial (Mello et al., 2012).

4.7.2 Silice lemongrass

Lemongrass je vysoká trvalka, patřící čeledi *Poaceae*, jejíž rod *Cymbopogon* má 55 druhů, které se hojně vyskytují v tropických a subtropických oblastech Asie a jsou pěstované v Jižní a Střední Americe, Africe a dalších tropických zemích. Lemongrass roste jako husté

shluky o výšce 1,8 m a šířce 1,2 m, které mají krátké oddenky s podlouhlými listy o šířce 1,3-2,5 cm (Reitz, 1982).

Silice lemongrass je charakteristická svým vysokým obsahem citralu (složeného z neralových a geraniolových izomerů (cca 69%)), který se používá jako surovina pro výrobu vitamínu A a beta-karotenu (Paviani et al., 2006).

Appendini et Hotchkiss, (2002); Serrano et al., (2005) ve svých studiích uvádějí, že silice lemongrass vykazuje antibakteriální účinky.

Silice lemongrass může být přidána do potravin k udržení organoleptických vlastností a zpomalení mikrobiální aktivity, potravinových patogenů, které jsou odpovědné za snížení kvality potravin, znehodnocení potravin a ekonomických ztrát (Masniyom et al., 2012).

4.7.2.1 Antifungální účinky

Silice lemongrass vykazuje fungicidní potenciál. Úplně inhiboval růst 35, 45 a 47 druhů plísní v množství 500 ppm, 1000 ppm a 1500 ppm a jeho fungicidní účinnost zůstala nezměněna po dobu 210 dnů skladování, po níž začala účinnost klesat, čímž silice lemongrass vykazuje potenciál pro uchovávání zemědělských plodin (Mishra et Dubey, 1994). Navíc silice lemongrass vykazuje silnější fungicidní účinky než syntetické fungicidy jako Agrosan GN, Dithane M-43 a oxychlorid měďnatý (Mishra et Dubey, 1994; Adegoke et Odesola, 1996).

Saikia et al. (2001) zjistili, že silice lemongrass vykazuje vyšší antifungální aktivitu než čistý izolát citralu.

Paranagama et al. (2003) uvádějí, že silice lemongrass má fungistatický a fungicidní účinek proti *Aspergillus flavus* izolovaný z rýže pocházející ze Srí Lanky. Fungistatický a fungicidní účinek byl pozorován při použití koncentrace při 0,60 a 1,0 mg/ml, zatímco sporulace byla zcela zastavena při koncentraci 2.8 mg/ml.

Tyagi et al. (2014), dospěli ve své studii k závěru, že silice lemongrass vykazuje antifungální aktivitu proti některým druhům kvasinek, jež se mohou podílet na kažení potravin. Antifungální aktivita silice lemongrass byla pozorována pomocí diskové difuzní metody a kapkové metody u *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida diversa*, *Pichia fermentans*, *Pichia kluyveri*, *Pichia anomala* a *Hansenula polymorpha*. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální fungicidní koncentrace se u těchto mikroorganismů pohybovaly (MFC) od 0,28 do 1,3 mg/ml a od 0,56 do 4,5 mg/ml.

4.7.2.2 Antibakteriální účinky

Silveira et al. (2012) ve svém výzkumu zjistili, že silice lemongrass je nejúčinnější ve srovnání se silicemi (rozmarýnu, fenyklu, oregana, bazalky, vavřínu) proti 12 kmenům bakterií: *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Yersinia enterocolitica*.

Výsledky antimikrobiální aktivity Silveira et al. (2012) jsou v souladu s prací Naik et al. (2010), jejichž výzkum ukazuje, že silice lemongrass je účinná proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím.

Silice lemongrass byla shledána účinnou proti Grampozitivním organismům (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis*), které byly náchylnější než gram-negativní organismy (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*). Byla zjištěna progresivně se zvyšující antibakteriální aktivita s koncentrací silice lemongrass. Maximální účinek byl zjištěn při koncentraci 30 % a minimální účinek byl pozorován při 5% koncentraci silice (Naik et al., 2010).

4.7.3 Mechanismus antimikrobiálního účinku silic

Složení, koncentrace a podíl chemických složek určují biologické účinky silic. Silice obsahující vyšší koncentrace terpenoidů vykazují vyšší antifungální aktivitu v porovnání se silicemi bohatými na monoterpeny a seskviterpeny. Silice bohaté na fenolické složky vykazují u bakterií vyšší poškození cytoplazmatické membrány např. thymol a karvakrol (Kordali, 2005).

Přestože jsou antimikrobiální vlastnosti silic zprostředkovány několika mechanismy, nejvíce se uplatňuje narušení buněčné membrány, což vede k nekróze prokaryotických a eukaryotických mikrobů. Bakteriální buněčná stěna a buněčná membrána jsou důležitými bariérami, které regulují pohyb látek mezi buňkou a okolím. Lipofilní molekuly, které jsou součástí silic, volně procházejí buněčnou stěnou a hromadí se v cytoplazmatické membráně, což vede k výrazným změnám v membráně, které ovlivňují její stabilitu, hydrofobní vlastnosti, propustnost a složení mastných kyselin v membráně (Sikkema et al., 1995).

Schopnost silic narušovat buněčné bariéry vyvolává různé morfologické a fyziologické změny. U bakterií dochází k rozkladu cytoplazmatické membrány, což vede ke ztrátě RNA, bílkovin a iontů a dochází k narušování iontového gradientu, který je rozhodující pro buněčné přežití (Ballal

et al., 2007). Draslík, přítomný ve vysokých koncentracích v prokaryotických a eukaryotických buňkách, je kriticky důležitý kation pro bakterie (Gram-negativní a Gram-pozitivní), který je nepostradatelný pro udržení osmotické rovnováhy, turgorového tlaku, pH, metabolismu glukózy, spotřeby kyslíku a aktivaci buněčných enzymů (Epstein, 1986).

Ztráta draslíku, zprostředkovaná porušením buněčných membrán vlivem silic, nakonec vede k smrti buněk. Silice také destabilizují buněčnou stavbu cytoplazmatické membrány. Tímto dochází k narušení funkce protonové pumpy, a tudíž dochází k nekontrolovanému toku iontů H^+ , což vede k porušení intracelulárního pH a inhibici pohybu molekul dependentních na H^+ ionty (Bakkali et al., 2008).

Kromě regulace pohybu látek v buňce se bakteriální buněčná membrána podílí také na přenosu energie. Produkce a hydrolýza adenosintrifosfátu (ATP) závisí na membránovém potenciálu a protonovém gradientu, tyto hybné síly jsou však sníženy v důsledku působení lipofilních složek silic. Bylo prokázáno, že bakteriální buňky ošetřené silicemi dramaticky ztrácejí ATP a nakonec ztratí životaschopnost. Pokles ATP v poškozených buňkách není pouze v důsledku úniku do vnějšího prostředí, ale také kvůli přerušení syntézy a hydrolýzy ATP na poškozených membránách buněčných struktur (Bakkali et al., 2008).

Změny struktury a složení lipidové dvojvrstvy po expozici silicemi mají za následek narušení struktury a funkce ATPáz, transferáz, oxidoreduktáz, kanálových proteinů a dalších proteinů podílejících se na respiraci a metabolismu. Silice také koagulují buněčný obsah a inhibují enzymy důležité pro metabolismus v bakteriích, jako je tomu v případě inhibice aminokyselinové dekarboxylázy pomocí silice bohaté na cinnamaldehyd (Di Pasqua et al., 2006).

4.7.4 Synergický efekt silic a tepelného záhřevu

Synergický účinek aplikace přírodního antimikrobiálního přípravku spolu s fyzikálním ošetřením může snížit intenzitu fyzikálního ošetření, jež zahrnuje tlak, teplotu a celkový čas, který je potřebný k dosažení dostatečného stupně poškození k usmrcení buněk. Snížené množství přírodních antimikrobiálních látek může být použito v kombinaci s fyzikálními úpravami k dosažení požadované úrovně antimikrobiální aktivity. K harmonizaci požadavků spotřebitelů a nezbytných bezpečnostních standardů, tradičních prostředků pro kontrolu mikrobiálního znehodnocení může být dosaženo inovativní technologií využívající kombinaci fyzikálního ošetření spolu s aplikací silic. Aplikace silic a jejich jednotlivých složek do ovocných šťáv spolu s použitím nových vznikajících technik fyzikálního ošetření je úspěšná

díky snížení koncentrace antibakteriálních látek, které by mohly negativně ovlivnit senzorické hodnocení produktu a také díky snížení aplikované teploty nutné k dostatečnému ošetření (Espina et al., 2011; Ouazzou et al., 2011).

Espina et al. (2012) navrhli použití kombinovaného ošetření mírným tepelným záhřevem spolu s přidáním silic z citrusového ovoce pro uchování ovocných šťáv. Při testovaných podmínkách bylo synergického efektu dosaženo přidáním citronové silice o koncentraci 75 µl/l, což umožnilo snížit dobu ošetření (5,7×) nebo snížit teplotu zpracování (4,5 °C) s ohledem na samotný účinek tepelného ošetření bylo dosaženo redukce cílového patogenu *E. coli* O157: H7 o 5 log.

4.8 Údržnost ovocných šťáv

Spotřeba ovocných šťáv v posledních letech neustále vzrůstá díky jejich příznivým zdravotním účinkům (Ashurst, 2004). Spotřebitelská poptávka po nepasterovaných ovocných šťávách oproti pasterovaným šťávám se v posledních desetiletích zvýšila kvůli jejich vyššímu obsahu vitamínu C a dalších antioxidantů, jelikož tyto složky hrají důležitou roli v prevenci proti civilizačním chorobám. (Melgar et al., 2012).

Nicméně v nepasterovaných šťávách může dojít ke ztrátě kvality z důvodu mikrobiologických, enzymatických, chemických nebo fyzikálních změn. Nepasterované šťávy nejsou tepelně ošetřeny a mohou tak přispívat ke zvýšenému riziku kontaminace. Přestože jsou v potravinářských procesech používány moderní technologie a uplatňovány mikrobiologické bezpečnostní standardy ke snížení onemocnění z potravin, tak znehodnocení produktů mikrobiální kontaminací v průmyslových zemích narůstá (Sospedra et al., 2012).

Z tohoto důvodu světové regulační orgány pro potraviny vydávají směrnice za účelem kontroly a snížení výskytu onemocnění z potravin a proti znehodnocení produktů ve prospěch konzumentů a odvětví ovocných šťáv (Tribst et al., 2009).

4.8.1 Mikroorganismy kontaminující ovocné šťávy

Změny v dietních a sociálních návycích spolu s metodami konzervace jsou také důvody, proč došlo ke zvýšení onemocnění spojených s konzumací čerstvých ovocných šťáv v posledních letech. Mezi hlavní důvody kontaminace patogeny byla příčina snížení obsahu ovocné složky a přidavek vody nevyhovující hygienickým požadavkům, které pak vedly k onemocněním po požití výrobků podobného původu. Většina z hlášených onemocnění byla

způsobena po konzumaci nepasterovaných šťáv, jako je jablečná, pomerančová, citrónová, ananasová, mrkvová, banánová, acaiová a směsných ovocných šťáv (Bevilacqua et al., 2011).

Znehodnocení ovocných šťáv může být způsobeno třemi hlavními příčinami, mikrobiální kontaminací, oxidace vedoucí ke žluknutí a hnědnutí. Komponenty ovocné šťávy poskytují ideální prostředí pro kontaminaci mikroorganismy, většina šťáv má však nižší pH (4,5), a z tohoto důvodu mají nejvyšší potenciál znečistit tyto produkty acidotolerantní mikroorganismy (Stratford et al., 2000).

4.8.1.1 Kvasinky

Kvasinky převažují v ovocných šťávách, protože mají vysokou toleranci ke kyselému prostředí a mnoho z nich má schopnost růst anaerobně. Těmito vlastnostem tak přispívají k téměř polovině hlášených komerčních kontaminací ovocných šťáv, což je primárně připisováno nedostatečné hygieně rostlinných částí (Stratford et al., 2000).

Většina kvasinek vykazuje vysokou fermentační schopnost, za tvorby produktů ethanolu a CO₂ z cukrů. Příkladem mohou být kvasinky *Pichia anomala*, které jsou známé vytvářením filmů na hladině džusů a vín (Pitt et Hocking, 2009).

Saccharomyces cerevisiae a *Schizosaccharomyces pombe* jsou řazeny mezi nejvýznamnější mikroorganismy znehodnocující ovocné šťávy (Stratford, 2006).

Pichia, *Candida*, *Saccharomyces* a *Rhodotorula* jsou rody, které se nejvíce podílejí na kažení ovocných šťáv a mezi druhy, které byly nejčastěji izolovány u zkažených ovocných šťáv patří: *Pichia membranifaciens*, *Candida maltosa*, *Candida sake*, *Saccharomyces bailii*, *Saccharomyces bisporus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces bayanus*, *Brettanomyces intermedius*, *Saccharomyces pombe*, *Torulopsis holmii*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Dekkera bruxellensis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces microellipsodes* a *Dekkera naardenensis* (Bevilacqua et al., 2011).

4.8.1.2 Bakterie

Několik ohnisek onemocnění způsobených konzumací kontaminovaných ovocných šťáv jež způsobily rody bakterií *Salmonella*, *Escherichia coli* O157: H7 a *Cryptosporidium* byly hlášeny ve Spojených státech v Centru pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC, 1996).

Nejběžnější patogeny spojené s kontaminací ovocných šťáv jsou *E. coli* O157: H7 a O111, *Salmonella* sp., *Cryptosporidium*. Několik dalších ohnisek onemocnění z potravin po požití neošetřených ovocných šťáv bylo způsobených *Vibrio cholerae*, *Clostridium botulinum*. Všechny hlášené případy kontaminace patogenními mikroorganismy byly způsobeny nepasterovanými šťávami. Salmonelové infekce jsou běžně spojovány s potravinami živočišného původu, avšak v posledních letech byly zaznamenány salmonelózy a enterohemorhagické výskyty *E. coli* spojené s konzumací nejrůznějších nepasterovaných šťáv (Massilia et al., 2009; EFSA, 2013; EFSA, 2014; EFSA, 2015).

Kontaminace ovoce způsobena bakteriemi fekálního znečištění byla nedávno spojena s vypuknutím netyphoidní salmonelózy pocházející z čerstvé ovocné šťávy. V roce 2005 bylo hlášeno 152 případů infekce pocházející ze *Salmonella Typhimurium*, která se objevila v komerčně distribuovaném nepasterovaném pomerančovém džusu, kdy ke kontaminaci došlo z důvodu nedodržení systému analýzy rizika a kritických kontrolních bodů (Keller et Miller, 2006).

4.8.1.3 Plísně

Jelikož jsou ovocné šťávy obvykle pasterované, přežívající organismy jsou většinou tepelně odolné plísně nebo jejich spory, pokud není hotový produkt kontaminován po pasteraci. Několik druhů plísní je schopno produkovat různé mykotoxiny v ovocných šťávách (Vasavada, 2003).

Mykotoxiny jsou produkovány vláknitými houbami jako sekundárními metabolity bez biochemického významu pro vývoj hub a jsou charakteristické svou nízkou molekulovou hmotností. Při vytvoření optimálních podmínek pro syntézu mykotoxinů, (vlhkost, přístup kyslíku, teplota) dochází k tvorbě těchto toxických metabolitů, které mohou způsobit onemocnění zvířat a lidí (Bennett et Klich, 2003).

Penicillium expansum, *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium roqueforti* var. *carneum*, *Penicillium granulatum*, *Penicillium claviforme*, *Penicillium funiculosum* a *Byssochlamys* spp. mohou produkovat mykotoxin patulin v jablečné šťávě (Vasavada, 2003).

Předchozí studie prokázaly, že patulin může vést k akutním příznakům, jako jsou křeče, agitovanost, ulcerace, edém, střevní zánět a zvracení. Mohou způsobit chronické neurotoxické, imunotoxické, genotoxické a teratogenní účinky u hlodavců (Boon et al., 2009).

Rod *Byssochlamys* také může produkovat byssotoxin A a kyselinu bysochlamovou. Dalšími mykotoxiny vyskytujícími se ovocné šťávě mohou být také ochratoxin A, citrinin a kyselina peniciliová (Vasavada, 2003).

Růst plísní může mít za následek nepříjemnou chuť, redukci obsahu cukru a produkci mykotoxinů (Keller et Miller, 2006).

4.8.2 Prevence mikrobiální kontaminace ovocných šťáv

Současný trend konzervace ovocných šťáv je založen na aplikaci určitých metod, které dokáží zajistit kvalitní produkty se sníženým množstvím přidaných konzervačních látek a vysokou výživovou hodnotou, zatímco lze současně udržovat produkt bezpečný z mikrobiologického hlediska. Metody uchovávání používané při prodloužení doby použitelnosti ovocných šťáv zahrnují (pasterace a sterilizace), okyselení, fermentace a přidání chemických konzervačních látek. V poslední letech se také objevují netermální techniky ošetření a přídavek přírodních antimikrobiálních látek (Massilia et al., 2009).

4.8.2.1 Pasterace

Tradičně je mikrobiální stability ovocných šťáv dosaženo tepelným ošetřením (80–95 °C po dobu do 15 vteřin), nicméně tento proces vede ke ztrátě původních chuťových a aromatických látek takto ošetřených ovocných šťáv. Ošetření nízkou teplotou po dlouhou dobu a ošetření vysokou teplotou po krátkou dobu jsou nejčastěji používané techniky pasterace ovocné šťávy (Aneja et al., 2014).

Pasterace však vede ke snížení kvality a čerstvosti produktu. Z tohoto důvodu v posledních několika desetiletích byly navrženy některé metody bez použití pasterace. Tyto nové technologie mají potenciál poskytovat bezpečné ovocné šťávy s prodlouženou trvanlivostí. Některé z těchto technik, které zahrnují ošetření vysokým hydrostatickým tlakem, pulzním elektrickým polem a ultrazvukem již začaly být komerčně využívány. Tyto metody nevyužívající termální ošetření mají potenciál snížit mikrobiální kontaminaci o 5 log (Aneja et al., 2014) a mohou poskytnout čerstvé, bezpečné šťávy s prodlouženou dobou skladovatelnosti, ovšem nevýhodou těchto metod je jejich vysoká cena, která se tak projevuje i na ceně produktu (Pandey et Negi, 2018)

4.8.2.2 Chemické konzervanty

Chemická konzervační činidla, jako je benzoát sodný, metabisulfit draselný a sorbát draselný se běžně používají k prodloužení doby trvanlivosti ovocných šťáv a nápojů. Nicméně

je v této oblasti vedena diskuse ohledně rizik a přínosů těchto chemických konzervačních látek z důvodu, že některé z nich jsou spojovány s poruchami trávicí soustavy, rakovinou, neurologickými poruchami (např. hyperkinetická porucha) (Sasaki et al., 2002).

Bezpečnost mnoha chemických konzervačních látek používaných v potravinách se navíc ještě nepodařilo určit. Chemická konzervační činidla mohou způsobovat respirační problémy a anafylaktický šok (Simon, 2004).

Mezi běžně používané chemické konzervační látky v ovocných šťávách patří kyselina benzoová a její deriváty, kyselina salicylová, kyselina sorbová, SO₂ atd. (Ranganna, 1986).

V současnosti však někteří spotřebitelé vnímají použití těchto syntetických konzervačních u produktů nekvalitní či nezdravé, což poté vede tyto konzumenty k odmítání potravinářských výrobků konzervovanými syntetickými látkami (Tribst et al., 2009).

V souvislosti s konzervačními činidly bylo zjištěno, že některé z nich mohou být mikroorganismy metabolizovány nebo vlivem fyzikálních faktorů transformovány na toxické látky. United Kingdom Food Standards Agency (2006) uvádí, že z kyseliny benzoové může vznikat benzen, který má karcinogenní účinky. *Saccharomyces cerevisiae* a *Pichia anomala* jsou schopny dekarboxylovat kyselinu sorbovou na 1,3-pentadien, jehož přítomnost pak může způsobit petrolejový zápach. (Stratford et al., 2007) a *Saccharomyces pombe* mohou vytvářet vady chuti, pokud jsou přítomny siričitan (Pandey et Negi, 2018).

4.8.2.3 Použití přírodních konzervantů

Tepelná pasterace má tendenci vyvolávat některé nežádoucí účinky na potraviny, jako je ztráta živin a pozitivních aromatických látek (Corbo et al., 2010) a chemické konzervanty mohou mít negativní zdravotní účinky (Tribst et al., 2009).

Z tohoto důvodu v poslední době roste požadavek konzumentů na čerstvé a bezpečné potraviny bez přidaných syntetických konzervantů a současně roste zájem po výrobcích v nichž jsou použity konzervanty pocházející z přírodních zdrojů (Massilia et al., 2009).

Jako přírodní konzervační látky mohou být využity bakteriociny, organické kyseliny, silice a fenolické sloučeniny (Massilia et al., 2009).

Silice se v současnosti používají v široké škále spotřebního zboží, jako jsou cukrářské výrobky, nealkoholické nápoje a destilované alkoholické nápoje. Kromě jejich rozšířeného použití jako příchutí (Kettenring et Geeganage, 2010), se používají v oblastech výživy a zemědělství pro své antibakteriální, antimykotické, antivirotické, nematocidní, insekticidní a antioxidační vlastnosti (Turek et Stintzing, 2013).

Silice jsou nejen používány jako antioxidanty a konzervační látky v potravinách (Tiwari et al., 2009), ale bylo nalezeno i jejich využití jako látky chránící plodiny (Adorjan et Buchbauer, 2010). Mnoho silic má antioxidační (Dandlen et al., 2010) a antimikrobiální vlastnosti (Lang et Buchbauer, 2012), ale jejich aplikace jako konzervační látky vyžaduje dobré znalosti o jejich vlastnostech, včetně citlivosti cílových mikroorganismů, specifický způsob účinku, jejich antimikrobiální účinnost a složení matrice potraviny a její vliv na antimikrobiální vlastnosti silic (Hyldgaard et al., 2012).

Příkladem je významná aktivita silice lemongrass v ovocných šťávách proti kvasinkám, což umožňuje použití této silice při konzervaci, jelikož je silice lemongrass toxikologicky považována za bezpečnou (Tyagi et al., 2014).

5 Materiál a metody

5.1 Mošt

Pro experimentální část této práce byl použit jablečno-řepný mošt, dodaný přímo od výrobce pana Václava Větrovce. Tento mošt byl vyroben lisováním jablek z odrůdy Spencer a červené řepy (*Beta vulgaris* var. *Vulgaris*), které byly sklizeny v roce 2016. Jablka spolu s řepou byly před lisováním namíchaný v poměru jablka:řepa 80:20. Před samotnou přípravou vzorků nebyl mošt ošetřen, ale skladován při teplotě -20 °C.

5.2 Chemikálie

Kyselina benzoová, Plate count agar, NaCl, pepton izolovaný z kaseinu, tween 80, silice: lemongrass, oregano, skořice, eukalyptus, máta (cornmint), hřebíček byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika).

5.3 Screening

Za účelem podrobnějšího testování vybraných druhů silic bylo nejprve provedeno testování inhibičních účinků silic a tepelného záhřevu v jablečno-řepném moštu. Pro testování byly vybrány silice lemongrass, oregano, skořice, eukalyptus, máta a hřebíček. Při screeningové analýze byla pomocí spektrofotometrie (Thermo Scientific Multiskan Ascent Microplate Reader Type 354, Thermo Fisher Scientific) průběžně měřena turbidita (zákal), který byl způsoben nárůstem mikroorganismů. Měření bylo prováděno v předem stanovených časových intervalech po dobu 29 dní a následně byla hodnocena inhibiční aktivita silic jednotlivých vzorků pomocí růstových křivek.

5.3.1 Příprava vzorků

Jablečno-řepný mošt byl ošetřen následujícími způsoby: přidáním vždy jedné silice a použití dvou časů tepelných ošetření (Tabulka 1). Jako metoda kontroly bylo použito vzorku bez ošetření a vzorku pouze tepelně ošetřeného. U každé z těchto variant byly provedeny tři opakování.

Tabulka 1 Varianty připravených vzorků

Silice	Teplota (°C)	Doba ošetření (minuty)	Koncentrace silice mg/l
Skořice	54	10	100
Lemongrass	54	10	100
Oregano	54	10	100
Eukalyptus	54	10	100
Máta (cornmint)	54	10	100
Hřebíček	54	10	100
Blank	-	0	0
Kontrola	80	10	0
Lemongrass	54	20	100
Oregano	54	20	100
Eukalyptus	54	20	100
Máta (cornmint)	54	20	100
Hřebíček	54	20	100
Blank	-	0	0
Kontrola	80	10	0

Pro všechny varianty bylo celkem odměřeno 480 ml jablečno-řepného moštu. Pro silice skořice (*Cinnamomum zeylanicum*), lemongrass (*Cymbopogon citratus*), oregano (*Origanum vulgare*), eukalyptus (*Eucalyptus globulus*), máta (*Mentha arvensis*), hřebíček (*Eugenia* spp.) byl připraven zásobní roztok o koncentraci 100 mg/l moštu, který byl následně podroben homogenizaci, po dobu deseti vteřin při 20 000 ot./min (T18 digital Ultra-Turrax, IKA) za účelem vzniku nanoemulze voda-silice. Z každé varianty silice byl za aseptických podmínek napipetován objem 10 ml do skleněných sterilních zkumavek o objemu 20 ml. Zkumavky byly uzavřeny kovovým víčkem a následně byly takto připravené vzorky protřepány na třepačce Vortex při 2500 ot./min po dobu pěti vteřin.

Poté byla provedena tepelná ošetření při teplotě 54 °C po dobu 10 minut a 54 °C po dobu 20 minut a pro kontrolní ošetření byla použita teplota 80 °C po dobu deseti minut. Tepelná ošetření byla provedena ve vodní lázni Medingen W12 a pro kontrolu teploty uvnitř zkumavek byl použit digitální teploměr Heidolph EKT Hei-Con. Vzorky byly následně skladovány při teplotě 23±2 °C a v temnu.

5.3.2 Odběr a příprava vzorků pro analýzu

Jednotlivé vzorky byly za aseptických podmínek ve flowboxu jednotlivě protřepány na třepačce Vortex při 2500 ot./min po dobu pěti vteřin a následně bylo z každého vzorku odpipetováno sterilní špičkou 100 µl na mikrotitrační destičku Verkon o 96 jamkách. Před

odebráním a po odebrání vzorku ze zkumavky bylo vždy ožehnuto hrdlo zkumavky plamenem a následně byl vzorek ihned uzavřen. Po odebrání vzorků byly vzorky uloženy v pokojové teplotě a temnu.

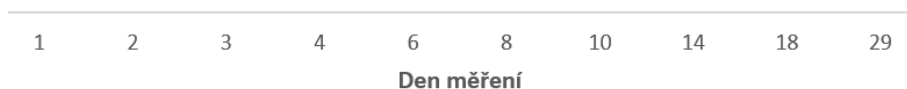
5.3.3 Měření turbidity pomocí spektrofotometrie

Pro samotné měření byla mikrotitrační destička s odebranými vzorky umístěna do přístroje Thermo Scientific Multiskan Ascent Microplate Reader Type 354, který je spojen s požadovanou PC sestavou vybavenou softwarem Ascent software verze 2.6.

Před analýzou byl přístroj seřízen pro typ mikrotitrační destičky Verkon 96, následně bylo nastaveno třepání mikrotitrační destičky na 840 ot./min po dobu pěti vteřin a pro měření byl použit filtr o vlnové délce 405 nm. Po měření byly hodnoty absorbancí jednotlivých jamek mikrotitrační destičky tříděny a uchovány pomocí softwaru Microsoft Excel. Jednotlivá měření byla provedena v intervalu ode dne, kdy vzorky byly připraveny do 29. dne od připravení vzorků (Obrázek 5).

Obrázek 5

Osa znázorňuje, v jakých intervalech v rámci dnů byla provedena měření.



5.4 Analýza účinnosti ošetření kombinací silic a tepelného záhřevu

Při analýze byla testována účinnost ošetření jablečno-řepného moštu pomocí kombinace silic a tepelného ošetření. Pro testování byly vybrány silice skořice a lemongrass. Při analýze byla pomocí spektrofotometrie průběžně měřena turbidita (zákal), který byl způsoben nárůstem mikroorganismů. Měření bylo prováděno v předem stanovených časových intervalech po dobu 29 dní a následně byla hodnocena inhibiční aktivita silic jednotlivých vzorků pomocí růstových křivek.

5.4.1 Příprava vzorků

Jablečno-řepný mošt byl ošetřen následujícími způsoby: Přidáním dvou různých silic o třech rozdílných koncentracích a použitím tří odlišných teplot (Tabulka 2). Jako metoda

kontroly bylo použito ošetření kyselinou benzoovou, ošetření kyselinou benzoovou a teplotním ošetřením, vzorky ošetřeny pouze teplotou, vzorky bez ošetření a vzorky ošetřené pouze silicemi o třech koncentracích (Tabulka 3). U každé z těchto variant byla provedena tři opakování.

Tabulka 2 Varianty testovaných vzorků s kombinací silice a teploty

Silice	Teplota (°C)	Doba ošetření (minuty)	Koncentrace silice mg/l
Skořice	54	10	64
Skořice	54	10	128
Skořice	54	10	256
Skořice	60	10	64
Skořice	60	10	128
Skořice	60	10	256
Skořice	64	10	64
Skořice	64	10	128
Skořice	64	10	256
Lemongrass	54	10	64
Lemongrass	54	10	128
Lemongrass	54	10	256
Lemongrass	60	10	64
Lemongrass	60	10	128
Lemongrass	60	10	256
Lemongrass	64	10	64
Lemongrass	64	10	128
Lemongrass	64	10	256

Tabulka 3 Varianty kontrolních ošetření

Silice/konzervant	Teplota (°C)	Doba ošetření (minuty)	Koncentrace mg/l
Skořice	-	0	64
Skořice	-	0	128
Skořice	-	0	256
Lemongrass	-	0	64
Lemongrass	-	0	128
Lemongrass	-	0	256
Kys. benzoová	-	0	150
Kys. benzoová	54	10	150
Kys. benzoová	60	10	150
Kys. benzoová	64	10	150
Blank	-	0	0
Pasterace	90	1	0

Pro všechny varianty bylo odměřeno 560 ml jablečno-řepného moštu. Pro každou skupinu testovaných silic byl vytvořen zásobní roztok o koncentraci 512 mg/l, který byl poté podroben homogenizaci po dobu deseti vteřin, pomocí přístroje T18 digital Ultra-Turrax firmy IKA, za účelem vzniku nanoemulze voda-silice. Zhomogenizovaný zásobní roztok byl použit pro přípravu finálních koncentrací 64 mg/l, 128 mg/l a 256 mg/l pro silice lemongrass a skořice. Následně byly připravené varianty daných koncentrací za aseptických podmínek napipetovány do sterilních penicilinek, a poté byly penicilinky uzavřeny gumovým septem a hliníkovou korunkou. Uzavřené penicilinky byly protřepány na třepačce Vortex při 2500 ot./min po dobu pěti vteřin.

Následně byla provedena tepelná ošetření 54 °C, 60 °C, 64 °C po dobu deseti minut. Pro tepelné ošetření byla použita vodní lázeň Medingen W12 a pro kontrolu teploty uvnitř penicilinky byl použit digitální teploměr Heidolph EKT Hei-Con.

Pro varianty kontrol byla připravena ošetření silicí v koncentracích 64 mg/l, 128 mg/l, 256 mg/l bez tepelného ošetření, ošetření kyselinou benzoovou v koncentraci 150 mg/l bez použití tepelného ošetření, ošetření kyselinou benzoovou s kombinací teplot 54 °C, 60 °C, 64 °C, varianta bez ošetření, ošetření teplotu 90 °C po dobu jedné minuty.

5.4.2 Odběr vzorků a příprava vzorků pro analýzu

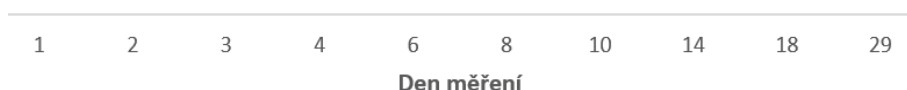
Vzorky v penicilinkách byly za aseptických podmínek ve flowboxu jednotlivě protřepány na třepačce Vortex při 2500 ot./min po dobu pěti vteřin. Následně bylo z každého vzorku přes gumové septum odebráno 150 µl sterilní injekční stříkačkou a vzorek byl nanesen na mikrotitrační destičku Verkon 96 o 96 jamkách. Před odebráním a po odebrání vzorku z penicilinky, bylo septum penicilinky vždy ožehnuto plamenem. Po nanesení všech vzorků injekční stříkačkou byl přenesen objem 100 µl z každé jamky pomocí multikanálové pipety na druhou mikrotitrační destičku, aby bylo dosaženo stejného objemu ve všech jamkách mikrotitrační destičky. Po odebrání vzorků byly vzorky uloženy v pokojové teplotě a temnu.

5.4.3 Měření turbidity pomocí spektrofotometrie

Pro samotné měření byla mikrotitrační destička s odebranými vzorky umístěna do přístroje Thermo Scientific Multiskan Ascent Microplate Reader Type 354, který je spojen s požadovanou PC sestavou vybavenou softwarem Ascent software verze 2.6.

Před analýzou byl přístroj seřízen pro typ mikrotitrační destičky Verkon 96, následně bylo nastaveno třepání mikrotitrační destičky na 840 ot./min po dobu pěti vteřin a pro měření byl použit filtr o vlnové délce 540 nm. Po měření byly hodnoty absorbancí jednotlivých jamek mikrotitrační destičky tříděny a uchovány pomocí softwaru Microsoft Excel. Jednotlivá měření byla provedena v intervalu ode dne kdy vzorky byly připraveny do 29. dne od připravení vzorků (Obrázek 5).

Obrázek 5 Osa znázorňuje, v jakých intervalech v rámci dnů byla provedena měření.



5.5 Stanovení celkového počtu mikroorganismů

Ve vzorcích připravených dle kapitoly 5.4.1 byl stanovován celkový počet mikroorganismů pomocí kapkové metody na Plate count agaru během 31 dní.

5.5.1 Odběr vzorků a příprava vzorků

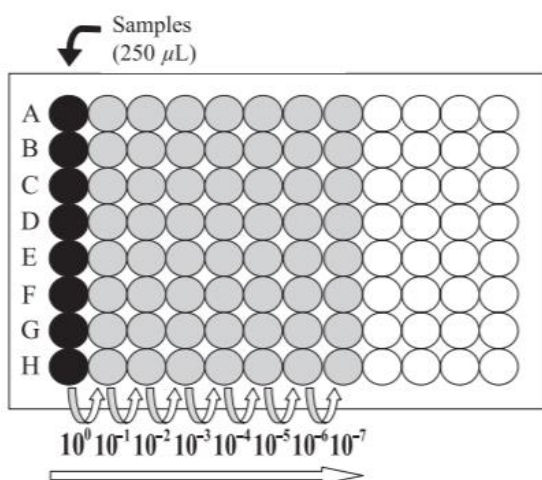
Vzorky v penicilinkách byly za aseptických podmínek ve flowboxu jednotlivě protřepány na třepačce Vortex při 2500 ot./min po dobu pěti vteřin. Následně bylo z každého vzorku přes gumové septum odebráno 100 μ l sterilní injekční stříkačkou a vzorek byl nanesen na mikrotitrační destičku Verkon o 96 jamkách. Před odebráním a po odebrání vzorku z penicilinky, bylo septum penicilinky vždy ožehnuto plamenem. Po odebrání vzorků byly vzorky uloženy v pokojové teplotě a temnu.

Za aseptických podmínek a se sterilními špičkami bylo z každé varianty vzorku napipetováno 80 μ l na další mikrotitrační destičku ve čtyřech opakováních. Následně bylo připraveno 500 ml fyziologického roztoku. Pro přípravu 500 ml fyziologického roztoku bylo použito 4,25 g NaCl, 0,5 g peptonu a 0,5 ml Tweenu 80. Tween 80 byl použit pro udržení nanoemulze voda-silice, která byla vytvořena ve vzorcích moštu pomocí homogenizátoru turrax.

Do následujících šesti jamek pod jednotlivými vzorky bylo napipetováno multikanálovou pipetou 180 μ l fyziologického roztoku. Poté bylo pomocí multikanálové pipety odebráno z řady vzorků 20 μ l, jež byly pipetovány do následující jamky s fyziologickým roztokem. Pro promíchání vzorku s fyziologickým roztokem bylo použito třikrát za sebou reverzního pipetování. Následně se znovu multikanálovou pipetou odebralo z takto promíchaných vzorků

20 μl , které byly pipetovány do následující řady jamek s fyziologickým roztokem a znovu reverzně pipetovány pro důkladné promíchání. Takto bylo postupováno až do šesté řady jamek s fyziologickým roztokem. Tímto způsobem bylo dosaženo ředící řady od 10^{-1} - 10^{-6} . Postup znázorněn na obrázku 6.

Obrázek 6 Ředící řada dle kapkové metody



(Chen et al., 2003)

Z mikrotitrační destičky s připravenou ředící řadou bylo poté na Petriho misky s deseti ml ztuhlého Plate count agaru firmy Sigma-Aldrich pomocí multikanálové pipety nanášeno 5 μl inokula z každé jamky vzestupně, dle ředící řady od 10^{-1} - 10^{-6} . Petriho misky byly po zaschnutí inokula umístěny do termostatu o teplotě 37 $^{\circ}\text{C}$ na dobu 24 hodin a následně byly spočítány vzrostlé kolonie bakterií jednotlivých vzorků v daných ředěních.

5.6 Výpočty a statistické zpracování dat

Po uplynutí 24 hodin za teploty 37 $^{\circ}\text{C}$ nutné pro inkubaci vzorků, byly spočítány kolonie na Petriho miskách a poté byly hodnoty dosazeny do níže uvedeného vztahu, z jehož výsledku bylo zjištěno množství KTJ/g jablečno-řepného moštu.

$$N = \frac{\sum c}{V} (n_1 + 0,1 n_2) d$$

N..... Počet KTJ/g

$\sum c$Součet kolonií spočítaných na petriho miskách

V.....Objem inokula

d.....Faktor prvního použitého ředění

n_1Počet misek vyššího ředění

n_2Počet misek nižšího ředění

Poté byly hodnoty KTJ/g vyjádřeny jako log KTJ/g. Následně byly výsledky stanovení celkového počtu mikroorganismů statisticky zpracovány a vyhodnoceny pomocí softwaru MS Excel a Statistika 12. Pomocí těchto nástrojů byly zjišťovány nejen statistické parametry (aritmetický průměr a směrodatná odchylka), rovněž byla data statisticky hodnocena pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) a dále analyzována pomocí Scheffeho testu. Při testování dat a zjišťování statisticky významných rozdílů byla použita hladina významnosti 0,05.

Absorbance získané při měření kombinace inhibiční aktivity silic a tepelného záhřevu byly zpracovány a statisticky vyhodnoceny v programu MS Excel, kde byly zjišťovány základní statistické parametry, jako je aritmetický průměr a směrodatná odchylka.

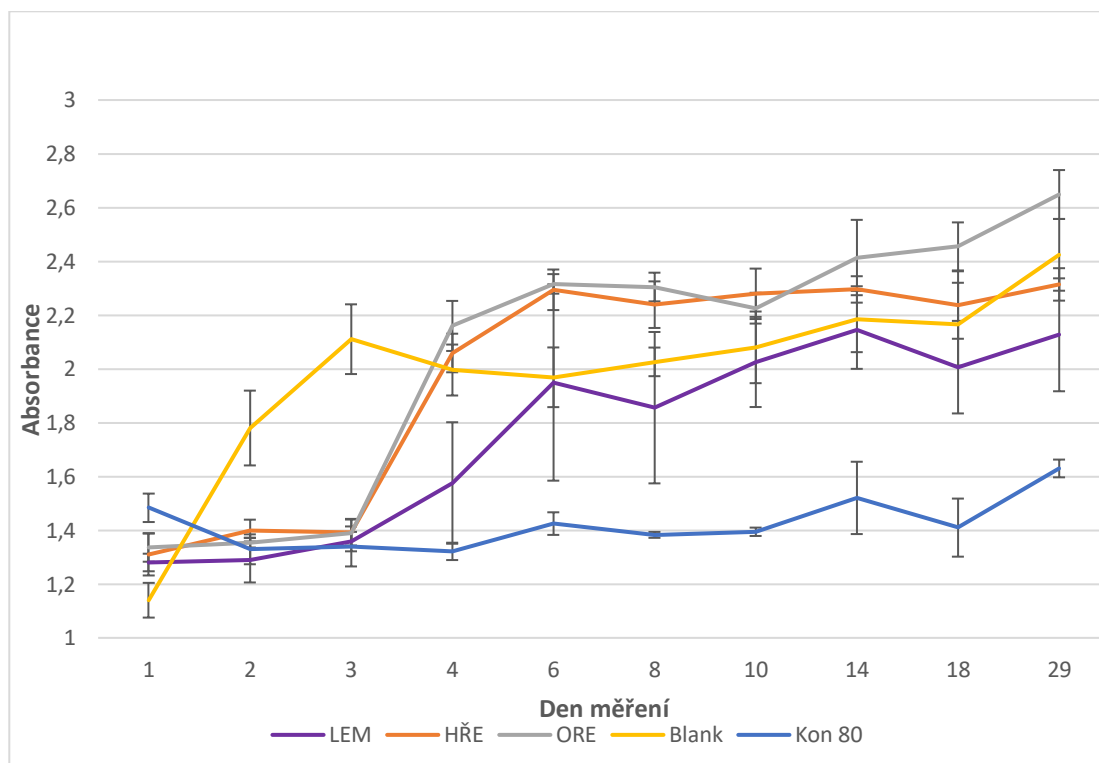
6 Výsledky

6.1 Screening antimikrobiální aktivity silic

Při screeningu byla měřena turbidita jednotlivých vzorků, na jejíž základě mohlo být usouzeno, které z testovaných silic (lemongrass, oregano, skořice, eukalyptus, máta (cornmint), hřebíček) mají nejvyšší inhibiční účinek proti růstu mikroorganismů. Silice byly použity v koncentraci 100 mg/l spolu s tepelnými ošetřeními 54 °C po dobu deseti minut a 54 °C po dobu dvaceti minut. Testované vzorky byly porovnávány proti kontrole bez ošetření a kontrole ošetřené na 80 °C po dobu deseti minut. Vzorky byly sledovány v daných intervalech od prvního dne přípravy vzorků po 29. den.

6.1.1 Výsledky měření turbidity

Výsledky turbidity z každého tepelného ošetření byly rozděleny do dvou grafů z důvodu přehlednosti průběhu křivek, neboť některá ošetření vykazovala podobný průběh nárůstu mikroorganismů.

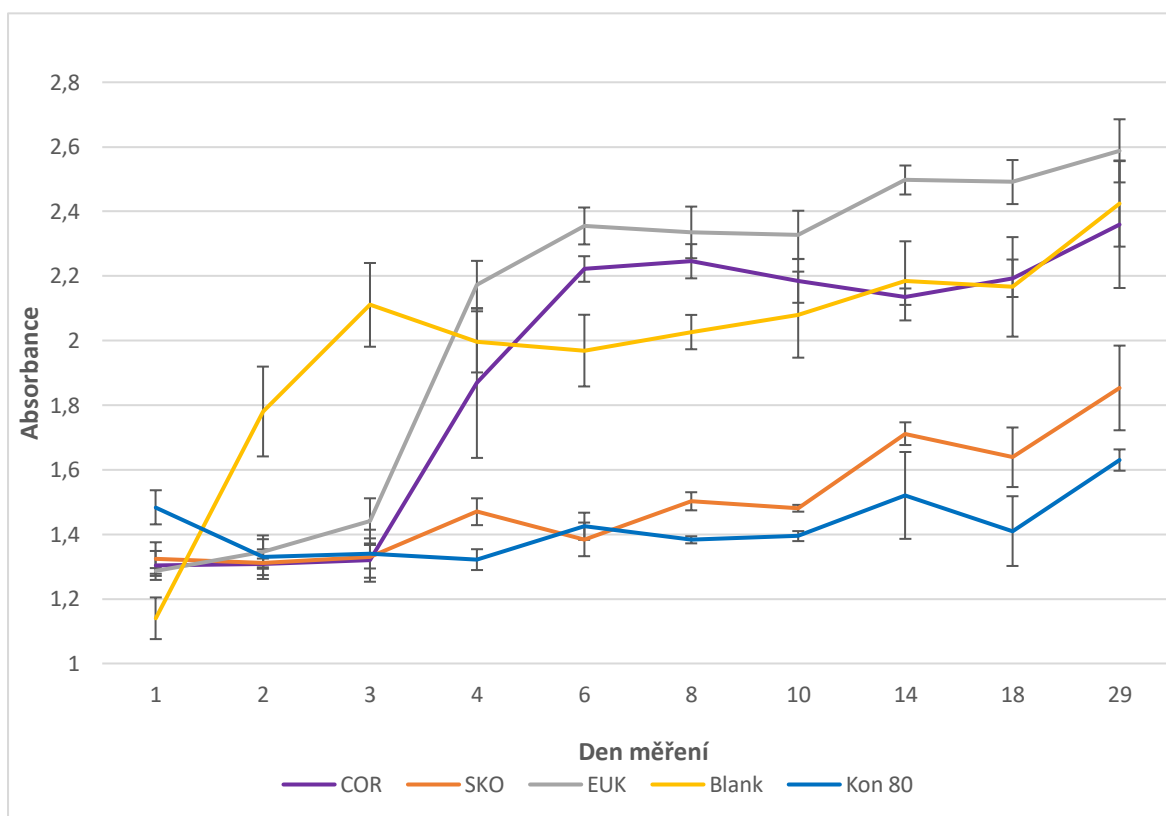


Graf 1 Průběh růstu turbidity u vzorků ošetřených teplotou 54 °C po dobu deseti minut.

Poznámka: Lem = lemongras, HŘE = hřebíček, ORE = oregano, Blank = bez ošetření Kon 80 = ošetřeno 80 °C po dobu 10 minut.

U vzorků HŘE, ORE byl zaznamenán podobný průběh nárůstu turbidity, který byl během prvních tří dní pouze pozvolnější než u vzorku Blank, u něhož došlo k prudkému nárůstu turbidity již druhý den. Nicméně čtvrtý den vzorky HŘE, ORE vykazovaly vyšší turbiditu než Blank.

U vzorku LEM byl pozorován nárůst turbidity pozvolnější oproti vzorkům HŘE a ORE, kdy bylo dosaženo maxima růstu turbidity po šestém dni měření. Navíc byl celkový nárůst oproti vzorku Blank nejen pozvolnější, ale i maximum dosažené turbidity bylo nižší než u vzorku Blank.

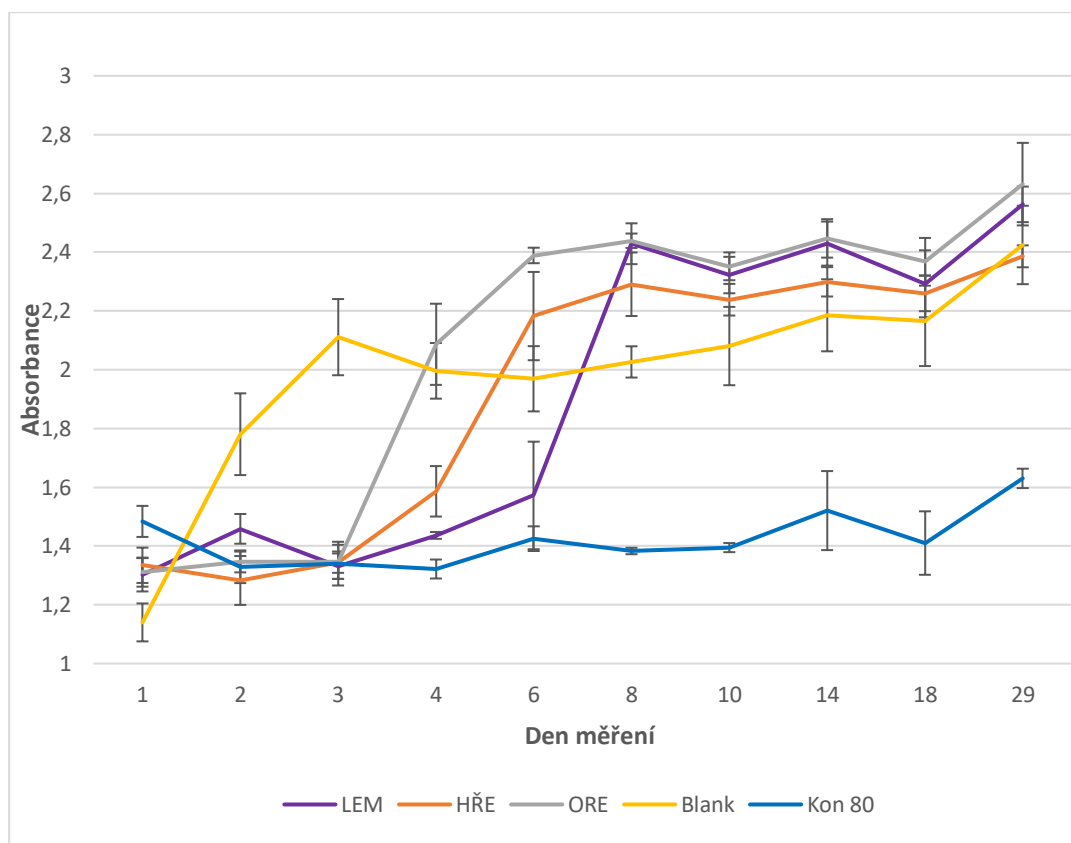


Graf 2 Průběh růstu turbidity u vzorků ošetřených teplotou 54 °C po dobu deseti minut.

Poznámka: COR = máta (cornmint), SKO = skořice, EUK = eukalyptus, Blank = bez ošetření Kon 80 = ošetřeno 80 °C po dobu 10 minut.

U vzorků COR a EUK bylo dosaženo maximálního růstu turbidity okolo šestého dne, naproti tomu vzorek Blank dosáhl maxima růstu již třetí den. Nejnižší turbiditu ze vzorků ošetřených silicí při teplotě 54 °C po dobu deseti minut vykazoval vzorek SKO. U vzorku SKO byl zaznamenán stejný průběh nárůstu turbidity jako vzorek Kon 80 a to až do 6. dne, od něhož

pak došlo k mírnému nárůstu, nicméně vzorek SKO dosáhl oproti vzorku Blank signifikantně nižší turbidity až do 29. dne měření.

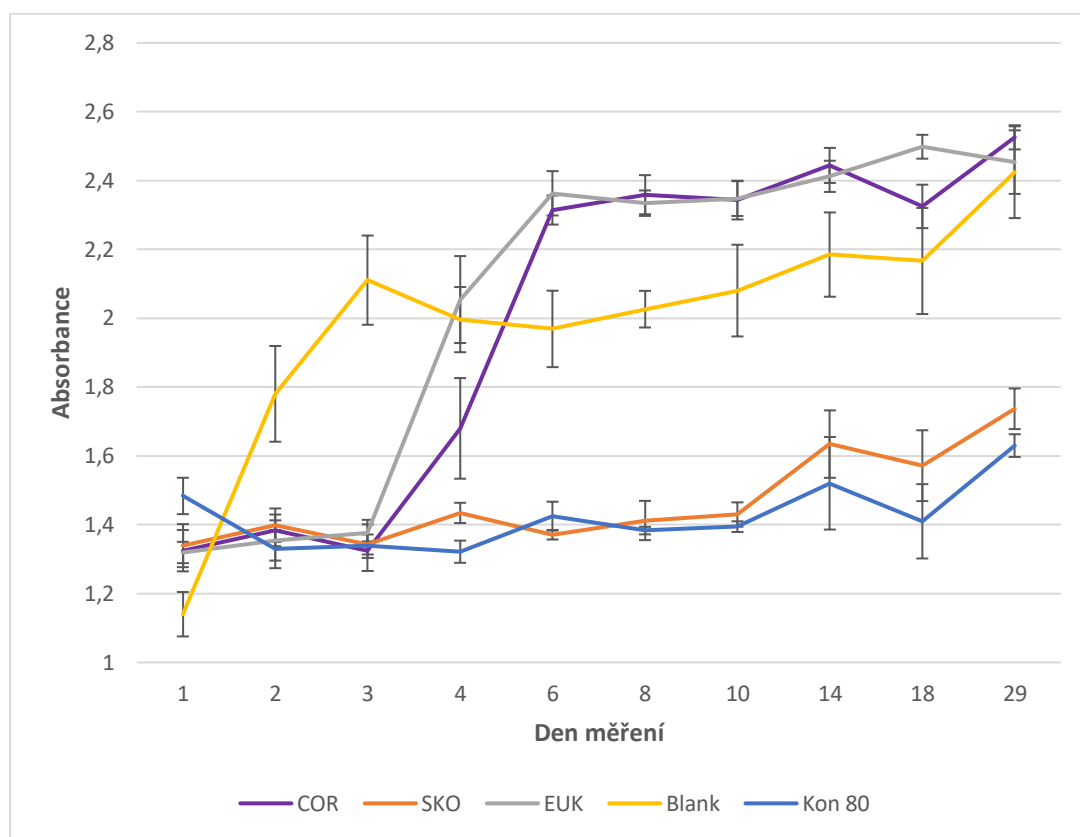


Graf 3 Průběh růstu turbidity u vzorků ošetřených teplotou 54 °C po dobu dvaceti minut.

Poznámka: Lem = lemongras, HŘE = hřebíček, ORE = oregano, Blank = bez ošetření Kon 80 = ošetřeno 80 °C po dobu 10 minut.

U vzorků HŘE a ORE bylo dosaženo pozvolnějšího nárůstu turbidity a maxima zde bylo dosaženo 6. den měření. Naproti tomu u vzorku Blank bylo dosaženo maxima již 3. den měření.

U vzorku LEM byl pozorován do 6. dne pouze mírný nárůst oproti vzorku Kon 80, 6. den měření byl zjištěn nárůst, který přesáhl turbiditu vzorku Blank a v 8. dni měření byla změřena turbidita, která dosahovala hladin vzorků HŘE a ORE.



Graf 4 Průběh růstu turbidity u vzorků ošetřených teplotou 54 °C po dobu dvaceti minut.

Poznámka: COR = máta (cornmint), SKO = skořice, EUK = eukalyptus, Blank = bez ošetření Kon 80 = ošetřeno 80 °C po dobu 10 minut.

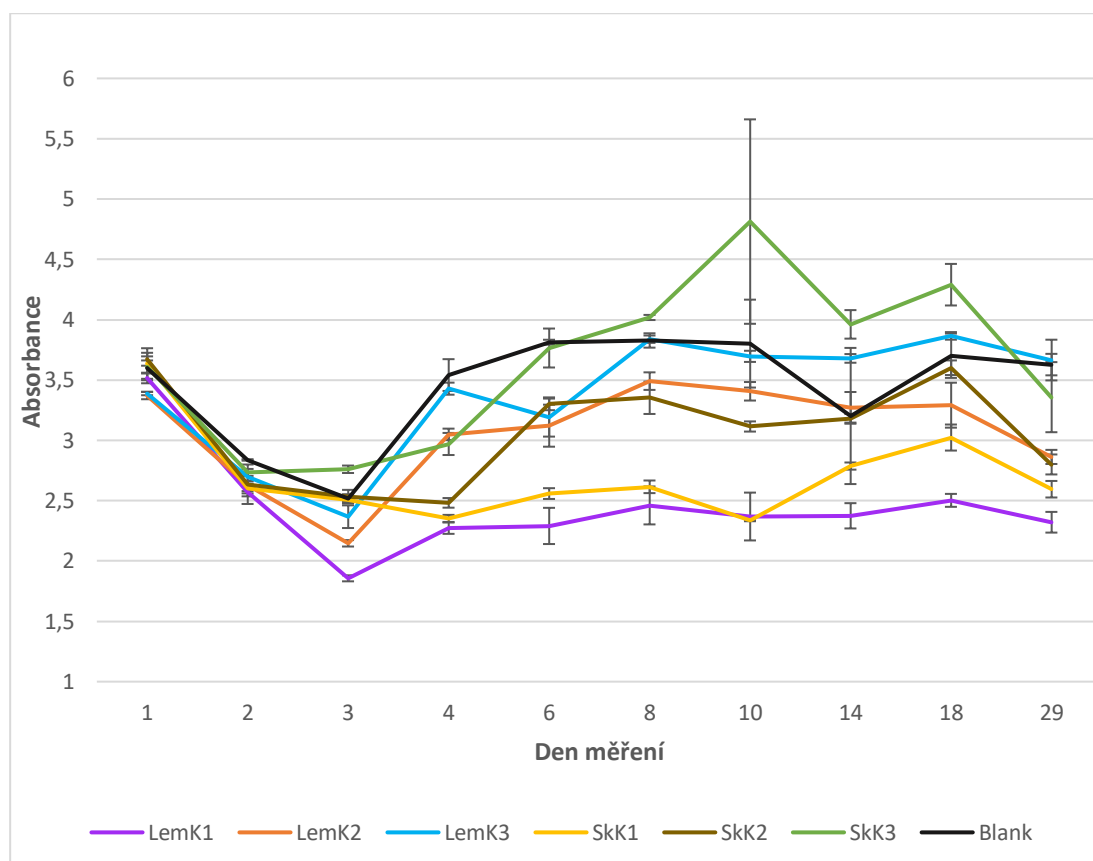
U vzorků COR a EUK byl pozorován mírnější nárůst s dosažením maxima turbidity 6. den měření. Naproti tomu vzorek Blank dosáhl maxima růstu již 3. den.

Pro vzorek SKO byl pozorován identický průběh turbidity v čase jako u vzorku Kon 80 a 10. dne měření byl identifikován mírný nárůst, který trval až do 29. dne měření. Nicméně bylo u vzorku SKO dosaženo nejnižšího nárůstu turbidity ve všech dnech měření oproti vzorku Blank.

Při screeningovém měření inhibiční aktivity silic spolu s tepelným záhřevem 54 °C po dobu deseti a dvaceti minut bylo zjištěno, že vzorky ošetřeny silicí lemongrass a skořice vykazují dle naměřených hodnot turbidity nejvyšší inhibiční aktivitu oproti ostatním testovaným silicím (oregano, eukalyptus, máta, hřebíček). Zároveň byly zjištěny u vzorků se silicemi lemongrass a skořice signifikantně nižší turbidity než u vzorku Blank.

6.2 Výsledky analýzy účinnosti ošetření kombinací silic skořice, lemongrass a tepelného záhřevu

Z důvodu zvýšení přehlednosti a orientace byly výsledky rozřizeny mezi následující grafy způsobem, kdy byly porovnány účinky koncentrace na růst turbidity jednotlivých silic a poté hodnoceny varianty nejúčinnějších ošetření silicí a teploty oproti kontrolám.



Graf 5 Průběh růstu turbidity u vzorků ošetřených různými koncentracemi silic

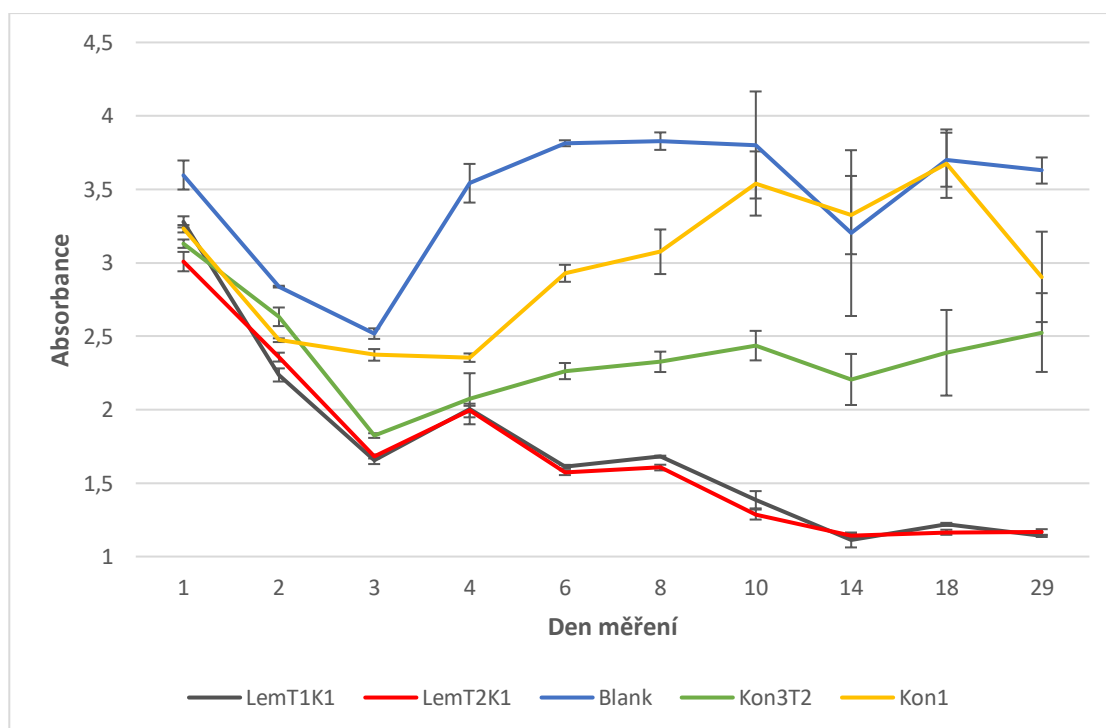
Poznámka: LemK1 = lemongrass (256 mg/l), LemK2 = lemongrass (128 mg/l), LemK3 = (64 mg/l), SkK1 = skořice (256 mg/l), SkK2 = skořice (128 mg/l), SkK3 = skořice (64 mg/l).

Nejmenší nárůst turbidity byl pozorován u vzorků LemK1 a SkK1, tedy nejvyššími koncentracemi obou silic. U těchto dvou vzorků byl pozorován nárůst turbidity od 3. dne měření. Průběh křivek těchto dvou vzorků je podobný, nicméně vzorek LemK1 vykazuje ze všech koncentrací nejnižší turbiditu.

Větší nárůst turbidity byl identifikován u vzorků LemK2 a SkK2 ošetřenými koncentracemi 128 mg/l, jejichž turbidita začala narůstat po 3. dni měření, nicméně u obou silic byl pozorován podobný vývoj nárůstu turbidit.

Největší nárůsty turbidit během měření byly identifikovány u vzorků LemK3 a SkK3, jež byly ošetřeny nejnižší koncentrací. U obou vzorků docházelo k nárůstu turbidity po 3. dni měření. Ve vzorku SkK3 byly během testování naměřeny nejvyšší turbidity při testování vlivu koncentrace na nárůst zákalu tvořeným mikroorganismy.

Oproti vzorku Blank byly zjištěny nižší turbidity u vzorků LemK1, SkK1, LemK2, SkK2 během všech měření, jež byla provedena v průběhu 29 dní. Oproti vzorku Blank byly zajištěny nižší hodnoty turbidit do 8. dne u vzorku LemK3, zatímco u vzorku SkK3 byly zjištěny nižší hodnoty turbidit pouze do 6. dne.



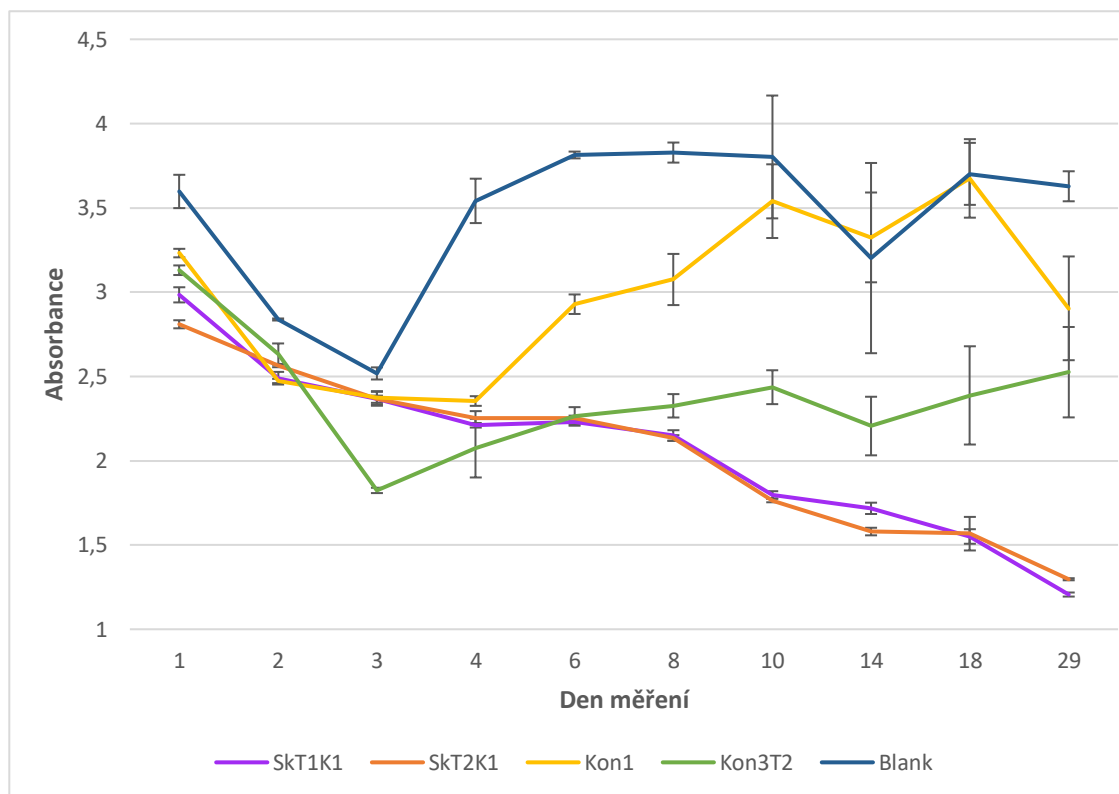
Graf 6 Průběh růstu turbidity u vzorků ošetřených silicí lemongrass a teplotou

Poznámka: LemT1K1 = lemongrass (256 mg/l, 64 °C), LemT2K1 = lemongrass (256 mg/l, 60 °C), Blank = neošetřeno, Kon3T2 = (60 °C), Kon1 = kys. benzoová

U vzorků LemT1K1 a LemT2K1, tedy dvou nejvyšších teplot v kombinaci s nejvyšší koncentrací, byla zjištěna nejnižší turbidita mezi sérií testovaných vzorků. Průběh naměřených turbidit je u obou vzorků stejný. U testovaných vzorků LemT1K1 a LemT2K1 byla zjištěna během 29 dní měření turbidita signifikantně nižší než u kontrolních vzorků.

Nejvyšší turbidity byly pozorovány u vzorku Blank, kde došlo k nárůstu po 3. dni měření a následně u vzorku Kon1 (kys. benzoová), kdy došlo k nárůstu po 4. dnu měření. Zatímco vzorek Kon3T2 vykazoval první tři dny měření hodnoty podobné naměřených u vzorků

LemT1K1 a LemT2K1, po třetím dni měření došlo k nárůstu turbidity i u tohoto kontrolního vzorku (Kon3T2)

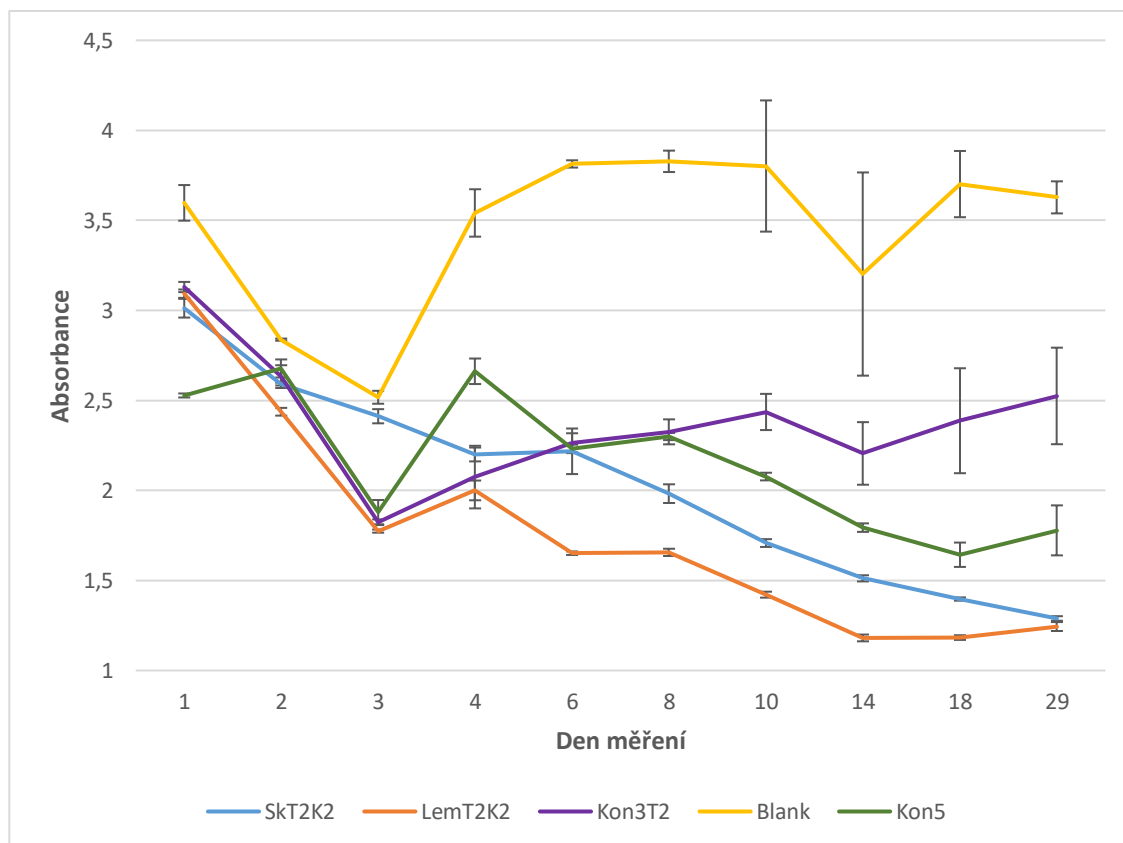


Graf 7 Průběh růstu turbidity u vzorků ošetřených silicí skořice a teplotou

Poznámka: SkT1K1 = skořice (256 mg/l, 64 °C), SkT2K1 = skořice (256 mg/l, 60 °C), Blank = neošetřeno, Kon3T2 = (60 °C), Kon1 = kys. benzoová

Vzorky SkT1K1 a SkT2K1, tedy vzorky ošetřené nejvyšší teplotou v kombinaci s nejvyšší koncentrací silice vykazovaly v testované sérii celkově nejnižší turbidity. U hodnot naměřených vzorků byl objeven stejný průběh trendu mezi turbiditami v rámci měřených dní.

Největší turbidity byly zaznamenány u kontrol Blank a dále Kon1 (kys. benzoová). Avšak u vzorku Kon3T2 ošetřeného teplotou 60 °C byla do 3. dne naměřena turbidita nižší než u testovaných vzorků se silicí SkT1K1 a SkT2K1, nicméně po třetím dni měření došlo u Kon3T2 k nárůstu turbidity a 6. dne turbidita překonala hodnoty vzorků SkT1K1 a SkT2K1.



Graf 8 Porovnání růstu turbidity u vzorků ošetřených teplotou a různou silicí

Poznámka: SkT2K2 = skořice (128 mg/l, 60 °C), LemT2K2 (128 mg/l, 60 °C), Kon3T2 = (60 °C), Blank = neošetřeno, Kon5 = (90 °C).

Nejnižší turbidity v této testované sérii byly celkově identifikovány u vzorku LemT2K2 ošetřeného koncentrací 128 mg/l a teplotou 60 °C během 29 dní měření.

Do 3. dne byly zjištěny nižší turbidity než u vzorku Blank ve vzorcích Kon5 ošetřeného 90 °C a Kon3T2 ošetřeného 60 °C. Od 3. dne začaly turbidity vzorků Kon5 a Kon3T2 stoupat a 6. dne přesáhly hodnoty turbidity vzorku SkT2K2, jenž byl ošetřen koncentrací 128 mg/l a teplotou 60 °C. Od šestého dne byly naměřené turbidity vzorků SkT2K2 a LemT2K2 nižší oproti testovaným kontrolám Kon5, Kon3T2 a Blank.

6.3 Výsledky stanovení celkového počtu mikroorganismů

Ve vzorcích jablečno-řepného moštu byl sledován celkový počet mikroorganismů, který byl sledován 1 den po přípravě vzorků, dále po 7, 14, 31 dnech od přípravy vzorků, nicméně kvůli časové náročnosti této metody a počtu vzorků, byly ve všech dnech testovány pouze vzorky ošetřené silicí a teplotami 64 °C a 60 °C a vzorky bez ošetření. Byly vyhodnocovány počty kolonií vyjádřených jako log KTJ/g jablečno-řepného moštu v jednotlivých vzorcích a následně byly výsledky zhodnoceny pomocí analýzy rozptylu.

Tabulka 4 Průběžný vývoj počtu log KTJ/g v závislosti na ošetření koncentrací silic

	1. den	SD	7. den	SD	14. den	SD	31. den	SD
LemK1	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	5,38 ^B	±0,11	5,42 ^B	±0,24
LemK2A	5,23 ^B	±0,04	6,96 ^B	±0,09	xx	xx	7,54 ^{DE}	±0,10
LemK3	6,12 ^B	±0,30	7,38 ^D	±0,10	8,42 ^D	±0,07	7,64 ^{DE}	±0,06
SkK1	xx	xx	xx	xx	xx	xx	5,00 ^B	±0,07
SkK2	xx	xx	xx	xx	xx	xx	6,51 ^C	±0,14
SkK3	6,12 ^C	±0,08	xx	xx	xx	xx	7,40 ^{DE}	±0,02
Kon1	5,46 ^B	±0,07	xx	xx	7,54 ^C	±0,21	6,70 ^{CD}	±0,08
KonT1Benz	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00
KonT2Benz	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00
KonT3Benz	xx	xx	xx	xx	xx	xx	7,33 ^{DE}	±0,11
KonT1	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00
KonT2	xx	xx	xx	xx	xx	xx	6,70 ^{CD}	±0,03
KonT3	xx	xx	xx	xx	7,47 ^C	±0,06	7,31 ^{DE}	±0,02
Blank	5,89 ^C	±0,10	7,29 ^{BC}	±0,14	8,44 ^D	±0,08	8,44 ^E	±0,29
Kon5	xx	xx	4,50 ^E	±0,10	xx	xx	7,67 ^E	±0,18

Poznámka: xx = nebylo měřeno

Mezi vzorky označenými stejným alespoň jedním stejným písmenem není statisticky významný rozdíl.

LemK1 = lemongrass (256 mg/l), LemK2 = lemongrass (128 mg/l), LemK3 = (64 mg/l), SkK1 = skořice (256 mg/l), SkK2 = skořice (128 mg/l), SkK3 = skořice (64 mg/l), Kon1 = (kys. benzoová), KonT1Benz = (64 °C, kys. benzoová), KonT2Benz = (60 °C, kys. benzoová), KonT3Benz = (54 °C, kys. benzoová), KonT1 (64 °C), KonT2 (60 °C), KonT3 (54 °C), Blank = bez ošetření, Kon5 (90 °C).

Nejnižší hodnoty Log KTJ/g mezi vzorky ošetřenými silicí byly zjištěny ve vzorcích LemK1 a SkK1 (**Tabulka 4**). Následovaly vzorky LemK2 a SkK2. Naopak nejvyšší naměřené hodnoty log KTJ/g mezi vzorky ošetřenými silicí byly u variant LemK3 a SkK3.

Výsledky ANOVA prokázaly statisticky významné rozdíly mezi log KTJ/g v závislosti na použité koncentraci silice. Po provedení post-hoc analýzy Sheffeho testem byly nalezeny statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi sadou vzorků LemK1 a SkK1 (vzorků ošetřených

nejvyšší koncentrací), oproti vzorkům LemK3 a SkK3 jež byly ošetřeny nejnižší koncentrací silice. Navíc byly zjištěny statisticky významné rozdíly LemK1 a SkK1 oproti kontrole bez ošetření a kontrole ošetřené 90 °C ($p < 0,05$).

Dle výsledků ANOVY byly nalezeny statisticky významné rozdíly hodnot log KTJ/g mezi dny. Po provedení post-hoc analýzy Sheffeho testem byl zjištěn statisticky významný rozdíl 31. dne od dní 1. a 14. ($p < 0,05$).

Tabulka 5 Vliv ošetření koncentrací silice a teploty na log KTJ/g moštu v jednotlivých dnech kontroly

	1. den	SD	7. den	SD	14. den	SD	31. den	SD
LemT1K1	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00
LemT1K2	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00
LemT1K3	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00
LemT2K1	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00
LemT2K2	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00
LemT2K3	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00
LemT3K1	xx	xx	xx	xx	xx	xx	5,61 ^B	±0,30
LemT3K2	xx	xx	xx	xx	xx	xx	7,10 ^{BC}	±0,58
LemT3K3	xx	xx	xx	xx	8,56 ^D	±0,11	8,12 ^{CD}	±0,39
Kon1	5,46 ^B	±0,07	xx	xx	7,54 ^B	±0,21	6,70 ^{BC}	±0,08
KonT1Benz	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00
KonT2Benz	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00
KonT3Benz	xx	xx	xx	xx	xx	xx	7,33 ^{CD}	±0,11
KonT1	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00
KonT2	xx	xx	xx	xx	xx	xx	6,70 ^{BC}	±0,03
KonT3	xx	xx	xx	xx	7,47 ^B	±0,06	7,31 ^{CD}	±0,02
Blank	5,89 ^C	±0,10	7,29 ^B	±0,14	8,44 ^C	±0,08	8,44 ^D	±0,29
Kon5	xx	xx	4,50 ^C	±0,10	xx	xx	7,67 ^{CD}	±0,18

Poznámka: Poznámka: xx = nebylo měřeno

Mezi vzorky označenými stejným alespoň jedním stejným písmenem není statisticky významný rozdíl.

LemT1K1 = lemongrass (256 mg/l, 64 °C), LemT1K2 = lemongrass (128 mg/l, 64 °C), LemT1K3 = lemongrass (64 mg/l, 64 °C), LemT2K1 = lemongrass (256 mg/l, 60 °C), LemT2K2 = lemongrass (128 mg/l, 60 °C), LemT2K3 = lemongrass (64 mg/l, 60 °C), LemT3K1 = lemongrass (256 mg/l, 54 °C), LemT3K2 = lemongrass (128 mg/l, 54 °C), LemT3K3 = lemongrass (64 mg/l, 54 °C).

U vzorků s ošetřeními LemT1K1 až LemT2K3 (**Tabulka 5**) během 31 dní nebyly stanoveny žádné KTJ, nicméně u vzorků LemT3K1, LemT3K2, LemT3K3 ošetření nebyla účinná a hodnoty Log KTJ/g zde byly od 5,61-8,12 log v 31. dni kontroly.

Byla provedena hierarchická ANOVA pro nezávislé proměnné a jejich kombinace. Byly zjištěny statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) v hodnotách log KTJ v závislosti na koncentraci silice, teplotě ošetření.

Post-hoc analýza pomocí Scheffeho testu prokázala, že existují statisticky významné rozdíly mezi sadou vzorků LemT1K1 až LemT2K3 a sadou vzorků LemT3K1, LemT3K2, LemT3K3 ($p < 0,05$). U sérií ošetření LemT1K1 až LemT2K3 byl rovněž nalezen statisticky významný rozdíl oproti kontrolním ošetřením KonT2 a Kon5, která se ukázala jako méně účinná. U těchto vzorků bylo při kultivaci stanoveno 6,70 a 7,67 log KTJ/g.

Dle výsledků ANOVY byly nalezeny statisticky významné rozdíly hodnot log KTJ/g mezi dny. Po provedení post-hoc analýzy Sheffeho testem byl zjištěn statisticky významný rozdíl 14. dne v porovnání s 1.; 7.; 31. dnem ($p < 0,05$). Rovněž byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi 31. dnem a 1.; 7.; 14. dnem ($p < 0,05$).

Tabulka 6 Vliv ošetření koncentrací silice a teploty na log KTJ/g moštu v jednotlivých dnech kontroly

	1. den	SD	7. den	SD	14. den	SD	31. den	SD
SkT1K1	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00
SkT1K2	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00
SkT1K3	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00
SkT2K1	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00
SkT2K2	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00
SkT2K3	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00
SkT3K1	xx	xx	xx	xx	xx	xx	6,10 ^B	±0,29
SkT3K2	xx	xx	xx	xx	xx	xx	7,79 ^{CD}	±0,10
SkT3K3	xx	xx	xx	xx	8,56 ^C	±0,2	8,48 ^D	±0,24
Kon1	5,46 ^B	±0,07	xx	xx	7,54 ^B	±0,21	6,70 ^{BC}	±0,08
KonT1Benz	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00
KonT2Benz	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00
KonT3Benz	xx	xx	xx	xx	xx	xx	7,33 ^C	±0,11
KonT1	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00	0,00 ^A	±0,00
KonT2	xx	xx	xx	xx	xx	xx	6,70 ^{BC}	±0,03
KonT3	xx	xx	xx	xx	7,47 ^B	±0,06	7,31 ^C	±0,02
Blank	5,89 ^C	±0,10	7,29 ^C	±0,14	8,44 ^C	±0,08	8,44 ^D	±0,29
Kon5	xx	xx	4,50 ^B	±0,10	xx	xx	7,67 ^{CD}	±0,18

Poznámka: Poznámka: xx = nebylo měřeno

Mezi vzorky označenými stejným alespoň jedním stejným písmenem není statisticky významný rozdíl.

SkT1K1 = skořice (256 mg/l, 64 °C), SkT1K2 = skořice (128 mg/l, 64 °C), SkT1K3 = skořice (64 mg/l, 64 °C), SkT2K1 = skořice (256 mg/l, 60 °C), SkT2K2 = skořice (128 mg/l, 60 °C), SkT2K3 = skořice (64 mg/l, 60 °C), SkT3K1 = skořice (256 mg/l, 54 °C), SkT3K2 = skořice (128 mg/l, 54 °C), SkT3K3 = skořice (64 mg/l, 54 °C).

U vzorků sady vzorků SkT1K1 až SkT2K3 (**Tabulka 6**) nebyly při kultivaci narostlé žádné KTJ, naopak ošetření SkT3K1, SkT3K2, SkT3K3 byla identifikována jako nedostatečná, neboť při kultivaci 31. dne dosahovali jejich hodnoty log KTJ/g 6,10; 7,79; 8,48.

Vzorky sady SkT1K1 až SkT2K3 vykazovaly rovněž efektivnější ošetření než vzorek Kon5, který byl ošetřen teplotou 90 °C po dobu jedné minuty, kde byl rozdíl při kultivaci v 7. dni 4,5 log KTJ.

Byla provedena hierarchická ANOVA pro nezávislé proměnné a jejich kombinace. Byly zjištěny statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) v hodnotách log KTJ v závislosti na koncentraci silice, teplotě ošetření.

Post-hoc analýza pomocí Scheffeho testu prokázala mezi sadou vzorků SkT1K1 až SkT2K3 a sadou SkT3K1, SkT3K2, SkT3K3 statisticky významné rozdíly pro log KTJ/g ($p < 0,05$). Rovněž byly objeveny statisticky významné rozdíly mezi sadou vzorků SkT1K1 až SkT2K3 a kontrolním ošetřením KonT2 a Kon5 ($p < 0,05$). Statisticky významné rozdíly byly identifikovány u ošetření SkT3K1 v porovnání se vzorkem Blank ($p < 0,05$).

Dle výsledků ANOVY byly nalezeny statisticky významné rozdíly hodnot log KTJ/g mezi dny. Po provedení post-hoc analýzy Sheffeho testem byl zjištěn statisticky významný rozdíl 14. dne v porovnání s 1.; 7.; 31. dnem ($p < 0,05$). Rovněž byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi 31. dnem a 1.; 7.; 14. dnem ($p < 0,05$).

7 Diskuze

Použití chemických nebo syntetických antimikrobiálních látek a potravinových konzervačních látek jsou jedny z nejstarších metod kontroly infekcí a mikrobiálního znehodnocení potravin. Nicméně, z důvodu přibývajících důkazů o škodlivých účincích syntetických látek používaných jako aditiva, v současnosti také narůstá souvislý tlak na snížení množství přidaných konzervačních látek (Burt, 2004).

V posledních letech roste poptávka po nepasterovaných ovocných šťávách oproti pasterovaným šťávám kvůli jejich vyššímu obsahu vitamínu C a dalších antioxidantů, jelikož tyto složky hrají důležitou roli v prevenci proti civilizačním chorobám. (Melgar et al., 2012). Zároveň dochází k nárůstu trendu zajištění bezpečnosti potravin přirozenou cestou. Jednou z možností je použití silic jako antimikrobiálních přísad (Burt, 2004).

Cílem této práce bylo zhodnotit, zda kombinace přídatku silic do jablečno-řepného moštu spolu s tepelným záhřevem dokáže prodloužit údržnost. V současnosti existuje mnoho studií, které se zabývají konzervací ovocných šťáv pomocí silic, nicméně pouze některé studie testují antibakteriální účinky vytvořením nanoemulze voda-silice za současného použití synergického účinku např. pomocí tepelného záhřevu.

Při screeningovém šetření bylo zjištěno pomocí růstových křivek, že silice lemongrass a skořice mezi testovanými silicemi (lemograss, skořice, eukalyptus, oregano, máta, hřebíček) vykazují nejvyšší antimikrobiální účinky v kombinaci s tepelným záhřevem. Avšak vzorky byly uchovávány za pokojových podmínek ve zkumavkách, které byly opatřeny kovovým víčkem, je proto možné, že u některých testovaných silic došlo vzhledem k nedostatečnému uzavření ke zkreslení jejich antimikrobiální aktivity, která se mohla jevit nižší. Nicméně silice lemongrass a skořice byly vybrány pro další testování, a to za použití kombinací různých koncentrací silic a teplot ošetření.

Při dalším šetření pomocí růstových křivek byl zjištěn vliv koncentrace na turbiditu vzorku. Při testování samotných koncentrací byla naměřena nejnižší turbidita ve vzorcích s nejvyšší koncentrací silice. Dále bylo pomocí růstových křivek zjištěno, že nejnižší turbidity oproti kontrole bez ošetření a ošetření pouze teplotou 60 °C byly zjištěny u vzorků ošetřených nejvyšší koncentrací silice (256 mg/l a teplotou 60 °C a 64 °C. Druhé nejnižší turbidity byly zaznamenány u vzorků ošetřených koncentrací silic 128 mg/l teplotou 60 °C. Nicméně během zkoumání růstových křivek bylo pozorováno, že turbidita u vzorků v čase klesá, což bylo způsobeno blednutím jablečno-řepného moštu během skladování. Toto blednutí bylo pravděpodobně způsobeno degradací betaninu (barvivo obsažené v řepě) (Azeredo, 2009).

Uvedené blednutí mohlo vést ke zkreslení inhibiční aktivity silic v jednotlivých vzorcích stanovených dle růstových křivek. Z tohoto důvodu je pravděpodobně spektrofotometrické hodnocení inhibiční aktivity silic nepřesné. Nicméně byl kromě spektrofotometrického měření stanovován také CPM (celkový počet mikroorganismů) pomocí kapkové metody, čímž bylo možno výsledky podrobně kvantifikovat a statisticky ověřit.

Celkový počet mikroorganismů je jedním ze základních parametrů hodnocení hygieny potravin. Dle vyhlášky č. 132/2004 Sb. platí pro čerstvé ovocné a zeleninové šťávy přípustná hodnota celkového počtu mikroorganismů 10^6 KTJ. Cílem této práce tedy bylo nejen dosažení redukce mikroorganismů pomocí kombinovaného ošetření, rovněž bylo důležité pomocí těchto ošetření dosáhnout legislativních požadavků na mikrobiální kvalitu takto ošetřeného produktu.

U vzorků ošetřených silicí lemongrass, skořice a teplotami 60 °C a 64 °C nedošlo v průběhu 29 dní testování k nárůstu KTJ a v porovnání s kontrolou bez ošetření tak bylo dosaženo ve dnech 1; 7; 14; 31 celkové redukce o 5,89; 7,29; 8,44; 8,44 log KTJ/g. Rovněž byly prokázány statisticky významné rozdíly mezi touto sadou vzorků a neošetřenou kontrolou.

Podobných výsledků jako v naší studii dosáhli ve svém výzkumu Espina et al., (2012), kteří potvrdili účinnost synergického efektu působením silice a tepelného záhřevu. Kombinované ošetření při 54 °C s 200 mg/l pomerančové silice dokázalo snížit počáteční populaci *E. coli* o 5 log KTJ/g do méně než 20 minut tepelného ošetření, zatímco kombinované ošetření s 200 ppm limonenu bylo dosaženo stejné úrovně inaktivace za 12 minut. Tyto výsledky ukázaly, že přidání pomerančové silice nebo limonenu do šťávy před tepelným ošetřením, může být dosaženo synergického účinku, který sníží čas potřebný k ošetření.

V naší studii bylo prokázáno efektivnějšího ošetření o 3 log KTJ/g a to za použití 10x nižších koncentrací v porovnání se studií Tyagi et al., (2014), při testování kombinace tepelného ošetření (80 °C po dobu 30 vteřin) a silice lemongrass (koncentrace 1120 mg/l) v ovocné šťávě. Při testování inhibice růstu proti *Saccharomyces cerevisiae* zjistili redukcí až o 2 log KTJ/g. Naproti tomu u vzorků ošetřených teplotami 54 °C a silicí při použití koncentrací 256 mg/l, 128 mg/l, 64 mg/l došlo k redukcím oproti neošetřenému vzorku kontroly (skořice, lemongrass) 2,34-2,83; 0,65-1,34; 0-0,32 log KTJ/g, nicméně u těchto sad vzorků byly prokázány statisticky významné rozdíly v porovnání s neošetřenou kontrolou pouze u ošetření s nejvyšší koncentrací silice.

Kombinaci ošetření silicí spolu s tepelným záhřevem testovali také Espina et al. (2012), kteří ve své studii navrhli kombinaci tepelného ošetření mírným záhřevem a přidáním silic z citrusového ovoce pro konzervaci ovocných šťáv. Synergického účinku bylo dosaženo přídatkem 75 mg/l silic z citronu což několikanásobně ($5,7\times$) snížilo čas ošetření nebo mohla

být snížena teplota ošetření o 4,5 °C. Vůči samotnému tepelnému ošetření byla tato kombinovaná metoda účinnější o 5 log cílového patogenu *E. coli* 0157:H7 při použití koncentrace silice 200 mg/l a teploty 54 °C.

Synergický účinek silic byl zkoumán také autory Karatzas et al., (2000), kteří ve své *in vitro* studii zjistili, že karvon (5 mmol l⁻¹) a mírný tepelný záhřev (45 °C, 30 min) redukovali růst *Listeria monocytogenes* oproti samotnému tepelnému ošetření o 1,3 log.

U výše uvedených studií, ve kterých byl testován vliv ošetření kombinací přídavku silice a tepelného ošetření, bylo prováděno testování inhibice růstu mikroorganismů maximálně v rovině sedmi dní. Naše práce však otestovala kombinovaná ošetření silic a tepelného záhřevu v celkové délce 31 dní, kdy bylo u testovaných ošetření pomocí teploty 60 °C a 64 °C a kombinací silic lemongrass a skořice dosaženo úplné inaktivace mikroorganismů až do 31. dne testování, kdy vzorek jenž nebyl ošetřen, dosahoval hodnot 8,44 log KTJ/g. Navíc, je většina předchozích studií zaměřena na patogenní mikroorganismy, zatímco naše studie zkoumá inaktivaci přirozených mikroorganismů ovocných šťáv.

Testování kombinace tepelného záhřevu spolu s aplikací silic pro prodloužení trvanlivosti jablečno-řepného moštu prokázalo velkou účinnost a s dlouhodobým prodloužením trvanlivosti. Ošetření provedená v této studii by měla být dále prozkoumána z hlediska sensorického hodnocení takto upraveného produktu. Vybrané silice byly použity v koncentracích, které v ovocných šťávách úspěšně otestovali Espina et al., (2012), nicméně tato ošetření nebyla zkoumána v jablečno-řepném moštu. Z tohoto důvodu je možné, že by použitá ošetření mohla mít nepříznivý vliv na hodnocení přijatelnosti konzumenty.

Použití synergického účinku silic a tepelného záhřevu navíc vykazuje potenciál přidané hodnoty nejen pro konzumenty v podobě zachování většího množství prospěšných látek díky snížení teploty nutné pro dostatečné ošetření, ale poznatky synergických účinků silic a tepelného záhřevu mohou být užitečné i pro samotné výrobce z důvodu ekonomických ztrát, které jsou zapříčinovány kratší dobou skladovatelnosti neošetřených šťáv. Dále může být pro výrobce výhodné použití silic z důvodu úspor energie, kdy díky synergickému účinku, může být u výrobků použito nižšího tepelného ošetření.

8 Závěr

Cílem této práce bylo otestovat účinek vybraných druhů rostlinných silic v kombinaci s tepelným ošetřením na konzervaci jablečno-řepného moštu, která by umožnila delší životnost produktu.

Na základě výzkumu bylo prokázáno:

- Silice lemongrass a skořice spolu s tepelným ošetřením mají schopnost prodloužit životnost jablečno-řepného moštu.
- Použití silic spolu s tepelným ošetřením mělo větší účinek proti růstu bakterií než použití těchto ošetření zvlášť.
- Byl pozorován přímý vliv koncentrace silic na snížení počtu log KTJ při testování CPM
- Silice lemongrass a skořice vykazovaly podobné inhibiční účinky při měření CPM
- U ošetření teplotami 60 °C a 64 °C spolu se silicemi došlo k úplné inhibici a během testování CPM během 31 dnů nebyl zjištěn žádný nárůst
- U vzorků ošetřenými teplotou 54 °C silicí skořice a lemongrass byly pozorovány významné redukce v nárůstu log KTJ dle koncentrace silice 256 µl, 128 µl, 64 µl oproti neošetřeným vzorkům: 2,34-2,83; 0,65-1,34; 0-0,32 log KTJ/g.

Na základě dat analyzovaných pomocí ANOVA a Scheffého testu byla přijata hypotéza: Pomocí kombinace silic a tepelného záhřevu lze prodloužit trvanlivost jablečno-řepného moštu.

Přestože bylo zjištěno efektivní využití silic spolu s tepelným záhřevem pro konzervaci jablečno-řepného moštu je třeba před praktickou aplikací podobného ošetření otestovat sensorické vlastnosti takto upraveného produktu.

9 Seznam literatury

- Adegoke, G. O., & Odesola, B. A. 1996. Storage of maize and cowpea and inhibition of microbial agents of biodeterioration using the powder and essential oil of lemon grass (*Cymbopogon citratus*). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 37(1–2), 81–84.
- Adorjan, B., & Buchbauer, G. 2010. Biological properties of essential oils: An updated review. *Flavour and Fragrance Journal*, 407-426.
- Ait-Ouazzou, A., Cherrat, L., Espina, L., Lorán, S., Rota, C., & Pagán, R. 2011. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12(3), 320–329.
- Aneja, K. R., Dhiman, R., Aggarwal, N. K., & Aneja, A. 2014. Emerging preservation techniques for controlling spoilage and pathogenic microorganisms in fruit juices. *International Journal of Microbiology*, 1-14.
- Appendini, P., & Hotchkiss, J. H. 2002. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 113-126.
- Ashurst, P. R. 2004. Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices. *Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices: Second Edition*, p. 390.
- Azeredo, H. M. C. (2009). Betalains: properties, sources, applications, and stability – A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), 2365–2376.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*. 447-467.
- Ballal, A., Basu, B., & Apte, S. K. (2007). The Kdp-ATPase system and its regulation. *Journal of Biosciences* 32, 559–568.
- Bennett, J. W., Klich, M., & Mycotoxins, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497–516.
- Bevilacqua, a, Corbo, M. R., Campaniello, D., D'Amato, D., Gallo, M., Speranza, B., & Sinigaglia, M. 2011. Shelf life prolongation of fruit juices through essential oils and homogenization: a review. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 2, 1157–1166.
- Boon, P. E., Te Biesebeek, J. D., Sioen, I., Huybrechts, I., Moschandreas, J., Ruprich, J., van Klaveren, J. D. 2012. Long-term dietary exposure to lead in young European children: Comparing a pan-European approach with a national exposure assessment. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 29(11), 1701–1715.

- Bouhdid, S., Abrini, J., Amensour, M., Zhiri, A., Espuny, M. J., & Manresa, A. 2010. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4), 1139–1149.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.
- Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2009). A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of Food Engineering*, 90(3), 409–413.
- Cassel, E., Vargas, R. M. F., Martinez, N., Lorenzo, D., & Dellacassa, E. 2009. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. *Industrial Crops and Products*, 29(1), 171–176.
- CDC, 1996. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice—British Columbia, California, Colorado and Washington. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 45, p. 875.
- Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Campaniello, D., Ciccarone, C., & Sinigaglia, M. 2010. Use of high pressure homogenization as a mean to control the growth of foodborne moulds in tomato juice. *Food Control*, 21(11), 1507–1511.
- Dandlen, S. A., Lima, A. S., Mendes, M. D., Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Sousa, M. J., ... Figueiredo, A. C. 2010. Antioxidant activity of six Portuguese thyme species essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(3), 150–155.
- Dennison, B. A. 1996. Fruit juice consumption by infants and children: a review. *Journal of the American College of Nutrition*, 15(5 Suppl), 4–11.
- Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., & Mauriello, G. 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2745–2749.
- Duan, J., & Zhao, Y. 2009. Antimicrobial efficiency of essential oil and freeze-thaw treatments against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* ser. *enteritidis* in Strawberry juice. *Journal of Food Science*, 74(3), 129–137.
- EFSA, 2013. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011 has been published. (2013). *Eurosurveillance*, 18(15), p. 3991.
- EFSA. 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal*, 12(2), p. 3547.
- EFSA. 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 13(1), p. 3991.

- Epstein, W. 1986. Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2(1–2), 73–78.
- Espina, L., Somolinos, M., Lóran, S., Conchello, P., García, D., Pagán, R., 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control* 22, 896–902.
- Espina, L., Somolinos, M., Pagán, R. N., & García-Gonzalo, D. 2010. Effect of Citral on the Thermal Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in Citrate Phosphate Buffer and Apple Juice. *Journal of Food Protection*, 73(12), 2189–2196.
- Espina, L., Somolinos, M., Ouazzou, A. A., Condón, S., García-Gonzalo, D., & Pagán, R. 2012. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in fruit juices by combined treatments of citrus fruit essential oils and heat. *International Journal of Food Microbiology*, 159(1), 9–16.
- Esteve, M. J., & Frígola, A. 2007. Refrigerated Fruit Juices: Quality and Safety Issues. *Advances in Food and Nutrition Research*, 104-132.
- European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, 11(4), 3129.
- Evans, W., C. 2009. Trease and Evans Pharmacognosy. *Saunders – Elsevier*, Edinburgh. 106–116.
- Ferrante, S., Guerrero, S., & Alzamorat, S. M. 2007. Combined use of ultrasound and natural antimicrobials to inactivate *Listeria monocytogenes* in orange juice. *Journal of Food Protection*, 70(8), 1850–1856.
- Dugo, G., Di Giacomo, A., 2002. The Genus Citrus. *Taylor Francis Publishing*, London., p. 656. ISBN: 9780415284912.
- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., & Nerín, C. 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116(4), 982–989.
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Von Wright, A. (1998). Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3590–3595.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. 2012. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3(JAN), 1-24.
- Chamorro, E., Zambon, S. N., Morales, W., Sequeira, a, & Velasco, G. 2011. Study of the chemical composition of essential oils by gas chromatography. *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications.*, (15), 308–324.

- Chen, C. Y., Nace, G. W., & Irwin, P. L. 2003. A 6x6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, 55(2), 475–479.
- Cheng, S. S., Liu, J. Y., Hsui, Y. R., & Chang, S. T. 2006. Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresource Technology*, 97(2), 306–312.
- ISO catalog. 2013. International Organization for Standardization: 71.100.60: Essential Oils. [online]. 2013 [cit. 2018-01-18]. Dostupné z < <https://www.iso.org/ics/71.100.60/x/>>.
- Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., & Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76(6), 626–631.
- Karatzas, A. K., Bennik, M. H. J., Smid, E. J., & Kets, E. P. W. (2000). Combined action of S-carvone and mild heat treatment on *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Microbiology*, 89(2), 296–301.
- Keller, S.E., Miller, A.J., 2006. Microbiological safety of fresh citrus and apple juices. In: Sapers, G.M., Gorny, J.R., Yousef, A.E. (Eds.), *Microbiology of Fruit and Vegetables*. CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, 211-224.
- Kettenring, M.M., Geeganage, M.V., 2010. Aroma-vital cuisine. In: Baser, K.H.C., Buchbauer, G. (Eds.), *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. CRC Press, Boca Raton, 863–880.
- Khajeh, M., Yamini, Y., Bahramifar, N., Sefidkon, F., & Reza Pirmoradei, M. 2005. Comparison of essential oils compositions of *Ferula assa-foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*, 91(4), 639–644.
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., & Yildirim, A. 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracuncululus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracuncululus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicig*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 125-137.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453–462.
- Lang, G., & Buchbauer, G. 2012. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 13-39.
- Lang, Q., & Wai, C. M. 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - A practical review. *Talanta*, 53(4), 771–782.

- Lee, H. C., Cheng, S. S., & Chang, S. T. 2005. Antifungal property of the essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum* leaf against tree pathogenic fungi. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(12), 2047–2053.
- Leela, J., 2008. Cinnamon and Cassia. In: Parthasarathy, V., Chempakam, B., Zachariah, T. (Eds.), *Chemistry of Spices*. CABI, USA, p. 443.
- Lima Tribst, A. A., de Souza Sant’Ana, A., & de Massaguer, P. R. 2009. Review: Microbiological quality and safety of fruit juices-past, present and future perspectives. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(4), 310–339.
- López-Malo, A., Barreto-Valdivieso, J., Palou, E., & Martín, F. S. 2007. *Aspergillus flavus* growth response to cinnamon extract and sodium benzoate mixtures. *Food Control*, 18(11), 1358–1362.
- Masango, P. 2005. Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, 13(8), 833–839.
- Masniyom, P., Benjama, O., & Maneesri, J. 2012. Effect of turmeric and lemongrass essential oils and their mixture on quality changes of refrigerated green mussel (*Perna viridis*). *International Journal of Food Science and Technology*, 47(5), 1079–1085.
- Mello da Silveira, S., Júnior, A. C., Scheuermann, G. N., Secchi, F. L., & Vieira, C. R. W. 2012. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. *Composição Química E Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais de Plantas Selecionadas Cultivadas No Sul Do Brasil Contra Micro-Organismos Patogênicos E Deteriorantes de Alimentos.*, 42(7), 1300–1306.
- Michalak, a. 2006. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Plant Cell*, 15(4), 523–530.
- Mishra, A. K., & Dubey, N. K. 1994. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(4), 1101–1105.
- Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R. M., & Martín-Belloso, O. 2012. Microbiological shelf life and sensory evaluation of fruit juices treated by high-intensity pulsed electric fields and antimicrobials. *Food and Bioprocesses Processing*, 90(2), 205–214.
- Naik, M. I., Fomda, B. A., Jaykumar, E., & Bhat, J. A. 2010. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(7), 535–538.
- Pandey, A., & Negi, P. S. 2018. Use of Natural Preservatives for Shelf Life Extension of Fruit Juices. In *Fruit Juices*, 571–605.
- Paranagama, P. A., Abeysekera, K. H. T., Abeywickrama, K., & Nugaliyadde, L. 2003. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus*

- (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. *Letters in Applied Microbiology*, 37(1), 86–90.
- Paviani, L., Pergher, S. B. C., & Dariva, C. 2006. Application of molecular sieves in the fractionation of lemongrass oil from high-pressure carbon dioxide extraction. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 23(2), 219–225.
- Preedy, V.,R. 2016. Essential oils in food preservation, flavor and safety. Amsterdam: Elsevier/APOD. *Academic Press is an imprint of Elsevier*. 2016. p. 930. ISBN: 9780124166417.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. 2009. Primary Keys and Miscellaneous Fungi. In *Fungi and Food Spoilage*, 53–143.
- Ranganna, S., 1986. Handbook of Analysis and Quality Control for Fruit and Vegetable Products, second edition. McGraw Hill Publishing Co. Ltd., New Delhi, 1-30.
- Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. 2009. Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(3), 157–180.
- Reitz, R., 1982. Flora Illustrate Catarinense. Itajai: Herbarium Barbosa Rodrigues. 1309–1314.
- Saikia, D., Khanuja, S.P.S, Kahol, A.P., Gurta, A.P., Kumar, S. 2001. Comparative antifungal activity of essential oils and constituents from three distinct genotypes of *Cymbopogon* spp. *Current Science*, 80, 1264-1266.
- Sasaki, Y. F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Tsuda, S. 2002. The comet assay with 8 mouse organs: Results with 39 currently used food additives. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 519(1–2), 103–119.
- Serrano, M., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Guillén, F., & Valero, D. 2005. The use of natural antifungal compounds improves the beneficial effect of MAP in sweet cherry storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6(1), 115–123.
- Sell, C., 2010. Chemistry of essential oils. In: Baser, K.H.C., Buchbauer, G. (Eds.), Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications. *CRC Press*, Boca Raton, p. 121–150.
- Sikkema, J., de Bont, J. A., & Poolman, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev*, 59(2), 201–222.
- Silveira, S. M. da, Cunha Júnior, A., Scheuermann, G. N., Secchi, F. L., & Vieira, C. R. W. 2012. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. *Ciência Rural*, 42(7), 1300–1306.

- Simon, R. A. 2003. Adverse reactions to food additives. *Current Allergy and Asthma Reports*, 3(1), 62–66.
- Somolinos, M., García, D., Condón, S., MacKey, B., & Pagán, R. 2009. Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1928–1939.
- Sonwa, M. M., & König, W. A. (2001). Chemical study of the essential oil of *Cyperus rotundus*. *Phytochemistry*, 58(5), 799–810.
- Sospedra, I., Rubert, J., Soriano, J. M., & Mañes, J. 2012. Incidence of microorganisms from fresh orange juice processed by squeezing machines. *Food Control*, 23(1), 282–285.
- Stratford, M., 2006. Food and beverage spoilage yeasts. In: Quarol, A., Fleet, G.H. (Eds.), *Yeasts in Food and Beverages: The Yeast Handbook*. Springer, Berlin, 335-379.
- Stratford, M., Hofman, P.D., Cole, M.B., 2000. Fruit juices, fruit drinks, and soft drinks. In: Lund, B.M., Baird Parker, T.C., Gould, G.M. (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Aspen Publishing, Gaithersburg, MD, 836-869.
- Stratford, M., Plumridge, A., & Archer, D. B. 2007. Decarboxylation of sorbic acid by spoilage yeasts is associated with the PAD1 gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), 6534–6542.
- Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., & Cullen, P. J. 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5987–6000.
- Turek, C., & Stintzing, F. C. 2013. Stability of essential oils: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 40-53.
- Tyagi, A. K., Gottardi, D., Malik, A., & Guerzoni, M. E. 2014. Chemical composition, invitro anti-yeast activity and fruit juice preservation potential of lemon grass oil. *LWT - Food Science and Technology*, 57(2), 731–737.
- United Kingdom Food Standards Agency, 2006. Survey of benzene in soft drinks. [online]. 2006 [cit. 2018 10-02]. Dostupné z <<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/fsis0606.pdf>>.
- Vasavada, P.C., 2003. Microbiology of fruit juice and beverages. In: Foster, T., Vasavada, C.P. (Eds.), *Beverage Quality and Safety*. CRC Press, Boca Raton, FL. 95-100.
- Vyhláška č. 132 ze dne 12. března 2004 o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení [online]. 2004 [cit. 2018-10-02]. Dostupné z <<http://www.bezpecnostpotravin.cz/attachments/132-2004mikrobiol.doc>>.
- Xing, Y., Li, X., Xu, Q., Yun, J., & Lu, Y. 2010. Antifungal activities of cinnamon oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* in vitro and in vivo fruit test. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(9), 1837–1842.