

**Česká zemědělská univerzita v Praze**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**  
**Katedra kvality a bezpečnosti potravin**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Obalové materiály pro účinné skladování pečiva v  
domácnostech**

**Diplomová práce**

**Autor: Bc. Adéla Ducháčová**

**Studijní obor: Výživa a potraviny**

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

**© 2024 ČZU v Praze**

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Obalové materiály pro účinné skladování pečiva v domácnostech" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19. 4. 2024

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Pavlovi Kloučkovi, Ph.D. za čas věnovaný vedení mé diplomové práce, pomoc s textovou částí projektu i realizováním pokusu.

# Obalové materiály pro účinné skladování pečiva v domácnostech

## Souhrn

Tato práce měla za cíl posoudit, zda mohou být látkové obaly potažené včelím voskem s přísadkou silic účinné proti výskytu plísní na pečivu a pomohou prodloužit běžnou trvanlivost čerstvého pečiva. V dnešní době je vyvíjen tlak na používání přírodních konzervačních látek a prodloužení trvanlivosti potravin, aby se co nejvíce zabránilo plýtvání potravinami. Podle mnoha studií, zaměřujících se na použití silic v potravinářství, mohou některé rostlinné silice značně inhibovat růst plísní a pomoci tak v prodloužení trvanlivosti potravin. Problémem rostlinných silic je jejich těkavost, díky které mohou účinné látky rychle vyprchat. Vytvořit vhodný obal s obsahem silic pro běžné skladování pečiva v domácnostech by měl značný přínos pro společnost díky snížení plýtvání potravinami.

Pro naši práci jsme vytvořili několik druhů povoskovaných látkových obalů včelím voskem s různými koncentracemi (1% a 0,1%) a druhy silic (dobromysl, tymián, citrónová tráva a skořice). Byla zkoumána účinnost těchto obalů v boji proti plísním a vysychání pečiva po dobu 14 dní. Během pokusu byly vzorky chleba zabaleny do povoskovaných obalů se silicemi a bez silic, látkových obalů a mikrotenových pytlíků. Každý den se kontroloval výskyt plísní a úbytek hmotnosti u každého vzorku. Došli jsme k závěru, že obaly s obsahem silic měly oproti ostatním obalům významné inhibiční účinky proti plísním a prodloužila se jejich trvanlivost. Nejlepší výsledky vykazovaly silice dobromyslu v 1% koncentraci a skořice v koncentraci 0,1 % a 1 %, u kterých se v prvním pokusu nevyskytla plíseň na vzorcích ani po 14 dnech. Nejhůře dopadl mikrotenový sáček s průměrným dnem výskytu plísní 8,5 a látkový pytlík hnědý s výskytem plísní po 6 dnech. Po zopakování pokusu se stejnými povoskovanými obaly bylo zjištěno, že účinek obalů po použití značně klesá. Plíseň se objevila u všech testovaných vzorků a objevovala se rychleji. Z chromatografického stanovení reziduí silic v obalech po pokusu a porovnání s výsledky obsahu silic před pokusem bylo zřejmé, že silice z obalů poměrně rychle unikají. Nejvyšší úbytek silic byl pozorován u skořice a citrónové trávy, a to až o 99 %.

Co se týká vysychání vzorků chleba, nejnižší úbytky hmotnosti vykazoval mikrotenový pytlík (průměrný denní úbytek 0,22 %) a nejhorší látkové pytlíky bez vosku (průměrný denní úbytek přes 2 %). U povoskovaných obalů sice docházelo k vyššímu úbytku hmotnosti než u mikrotenových pytlíků, ale vrstva vosku dokázala uspokojivě zabránit vysychání chleba. I přes to, že bude potřeba provést několik menších úprav v rámci technologie obalu, mohou být obaly s obsahem silic účinným řešením pro prodloužení trvanlivosti čerstvého pečiva a v boji proti plýtvání potravinami.

**Klíčová slova:** Silice, prodloužení trvanlivosti, antimykotická aktivita, plíseň, aktivní obaly

# Packaging materials for storage of bakery products in households

## Summary

The aim of this thesis was to assess whether beeswax-coated fabric packaging with the addition of essential oils could be effective against the occurrence of mould on baked goods and help to extend the normal shelf life of fresh baked goods. Nowadays, there is pressure to use natural preservatives and to extend the shelf life of food in order to avoid food waste as much as possible. According to many studies focusing on the use of essential oils in the food industry, some plant essential oils can significantly inhibit the growth of moulds and thus help in extending the shelf life of food. The problem with plant essential oils is their volatility, which can cause the active ingredients to evaporate quickly. Developing suitable packaging containing essential oils for routine storage of pastries in households would have significant benefits for society by reducing food waste.

We have developed several types of beeswax-coated fabric packaging with different concentrations (1% and 0.1%) and types of essential oils (oregano, thyme, lemongrass and cinnamon). The effectiveness of these wrappers in preventing mould and drying out of baked goods was investigated for 14 days. During the experiment, bread samples were wrapped in waxed packaging with and without essential oils, cloth wrappers and microtene bags. Mold growth and weight loss were checked daily for each sample. We concluded that the packaging containing essential oils had a significant inhibitory effect against mould and prolonged shelf life compared to the other types of packaging. The best results were shown by the oregano essential oils at a concentration of 1% and cinnamon at concentrations of 0.1% and 1%, which did not show mould on the samples even after 14 days in the first experiment. The worst performers were the microtene bag with an average mould day of 8.5 and the brown cloth bag with mould occurring after 6 days. After repeating the experiment with the same waxed packaging, it was observed that the effect of the packaging decreased significantly after use. Mould appeared in all samples tested and appeared more rapidly. Chromatographic determination of the essential oil residues in the packaging after the experiment and comparison with the results of the essential oil content before the experiment showed that the essential oils evaporate from the packaging relatively quickly. The highest loss of essential oils was observed for cinnamon and lemongrass, up to 99%.

With regard to the drying out of the bread samples, the microtene bags showed the lowest weight loss (average daily loss of 0,22 %) and the unwaxed cloth bags the worst (average daily loss of over 2 %). Although the waxed packages showed a higher weight loss than the microtene bags, the wax layer was able to prevent the bread from drying out satisfactorily. Despite the fact that some minor modifications to the packaging technology will be needed, packaging containing essential oils can be an effective solution for extending the shelf life of fresh pastry and in the battle against food waste.

**Keywords:** Essential oils, shelf life extension, antifungal activity, molds, active packaging

# Obsah

<b>1 Úvod</b>	<b>8</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce</b>	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Skladování pekárenských výrobků</b>	<b>10</b>
3.1.1 Problematika plýtvání pečivem	10
3.1.2 Podmínky skladování pečiva	12
<b>3.2 Obalové materiály pro balení pečiva</b>	<b>12</b>
3.2.1 Běžně používané obaly	12
3.2.1.1 Plastové sáčky	13
3.2.1.2 Chlebníky	13
3.2.1.3 Celulózové obaly	14
3.2.1.4 Kombinované sáčky	14
3.2.1.5 Látkové a povoskované obaly	14
3.2.2 Biologicky odbouratelné folie	15
3.2.3 Aktivní obaly	15
3.2.3.1 Antimikrobiální obaly	16
3.2.3.2 Antioxidační obaly a pohlcovače vzduchu	16
3.2.3.3 Obaly pohlcující vlhkost	16
3.2.4 Chytré obaly	17
<b>3.3 Výskyt plísní na pekařských výrobcích</b>	<b>17</b>
3.3.1 Rod <i>Penicillium</i>	17
3.3.2 <i>Aspergillus niger</i>	19
3.3.3 Rod <i>Neurospora</i>	20
3.3.4 Rod <i>Mucor</i>	20
3.3.5 <i>Rhizopus stolonifer</i>	21
<b>3.4 Rostlinné silice</b>	<b>22</b>
3.4.1 Legislativa používání silic v potravinářství	22
3.4.2 Způsoby získávání silic a jejich extraktů	23
3.4.3 Způsoby začlenění silic do obalových materiálů a potravin	24
3.4.4 Antioxidační aktivita silic	25
3.4.5 Antibakteriální aktivita silic	25
3.4.6 Antimykotická aktivita silic	26
3.4.7 Silice z dobromyslu	26
3.4.8 Skořicová silice	27
3.4.9 Tymiánová silice	28

3.4.10	Silice z citrónové trávy .....	29
3.4.11	Další druhy silic .....	30
<b>3.5</b>	<b>Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem .....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>Metodika .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Použitý materiál .....</b>	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Postup výroby obalů.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3</b>	<b>Způsob testování.....</b>	<b>33</b>
4.3.1	Testování trvanlivosti pečiva v obalech .....	33
4.3.2	Stanovení reziduí silic v obalech .....	34
4.3.2.1	Chromatografie s hmotnostním spektrometrem.....	34
<b>4.4</b>	<b>Vyhodnocování výsledků .....</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>35</b>
<b>5.1</b>	<b>Skladovací pokus .....</b>	<b>35</b>
5.1.1	Úbytek hmotnosti .....	38
5.1.2	Výskyt plísní .....	43
<b>5.2</b>	<b>GC/MS s metodou SPME.....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>49</b>
<b>6.1</b>	<b>Skladovací pokus .....</b>	<b>49</b>
<b>6.2</b>	<b>Stanovení reziduí silic v obalech.....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>53</b>

# 1 Úvod

Plýtvání potravinami je v dnešní době stále více řešený problém. Průměrný Čech vyhodí přes 25 kg potravin ročně, z toho průměrně 7 kg tvoří pečivo (Kubičková. 2021). Většina pečiva je určena k okamžité spotřebě a v závislosti na špatném nebo delším skladování v domácnostech často končí v koši. V západní Evropě se vyřazuje až 5 % pečiva, které se stává nekonzumovatelným z důvodu napadení plísněmi (Bao et al. 2023). Nejčastěji pečivo znehodnocují plísně rodu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Neurospora*, *Mucor* a *Rhizopus stolonifer* (Valková et al. 2022; Clemente et al. 2019). Kromě plísní je dalším důvodem vyhazování pečiva jeho vysychání a změna organoleptických vlastností. V rámci Green deal se státy Evropské unie zavázaly snížit plýtvání potravinami na maloobchodní a spotřebitelské úrovni do roku 2030 až o polovinu. Proto je důležité hledat způsoby prodloužení trvanlivosti pečiva, aby se zabránilo plýtváním jídlem a ekonomickým ztrátám. Z tohoto důvodu se vyvíjejí a zkoušejí různé přídatné látky nebo obaly, které by měly prodloužit trvanlivost výrobku. V dnešní společnosti je snaha hledat přírodnější způsoby prodloužení trvanlivosti. Jako vhodnou alternativou k syntetickým látkám se jeví použití přírodních antimykotických látek, kterými mohou být právě rostlinné silice (Valková et al. 2022).

Silice jsou těkavé, aromatické látky složené nejčastěji z terpenů, terpenoidů a fenylypropanoidů. Nacházejí se téměř ve všech částech aromatických rostlin a slouží jako ochrana rostlin před predátory nebo ke komunikaci mezi rostlinami (Valková et al. 2022). Silice se používají již po staletí pro své antimykotické, antibakteriální, antioxidační, analgetické a protizánětlivé účinky. Krom lékařství a se silice používání také pro výrobu kosmetiky a v potravinářství pro ochucení potravin a prodloužení trvanlivosti (Pandey et al. 2021). Výrazné antimikrobiální účinky mají například silice skořice, tymiánu, dobromyslu nebo hřebíčku (Cíсарová et al. 2020). Čistou silici získáme destilací nebo u citrusů lisováním. Pomocí různých druhů extrakcí získáváme extrakty podobné silici. Nejčastěji se používá parní destilace, hydrodestilace nebo extrakce rozpouštědlem (Pandey et al. 2021). Pokud budeme chtít použít silice v potravinách pro prodloužení trvanlivosti, překážkou může být výrazné aroma silice, které mění organoleptické vlastnosti potravin a vysoká těkavost silic (Rout et al. 2022).

Silice se mohou vpravit do takzvaných jedlých biofilmů, které zabraňují vytěkání silic a dochází k jejich postupnému uvolňování k potravine. Tento druh obalů je ekologičtější než běžné obaly (Klinmalai et al. 2021). Do biofilmů se silice vpravují v podobě nanoemulzí, což je stabilní dispergovaná fáze vzniklá spojením dvou nemísitelných tekutin (Pandey et al. 2021). Silice se často využívají v aktivních obalech, které obsahují určitou aktivní látku prodlužující trvanlivost výrobku. Aktivní obaly mohou být antimikrobiální, antioxidační a obaly pohlcující vlhkost. V dnešní době se často vyvíjejí i takzvané chytré obaly, které monitorují teplotu, čas, obsah plynů nebo čerstvost výrobku (Qian et al. 2021).



## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem diplomové práce bude zpracovat dostupné informace o způsobech prodloužení trvanlivosti pečiva, a to především pomocí silic a rozdílných druhů obalů. V praktické části diplomové práce bude mým cílem vytvořit vhodný obalový materiál pro účinné skladování pečiva v domácích podmínkách, který prodlouží trvanlivost pečiva a zachová jeho texturní a sensorické vlastnosti. Zároveň bude vhodný pro použití v domácnostech a cenově dostupný. Výsledkem by měl být obal, jehož výroba nebude příliš složitá ani nákladná a použití bude praktické a jednoduché. Jelikož spotřebitelé hodnotí produkty i podle vzhledu, bude snaha také o přívětivý design.

Bude vyvinut obal, který výrazně prodlouží trvanlivost pečiva a zachová jeho sensorické vlastnosti. Vosková vrstva na obalu s obsahem silic omezí růst plísní a vysychání pečiva za běžných skladovacích podmínek v domácnostech. Oproti pečivu skladovanému v běžných obalech bude mít pečivo skladované v našem obalu delší trvanlivost. Díky obsaženým silicím v našem obalu se okem pozorovatelné plísně na pečivu objeví výrazně později než na běžně baleném pečivu. Vrstva vosku na našem obalu zároveň zabrání vysychání pečiva.

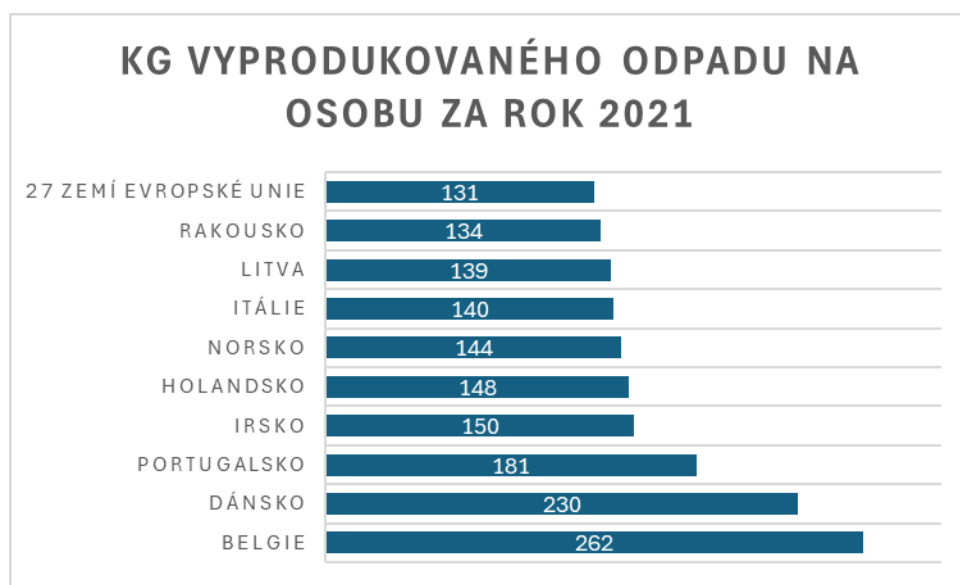
## 3 Literární rešerše

### 3.1 Skladování pečárenských výrobků

Pečivo, především chléb, patří mezi hlavní produkty, které se ve světě nejvíce konzumují. Při jeho skladování dochází k mikrobiálnímu (kvasinky, bakterie a plísně), chemickému (oxidace tuků) a fyzikálnímu (ztráty vlhkosti) kažení. Pšeničný chléb je pečivo s obsahem vody okolo 35 a 42 % a vodní aktivitou vyšší než 0,95. Právě díky tomu chléb snadno podléhá výskytu plísní a kvasinek (Valková et al. 2022). Plísně jsou v potravinách zodpovědné za nepříjemné aroma a tvorbu nebezpečných sekundárních metabolitů – mykotoxinů, které mohou způsobovat značné riziko pro konzumenty. Představují také ekonomické ztráty spotřebitelům i výrobcům pečiva (Bao et al. 2023). Negativně na výskyt plísní a senzorické vlastnosti pečiva mohou působit i špatné podmínky skladování, jak v obchodech, tak v domácnostech.

#### 3.1.1 Problematika plýtvání pečivem

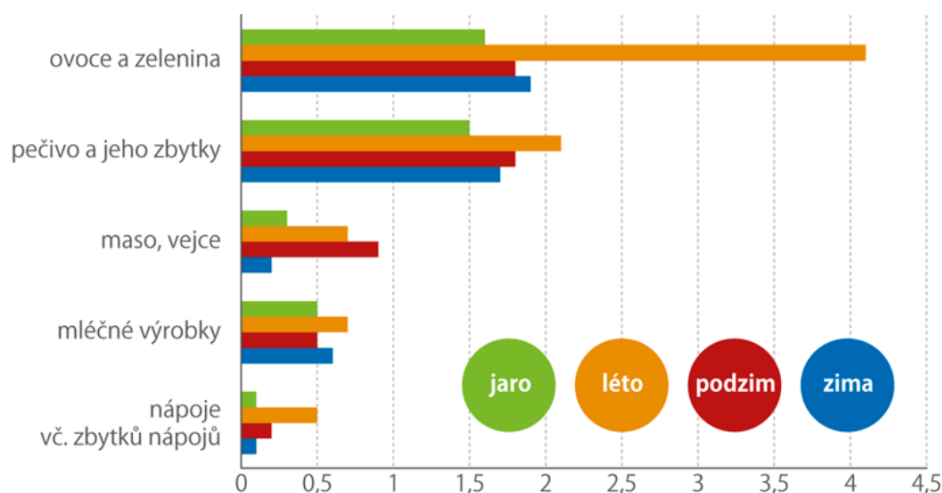
V rámci Green deal se státy Evropské unie zavázaly k cíli udržitelného rozvoje, jehož podstatou je do roku 2030 snížit plýtvání potravinami na maloobchodní a spotřebitelské úrovni o polovinu a snížit výrobní a dodavatelské ztráty, včetně ztrát po sklizni. Podle Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) jsou plísně a jejich metabolity zodpovědné za ztráty zhruba 25 % zemědělských produktů (Abdi-Moghadam et al. 2023). Největší podíl potravinového odpadu tvoří ovoce a zelenina. Plýtvání pečivem je také velký problém, jelikož pečivo je jedno z odvětví potravin, které má krátkou trvanlivost, protože rychle mění své organoleptické vlastnosti nebo podléhá mikrobiální zkáze (Caldeira et al. 2019). Obrázek č. 1 ukazuje přehled dat za rok 2021 zaměřující se na plýtvání potravinami v EU, kde se průměrné množství vyprodukovaného odpadu pohybuje od 68 kg (Slovensko) po 262 kg (Belgie) na osobu za rok. V některých zemích data chybějí (Commission Europa. 2024).



Obrázek č. 1: Množství vyprodukovaného odpadu na osobu za rok (Commission Europa. 2024)

Z dat českého statistického úřadu vyplývá, že průměrný Čech vyhodí přes 25 kg potravin ročně. Ze sledování plýtvání potravin v Brně máme k dispozici informaci, že průměrný obyvatel vyplývá průměrně 7 kg pečiva za rok. Z obrázku č. 2 je zřejmé, že pečivo je podle dostupných informací druhá nejvíce vyhazovaná komodita potravin. Na prvním místě je ovoce a zelenina. Poté následují mléčné výrobky a maso. Míra plýtvání jednotlivými potravinami se také liší podle ročního období (Kubíčková. 2021).

**Vybrané kategorie vyplývaných potravin podle ročního období  
(kg/os/rok)**



**Obrázek č. 2:** Míra plýtvání potravinami na osobu za rok (Kubíčková. 2021)

### 3.1.2 Podmínky skladování pečiva

Každý druh pečiva má specifickou dobu trvanlivosti podle jeho složení a technologie výroby. Při skladování chleba bez použití obalů nebo konzervačních látek můžeme očekávat trvanlivost 2–3 dny. Poté chléb začíná osychat a podléhat mikrobiální zkáze.

**Přístup vzduchu** k pekařským výrobkům zvyšuje riziko růstu aerobních mikroorganismů, především plísní. U baleného pečiva se často využívá modifikovaná atmosféra za použití N<sub>2</sub> nebo CO<sub>2</sub>, která pomáhá snížit obsah kyslíku ve výrobku. Tyto plyny ale zcela nedokáží odstranit veškerý kyslík z prostoru výrobku. Běžně tak v zabaleném výrobku zůstává 0,5 - 5 obj. % kyslíku, což stačí pro následný růst plísní. Bylo zjištěno, že pekařské plísně jako *Penicillium commune*, *P. roqueforti* a *Aspergillus flavus* jsou schopny růst i při zbytkovém kyslíku 0,3 %. S tímto mohou pomoci takzvané pohlcovače vlhkosti (Rüegg et al. 2022).

**Teplota skladování** dokáže výrazně ovlivnit růst plísní. Je známé, že chladírenské teploty dokážou zabránit růstu plísní. Během skladovacího pokusu chleba v mikrotenovém pytlíku se při pokojové teplotě již po 4 dnech skladování objevily plísně. Při použití teploty 8 °C se ani po 10 dnech skladování na chlebu neobjevily okem viditelné plísně. Zároveň se nízká teplota skladování podílí na zrychlení zpevňování škrobových gelů uvnitř chleba. To znamená, že skladování v chladírenských teplotách urychluje tuhnutí chleba (Alpers et al. 2021).

## 3.2 Obalové materiály pro balení pečiva

Běžné čerstvé pečivo se ve většině obchodech nebalí, jelikož je určeno k okamžité spotřebě a předpokládá se, že zákazník zkonzumuje pečivo do druhého dne. V praxi ale dochází ke skladování pečiva v domácnostech i po několik dní. Existuje mnoho způsobů, jak v domácích podmínkách uchovat čerstvé nebalené pečivo. Nejčastěji v domácnostech volíme mikrotenové pytlíky, papírové pytlíky nebo kombinovaný sáček z papíru a plastu. Některé generace jsou zvyklé balit pečivo pouze do utěrek, látkových pytlíků nebo ho skladovat v chlebnících. V poslední době se i na českém trhu začínají objevovat obaly z povoskovaných látek, nejčastěji za využití včelího vosku. Obaly chrání pečivo před senzorickými změnami vzniklé vlivem ztráty vlhkosti, prostupu kyslíku k výrobku nebo výskytem nežádoucích mikroorganismů, především plísní. Díky tomu tak můžeme zabránit nadměrnému vyhazování pečiva. Při hledání vhodného obalového materiálu se zhodnocují jeho fyzikální vlastnosti, chemické složení a prostup látek z obalu k potravíně. Během výroby vývoje obalového materiálu je důležitý ekologický dopad, ekonomická stránka, logistika i distribuce hotových obalů a marketing (vzhled, cena obalu atd.).

### 3.2.1 Běžně používané obaly

Hlavní funkcí obalů je minimalizovat reakce ovlivňující stabilitu daného výrobku a prodloužit tak jeho trvanlivost. Obal potravinu chrání před nežádoucími vnějšími vlivy jako

je vzduch, vlhkost, kontaminanty, mikroorganismy nebo světlo. Nejčastěji se pro balení pečiva používá celulózová či polypropylenová fólie (nebo jejich kombinace), či chlebníky a látkové sáčky.

### **3.2.1.1 Plastové sáčky**

Plastové sáčky tvoří více než 50 % všech používaných sáčků na skladování potravin. Poptávka po plastových sáčcích se neustále zvyšuje, díky nízké ceně, praktičnosti a univerzálnosti. Většina plastových sáčků pro použití v potravinářství je vyrobena z polyethylenu o nízké hustotě (LDPE). Během výroby se používají různé chemické látky zlepšující vlastnosti obalového materiálu jako jsou změkčovadla nebo nátěrové hmoty. Při výběru vhodného obalového materiálu pro balení pečiva musíme zohlednit také prostup látek z obalů do potraviny. Toto je hlavní problém plastových sáčků. Výhodou je však nízká výrobní cena. Celkem se ve světě pro výrobu LDPE obalů používá cca 5000 různých chemických látek a zhruba 325 z nich je potenciálně nebezpečných a hrozí riziko jejich migrace do potravin. Zároveň plastové sáčky nejsou prodyšné a zabraňují tak úniku vlhkosti. Ta se může na povrchu pečiva shromažďovat a tvořit vhodné prostředí pro vznik plísní (Stroski and Sapozhnikova. 2023).

Byla zkoumána trvanlivost pšeničného chleba při skladování v mikrotenových sáčků po dobu deseti dní při pokojové teplotě. Již během 4. dne pokusu se začaly na chlebu objevovat viditelné plísně. Mycelia plísní se objevovaly především na kůrce chleba než na jeho střídě. Dramatický nárůst plísní způsobila vysoká relativní vlhkost, která se udržovala v plastovém pytlíku (až 89,9 %), jelikož tento obalový materiál úplně zamezuje proudění vzduchu a unikající vlhkost z chleba se hromadí v atmosféře nad chlebem. Naopak co se týká předcházení vysychání krájeného chleba, plastový sáček dopadl v testu nejlépe. Jako jediný dokázal zabránit úniku vlhkosti z chleba a jeho vysychání. Teplota skladování neměla vliv na úbytek vlhkosti v chlebu ani na vlhkost uvnitř obalu. Zároveň skladování chleba v mikrotenovém sáčku výrazně zpomaluje tuhnutí střídy. (Alpers et al. 2021).

### **3.2.1.2 Chlebníky**

Chlebníky jsou známé již mnoho let jako prostředek pro skladování pečiva v domácnostech. Většinou se jedná o dřevěné uzavíratelné boxy, kam se ukládá především chléb. Během pokusu skladování pšeničného chleba v chlebníku došlo k výskytu viditelných plísní už 4. den skladování. Oproti mikrotenovému pytlíku byl pozorován pomalejší růst a delší lag fáze. V chlebnících se také vyskytuje vyšší relativní vlhkost (89 %), která se akumulovala především v části dotyku chleba s podložkou, kde docházelo k největšímu výskytu plísní (spodní strana chleba). Na vině je špatná cirkulace vzduchu a vznik zamokření. Navíc ani při prevenci proti vysychání chleba chlebník neobstál. Co se týká rychlosti tuhnutí chleba během skladování, je chlebník hned v závěsu za mikrotenovými sáčky. (Alpers et al. 2021).

### 3.2.1.3 Celulókové obaly

Celulókové sáčky se vedle mikrotenových sáčků běžně používají v supermarketech nebo trzích, kde si může spotřebitel zabalit pečivo sám. V některých případech, většinou u menších firem, je pečivo v tomto druhu obalu dodáváno již od výrobce. U celulókových sáčků byl zjištěn výskyt plísně na vzorku chleba 5. nebo 6. den skladování při pokojové teplotě. Zároveň byla zjištěna i nižší relativní vlhkost uvnitř sáčku a lepší propustnost pro vodu. To ale vedlo k vysoké míře vysychání chleba a změně sensorických vlastností. Díky svému složení jsou papírové sáčky lépe rozložitelné než například mikrotenové, povoskované nebo kombinované sáčky (Alpers et al. 2021).

### 3.2.1.4 Kombinované sáčky

Většinou se jedná o sáčky kombinující papír a perforovanou polyethylenovou vrstvu. Tento druh sáčků se dnes běžně objevuje v supermarketech nebo na trzích, kde si do nich spotřebitel může pečivo sám zabalit. Někdy je pečivo do tohoto obalu zabaleno již od výrobce. Díky polyethylenové vrstvě spotřebitel vidí na produkt uvnitř a zároveň je zbytek obalu z papíru. Kombinované sáčky snížily ve studii Alpers et al rychlost růstu plísní na chlebu během skladování při pokojové teplotě. Viditelný růst mycelia se objevil 6. den pokusu. Tento druh obalu má díky perforované části obalu vyšší propustnost pro vodní páry a tím nižší relativní vlhkost atmosféry uvnitř obalu. Vysychání chleba bylo v tomto druhu obalu společně s papírovým sáčkem nerychlejší. Docházelo k velkému úbytku vlhkosti uvnitř chleba (Alpers et al. 2021).

### 3.2.1.5 Látkové a povoskované obaly

Látkové obaly se používají spíše v domácnostech nebo při nákupu samotného pečiva, kdy si spotřebitel donese vlastní látkový obal z ekologických důvodů. Tento způsob balení znaly již naše babičky a dodnes se v některých domácnostech používá. Jedná se o poměrně ekologický způsob balení. Obal se dá vyprat a znovu použít. Problém ale může být v jeho funkčnosti, jelikož se k pečivu dostává poměrně velké množství vzduchu a pečivo může vysychat. Z dostupných odborných databází je zřejmé, že v posledních několika letech nebyly provedeny téměř žádné výzkumy, které by zkoumaly účinnost látkových obalů při skladování pečiva. Není tak možné zhodnotit, zda je dostatečně účinný. V našem pokusu (kde jsme ale měli látkové obaly pouze ve dvou opakování) jsme dospěli k závěru, že u pečiva v látkových obalech se sice plíseň vyskytla později než u mikrotenových sáčků, ale ze sensorického hlediska byly chleby dříve nepoživatelné. Docházelo k velkému a rychlému úbytku vlhkosti ve vzorcích chleba oproti jiným námi hodnoceným materiálům.

Možná právě z hlediska rychlého vysychání pečiva v látkových obalech se vyvíjejí povoskované látkové obaly. Nejčastěji se používá včelí vosk, který aspoň z části může zabránit úniku vlhkosti. Co se týká antimikrobiálního účinku povoskovaných obalů, výsledky studií jsou sporné. Ve studii Szulc et al 2020 zaměřené na porovnání běžných látkových obalů a obalů se

včelím voskem bylo prokázáno, že samotný včelí vosk dokáže inhibovat růst plísní *Aspergillus niger*. Naopak v jiné studii nebyl potvrzený rozdíl v délce trvanlivosti mezi povoskovanou látkou, povoskovaným papírem a plastovým sáčkem (Beck et al. 2021). Ani v *in vitro* testování papíru s obsahem včelího vosku neprokázalo výrazný antimykotický účinek (Pinto et al. 2017).

### 3.2.2 Biologicky odbouratelné folie

**Bioplasty a biologicky odbouratelné materiály** jsou ve světě čím dál populárnější. Čím dál více se řeší ekologický dopad plastových a jiných neekologických balení potravin, které často končí i mimo kontejnery na odpad. Tyto materiály se běžně v přírodě nerozloží ani za několik let, proto je snaha vyvíjet biologicky rozložitelné obalové materiály. Za posledních několik let vzrostla výroba biologicky odbouratelných folií z kyseliny polymléčné (PLA), polybutylen adipát tereftalátu (PBAT), termoplastického škrobu a polybutylen sukcinátu. Samostatné biodegradabilní polymery neposkytují efektivní účinnost obalů, proto je nutné jejich kombinování. K tuhému polymeru PLA je přidávám PBAT, který zaručuje pružnost obalu a jejich kombinace zajišťuje požadované fyzikální vlastnosti obalu. K úpravě vlastností odbouratelných obalů se používají různé chemicko-fyzikální modifikace, síťování nebo vrstvení. Do obalů se přidávají směsi různých aktivních látek, jako jsou například silice, které obalům přidávají antimikrobiální účinek. Směs látek se zahřívá a je vytlačována nebo vyfukována do tenké fólie (Klinmalai et al. 2021).

**Nanoemulze** je stabilní dispergovaná fáze vzniklá spojením dvou nemísitelných tekutin, v tomto případě oleje a vody, u kterých je velikost částic velice malá. Pro výrobu se využívají nízkoeenergetické a vysokoenergetické metody. V dnešní době se v potravinářství pro vpravení silic do vody používají spíše vysokoenergetické metody za použití vysokotlakých ventilových homogenizátorů, ultrasonikátorů a mikrofluidizérů, které narušují olejovou fázi vytvářením nadměrného napětí, aby se vytvořily menší kapičky oleje ve vodní fázi. Přesná velikost vrstvy nanoemulze na potravině nebyla stanovena a je velice individuální. Tloušťka vrstvy se odvíjí od mnoha faktorů, například od druhu potravin, druhu silice, podmínkách sušení atd (Pandey et al. 2021).

### 3.2.3 Aktivní obaly

Takzvané aktivní obaly by mohly být významným řešením proti mikrobiální kontaminaci, oxidaci lipidů a proteinů u pekárenských výrobků. Dále mohou zlepšit bezpečnost a kvalitu výrobků. Aktivní obaly jsou založené na principu absorbování nebo uvolňování aktivních látek, které mohou prodloužit trvanlivost pekárenských výrobků. Existuje několik druhů aktivních obalů podle jejich hlavní funkce (Qian et al. 2021). Kromě antimikrobiálních a antioxidačních vlastností obalů existují i obaly, které obsahují sloučeniny zabírající průniku UV záření k potravině. Ze strany spotřebitelů je tlak na používání přírodních látek pro prodloužení trvanlivosti, jako jsou například rostlinné silice. Přírodní látky jsou i většinou vhodnější z hlediska bezpečnosti potravin (Gengatharan, Rahim. 2023).

### 3.2.3.1 Antimikrobiální obaly

Antimikrobiální obaly chrání výrobek před růstem nežádoucích mikroorganismů. Antimikrobiální činidla (například rostlinné oleje) se mohou aplikovat různými způsoby. Přímé přidávání antimikrobiálních látek do obalových fólií je nejčastější způsob aplikace. Tepelně stabilní antimikrobiální činidla se mohou vpravovat do obalů vstříkáním nebo koextruzí. Činidla citlivá na teplo mohou být přidána do obalů pomocí rozpouštědel. Dále lze přidávat antimikrobiální činidla na povrch obalů, pomocí sáčku/podložky s antimikrobiální složkou nebo nanášením jedlého bioaktivního filmu (Qian et al. 2021).

Dalším druhem jsou obaly s ethanolovým emitery. Jedná se o sáček, který uvolňuje alkoholové páry do horního prostoru obalu, čímž zabraňuje růstu plísní. Ethanol je dlouho znám pro své konzervační a antimikrobiální účinky. K zamaskování chuti alkoholu se může použít například vanilkové aroma (Qian et al. 2021).

### 3.2.3.2 Antioxidační obaly a pohlcovače vzduchu

Antioxidační obaly zabraňují přístupu kyslíku k výrobku a zajišťují trvalé uvolňování antioxidantů. Vyšší procento kyslíku v obalech usnadňuje růst mikroorganismů, oxidaci lipidů a může ovlivnit chuť, barvu, texturu i nutriční hodnotu pekařského výrobku s vysokým obsahem tuků. Oxidací lipidů dochází ke žluknutí a typické nepříjemné chuti a vůni. Používají se antioxidační činidla na bázi železa nebo jemného prášku oxidu železitého v podobě sáčků či štítků (Qian et al. 2021). Použit se dají syntetické nebo přírodní antioxidační látky. Z těch syntetických se v potravinářství v posledních letech používá butylovaný hydroxyanisol a butylovaný hydroxytoluen. Tyto látky jsou tepelně stabilní a oproti přírodním antioxidantům také účinnější. Pro spotřebitele jsou ale přírodní antioxidanty přijatelnější. Mezi přírodními antioxidanty patří například tokoferoly, kyselina askorbová a polyfenoly. Zajímavý způsob získávání polyfenolů je z odpadní vody po zpracování oliv (Galanakis et al. 2018).

Obaly na bázi pohlcovače vzduchu obsahují nemigrační systém, který pohlcuje nebo absorbuje plynné složky (nejčastěji právě kyslík). Vyrábějí se ve formě sáčků, fólií nebo etiket ve kterých se nacházejí chemické sloučeniny pohlcující kyslík nebo reagující s kyslíkem. Je snaha o používání přírodních, udržitelných a biologicky odbouratelných látek, jelikož syntetické chemické látky mohou způsobit zdravotní riziko pro člověka (Ahmed et al. 2022).

### 3.2.3.3 Obaly pohlcující vlhkost

V neposlední řadě se využívají obaly s látkami pohlcující vlhkost. Nejvíce se tento typ obalu využívá u sušených potravin nebo jako podložky pod maso. Příliš vysoká vlhkost v obalech vede k rozvoji nežádoucích mikroorganismů a kažení potravin. Samotná vlhkost může i měnit sensorické a nutriční vlastnosti výrobku. V dnešní době se vědci zaměřují na použití přírodních absorbentů, jako je například sorbitol, fruktóza nebo celulóza. (Ahmed et al. 2022). Mezi nejčastější chemické látky absorbující přebytečnou vodu se řadí silikagel, oxid vápenatý, chlorid sodný, molekulární síta nebo přírodní jíly. Pohlcovače vlhkosti jsou používány s obalem v sáčku nebo podložce (Qian et al. 2021).



### 3.2.4 Chytré obaly

Kromě zmíněných aktivních obalů existují ještě takzvané chytré obaly. Ty mají za úkol monitorovat teplotu, čas, čerstvost nebo obsah plynů (Qian et al. 2021). Chytré obaly by mohly být skvělým nástrojem pro snížení skleníkových plynů a prodloužení trvanlivosti výrobku. Usnadňují přepravu výrobku, jeho sledovatelnost, marketing, pravost a bezpečnost. Mohlo by se jednat i o účinný nástroj pro snížení potravinového odpadu. Nejvíce se tento druh obalů používá u masa a mastných výrobků nebo čerstvé zeleniny a ovoce, kde často dochází k jejich rychlému kažení nebo riziku kažení. Chytré obaly zabraňují plýtvání potravinami díky senzorům, indikátorům a nosičům zakomponovaných přímo do obalu. Podle těchto senzorů můžeme například zjistit, zda v průběhu skladování nedošlo k porušení celistvosti obalu, zvýšení teploty nad limit nebo krádežím. Zároveň můžeme sledovat úroveň zralosti výrobku (například u ovoce) nebo mikrobiální aktivitu. Narozdíl od aktivních obalů chytré obaly pouze zaznamenávají informace o potravině a okolním prostředí (Fernandez et al. 2022).

## 3.3 Výskyt plísní na pekařských výrobcích

Plíseň je druh houby vyznačující se velkou populací. Při vhodných teplotních a podmínkách a vyšší vlhkosti dokáže růst velice snadno a rychle. Má velice rychlý metabolismus i velkou reprodukční schopnost (Zhao et al. 2023). Plísně jsou nejčastější mikroorganismy podílející se na kažení pekařských výrobků, protože tyto výrobky mají vysokou vlhkost a vodní aktivitu. Primárním zdrojem kontaminace spory plísní je mouka. Větší část spor je zničena během pečení, ale v prostoru pekárny se nachází spory plísní ve vzduchu, které kontaminují již upečené pečivo při jeho chlazení, manipulaci či balení (Pandey et al. 2021). Růst plísní následně způsobuje nevábný vzhled výrobku, nepříjemnou chuť, případně výskyt mykotoxinů a alergenních látek v pečivu. V zemědělství se běžně proti plísním používají syntetické chemické látky jako jsou například pyrrolbenzeny, imidazol nebo thiokyanáty (Zhao et al. 2023).

Nejvýznamnější houby znehodnocující pekárenské výrobky jsou *Aspergillus niger*, *A. pseudoglaucuss*, *Penicillium citrinum*, *P. chrysogenum*, *P. digitatum*, *P. expansum* a *P. italicum*, *P. paneum*, *P. commune*. Některé saprofytické houby, jako je *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*, navíc mohou v potravinách produkovat mykotoxiny a způsobit konzumentům vážné zdravotní problémy (Pandey et al. 2021; Rüeegg et al. 2022). Nejčastěji byly na chlebu zaznamenány plísně rodu *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Neurospora* a *Mucor*, přičemž jako největší zdroj jejich kažení byly identifikovány plísně rodu *Penicillium* (Valková et al. 2022). Další významnou plísní, objevující se především na chlebu, je *Rhizopus stolonifer* (Clemente et al. 2019).

### 3.3.1 Rod *Penicillium*

Rod *Penicillium* obsahuje 354 potvrzených druhů a některé z nich jsou člověkem hojně využívány. Ostatní jsou běžnými kontaminanty na různých substrátech a mohou tvořit mykotoxiny. Lidské patogenní druhy nejsou běžné. Ale objevily se oportunní infekce

způsobující mykotickou keratitidu, otomykózu nebo endokarditidu. Kolonie se vyznačují rychlým růstem, hustou plstí konidioforů a barvou v odstínech zelené nebo bílé. *Penicillium* produkuje phialidy, které tvoří takzvaný kartáčovitý vzhled neboli rozvětvení. Některé druhy mohou produkovat sklerocita (Kidd, Halliday and Ellis. 2023).

*Penicillium roqueforti* (viz obrázek č. 3) je saprofytická houba vyskytující se přirozeně v přírodě na dřevě nebo v půdě. Její barva se většinou pohybuje od tmavě nebo světle zelenošedé až po nažloutlou nebo olivově zelenou. Optimální teplota pro růst je 25 °C. Při teplotách nad 35 °C už nemůže růst, ale naopak zvládá růst i při teplotách okolo 5 °C. Co se týká vodní aktivity prostředí nebo potravin, na kterých roste, ideální rozmezí je  $a_w$  0,87 až 0,99. Optimální pH je 6 a rozmezí je od 3,0 do 10,5 (Coton et al. 2020).

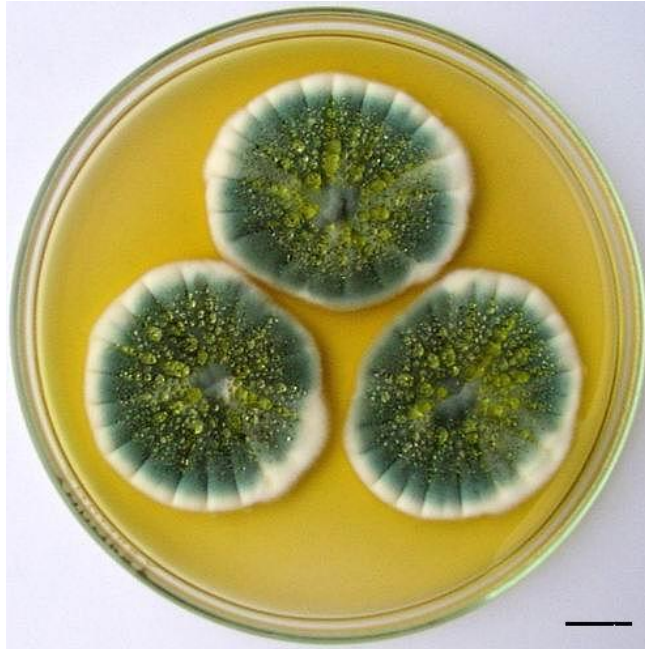
Mimo jiné se tento druh používá jako ušlechtilá plíseň v potravinářství, především v sýrech s modrou plísní, ale v pečivu působí nepříznivě. V potravinách rozkládá bílkoviny za vzniku typických aromatických látek tvořených aldehydy, alkoholy, kyselinami, laktony a methylketony (Caron et al. 2021). Tato plíseň je navíc odolná proti propionátu vápenatému, který se v pekárenství používá jako konzervant a rychle se množí i v chladírenských teplotách (Garcia et al. 2019). Odolná je i vůči kyselinám, zvládá nedostatek kyslíku i vysokou koncentraci CO<sub>2</sub>. Objevuje se často na obilovinách, pečivu sýrech a mnohdy i masné výrobky. Způsobuje proto značné ztráty v zemědělské výrobě a má negativní vliv na lidské zdraví. *Penicillium roqueforti* může produkovat toxiny Roquefort, roquefortin C a kyselinu mykofenolovou. Požití kontaminovaných potravin způsobuje trávicí potíže a ve výjimečných případech i smrt (Zhao et al. 2023).



**Obrázek č. 3:** Plíseň *Penicillium roqueforti* na živném médiu (Tvrzová et al. 2006)

*Penicillium chrysogenum* má nízké kolonie se sametovým povrchem. Mycelium má bílou až nažloutlou barvu. Konidie jsou šedavě tyrkysové až matně zelené, někdy žlutozelené (viz obrázek č. 4). Produkují světle žlutý až žlutohnědý rozpustný exsudát. Kolonie rostou rychle na standardním médiu při 23–25 °C. Minimální teplota pro růst jsou 4 °C a maximální teplota 37 °C. Snáší pH v rozmezí 4–6. *Penicillium chrysogenum* se nejčastěji vyskytuje v lodních kontejnerech na převoz potravin. Tato plíseň produkuje mykotoxiny roquefortin C,

PR toxin a sekalonové kyseliny. Při *in vivo* testech na myších roquefortin C působil zánětlivě na plíce a PR toxin byl pro ně vysoce toxický. Jelikož *Penicillium chrysogenum* způsobuje kažení potravin jen zřídka, riziko otrav jeho mykotoxiny u lidí je nízké. Existuje pouze několik málo záznamů otrav touto plísní. Zdroji byli například pekařské výrobky, maso, mléčné výrobky, ořechy a koření. Známa je například kontaminace margarínu plísní *Penicillium chrysogenum* v Austrálii (Pitt and Hocking. 2022).

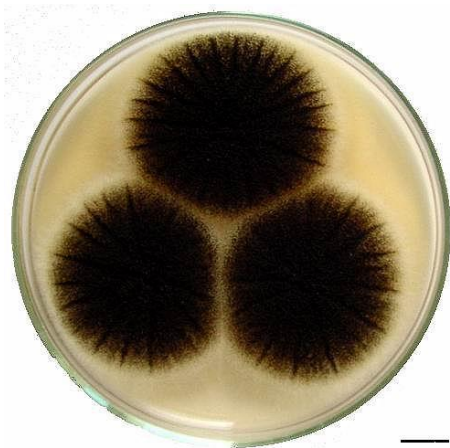


**Obrázek č. 4:** Plíseň *Penicillium chrysogenum* na živném médiu (Tvrzová et al. 2006)

### 3.3.2 *Aspergillus niger*

*Aspergillus niger* je jeden z nejběžněji se vyskytujících Aspergillí. Mycelium má bílý až žlutý povrch, který později nese černé konidie (viz obrázek č. 5). Jedná se o nejčastějšího původce otomykózy a je běžným laboratorním kontaminantem (Kidd, Halliday and Ellis. 2023). *Aspergillus niger* patří do skupiny černých Aspergillí, které se přirozeně vyskytují na zemědělských produktech jako jsou ovoce, zelenina, obilí nebo ořechy. Přežívá v poměrně širokém rozmezí teplot od 6 °C do 47 °C. Snáší také pH v rozmezí 1,5 – 9,8 (Li et al. 2020). Tento druh plísně je jeden z nejčastějších mikroorganismů způsobující kažení pečených výrobků. Vyznačuje se tmavými koloniemi s jednobuněčnými nebo dvoubuněčnými konidiami (Gil-Serna et al. 2019).

Tato houba je známá tvorbou mykotoxinů v potravinách jako je například ochratoxin A. Schopnost produkovat mykotoxiny má pouze malý počet kmenů (Gil-Serna et al. 2019). Kromě mykotoxinů produkuje *Aspergillus niger* také kyselinu citrónovou, která se hojně využívá v potravinářství. V laboratořích se tato plíseň používá právě pro produkci kyseliny citrónové nebo dalších kyselin, jako jsou kyselina glukonová a gallová. Plíseň se také uplatňuje při výrobě fermentovaných výrobků, kterými jsou ocet, sójová omáčka nebo víno. Dále se využívá pro produkci různých enzymů (Li et al. 2020).



**Obrázek č. 5:** Plíseň *Aspergillus niger* na živném médiu (Tvrzová et al. 2006)

### 3.3.3 Rod *Neurospora*

*Neurospora crassa* je vláknitá mikroskopická houba spadající do askomycet. Nejvíce se jako saprofytická houba vyskytuje na spálené vegetaci, kde pomáhá s rozkladem spálených rostlin. Vzhled houby můžeme vidět na obrázku č. 6. Jedná se o jednu z nejrychleji rostoucích mikroskopických hub. Člověkem je využívána při fermentaci potravin. *Neurospora* byla testována na přítomnost známých mykotoxinů, přičemž bylo potvrzeno, že neobsahuje žádný z nich a je tak z hlediska toxicity bezpečná (Bartholomai et al. 2022).



**Obrázek č. 6:** Vláknitá houba *Neurospora crassa* požírá rostlinnou biomasu (Wu et al. 2020)

### 3.3.4 Rod *Mucor*

Rod *Mucor* obsahuje více než 50 taxonů, ale pouze několik konkrétních druhů je termotolerantní a mohou mít negativní vliv na lidské zdraví. Jedná se o rychle rostoucí plíseň, která tvoří kolonie bílé, nažloutlé nebo tmavě šedé barvy a má nadýchanou vatovitou strukturu. Růst plísně se zastavuje při teplotách nad 32 °C a pod 5 °C (Kidd, Halliday and Ellis. 2023).

V přírodě je *mucor* velice běžný a rozšířený. Vyskytuje se většinou na vlhkých stanovištích nebo rozkládající se vegetaci. Nejrozšířenější druhy na potravinách jsou *M. circinelloides*, *M. hiemalis*, *M. piriformis*, *M. plumbeus* (viz obrázek č. 7) a *M. racemosus*. Specificky se tento druh plísňe (konkrétně *Mucor circinelloides*) nachází na tradičním slovenském ovčím sýru a francouzských sýrech. Může způsobovat kažení ovoce, sýrů, ořechů, sójových bobů, obilovin, fazolí a sladkých brambor. Není známé, že by tento rod plísni produkoval mykotoxiny a většina druhů neprodukuje ani rhizoidy. Některé druhy *mucor* jsou schopné růst a fermentovat za anaerobních podmínek a tím způsobit kažení nápojů, což může připomínat kvasinky, ale buňky jsou příliš velké na to, aby mohlo dojít k záměně s kvasinkou (Pitt and Hocking. 2022).



**Obrázek č. 7:** Plíseň *Mucor plumbeus* na živném médiu (Tvrzová et al. 2006)

### 3.3.5 *Rhizopus stolonifer*

*Rhizopus stolonifer* se vyznačuje přítomností stolonů, pigmentovaných rhizoidů a tvorbou sporangioforů. Na obrázku č. 8 můžeme vidět bílá mycelia se sporangii, která tvoří a které jsou nejdříve bílá a po dozrání zčernají. Roste při teplotách od 5 do 37 °C a optimální teplota pro růst je 25 °C. Může růst i při anaerobních podmínkách, ale rychlost růstu se výrazně snižuje. Nachází se hojně v tropických a subtropických oblastech (Pitt and Hocking. 2022).

Tato plíseň způsobuje posklizňovou hnilobu potravin. V některých zemích plíseň nejčastěji napadá rajčata, lilky, hrášek, mrkev a ostatní druhy zeleniny a ovoce. Často se objevuje na sušeném ovoci, oříškách, obilovinách či sójových bobech. Peptidové enzymy *Rhizopus stolonifer* jsou odolné vůči běžným konzervačním procesům při zpracování ovoce a zeleniny, proto i jeden infikovaný kus může způsobit zkažení celé dávky (Pitt and Hocking. 2022). U ovoce se projevuje měkkou vodnatou strukturou, světle hnědou skvrnou a kyselým zápachem. Vlivem této plísňe dochází k rozpadu plodu bez porušení kutikuly. Infekce se rychle rozšiřuje přes sebemenší trhlinu na plodu (Phyo et al. 2023).



**Obrázek č. 8:** Plíseň *Rhizopus stolonifer* na živném médiu (Tvrzová et al. 2006)

### 3.4 Rostlinné silice

Rostlinné silice jsou těkavé aromatické látky přirozeně obsažené ve všech částech rostliny. Hlavními složkami silic jsou většinou terpeny, terpenoidy a fenylypropanoidy, ale kromě těchto látek obsahují i mnoho dalších sloučenin. Tyto sekundární metabolity slouží jako obranné mechanismy rostlin, které je chrání proti nežádoucím organismům (Valková et al. 2022). Na světě existuje přes 3000 různých druhů silic, přičemž cca 300 z nich má významné komerční použití. Mnoho z nich bylo identifikováno jako bezpečná potravinářská aditiva (Abdi-Moghadam et al. 2023).

Rostlinné silice jsou již dlouho známy pro své antimykotické, antibakteriální, antivirové, antioxidační, imunomodulační, protizánětlivé, protinádorové a analgetické účinky. V minulosti byly rostlinné silice používány v potravinářství především pro jejich aroma. Později se však začaly prokazovat jejich antimikrobiální a antioxidační účinky, tudíž se postupně silice začaly používat pro prodlužování trvanlivosti potravin. Silice by tedy mohly sloužit jako antimikrobiální konzervační látky pro potraviny. Při použití silic jako antimikrobiálních přídatných látek, namísto umělých konzervačních látek, nedochází k mikrobiální rezistenci či adaptaci ani se neobjevují významné nepříznivé vedlejší účinky (Pandey et al. 2021).

Je tu ovšem hned několik překážek použití silic. Silice často mívají výrazné aroma, které nemusí být u některých druhů potravin žádoucí a může měnit organoleptické vlastnosti. Je tu zároveň i riziko kontaminace pesticidy. Kromě toho se jedná o látky velice těkavé a špatně rozpustné ve vodě. Během skladování silic se tak může snižovat jejich účinnost vlivem teploty a světla. Silice se mohou například vpravit do takzvaných jedlých filmů, což jsou biologicky odbouratelné polymery, které vytváří samotný obal. Tento způsob balení je velice udržitelný a není potřeba používat plastový materiál (Rout et al. 2022). Silice lze také použít v plynné fázi jako fumigant. V posledních letech je snaha silice používat ve formě nanoemulzí (Pandey et al. 2021).

#### 3.4.1 Legislativa používání silic v potravinářství

Aby se nové silice, které nejsou uvedené ve schváleném seznamu, mohly používat v potravinářství, musí být schválené Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA).

Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1334/2008 o látkách určených k aromatizaci a některých složkách potravin vyznačujících se aromatem pro použití v potravinách nebo na jejich povrchu říká, že v potravinářství mohou být používány pouze látky uvedeny ve schváleném seznamu. Toto nařízení zároveň obsahuje popis a požadavky na používané látky, aby se zajistilo bezpečné používání látek. S použitím silic v potravinářství souvisí i Vyhláška č. 253/2018 Sb. o požadavcích na extrakční rozpouštědla používaná při výrobě potravin, která určuje, která extrakční činidla jsou vhodná na extrakci silic pro potravinářské účely. Ve Spojených státech schvaluje používání silic v potravinářství Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) (Eur-lex. 2013).

V EU byl vytvořen seznam schválených silic, které lze používat jako potravinářská aditiva a bylo zdůrazněno, že jejich bezpečnost závisí na dodržení doporučené dávky. Některé silice mohou i přesto způsobit u citlivějších lidí alergické reakce. Při určitých dávkách silic s aldehydovou a fenolovou skupinou může dojít k podráždění sliznic, kůže a očí. Například při akutním orálním požití hřebíčkového oleje může dojít k acidóze, zhoršení jaterních funkcí, snížení hladiny glukózy v krvi, ketonurii a křečím. Otrava citronelovou silicí se může projevit zvracením, horečkou, křečemi, cyanózou nebo zrychleným dýcháním. Proto je důležité rozlišit účinnou a toxickou dávku silic (Shrirame et al. 2022).

Podle Nařízení komise (ES) č. 450/2009 o aktivních a inteligentních materiálech a předmětech určených pro styk s potravinami, se aktivními materiály nebo obaly rozumí složky, které jsou určeny k prodloužení trvanlivosti nebo zlepšení či udržení stavu balené potraviny. Jsou navrženy tak, aby záměrně obsahovaly složky, které jsou uvolňovány nebo absorbovány do potraviny či nějakou látku z potraviny nebo prostředí obalu do sebe absorbují. Pokud jsou účinné látky zapouzdřeny do obalového materiálu, uvolňují účinné látky, které zlepšují kvalitu a bezpečnost potravin (Shrirame et al. 2022).

### 3.4.2 Způsoby získávání silic a jejich extraktů

Čistá silice se dá získat pouze dvěma způsoby: destilací nebo u citrusů lisováním. Ostatními metodami získáváme pouze extrakty podobné silici. Extrakce je proces oddělování látek. Výběr metody extrakce závisí na povaze chemických složek v silicích. Typ extrakční metody ovlivňuje výtěžnost silic, fyzikální změny a biologickou hodnotu. Nejčastěji se využívají metody hydrodestilace (která se úplně neřadí mezi extrakci jako takovou) přes Clevengerův přístroj, hydrodifuze, Soxhletova extrakce, ultrazvuk, solární hydrodestilace, metoda extrakce superkritickou tekutinou, mikrovlnné záření a jejich kombinace. Před samotnou extrakcí je také důležitý způsob a teplota sušení, která má výrazný vliv na výtěžnost silic (Pandey et al. 2021).

**Extrakce rozpouštědlem** (Soxhletova extrakce) je nejběžněji používaná metoda pro extrakci silic z rostlin. Jako rozpouštědlo se nejčastěji používá éter, n-hexan, ethanol, petrolej a methanol. Nevýhodou této metody je změna chuti a zanechání zbytkových látek z extrakce. Při extrakci se nejdříve rostlinný materiál rozemele a převede na filtrační papír nebo do filtrační patrony. Poté se umístí do Soxhletova přístroje a baňka s organickým rozpouštědlem se přivede k varu. Rozpouštědlo se zahřívá, odpařuje a kondenzuje v chladiči. Kondenzát rozpouštědla poté několikrát promývá rostlinný materiál v patroně, čím se oddělí silice z rostliny (Pandey et al. 2023; Katekar et al. 2023).

**Macerace** je proces získávání siličných extraktů vylouhováním rostlinných částí v nádobě s rozpouštědlem. Rostlina se nechá volně máčet v rozpouštědle, přičemž těkavé látky přecházejí do rozpouštědla. Rostlina se nechá v rozpouštědle minimálně po dobu 3 dnů při pokojové teplotě za občasného promíchání a poté se směs vylisuje a přefiltruje (Katekar et al. 2023).

**Parní destilací** lze vyextrahovat 93 % těkavých složek z rostlin. Rostlinný materiál se zahřívá pomocí páry vytvořené v parním generátoru. Pára rostlinou pouze prochází, díky čemuž se vařící voda s rostlinným materiálem nemísí. Pára kondenzuje a odděluje se složky silice. Teplo dodávané parou určuje účinnost rozkladu rostlinného materiálu a uvolňování silic. Při parní destilaci je nižší množství odpadní vody, která vzniká extrakcí (Sharma et al. 2021; Katekar et al. 2023).

**Hydrodestilace** patří mezi nejpraktičtější metodu získávání silic. K suchému prášku rostlinného materiálu v baňce se přidá voda, petrolether nebo jiné organické rozpouštědlo. Roztok se zvenčí zahřeje pomocí elektrické topné spirály a těkavé látky jsou unášeny parou do chladiče. Poté se oddělí nežádoucí látky a získáme roztok silic. Výhodou je, že hydrodestilace dokáže extrahovat silice z hydrofobních rostlin s vysokým bodem varu za použití teplot pod 100 °C (Pandey et al. 2023; Katekar et al. 2023; Sharma et al. 2021).

**Mikrovlnná extrakce** je šetrná a efektivní metoda získávání siličných extraktů s vysokou výtěžností. Oproti hydrolýze, louhování a účinkům tepla nemáme při použití této metody takové ztráty (Pandey et al. 2023). Při mikrovlnné extrakci se používají rozpouštědla nebo voda. Těkavé látky v rostlinách (silice) jsou senzibilní na mikrovlnné záření. Mikrovlny v tukové molekule navýší tlak, čímž molekula praskne a uvolní se a odpaří těkavé látky v ní obsažené. Uvolněné látky přechází do chladiče, kde jsou kondenzovány (Chouhan, Mukherjee, Mandal. 2023).

**Extrakce superkritickou kapalinou**, například CO<sub>2</sub> se zdá být jako jeden z dalších efektivních a rychlých způsobů získávání čisté silice. Použití CO<sub>2</sub> jako rozpouštědla přináší několik výhod. CO<sub>2</sub> je nehořlavý, netoxický a má nízkou kritickou teplotu i tlak. Navíc získaná silice je kvalitní, má vysokou čistotu a výtěžnost. Oxid uhličitý je nejdříve natlakován a poté zahříván na určitou teplotu. Dále se smíchá s rozemletým vzorkem a směs je převedena do extrakční kolony. Jednotlivé složky se oddělí v separátoru (Shrirame et al. 2022).

**Ultrazvuková extrakce** je jeden z dalších šetrných způsobů získávání siličných extraktů. Tato metoda urychluje proces extrakce a je na ní spotřebováno méně energie oproti jiným metodám. Používají se ultrazvukové vlny o frekvenci v rozmezí 20 kHz do 2 000 kHz. Ultrazvukové vlny narušují fyzikální a chemické vlastnosti rostlinného materiálu a uvolňují z něho jeho složky (Pandey et al. 2023; Katekar et al. 2023).

### 3.4.3 Způsoby začlenění silic do obalových materiálů a potravin

Silice se mohou do obalů začlenit pomocí **mikroenkapsulace (zapouzdřování)**, kdy se zachová jejich bioaktivita a neovlivní se jejich funkční vlastnosti. Při běžných způsobech začleňování do obalů se používají vyšší teploty, které způsobují vytěkání aktivních látek. Silice se při tomto způsobu výroby vysuší rozprašováním a jako prášek se přidává do biofilmu. Tento způsob použití silice je ekonomický, kvalitní, flexibilní, kontinuální a rychlý proces, který lze



provádět na snadno dostupném přístroji (Balan et al. 2021). Mikroenkapsulace zajišťuje řízené uvolňování látky. Zároveň se zvyšuje stabilita látek a zabrání se vedlejším účinkům (například nežádoucí chuť či zápach). Hlavním materiálem při výrobě jsou polymery, lipidy nebo směsi dalších látek (Pandey et al. 2023).

Populárním způsobem použití silic je nanosení vrstvy silice ve formě **nanoemulze** přímo na danou potravinu. Hlavními výhodami použití nanoemulzí místo přímého přidavku silic jsou ochrana před degradací silic, vysoká stabilita, použití nižšího množství se stejnou účinností, možnost řízeného uvolňování silice a zvýšení rozpustnosti silic. U nanoemulzí byla zjištěna vyšší antifungální aktivita oproti samotnému použití silice. Společně se silicemi se do nanoemulzí často přidává chitosan, který nahrazuje část silice v případě, že by samotná silice mohla výrazně změnit organoleptické vlastnosti potraviny. Chitosan má totiž také antimikrobiální vlastnosti. Dalšími důvody mohou být ekonomické (silice bývají výrazně dražší). Podobně se využívají i nanoemulze na bázi mědi (Pandey et al. 2021).

#### **3.4.4 Antioxidační aktivita silic**

Antioxidační aktivita spočívá v ochraně potravin před volnými radikály způsobujícími oxidativní degradaci. V lidském těle mohou volné radikály a reaktivní formy kyslíku způsobit nádorová onemocnění, záněty, mozkové dysfunkce, kardiovaskulární onemocnění a poruchy imunitního systému. Silice se jeví jako přírodní alternativa k syntetickým antioxidantům běžně používaných v potravinářství. Antioxidační účinek silic závisí na koncentraci silice, části rostliny, ze které je silice získávána, místu původu a také je ovlivňován stresem působícím na rostlinu (Pandey et al. 2021). Oproti syntetickým antioxidantům jsou silice o něco bezpečnějším a ekologičtějším řešením proti oxidaci tuků v potravinách. Oxidace tuků v potravinách způsobuje nežádoucí sensorické a nutriční změny výrobku. Objevuje se žluklá chuť a vůně, změna barvy a může docházet k produkci toxických látek. Antioxidační aktivita silic závisí na obsahu antioxidantů (především monoterpenů a sekviterpenů v silicích) a schopnosti vychytávat kyslík. Antioxidační aktivita v silicích se dá stanovit pomocí analytické metody testu železité redukční antioxidační síly (Sharma et al. 2021).

#### **3.4.5 Antibakteriální aktivita silic**

Antibakteriální aktivita silic závisí na jejich chemickém složení a koncentraci. Hlavní antibakteriální složky v silicích jsou terpeny, terpenoidy, fenoly a aldehydy. Mnoho studií ukázalo, že silice s vysokým obsahem fenolů mají vyšší antibakteriální účinky. Mezi takové fenoly patří například thymol, eugenol nebo karvakrol. Ukázalo se, že aktivní složky silic mají širokospektrální antibakteriální účinek. Díky tomu se silice dají použít proti bakteriím způsobující kažení potravin a zabránit tak plýtvání jídlem (Wang et al. 2023).

Mechanismus antibakteriálního účinku se zakládá na snížení membránového potenciálu, narušením protonové pumpy a vyčerpání ATP. Tyto změny na membráně často vedou k takzvanému kaskádovému efektu, při kterém mohou být ovlivněny i další buněčné orgány. Právě obsah lipofilních složek silic hydrofobní povahy způsobuje narušení buněčné membrány bakterií (Pandey et al. 2021). Antibakteriální účinek je kombinací několika mechanismů. Účinek jedné látky silice může mít rozdílné vlivy na různé patogeny. Silice

mohou mít lepší antibakteriální účinek než některé syntetické chemické látky, jelikož obsahují komplexnější složení látek, které spolu navzájem synergizují. Bylo zjištěno, že skořicová silice inhibuje bakterie narušením buněčné stěny, inhibicí ATPázy, tvorbou biofilmu a samoagregace membrány. Oproti gram pozitivním bakteriím s hydrofobním povrchem jsou gramnegativní bakterie pro svůj hydrofilní povrch odolnější vůči působení silic (Wang et al. 2023).

### 3.4.6 Antimykotická aktivita silic

Antimykotická aktivita je spojená s obsahem monoterpenů a sekviterpenů v silicích. U plísní dochází vlivem silic k narušení jejich buněčné membrány a degeneraci houbových hyf. Silice u plísní poškozují i plazmatickou membránu a buněčné organely. Lipofilní vlastnosti silic způsobují snadnější pronikání přes plazmatickou membránu plísní. U thymolu bylo dokonce pozorováno narušení buněčné membrány plísně *Fusarium graminearum* vlivem peroxidace lipidů a narušení biosyntézy ergosterolu (Pandey et al. 2021). Bioaktivní látky obsažené v silicích vstupují do membrány spor plísní, snižují její elasticitu a negativně ovlivňují morfologii i expresi genu, což zapříčiňuje ztrátu její funkce a struktury (Cruz et al. 2023). Silice jsou přednostně absorbovány lipofilním povrchem mycelia plísní a jejich inhibiční účinek závisí na velikosti povrchu mycelia. S největší pravděpodobností látky obsažené v silicích tvoří s látkami v buněčné membráně plísní nevratné vazby, což vede k úniku intracelulární tekutiny (Abdi-Moghadam et al. 2023).

Hodnocení antimikrobiální aktivity *in vitro* lze pomocí diskových difuzních metod nebo pomocí metody agarového a bujónového ředění. Antimykotická aktivita se dá hodnotit pomocí minimální inhibiční koncentrace. Jedná se o nejnižší koncentraci látky způsobující alespoň 90% snížení životaschopnosti buněk. Minimální mykotická koncentrace zase stanovuje koncentraci, při níž je usmrceno alespoň 99,9 % počátečního inokula. Dále se dá antimykotický účinek hodnotit pomocí inhibičních zón (Abdi-Moghadam et al. 2023). Silice s inhibiční zónou pod 7 mm mají spíše nízký antimykotický účinek. Aby se silice vyznačovala výraznějším antimykotickým účinkem, musí mít inhibiční zónu přesahující 12 mm (Cruz et al. 2023).

### 3.4.7 Silice z dobromyslu

Dobromysl obecná (*Origanum vulgare*), známá také jako koření oregano, je významná aromatická rostlina z čeledi hluchavkovité (*Lamiaceae*.) která díky obsahu flavonoidů, tříslovin, fenolických glykosidů, sterolů triterpenů, pryskyřic a silic nachází rozsáhlé uplatnění v mnoha oblastech. Patří mezi nejvíce konzumované a obchodované koření na světě. Využívá se v potravinářství pro dochucení potravin, v lékařství pro jeho příznivé účinky na tělo ale i v kosmetickém průmyslu. Používá se do různých léčivých přípravků proti kašli, astmatu, bronchitidě, při poruchách trávení, menstruačních problémech a dále jako protizánětlivá a antioxidantní látka (Morshedloo et al. 2018).

Hlavní obsažené silice jsou karvakrol, linalyl-acetát, thymol, (Z)- $\alpha$ -bisabolen, (E)- $\beta$ -karyofylen a oxid karyofylen. Obsah jednotlivých silic se liší napříč různými odrůdami dobromyslu. Roli v obsahu silic hraje také zeměpisné umístění a bioklimatické podmínky (Morshedloo et al. 2018).

Účinek karvakrolu na prodloužení trvanlivosti pečiva byl zkoumán v několika studiích. Antifungální aktivita karvakrolu byla prokázána po začlenění nanovláken s 30 % karvakrolu do aktivního obalu. MIC proti *Penicillium sp.* byla 0,098 mg/ml a 9,8 mg/ml proti *Aspergillus flavus*. Výzkum se prováděl na chlebu. Nanovláknata obohacená o karvakrol by tak mohla být vhodnou alternativou k chemickým konzervačním látkám proti plísním (Fonseca et al. 2021). Během zkoumání inhibice růstu *A. flavus* na živném médiu pomocí karvakrolu byla tato plíseň zcela inhibována při koncentraci silice 0,071 µl/ml. Zároveň bylo zjištěno, že karvakrol způsobuje abnormální morfologii mycelia *A. flavus*, narušuje integritu buněčné stěny a poškozuje plazmatickou membránu plísně (Duan WY et al. 2024). Karvakrol a thymol vykazovali trvalou antimykotickou aktivitu proti *Aspergillus niger* a inhiboval růst této plísně po dobu 30 dnů (Abdi-Moghadam et al. 2023). Během 14denního *in vitro* testování dobromyslového oleje proti plísním *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus* a *Aspergillus westerdijkiae* vykazovala silice inhibiční účinek proti všem testovaným plísním. MID dobromyslové silice byla 31,25 µL/ L vzduchu. Při *in situ* testování přímo na chlebu byla MID50 pro dobromyslovou silici 125 µL/L vzduchu (Cíсарová et al. 2020).

### 3.4.8 Skořicová silice

Skořicovník pravý (*Cinnamomum verum*) patřící do čeledi vavřínovité (*Lauraceae*) je ve světě využíván především pro své příjemné aroma. Skořicový olej je jeden z nejoblíbenějších druhů rostlinných silic. Je schválený Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv jako bezpečný a uplatňuje se v potravinářském průmyslu. Nejčastěji se pro potravinářské použití využívají listy a kůra. Hlavními složkami ve skořicové silici jsou cinnamaldehyd a eugenol. Mezi další obsažené látky patří kafr, cinnamyl-acetát, caryofylen, trans  $\alpha$ -ergamoten, caryofylen oxid, linalool, geraniol, bornyl acetát,  $\alpha$ -kubeben,  $\gamma$ -elemen,  $\alpha$ -kopaen a guaiol (Valková et al. 2022).

Silice obsažené ve skořici prokazatelně zvyšují trvanlivost pečiva díky svým antimikrobiálním vlastnostem. Minimální inhibiční koncentrace silice proti plísním na pečivu byla ve studii Rout et al z roku 2022 u skořice stanovena na 0,21–0,83 µl/ml. Senzorická analýza navíc ukázala, že po přidání 1 % silice nebyla vůně ani chuť výrobku ovlivněna (Rout et al. 2022). Jiná studie prokázala minimální inhibiční koncentraci u citrónového koláče v rozmezí 0,21-0,83 a minimální letální koncentraci 0,42-0,83 přičemž se trvanlivost tohoto produktu prodloužila o 5-6 dní (Ju et al. 2018). V další studii byly porovnávány silice z různých druhů a částí skořice. Použity byly silice z *Cinnamomum cassia* izolované z kůry, z *C. verum* izolované z kůry a z *C. verum* izolované z listů. Antimykotická aktivita byla zkoumána proti plísním *Penicillium citrinum*, *P. expansum* a *P. crustosum*. Nejsilnější antimykotickou aktivitu vykazovaly všechny druhy při nejvyšší použité koncentraci 500 µl/l proti plísni *Penicillium crustosum*. Nejvyšší inhibice růstu mycelia byla stanovena u *C. verum* izolované z kůry při koncentraci 250 µl/l proti *P. citrinum*. Pokus byl prováděn na pšeničném chlebu. Skořicová silice má také prokazatelné antibakteriální účinky například proti různým druhům bakterií včetně gram pozitivních (*Staphylococcus aureus*) a gram negativních (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio*

*parahaemolyticus* a *Samonella typhymurium*). Je také účinná proti některým kvasinkám jako jsou *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* a *C. krusei* (Valková et al. 2022). I u skořice byla ve studii Císarová et al. 2020 zjištěna výrazná inhibice všech testovaných plísní rodu *Aspergillus*. U *in vitro* testování byla MID skořicové silice 15,625  $\mu\text{L/L}$  vzduchu a u *in situ* testování přímo na chlebu byla MID 50 131,62  $\mu\text{L/L}$  vzduchu.

Skořicová silice byla také zkoumána v kombinaci s hořčičnou silicí, která má vysoký antimykotický účinek, ale nepříznivý vliv na organoleptické vlastnosti. V kombinaci se skořicovou silicí se tak přijatelnost chuti zlepšila. Silice byly na parní bázi aplikované na chléb a byla sledována odolnost proti různým plísním, především pak velice odolné plísni *Rhizopus stolonifer*. Maximální inhibice této plísně dosažená při poměru 100:1, skořice:hřebíček byla 29 %, což ukazuje na vysokou odolnost. U všech ostatních druhů plísní byla pozorována výraznější inhibice růstu (Clemente et al. 2019).

### 3.4.9 Tymiánová silice

Rostliny rodu *Thymus*, patřící do čeledi hluchavkovité (*Lamiaceae*), jsou bohatým zdrojem silic, které se nacházejí ve všech částech rostliny. Obsahují především terpeny jako je thymol a karvakrol, které způsobují typické tymiánové aroma. Další fenolické sloučeniny jako jsou  $\gamma$ -terpinen, p-cymen, geraniol, borneol a linalool se vyskytují spíše ve stopovém množství. Druhy tymiánu *T. vulgaris*, *T. zygis subsp. sylvestris*, *T. glandulosus*, *T. striatus*, *T. daenensis*, *T. eriocalyx*, *T. x-porlock* a *T. serpyllum* jsou rostliny s převahou thymolu a druhy *T. satureioides*, *T. capitatus*, *T. caramanicus*, *T. leptobotrys*, *T. riatarum*, a *T. kotschyanus* naopak obsahují vyšší množství karvakrolu. Hlavními látkami vykazující antimikrobiální a antioxidační aktivitu pro potravinářské použití jsou thymol,  $\gamma$ -terpinen, karvakrol a p-cymen. Obsah jednotlivých látek v rostlině může být ovlivněn geografickou polohou, dobou sklizně, skladováním, sušením či postupem extrakce. Hrají zde roli také genetické odlišnosti rostlin a odlišné postupy v agrikultuře (Pandey et al. 2021).

Antifungální aktivita tymiánových silic byla zkoumána hned v několika studiích. Při použití 3,0  $\mu\text{l/l}$  MIC silice *T. capitatus* byl výrazně ovlivněn růst mycelia plísní *Aspergillus flavus*, *A. niger* a *A. ochraceus*, infikujících zrna pšenice. Tymiánová silice inhibovala produkci až 96 % *A. flavus*, přičemž nejvyšší inhibice produkce aflatoxinu byla při 100 a 150  $\mu\text{l}$ . Výsledky studie z roku 2019 ukázaly, že silice *T. capitatus* s MIC 1,00 mg/ml kromě inhibice plísně *A. flavus* také potlačuje produkci aflatoxinu B1. Některé tymiánové silice byly testovány proti plísním rodu *Penicillium*, ale výsledky testování neměly moc velký význam v ochraně proti tomuto druhu plísně (Pandey et al. 2021; Abdi-Moghadam et al. 2023).

U tymiánových silic byla prokázána i silná antioxidační aktivita, především u druhů *T. munbyanus*, *T. daenensis*, *T. vulgaris*, *T. fontanesii*, *T. linearis*, *T. serpyllum* a *T. calcareous*. Za antioxidačními účinky stojí především fenolické sloučeniny, zejména flavonoidy obsažené v olejích tymiánu. Fenolické sloučeniny díky dvojným vazbám mají vliv na redoxní vlastnosti a neutralizují volné radikály. Nejvýznamnější fenolické sloučeniny jsou karvakrol, thymol, kafr, linalool apigenin, kyselina skořicová a kyselina rozmarýnová. Složení tymiánové silice je dáno vývojovými fázemi rostliny. Ovšem extrakt z rozmarýnu je jako antioxidační látka

mnohem účinnější. Je také veden v EU jako schválená potravinářská přídatná látka, což extrakt z tymiánu není (Pandey et al. 2021).

Hlavním problémem tymiánové silice je její potencionální toxicita. Dvě hlavní fenolické látky v tymiánu tymol a karvakrol prokázaly cytotoxickou aktivitu. Není vhodné tedy tymiánovou silici používat perorálně ve větším množství. Oproti  $\alpha$ -pinenu, borneolu a  $\beta$ -aryofylenu se dá ale říci, že je tymiánová silice méně toxická, jelikož dominantní složkou tymiánové silice tyto složky nejsou (Pandey et al. 2021).

#### 3.4.10 Silice z citrónové trávy

Citrónová tráva (*Cymbopogon citratus*), známá pod názvem lemongrass, je vytrvalá aromatická rostlina z čeledi lipnicovité (*Poaceae*). Silice z této rostliny má silnou citrónovou vůni. Rostlina se vyznačuje protinádorovými, antimikrobiálními, antimykotickými a antioxidačními účinky. Díky těmto účinkům se využívá v lékařství (především ortopedii, dermatologii nebo fyziologii), jako herbicid, do parfémů nebo jako konzervační látka a ochucovadlo v potravinářství. Primární složkou silice je citral, který se skládá z izomerů neral a geranial. Je zodpovědný za citrónové aroma a většinu biologických aktivit silice. Citral byl schválen Evropskou komisí jako bezpečný přídavek do potravin (Chouhan, Mukherjee, Mandal. 2023).

Při *in vitro* testování citrónové trávy byla prokázána antifungální aktivita proti plísním *Penicillium crustosum* and *Aspergillus flavus*, přičemž *Aspergillus* byla odolnější. Pro *Penicillium* byla inhibiční zóna při agarovém difuzním testu po třech dnech  $21,9 \pm 2,7$  mm a po 12 dnech  $22,4 \pm 2,9$  mm naopak u *Aspergillus* byla inhibiční zóna po třech dnech  $21,2 \pm 3,2$  mm a po 12 dnech už pouze  $9,9 \pm 1,0$  mm. MIC pro obě plísně byla  $0,03 \mu\text{L}/\mu\text{L}$  u volné silice a pro zapouzdřenou silici v maniokových vlákních byla MIC u obou plísní  $0,022$  (20% koncentrace),  $0,022$  (30%) a  $0,020 \text{ mg}/\mu\text{L}$  (40%). Zkoumala se také antimykotická aktivita silic proti plísním na chlebu zabaleném v aktivním obalu. Při použití čisté silice do aktivního obalu byla po 10 dnech antimykotická aktivita  $5,47 \pm 0,10 \text{ Log.CFU}/\text{g}$ . U aktivního obalu se zapouzdřenou silicí v maniokových vlákních byla antimykotická aktivita  $5,84 \pm 0,27 \text{ Log.CFU}/\text{g}$ . Zapouzdřená silice se ukázala účinnější než kontrolní vzorky bez silic i s pouze volnou silicí (Cruz et al. 2023).

Ve studii zabývající se inhibicí plísní rodu *Aspergillus* (konkrétně druhy *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae*) se ukázalo, že silice z citrónové trávy výrazně inhibovala růst všech druhů této plísně. Během *in vitro* testování byla MID (minimální inhibiční dávka) silice citrónové trávy proti testovaným plísním  $15,625 \mu\text{L}/\text{L}$  vzduchu, což byly nejlepší výsledky ze všech ostatních použitých silic (hřebíček, levandule, tymián, kmín, šalvěj, bazalka, skořice a rozmarýn). Hodnocení proběhlo pomocí metody plynové difuze. Během testování silice přímo na chlebu v hermeticky uzavřených skleněných nádobách inhibovala silice z citrónové trávy plísně i v relativně malých dávkách. MID50 byla  $70,26 \mu\text{L}/\text{L}$  vzduchu. Nevýhodou použití silice z citrónové trávy byla změna sensorických vlastností chleba, což nemusí někteří konzumenti hodnotit příznivě. Oproti *in vivo* testování je také nutné na potraviny použít vyšší koncentrace silice, aby se dosáhlo požadovaného účinku (Cíсарová et al. 2020).

### 3.4.11 Další druhy silic

Hned po skořicové silici, patří **hřebíčková silice** k nejvíce používaným silicím v potravinářství, jelikož se také ukázala jako účinná v boji proti plísním. Rout et al. uvádějí ve své práci minimální inhibiční koncentraci silice hřebíčku proti plísním v rozmezí 0,21–1,67  $\mu\text{l/ml}$  (Rout et al. 2022). Ve studii Ju et al. byla zjištěna minimální inhibiční koncentrace u citrónového koláče v rozmezí 0,21-1,67 a minimální letální koncentraci 0,83-1,67 přičemž se trvanlivost tohoto produktu prodloužila o 2-3 dny (Ju et al. 2018). Biofilm obsahující kombinaci citrátu  $\beta$ -cyklodextrinu a oxidovaných nanocelulóзовých frakcí s přidavkem hřebíčkové silice se ukázal jako účinný prostředek proti plísním *Aspergillus niger* (Gengatharan, Rahim. 2023).

Hřebíčková silice obstála i v další studii, tentokrát proti plísním *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae*. Silice úspěšně inhibovala všechny tyto druhy plísní. Fungicidní účinek byl hodnocen metodou plynové difuze, přičemž minimální inhibiční dávka (MID) při in vitro testování byla 31,25  $\mu\text{L/L}$  vzduchu. Nejcitlivější byl druh *Aspergillus flavus*. Silice byla hodnocena také přímo na chlebu ve skleněných, hermeticky uzavřených nádobách, kdy MID 50 byla 205,02  $\mu\text{L/L}$  vzduchu (Cíсарová et al. 2020). Jako účinný se eugenol prokázal i proti kvasinkám rodu *candida*, plísním *Penicillium species* a mnoho druhům bakterií. Řada plísní a bakterií je ale podle výzkumů odolná proti účinkům hřebíčkového oleje. U pečiva může hřebíčkový olej prodloužit trvanlivost a zároveň zachovat senzorycké vlastnosti výrobku nezměněné (Pandey et al. 2023).

**Badyánový olej** byl zkoumán pro jeho antimykotické účinky především proti *Aspergillus niger*. Dokáže snížit obsah ATP a životaschopnost buněk *A. niger*. Díky těmto účinkům může jeho aplikace prodloužit trvanlivost pečiva (konkrétně chleba) až na 8 dní. V experimentu byly na povrch chleba v aseptickém prostředí naočkovány spory *A. niger*. Chléb se následně umístil do sáčku s papírovým proužkem napuštěným badyánovým olejem. Skladování v obalu probíhalo při teplotě 28 °C a kontrola okem viditelných plísní probíhala každý den. U kontrolního vzorku bez přidání esenciálního oleje (EO) se objevovaly skvrny kolonií plísní už 6. den skladování. Experimentální vzorek s přidavkem 400 mg/l EO vykazoval mikrobiální růst až 9. den. Jiná studie potvrdila podobný efekt citrónového EO na růst plísní *A. niger* a rodu *Penicillium*. Dokonce potvrdila, že se extrakcí CO<sub>2</sub> zvýší antimykotický účinek EO (Zhao et al. 2022). Bao et al (2023) zkoumal účinek hlavních složek badyánové silice proti *A. niger* a *Penicillium roqueforti* na chlebu. MIC byla pro *Penicillium* 125,00  $\mu\text{l/ml}$  a pro *Aspergillus* 31,25  $\mu\text{l/ml}$ . Trans-anetol a estragol vykazovaly antifungální aktivitu proti oběma druhům plísní, zatímco linalool vykazoval antifungální aktivitu pouze proti *Aspergillus niger*. Extrakt z badyánu tak dokázal prodloužit trvanlivost chleba o 6 dní.

U **kmínové silice** ve studii zaměřující se na inhibici plísní rodu *Aspergillus* byla během in vitro testování MID (minimální inhibiční dávka) pro *A. flavus* 125  $\mu\text{L/L}$  vzduchu a pro kmeny *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae* 62,5  $\mu\text{L/L}$  vzduchu. Při testování silice přímo na chlebu hermeticky uzavřeném ve skleněné nádobě byla MID 304,58  $\mu\text{L/L}$  vzduchu, což byl nejhorší výsledek ze všech testovaných druhů silic a vykazovala spíše slabší inhibiční účinek (méně než 80 %). Zároveň kmínová silice vykazovala téměř žádný účinek na tvorbu mykotoxinů plísní *Aspergillus* (Cíсарová et al. 2020).

Během testování účinku kmínové silice na růst mycelia *Aspergillus flavus* byla už 0,2% koncentrace silice schopná během 7 dnů inhibovat 50 % mycelia. MIC (minimální inhibiční

koncentrace) kmínové silice, která zcela inhibovala rozšíření mycelia byla 0,4 %. Rychlost růstu výrazně ovlivňuje spíše samotný karvon. Při koncentraci 1500 µg/ml dokáže zcela inhibovat růst mycelia, zatímco limonen spíše nemá vliv na rychlost růstu *A. flavus* (Lasram et al. 2019). Bylo zjištěno, že látky kmínové silice narušují biosyntézu ergosterolu a methylglyoxalu u *A. flavus*, čímž zamezují biosyntéze aflatoxinu B1 a dochází zároveň ke ztrátě životně důležitých buněčných iontů plísně (Maurya et al. 2021).

### 3.5 Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem

Metoda GC/MS je kombinací plynové chromatografie, která zajišťuje oddělení sloučenin a hmotnostního spektrometru, na kterém dojde k citlivé a specifické identifikaci látek. Oproti kapalinové chromatografii je plynová chromatografie jednodušší, má vyšší separační výkon a je na ní potřeba méně rozpouštědel, což může vést i k menším nákladům metody. I údržba stroje a používané kolony mohou být cenově dostupnější než u kapalinové chromatografie. GC/MS je vhodná pro detekci malých molekul, jelikož je vysoce citlivá a detekuje vícero kontaminantů najednou i v nízkých koncentracích a malém množství vzorku. Zároveň je účinná při stanovování sloučenin s vysokým tlakem par. Pro tyto vlastnosti je často vyžadována regulačními orgány pro analýzu léčiv, drog nebo kontaminantů. Jedná se tedy o vynikající kvantitativní metodu, při které se dají stanovovat koncentrace od pikogramů po miligramy (Filho et al. 2024).

Plynová chromatografie je separační metoda, při které dochází k oddělování těkavých a semi-těkavých látek při průchodu chromatografickou kolonou. V koloně se nachází speciální povlak (stacionární fáze) a nosný (inertní) plyn (mobilní fáze). Výběr stacionární fáze je velice důležitý a závisí na interakcích, které působí mezi analytem a stacionární fází jako jsou dipólové interakce, vodíkové vazby a van der Waalovy síly. Stacionární fáze musí odpovídat vlastnostem separovaných sloučenin. Těkavější látky obsažené ve sloučenině prochází kolonou rychleji a způsobují kratší retenční časy. Méně těkavé látky více interagují se stacionární fází a prochází kolonou pomaleji. Separace látek závisí na těkavosti, ale i na chemické struktuře látek (Gaida et al. 2023). Avšak ne všechny analyty můžeme stanovovat pomocí GC kvůli jejich nízké těkavosti, asymetrickým píkům nebo termolabilitě. V tomto případě můžeme vzorek před analýzou upravit analytickou derivatizací, která je časově náročná, nebo použít kapalinovou chromatografii. Asymetrické píky způsobují organické látky s funkčními skupinami obsahující hydroxyl, karboxylovou kyselinou, amin nebo thiol (Atapattu and Azamat. 2023).

Hmotnostní spektrometr se používá pro detekci a identifikaci chemických látek. Je velice přesný, citlivý a má dobrou selektivitu. Přístroj se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Iontový zdroj ionizuje neutrální atomy a molekuly, hmotnostní analyzátor odděluje látky na základě poměru hmotnosti a náboje iontů a detektor detekuje a zesiluje iontový svazek. Nevýhodou hmotnostních spektrometrů mohou být velké rozměry, energetická náročnost a vysoká cena. Proto se v dnešní době vědci snaží vyvíjet menší přístroje, přičemž se ale zhoršuje jejich výkon (Yang et al. 2022).

GC/MS je někdy spojována s technikou SPME. Mikroextrakce na pevné fázi je jednoduchá a účinná metoda přípravy vzorku, která se dá dobře využít například v potravinářství. Extrakce probíhá na tenkém vlákně potaženém vhodnou látkou. Spojuje do

jednoho kroku odběr, extrakci, čištění a obohacení vzorku bez použití rozpouštědla. Nevýhoda SPME může spočívat ve vytěsnění látky s nižší afinitou k povrchu vlákna látkou s vyšší afinitou k povrchu. Nižší afinitu mají spíše látky polárního charakteru. U těchto látek může být nižší úroveň výtěžnosti (Wieczorek et al. 2024).

## 4 Metodika

### 4.1 Použitý materiál

Pro výrobu obalů, ve kterých jsme zkoumali trvanlivost pečiva, jsme použili látkové ubrousky o velikosti 28,2 x 30 cm. Látko byla vyrobena z bavlny o hmotnosti 140 g/m. Na látku jsme nanášeli směs včelího vosku, kokosového oleje a silice. U 4 vzorků s 1 % dobromyslové silice jsme místo kokosového oleje použili jojobový olej. Vosková směs obsahovala 180 g včelího vosku a 20 g oleje. Silice jsme přidávali do vosku ve dvou koncentracích a to 1% (2 g silice) a 0,1% (0,2 g). Konkrétně jsme testovali silice tymiánu, citrónové trávy, dobromyslu a skořice. Na každý kus látky bylo nanášeno cca 15 g voskové směsi. Samotné plátno vážilo cca 13,46 g a po přidání vosku jednotlivé ubrousky vážili 27–30 g. Jako kontrolní vzorky jsme použili látku se směsí vosku a oleje bez silice. Od každé koncentrace a druhu silice jsme měli 4 opakování. Kontrolní vzorky jsme také dělali ve 4 opakování. Kromě námi vyrobených obalů jsme testovali také 2 komerčně vyráběné obaly pouze z látky (u tohoto druhu jsme provedli jen 1 opakování) a mikrotenové pytlíky ve 4 opakování. Komerční látkový pytlík hnědé barvy byl značky Wrap up a černobílý pytlík značky Green smile. Pro testování jsme si zvolili jako vzorky čerstvý chléb pšenično-žitný (českolipský). Celkově jsme tedy testovali 46 vzorků.



Obrázek č. 9: Látkový obal potažený včelím voskem (Ducháčová 2024)





**Obrázek č. 10:** Látkový obal značky Green smile (vlevo) a látkový obal značky Wrap up (Ducháčová 2024)

## 4.2 Postup výroby obalů

Bavlněná látka byla nastříhána na ubrousky o velikosti 28,2 x 30 cm. V ohřevném hrnci byl pomalu rozpouštěn vosk s olejem. Ke konci rozpouštění bylo přidána silice a směs se promíchala. Ubrousek byl umístěn na vyhřívanou desku a válečkem na něj byla nanášena vosková směs. Špachtlí byl rovnoměrně rozetřen vosk a z ubrousku odstraněn přebytečný vosk. Ubrousek se nechal volně zavěšený na vzduchu uschnout a převážila se jeho hmotnost. Případně byl ubrousek znovu nahřátý na desce a přidal či odebral se přebytečný vosk. Po uschnutí se ubrousky skladovali zvlášť oddělené alobalem.

## 4.3 Způsob testování

### 4.3.1 Testování trvanlivosti pečiva v obalech

Byla testována trvanlivost chleba v různých obalech po dobu 14 dní. Sledoval se především hmotnostní úbytek vzorků a výskyt okem viditelných plísní. Voskové obaly byly vyrobeny 1.8. a skladovací pokus byl zahájen 5.8. 2024. Chléb určený pro testování byl rozkrojen na 4 části. Každá část byla zabalena do našeho voskovaného ubrousku, komerčního obalu nebo mikrotenového pytlíku. Jako kontrola byl zvolen povoskovaný obal bez obsahu silic. Každý

den byla sledována měnící se hmotnost chlebů a vizuálně se kontroloval výskyt plísní. Vždy byl chléb vyjmut z obalu a poté zvážen a znova zabalen. Díky tomu se imitovaly podmínky běžného užívání spotřebitelem. Byl tak sledován úbytek vody ve vzorcích a jejich trvanlivost během následujících dvou týdnů. Pokus byl proveden ve dvou opakováních se stejnými již použitými obaly s odstupem 78 dní. Použité obaly nebyly nijak omyty, pouze z nich byly vyklepány drobký po předchozím pokusu. Pouze u mikrotenového pytlíku byly použity nové sáčky. Výsledky byly zapisovány do tabulky a následně byl sestaven graf, ze kterého byla hodnocena účinnost jednotlivých druhů obalů, silic a jejich koncentrací. Sensorika u těchto vzorků nebyla primárně sledována.

### **4.3.2 Stanovení reziduí silic v obalech**

Část vosku při výrobě obalů byla odebrána pro stanovení množství silic ve vosku na začátku pokusu. Po dokončení skladovacího pokusu s chlebem byly obaly použité na přechovávání chleba podrobeny stejnému rozboru na chromatografu pro stanovení reziduí silic. Od výroby obalů do jejich rozboru na rezidua silic uběhlo 112 dní. Pro rozbor vosků a obalů na stanovení obsahu charakteristických látek pro danou silici byla použita plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostním spektrometrem a mikroextrakcí na pevné fázi. Stanovovala se vždy jedna hlavní komponenta konkrétní silice.

#### **4.3.2.1 Chromatografie s hmotnostním spektrometrem**

Relativní obsah hlavních složek silic byl stanoven plynovou chromatografií s následnou hmotnostní spektrometrií (GC-MS), Agilent 7890A + 5973 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) s kolonou HP-5MS, 30 m × 0,25 mm a tloušťkou vrstvy 0,25 μm. Teplota v peci byla zvyšována z 60 °C rychlostí 3 °C/min na maximální teplotu 231 °C, kde byla udržována konstantní po dobu 10 min. Před analýzou byly EO zředěny v hexanu na koncentraci 1 μl/ml. Pro sorpci těkavých látek bylo použito SPME vlákno DVB/CAR/PDMS (Supelco, USA). Vzorek byl měřen v režimu splitless. Nosným plynem bylo helium (konstantní průtok 1 ml/min, čistota 99,999 %); teplota injektoru byla 250 °C. Do sterilovaných skleněných vialek bylo naváženo 0,1 g vosku nebo použitého obalu s voskem s přesností na 3 desetinná místa. Ampulky byly uzavřeny a analyzovány. Relativní obsahy látek byly vypočteny porovnáním píků stejných látek v jednotlivých vzorcích.

## **4.4 Vyhodnocování výsledků**

Každý den v obou pokusech byly jednotlivé vzorky zváženy a hodnoty zapsány do tabulek. Pokud se na vzorku chleba objevila plíseň, byl vzorek další den vyřazen. U všech vzorků tedy nebyla měřena hmotnost až do 14. dne. Výsledky měření hmotností z prvního a druhého skladovacího pokusu byly zapsány do tabulek a hodnoty ze všech opakování byly zprůměrovány pro každý druh obalu. Byl vypočten průměrný denní úbytek hmotnosti pro každý druh obalu a z těchto hodnot byl spočítán průměrný % úbytek hmotnosti. Byl zapsán také den výskytu plísně na vzorku u každého obalu a výsledky byly zprůměrovány. Do výsledků bylo zahrnuto také u kolika kusů a z kolika opakování pro každý druh obalu se vyskytla viditelná plíseň. Tento údaj byl pro lepší přehlednost a vypovídající hodnotu převeden na procenta. Nakonec byla vypočítaná směrodatná odchylka % úbytků hmotností a všechny hodnoty byly

vloženy do tabulek. Výsledky byly vyhodnocovány pomocí znázornění v grafech a použití statistických metod ANOVA (post hoc Tukey test) a t-testu s hladinou významnosti 0,05.

Vyhodnocování výsledků obsahu reziduí silic proběhlo pomocí chromatografie s hmotnostním spektrometrem metodou SPME. V chromatografu byl u každého vzorku nalezen chromatografický pík pro konkrétní složku silice, kterou stanovujeme a do tabulek byla zapsána plocha daných píků. Hodnoty byly zprůměrovány pro každý druh obalu a přes naši navážku přepočítány na 0,1 g a převedeny na mikrogramy. Pro porovnání obsahu silic ve vosku a v obalech po pokusu byl vypočten průměrný úbytek obsahu silic v %. Díky tomu bylo možné zjistit, o kolik se snížilo množství silic ve vosku během pokusu.

## 5 Výsledky

### 5.1 Skladovací pokus

Podle dat z prvního měření v tabulce 1 z hlediska průměrného dne výskytu plísní nejlépe vycházely obaly dobromysl 1%, dobromysl s jojobovým olejem 1%, skořice 1%, skořice 0,1 % a látkový pytlík černobílý. U všech těchto obalů se ani po 14 dnech nevyskytla žádná viditelná plíseň. Nejhůře z pohledu průměrného dne výskytu plísní na tom byl látkový pytlík hnědý (6. den). Hned po něm následoval mikrotenový pytlík (8,5 dní) a kontrola (8,6 dní). Průměrné denní hmotnostní úbytky byly nejvyšší u vzorků z látkového pytlíku hnědého (2,01 %) a látkového pytlíku černobílého (2,40 %). Nejnižší průměrné denní hmotnostní úbytky měly vzorky zabalené v mikrotenovém pytlíku (0,22 %).

Druhé měření vyobrazené v tabulce 2 nám ukazuje poměrně odlišné výsledky výskytu plísní oproti prvnímu měření. V druhém pokusu zplesnivěly během 14 dní všechny vzorky. Pouze u dobromyslu 1% s jojobovým olejem a skořice 0,1% se vyskytla plíseň ve 3 ze 4 opakování. U ostatních vzorků se vyskytla plíseň ve všech opakování. Průměrný den výskytu plísní byl nejvyšší u dobromyslu 1% s jojobovým olejem (10,67 dní) a skořice 1% (11 dní). Nejhůře na tom byla citrónová tráva 0,1% (5,25 dní) a kontrola (6 dní). Úbytky hmotností se mírně snížily u látkového pytlíku hnědého (1,21 %) a látkového pytlíku černobílého (1,82 %). Průměrný denní úbytek hmotnosti se naopak mírně navýšil u dobromyslu 1% s jojobovým olejem (z 0,94 na 1,55 %), skořice 0,1% (z 0,64 na 0,97 %) a skořice 1% (z 0,66 na 1,03 %).

**Tabulka 1:** Výsledky úbytku hmotnosti a výskytu plísní v prvním skladovacím pokusu

<b>První skladovací pokus</b>				
<b>Druh silice</b>	<b>Koncentrace silice (%)</b>	<b>Průměrný den výskytu plísně</b>	<b>% zplesnivělých kusů za 14 dní</b>	<b>Průměrný denní hmotnostní úbytek (%)</b>
Dobromysl	0,1	10,5 +- 3,30	50	0,82 +- 0,73
Dobromysl	1	>14*	0	0,796 +- 0,67
Dobromysl s jojobovým olejem	1	>14*	0	0,95 +- 0,69
Tymián	0,1	11,00 +- 2,00	25	0,74 +- 0,498
Tymián	1	9,75 +- 1,50	100	0,55 +- 0,53
Citrónová tráva	0,1	9,50 +- 1,00	100	0,65 +- 0,56
Citrónová tráva	1	10,00 +- 2,50	25	0,91 +- 0,66
Skořice	0,1	>14*	0	0,64 +- 0,596
Skořice	1	>14*	0	0,66 +- 0,63
Mikrotenový pytlík	0	8,50 +- 1,29	100	0,22 +- 0,39
Látkový pytlík hnědý**	0	6,00 +- 0,00	100	2,08 +- 1,24
Látkový pytlík černobílý**	0	>14*	0	2,396 +- 1,45
Kontrola***	0	8,60 +- 3,20	75	0,81 +- 0,66

\* Plíseň se nevyskytla ani po 14 dnech

\*\*Všechny obaly ve 4 opakování, látkové pytlíky pouze v jednom opakování

\*\*\* Látka se včelím voskem bez silic

**Tabulka 2:** Výsledky úbytku hmotnosti a výskytu plísní ve druhém skladovacím pokusu

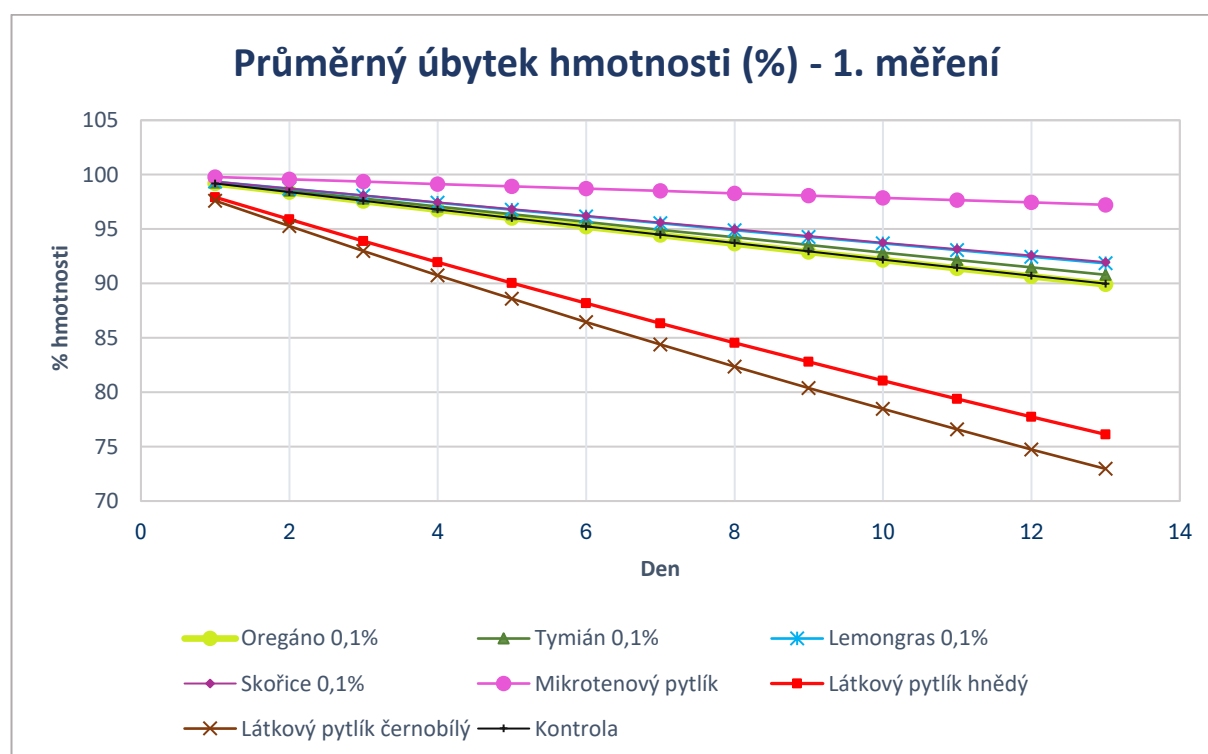
<b>Druhý skladovací pokus</b>				
<b>Druh silice</b>	<b>Koncentrace silice (%)</b>	<b>Průměrný den výskytu plísně</b>	<b>% zplesnivělých kusů za 14 dní</b>	<b>Průměrný denní hmotnostní úbytek (%)</b>
<b>Dobromysl</b>	0,1	7,50 +- 1,73	100	0,896 +- 0,32
<b>Dobromysl</b>	1	7,75 +- 1,71	100	0,79 +- 0,38
<b>Dobromysl s jojobovým olejem</b>	1	10,67 +- 2,75	75	1,55 +- 0,64
<b>Tymián</b>	0,1	7,75 +- 2,63	100	0,87 +- 0,56
<b>Tymián</b>	1	8,25 +- 0,96	100	0,66 +- 0,31
<b>Citrónová tráva</b>	0,1	5,25 +- 1,50	100	0,71 +- 0,32
<b>Citrónová tráva</b>	1	7,00 +- 1,63	100	1,08 +- 0,43
<b>Skořice</b>	0,1	8,00 +- 3,59	75	0,97 +- 0,61
<b>Skořice</b>	1	11,00 +- 1,83	100	1,03 +- 0,42
<b>Mikrotenový pytlík</b>	0	7,75 +- 0,96	100	0,15 +- 0,05
<b>Látkový pytlík hnědý**</b>	0	7 +- 0,00	100	1,21 +- 0,51
<b>Látkový pytlík černobílý**</b>	0	8,00 +- 0,00	100	1,82 +- 0,62
<b>Kontrola***</b>	0	6,00 +- 1,41	100	1,17 +- 0,33

\*\*Všechny obaly ve 4 opakování, látkové pytlíky pouze v jednom opakování

\*\*\* Látka se včelím voskem bez silic

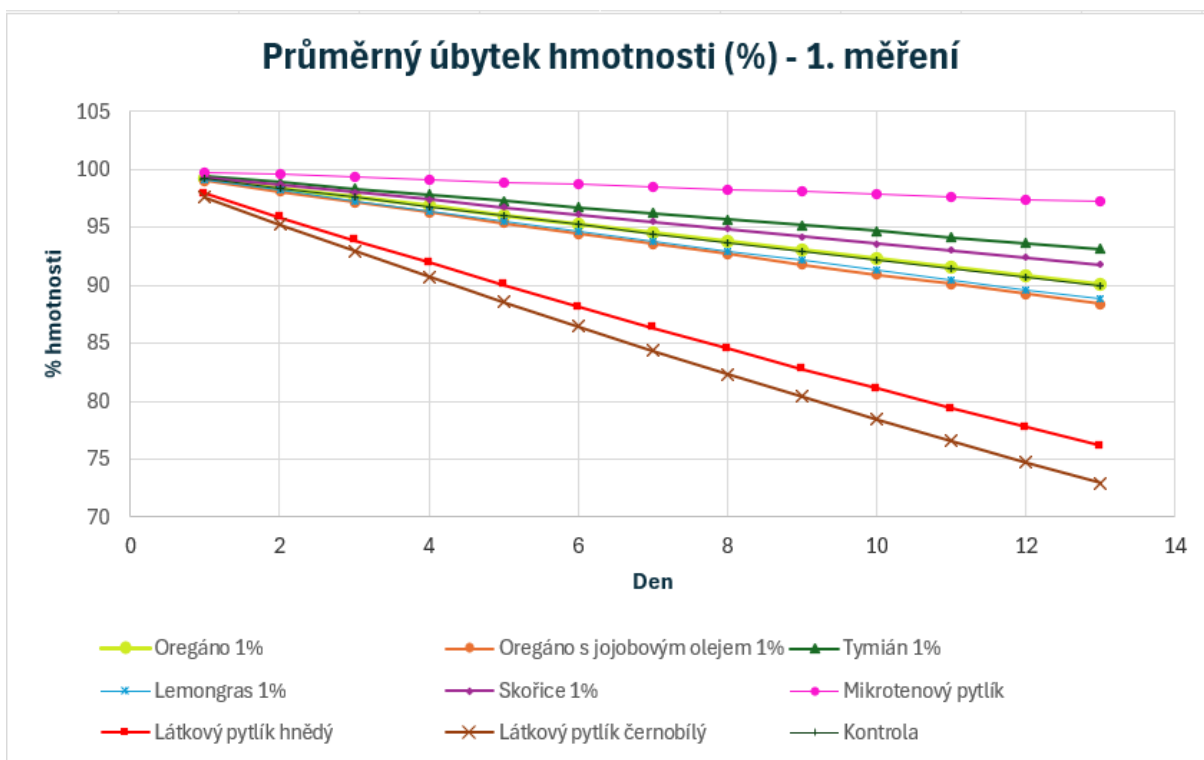
### 5.1.1 Úbytek hmotnosti

Z průměrných % úbytků hmotností byly sestaveny bodové grafy pro obě měření (viz graf 1-4) z kterých vyplývá, že v prvním měření byl nejvyšší úbytek hmotnosti u obou látkových pytlíků, a naopak nejmenší u mikrotenových sáčků. Všechny povoskované obaly se silicemi i kontrola měli podobné úbytky hmotnosti. Ve druhém měření se o trochu snížil úbytek hmotnosti u látkového pytlíku hnědého, ale naopak se zvýšil úbytek hmotnosti u dobromyslu s jojobovým olejem a kontroly. O ostatních druhů silic se také mírně zhoršila schopnost zabránění vysychání vzorku v obalu, ale mezi prvním a druhým měřením neexistuje statisticky významný rozdíl.



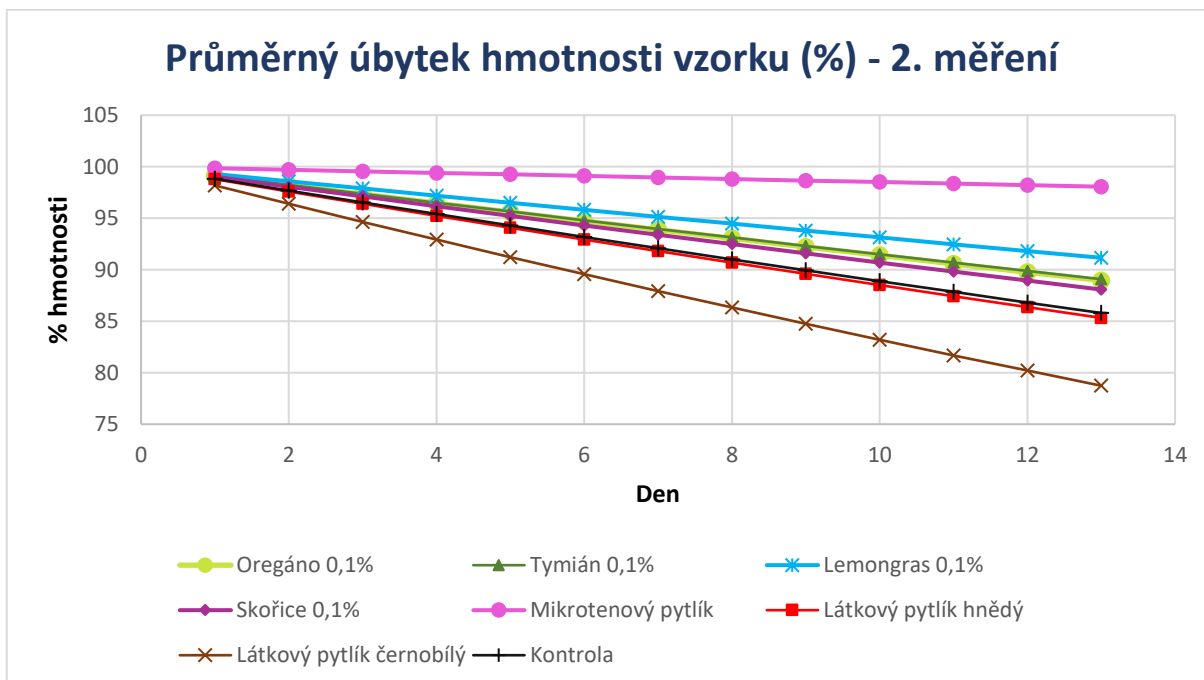
**Graf 1:** Průměrný úbytek hmotnosti vzorků v prvním pokusu (koncentrace 0,1 %)

\*Všechny obaly ve 4 opakování, látkové pytlíky pouze v jednom opakování



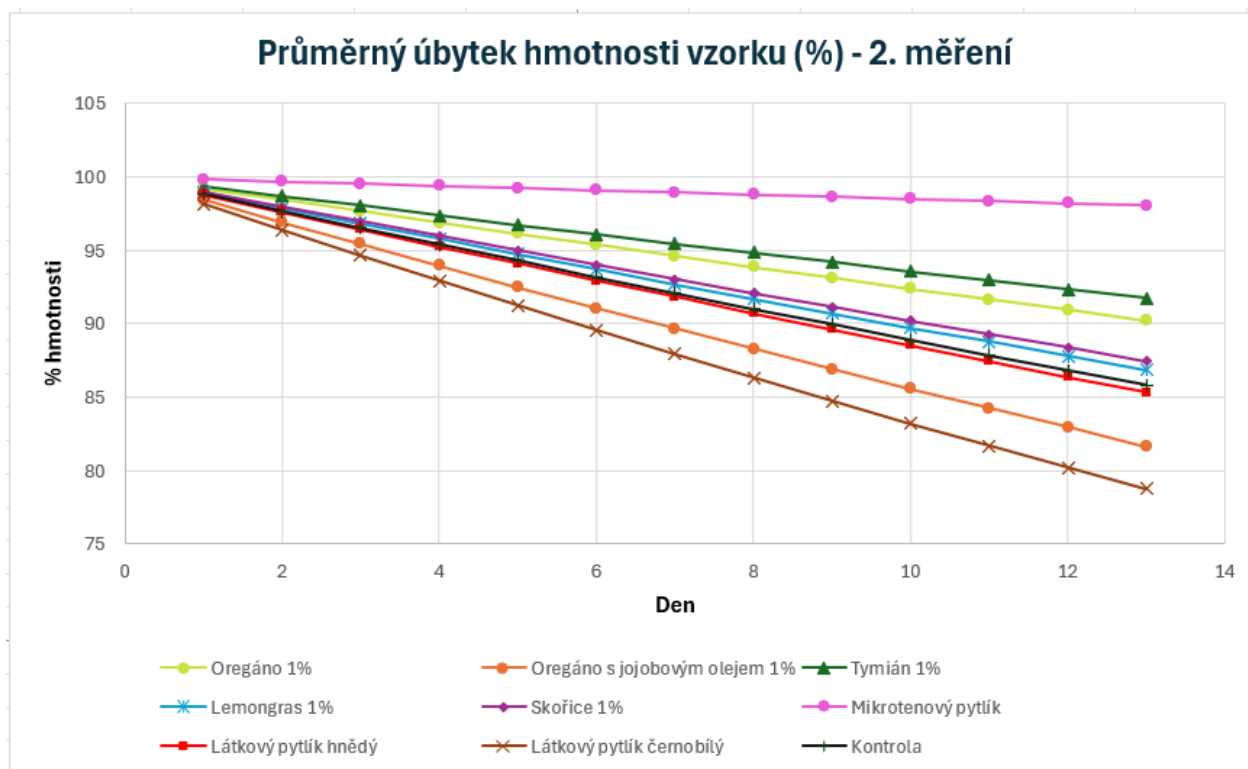
**Graf 2:** Průměrný úbytek hmotnosti vzorků v prvním pokusu (koncentrace 1 %)

\*Všechny obaly ve 4 opakování, látkové pytlíky pouze v jednom opakování



**Graf 3:** Průměrný úbytek hmotnosti vzorků ve druhém pokusu (koncentrace 0,1 %)

\*Všechny obaly ve 4 opakování, látkové pytlíky pouze v jednom opakování



**Graf 4:** Průměrný úbytek hmotnosti vzorků ve druhém pokusu (koncentrace 1 %)

\*Všechny obaly ve 4 opakování, látkové pytlíky pouze v jednom opakování

Bylo provedeno vyhodnocení úbytku hmotnosti vzorku v různých obalech pomocí statistické metody ANOVA a post hoc testování Tukey metodou (viz tabulky 3-7). Cílem bylo zjistit, zda existuje statisticky významný rozdíl mezi úbytkem hmotnosti vzorků a vybranými obaly a mezi kterými konkrétními obaly. Pomocí metody ANOVA bylo zjištěno, že existuje statisticky významný rozdíl v úbytku hmotnosti vzorků mezi všemi druhy obalů a látkovými pytlíky. Po vynechání látkových pytlíků bylo pomocí ANOVA zjištěno, že existuje statisticky významný rozdíl v úbytku hmotnosti mezi mikrotenovými pytlíky a povoskovanými obaly. Po zprůměrování výsledků všech obalů s obsahem silic a porovnáním s kontrolou a mikrotenovými pytlíky bylo pomocí ANOVA zjištěno, že existuje statisticky významný rozdíl v úbytku hmotnosti mezi mikrotenovými pytlíky a kontrolou a mikrotenovými pytlíky a obaly se silicemi. Při porovnávání kontroly a obalů se silicemi t-testem i ANOVOU jsme došli k závěru, že neexistuje statisticky významný rozdíl v úbytku hmotnosti mezi obaly s obsahem silic v obale a kontrolou bez silic. K podobným výsledkům statistických metod jsme došli i během druhého měření. Z dat bez látkových pytlíků bylo zjištěno, že existuje statisticky významný rozdíl v úbytku hmotnosti mezi dobromyslem s jojobovým olejem 1% a dobromyslem 1%, tymiánem 1%, citrónovou trávou 0,1% a mikrotenovým pytlíkem. Dále byl zjištěn statisticky významný rozdíl v úbytku hmotnosti mezi mikrotenovým pytlíkem a všemi ostatními obaly kromě dobromyslu 1%, tymiánu 1% a citrónovou trávou 0,1 %.



**Tabulka 3: Post hoc testování rozdílu úbytku hmotností mezi všemi obaly Tukeyovým testem (1. měření)**

Tukeyův HSD test; proměnná % hmotnosti (ANOVA 1 hmotnosti)														
Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy														
Chyba: meziskup. PC = 14,912, sv = 156,00														
Č. buňky	Druh obalu	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}
		94,480	94,603	94,970	96,257	95,554	93,881	98,500	94,515	95,613	95,514	93,635	86,604	84,732
1	Dobromysl 0,1%		1,000000	1,000000	0,994402	0,999966	1,000000	0,277782	1,000000	0,999939	0,999977	0,999998	0,000034	0,000020
2	Dobromysl 1%	1,000000		1,000000	0,997130	0,999991	1,000000	0,326862	1,000000	0,999982	0,999994	0,999989	0,000029	0,000020
3	Tymián 0,1%	1,000000	1,000000		0,999763	1,000000	0,999960	0,494052	1,000000	1,000000	0,999657	0,000022	0,000020	
4	Tymián 1%	0,994402	0,997130	0,999763		1,000000	0,939456	0,960541	0,995348	1,000000	0,999999	0,882104	0,000020	0,000020
5	Citrónová tráva 0,1%	0,999966	0,999991	1,000000	1,000000		0,996802	0,768553	0,999976	1,000000	1,000000	0,988938	0,000021	0,000020
6	Citrónová tráva 1%	1,000000	1,000000	0,999960	0,939456	0,996802		0,107673	1,000000	0,995576	0,997452	1,000000	0,0000131	0,000020
7	Mikrotenový pytlík	0,277782	0,326862	0,494052	0,960541	0,768553	0,107673		0,291457	0,792382	0,751955	0,067870	0,000020	0,000020
8	Kontrola	1,000000	1,000000	1,000000	0,995348	0,999976	1,000000	0,291457		0,999956	0,999984	0,999996	0,000032	0,000020
9	Skořice 0,1%	0,999939	0,999982	1,000000	1,000000	1,000000	0,995576	0,792382	0,999956		1,000000	0,985638	0,000020	0,000020
10	Skořice 1%	0,999977	0,999994	1,000000	0,999999	1,000000	0,997452	0,751955	0,999984	1,000000		0,990782	0,000021	0,000020
11	Dobromysl s jojobou 1%	0,999998	0,999989	0,999657	0,882104	0,988938	1,000000	0,067870	0,999996	0,985638	0,990782		0,000267	0,000021
12	Látkový pytlík hnědý	0,000034	0,000029	0,000022	0,000020	0,000021	0,000131	0,000020	0,000032	0,000020	0,000021	0,000267		0,991101
13	Látkový pytlík černobílý	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000021	0,991101	

**Tabulka 4: Post hoc testování rozdílu úbytku hmotností mezi obaly bez látkových pytlíků Tukeyovým testem (1. měření)**

Tukeyův HSD test; proměnná % hmotnosti (ANOVA 1 hmotnosti)												
Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy												
Chyba: meziskup. PC = 7,2605, sv = 132,00												
Č. buňky	Druh obalu	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}
		94,480	94,603	94,970	96,257	95,554	93,881	98,500	94,515	95,613	95,514	93,635
1	Dobromysl 0,1%		1,000000	0,999996	0,845157	0,995226	0,999973	0,006674	1,000000	0,992661	0,996490	0,999376
2	Dobromysl 1%	1,000000		1,000000	0,896962	0,998268	0,999847	0,010330	1,000000	0,997120	0,998797	0,997978
3	Tymián 0,1%	0,999996	1,000000		0,980612	0,999979	0,994684	0,034129	0,999998	0,999947	0,999989	0,974812
4	Tymián 1%	0,845157	0,896962	0,980612		0,999880	0,469925	0,561171	0,861374	0,999947	0,999802	0,315384
5	Citrónová tráva 0,1%	0,995226	0,998268	0,999979	0,999880		0,889770	0,162641	0,996373	1,000000	1,000000	0,770919
6	Citrónová tráva 1%	0,999973	0,999847	0,994684	0,469925	0,889770		0,000641	0,999954	0,865517	0,904355	1,000000
7	Mikrotenový pytlík	0,006674	0,010330	0,034129	0,561171	0,162641	0,000641		0,007581	0,185737	0,148394	0,000226
8	Kontrola	1,000000	1,000000	0,999998	0,861374	0,996373	0,999954	0,007581		0,994307	0,997373	0,999106
9	Skořice 0,1%	0,992661	0,997120	0,999947	0,999947	1,000000	0,865517	0,185737	0,994307		1,000000	0,735755
10	Skořice 1%	0,996490	0,998797	0,999989	0,999802	1,000000	0,904355	0,148394	0,997373	1,000000		0,793193
11	Dobromysl s jojobou 1%	0,999376	0,997978	0,974812	0,315384	0,770919	1,000000	0,000226	0,999106	0,735755	0,793193	

**Tabulka 5: Post hoc testování rozdílu úbytku hmotností mezi obaly bez látkových pytlíků Tukeyovým testem (2. měření)**

Tukeyův HSD test; proměnná % hmotnosti (ANOVA 1 hmotnosti)												
Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy												
Chyba: meziskup. PC = 12,090, sv = 132,00												
Č. buňky	Druh obalu	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}
		93,944	94,650	94,015	95,485	95,171	92,767	98,951	92,172	93,451	93,106	89,803
1	Dobromysl 0,1%		0,999988	1,000000	0,989025	0,998267	0,998788	0,010945	0,969243	1,000000	0,999942	0,085194
2	Dobromysl 1%	0,999988		0,999996	0,999945	0,999999	0,953307	0,060767	0,770467	0,998575	0,988835	0,016675
3	Tymián 0,1%	1,000000	0,999996		0,992374	0,998955	0,998011	0,013190	0,959724	0,999999	0,999879	0,073638
4	Tymián 1%	0,989025	0,999945	0,992374		1,000000	0,654342	0,280084	0,347995	0,923161	0,812638	0,001572
5	Citrónová tráva 0,1%	0,998267	0,999999	0,998955	1,000000		0,802207	0,168946	0,505541	0,975046	0,915536	0,004000
6	Citrónová tráva 1%	0,998788	0,953307	0,998011	0,654342	0,802207		0,000309	0,999998	0,999992	1,000000	0,524067
7	Mikrotenový pytlík	0,010945	0,060767	0,013190	0,280084	0,168946	0,000309		0,000048	0,002711	0,000950	0,000015
8	Kontrola	0,969243	0,770467	0,959724	0,347995	0,505541	0,999998	0,000048		0,997551	0,999844	0,816431
9	Skořice 0,1%	1,000000	0,998575	0,999999	0,923161	0,975046	0,999992	0,002711	0,997551		1,000000	0,211388
10	Skořice 1%	0,999942	0,988835	0,999879	0,812638	0,915536	1,000000	0,000950	0,999844	1,000000		0,352398
11	Dobromysl s jojobou 1%	0,085194	0,016675	0,073638	0,001572	0,004000	0,524067	0,000015	0,816431	0,211388	0,352398	

**Tabulka 6:** homogenní skupiny průměrných denních úbytků hmotností (1. měření)

Tukeyův HSD test; proměnná % hmotnosti (ANOVA 1 hmotnosti) Homogenní skupiny, alfa = ,05000 (Neúplné vyhledávání) Chyba: meziskup. PČ = 14,912, sv = 156,00				
Č. buňky	Druh obalu	% hmotnosti Průměr	1	2
13	Látkový pytlík černobílý	84,73172	****	
12	Látkový pytlík hnědý	86,60380	****	
11	Dobromysl s jojobou 1%	93,63474		****
6	Citrónová tráva 1%	93,88081		****
1	Dobromysl 0,1%	94,47963		****
8	Kontrola	94,51522		****
2	Dobromysl 1%	94,60316		****
3	Tymián 0,1%	94,96963		****
10	Skořice 1%	95,51434		****
5	Citrónová tráva 0,1%	95,55404		****
9	Skořice 0,1%	95,61338		****
4	Tymián 1%	96,25726		****
7	Mikrotenový pytlík	98,50015		****

**Tabulka 7:** homogenní skupiny průměrných denních úbytků hmotností (2. měření)

Tukeyův HSD test; proměnná % hmotnosti (ANOVA 1 hmotnosti) Homogenní skupiny, alfa = ,05000 (Neúplné vyhledávání) Chyba: meziskup. PČ = 14,760, sv = 156,00						
Č. buňky	Druh obalu	% hmotnosti Průměr	1	2	3	4
13	Látkový pytlík černobílý	88,13042	****			
11	Dobromysl s jojobou 1%	89,80328	****	****		
12	Látkový pytlík hnědý	91,90200	****	****	****	
8	Kontrola	92,17239	****	****	****	
6	Citrónová tráva 1%	92,76727	****	****	****	
10	Skořice 1%	93,10614	****	****	****	
9	Skořice 0,1%	93,45094		****	****	
1	Dobromysl 0,1%	93,94414		****	****	
3	Tymián 0,1%	94,01451		****	****	****
2	Dobromysl 1%	94,65016		****	****	****
5	Citrónová tráva 0,1%	95,17130			****	****
4	Tymián 1%	95,48470			****	****
7	Mikrotenový pytlík	98,95144				****

## 5.1.2 Výskyt plísní

Bylo provedeno vyhodnocení výskytu plísní na vzorcích v různých obalech pomocí statistické metody ANOVA a post hoc testování Tukey metodou (tabulky 8-11). Cílem bylo zjistit, zda existuje statisticky významný rozdíl mezi průměrným dnem výskytu plísní a jednotlivými obaly. Do tohoto měření ale nebyly zahrnuty vzorky látkový pytlík hnědý a látkový pytlík černobílý, jelikož testování bylo provedeno pouze v jednom opakování. Z metody ANOVA pro zhodnocení výskytu plísní na vzorcích vyplývá, že existuje statisticky významný rozdíl mezi průměrným dnem výskytu plísní a druhem obalu. V prvním pokusu se konkrétně jednalo o rozdíl mezi obalem dobromysl 1% a tymiánem 1%, citrónovou trávou 0,1%, mikrotenovým pytlíkem a kontrolou. Dále mezi dobromyslem s jojobovým olejem 1% a tymiánem 1%, citrónovou trávou 1%, mikrotenovým pytlíkem a kontrolou. Další statisticky významný rozdíl se vyskytl mezi tymiánem 1%, citrónovou trávou 0,1% a mikrotenovým pytlíkem. Další rozdíl byl mezi Tymiánem 1% a skořicí 1% i 0,1%. Rozdíl byl také mezi skořicí v obou koncentracích a citrónovou trávou 0,1 %. Rozdíl se vyskytl také mezi skořicí v obou koncentracích, mikrotenovým pytlíkem a kontrolou. Poslední rozdíl byl mezi citrónovou trávou 1% a mikrotenovým pytlíkem. Ve druhém měření byl rozdíl pouze mezi dobromyslem s jojobovým olejem 1%, citrónovou trávou 0,1% a kontrolou. Dále mezi skořicí 1%, citrónovou trávou 0,1% a kontrolou. Výskyt plísní u jednotlivých vzorků v jednotlivých dnech zobrazují grafy 5 a 6.

**Tabulka 8:** Post hoc testování (Tukeyův test) výskytu plísní na vzorcích v prvním pokusu

Tukeyův HSD test: proměnná Den výskytu plísně (ANOVA 1 plísně) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 3,3030, sv = 33,000												
Č. buňky	Druh obalu	(1) 12,750	(2) 15,000	(3) 15,000	(4) 14,000	(5) 9,7500	(6) 9,5000	(7) 13,750	(8) 8,5000	(9) 10,250	(10) 15,000	(11) 15,000
1	Dobromysl 0,1%		0,798768	0,798768	0,995426	0,436030	0,325043	0,999291	0,070144	0,684861	0,798768	0,798768
2	Dobromysl 1%	0,798768		1,000000	0,999291	0,010301	0,006173	0,995426	0,000833	0,027790	1,000000	1,000000
3	Dobromysl s jojobovým olejem 1%	0,798768	1,000000		0,999291	0,010301	0,006173	0,995426	0,000833	0,027790	1,000000	1,000000
4	Tymián 0,1%	0,995426	0,999291	0,999291		0,070144	0,044587	1,000000	0,006173	0,160881	0,999291	0,999291
5	Tymián 1%	0,436030	0,010301	0,010301	0,070144		1,000000	0,107678	0,995426	0,999999	0,010301	0,010301
6	Citrónová tráva 0,1%	0,325043	0,006173	0,006173	0,044587	1,000000		0,070144	0,999291	0,999945	0,006173	0,006173
7	Citrónová tráva 1%	0,999291	0,995426	0,995426	1,000000	0,107678	0,070144		0,010301	0,232774	0,995426	0,995426
8	Mikrotenový pytlík	0,070144	0,000833	0,000833	0,006173	0,995426	0,999291	0,010301		0,949335	0,000833	0,000833
9	Kontrola	0,684861	0,027790	0,027790	0,160881	0,999999	0,999945	0,232774	0,949335		0,027790	0,027790
10	Skořice 0,1%	0,798768	1,000000	1,000000	0,999291	0,010301	0,006173	0,995426	0,000833	0,027790		1,000000
11	Skořice 1%	0,798768	1,000000	1,000000	0,999291	0,010301	0,006173	0,995426	0,000833	0,027790	1,000000	

**Tabulka 9:** Post hoc testování (Tukeyův test) výskytu plísní na vzorcích ve druhém pokusu

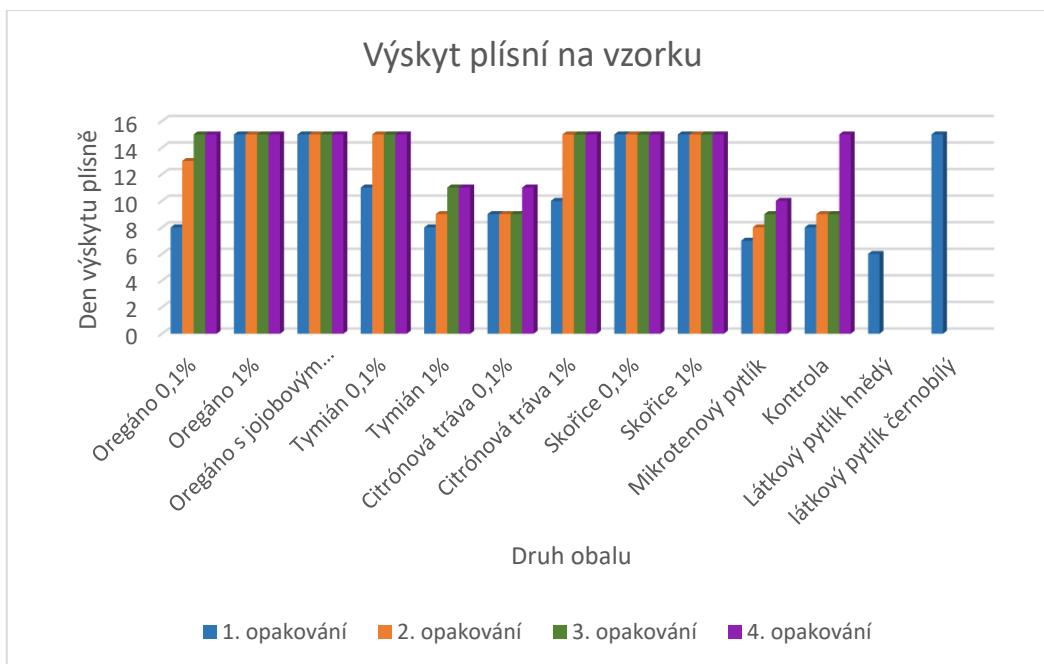
Tukeyův HSD test: proměnná Den výskytu plísně (ANOVA 2 plísně) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 4,1288, sv = 33,000												
Č. buňky	Druh obalu	(1) 7,5000	(2) 7,7500	(3) 11,750	(4) 7,7500	(5) 8,2500	(6) 5,2500	(7) 7,0000	(8) 7,7500	(9) 6,0000	(10) 9,7500	(11) 11,000
1	Dobromysl 0,1%		1,000000	0,148540	1,000000	0,999980	0,885166	1,000000	1,000000	0,992074	0,885166	0,375959
2	Dobromysl 1%	1,000000		0,208271	1,000000	1,000000	0,804509	0,999980	1,000000	0,975707	0,941926	0,480982
3	Dobromysl s jojobovým olejem 1%	0,148540	0,208271		0,208271	0,375959	0,003236	0,070326	0,208271	0,012803	0,941926	0,999980
4	Tymián 0,1%	1,000000	1,000000	0,208271		1,000000	0,804509	0,999980	1,000000	0,975707	0,941926	0,480982
5	Tymián 1%	0,999980	1,000000	0,375959	1,000000		0,593261	0,998162	1,000000	0,885166	0,992074	0,704369
6	Citrónová tráva 0,1%	0,885166	0,804509	0,003236	0,804509	0,593261		0,975707	0,804509	0,999980	0,103295	0,012803
7	Citrónová tráva 1%	1,000000	0,999980	0,070326	0,999980	0,998162	0,975707		0,999980	0,999731	0,704369	0,208271
8	Mikrotenový pytlík	1,000000	1,000000	0,208271	1,000000	1,000000	0,804509	0,999980		0,975707	0,941926	0,480982
9	Kontrola	0,992074	0,975707	0,012803	0,975707	0,885166	0,999980	0,999731	0,975707		0,284224	0,046955
10	Skořice 0,1%	0,885166	0,941926	0,941926	0,941926	0,992074	0,103295	0,704369	0,941926	0,284224		0,998162
11	Skořice 1%	0,375959	0,480982	0,999980	0,480982	0,704369	0,012803	0,208271	0,480982	0,046955	0,998162	

**Tabulka 10:** homogenní skupiny dne výskytu plísně (1. měření)

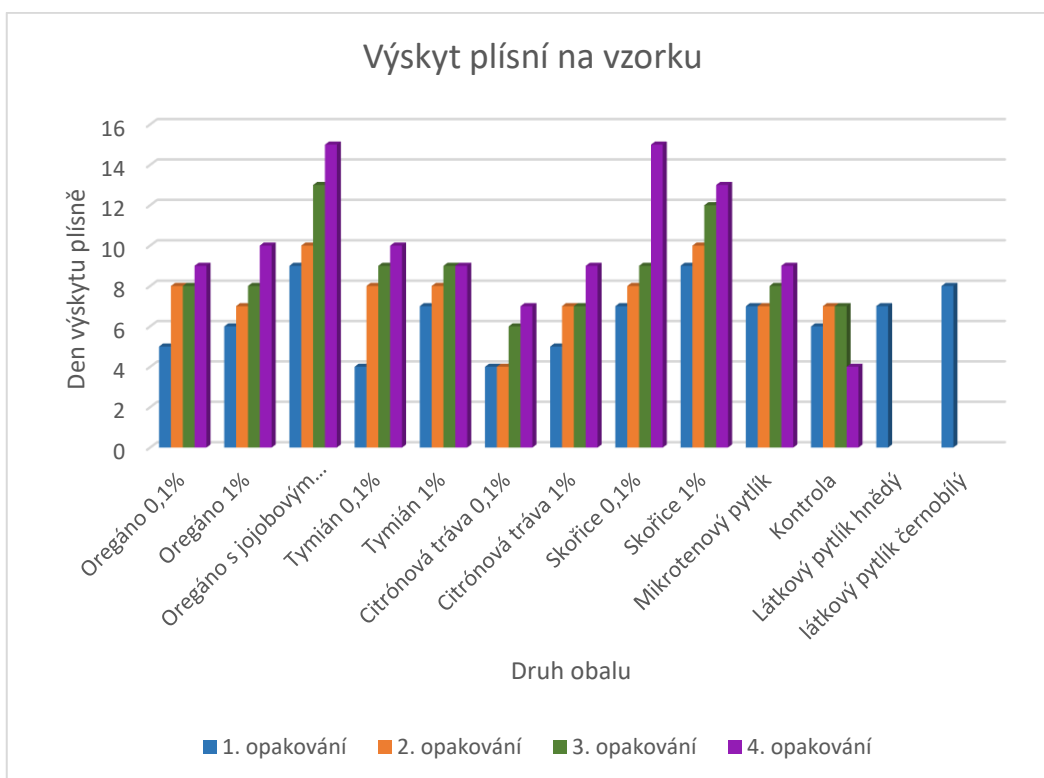
Tukeyův HSD test; proměnná Den výskytu plísně (ANOVA 1 plísně)						
Homogenní skupiny, alfa = ,05000						
Chyba: meziskup. PČ = 3,3030, sv = 33,000						
Č. buňky	Druh obalu	Den výskytu plísně Průměr	1	2	3	4
8	Mikrotenový pytlík	8,50000		****		
6	Citrónová tráva 0,1%	9,50000		****	****	
5	Tymián 1%	9,75000		****	****	****
9	Kontrola	10,25000		****	****	****
1	Dobromysl 0,1%	12,75000	****	****	****	****
7	Citrónová tráva 1%	13,75000	****		****	****
4	Tymián 0,1%	14,00000	****			****
2	Dobromysl 1%	15,00000	****			
10	Skořice 0,1%	15,00000	****			
11	Skořice 1%	15,00000	****			
3	Dobromysl s jojobovým olejem 1%	15,00000	****			

**Tabulka 11:** homogenní skupiny průměrných denních úbytků hmotností (2. měření)

Tukeyův HSD test; proměnná Den výskytu plísně (ANOVA 2 plísně)				
Homogenní skupiny, alfa = ,05000				
Chyba: meziskup. PČ = 4,1288, sv = 33,000				
Č. buňky	Druh obalu	Den výskytu plísně Průměr	1	2
6	Citrónová tráva 0,1%	5,25000	****	
9	Kontrola	6,00000	****	
7	Citrónová tráva 1%	7,00000	****	****
1	Dobromysl 0,1%	7,50000	****	****
4	Tymián 0,1%	7,75000	****	****
2	Dobromysl 1%	7,75000	****	****
8	Mikrotenový pytlík	7,75000	****	****
5	Tymián 1%	8,25000	****	****
10	Skořice 0,1%	9,75000	****	****
11	Skořice 1%	11,00000		****
3	Dobromysl s jojobovým olejem 1%	11,75000		****



**Graf 5:** Porovnání dne výskytu plísně u jednotlivých druhů obalů v každém opakování (1. měření)



**Graf 6:** Porovnání dne výskytu plísně u jednotlivých druhů obalů v každém opakování (2. měření)

Co se týká vzhledu a charakteristiky plísní vyskytujících se na vzorcích, nejčastěji se na vzorcích objevovaly plísně zelené barvy (viz obrázek č. 11), poté bílé barvy (viz obrázek č. 11) a na několika kusech se objevila žlutá plíseň s černými konidii (viz obrázek č. 12).



**Obrázek č. 11:** Výskyt plísně na vzorcích 9. den pokusu v obalech látkový pytlík hnědý (vlevo) a povoskovaný obal dobromysl 1% (vpravo) (Ducháčová 2023)



**Obrázek č. 12:** Výskyt plísně na vzorku 11. den pokusu v povoskovaném obalu skořice 1% (Ducháčová 2023)

## 5.2 GC/MS s metodou SPME

Ve výsledcích z GC/MS nás v našich vzorcích zajímala velikost píků hlavních komponentů silic. Pro tymián thymol, pro citrónovou trávu citral a neral, pro skořici cinamaldehyd a pro dobromysl karvakrol. Podle tabulky 12 byly úbytky silic v našich testovaných obalech poměrně vysoké. Nejvíce vytěkaly silice skořice a citrónové trávy, a to průměrně z 99 %. Nejméně vyprchala silice z obalu u tymiánu 0,1% (15,33) a dobromyslu 0,1% (23,92). U dobromyslu 1%, dobromyslu s jojobovým olejem 1% a tymiánu 1% byly poměrně uspokojivé výsledky úbytku silic mezi 72 – 80 %.

**Tabulka 12: Úbytek obsahu silic v obalech po 112 dnech**

<b>Úbytek obsahu silic v obalech</b>		
<b>Vzorek</b>	<b>% úbytek silic po pokusu</b>	<b>Látka</b>
<b>Dobromysl 0,1%</b>	23,92	Karvakrol
<b>Dobromysl 1%</b>	72,58	Karvakrol
<b>Dobromysl s jojobovým olejem 1%</b>	78,84	Karvakrol
<b>Tymián 0,1%</b>	15,33	Thymol
<b>Tymián 1%</b>	78,31	Thymol
<b>Citrónová tráva 0,1%</b>	99,70	citral
	99,67	neral
<b>Citrónová tráva 1%</b>	99,89	cital
	99,91	neral
<b>Skořice 0,1%</b>	99,91	Cinamaldehyd
<b>Skořice 1%</b>	99,98	Cinamaldehyd



## 6 Diskuze

### 6.1 Skladovací pokus

Ve skladovacím pokusu jsme se zaměřili na sledování úbytku hmotnosti vzorků, což nám ukazuje ztráty vody a míru vysychání chleba. Dále jsme se zaměřili na výskyt plísně u jednotlivých druhů obalů. Průměrné denní hmotnostní úbytky v prvním a druhém měření se na první pohled výrazně nelišily. Podle statistického vyhodnocení pomocí t-testu ale existuje statisticky významný rozdíl mezi průměrným denním úbytkem hmotnosti vzorků v povoskovaných obalech v prvním a druhém měření.

Z výsledků obou měření (viz tabulka 1 a 2) je zřejmé, že nejvýraznější úbytek hmotnosti byl u vzorků v látkovém obalu hnědém a látkovém obalu černobílém. Mikrotenový sáček byl sice nejlepší v zabránění vysychání vzorku chleba a na první pohled si zachoval nejlepší senzorycké vlastnosti (senzorycká analýza nebyla součástí pokusu, ale při vážení vzorků bylo na první pohled a dotyk zřejmé, které vzorky byly po kolika dnech ještě senzorycky uspokojivé), ale díky nízké prodyšnosti se držela vlhkost na povrchu vzorku a byly tak vytvořeny vhodné podmínky pro růst plísní. Plísně potřebují ke svému růstu kyslík, tudíž teoreticky by méně prodyšné obaly měly zabránit růstu plísní, ale při běžném spotřebitelském používání se kyslík do málo prodyšného obalu dostává. Navíc pro růst plísní stačí i menší množství kyslíku. Mikrotenový pytlík by tedy možná dobře fungoval proti vysychání a zároveň sníženému výskytu plísní jen v případě vakuového uzavření či aplikace modifikované atmosféry po každém použití. Navzdory tomu by ale pravděpodobně uvnitř vzorku zůstávalo dostatečné množství vzduchu. Navíc by také mohlo dojít k značné deformaci chleba.

Ve studii, kde se zkoumala propustnost vodních par v papírovém obalu potřením směsí včelího vosku a lněného oleje, bylo zjištěno, že včelí vosk výrazně snížil rychlost přenosu vodních par přes obal (Vijayan et al. 2023). Tato skutečnost byla prokázána i v našem pokusu. Oproti komerčním látkovým obalům naše povoskované látkové obaly byly schopné zabránit úniku vlhkosti ze vzorku, a tím úbytku hmotnosti vzorku, výrazně lépe. S pravděpodobným úbytkem vosku na obalech po opakovaném použití obalů se schopnost povoskovaných obalů zabránit úniku vlhkosti zhoršovala. V jednom druhu obalu s obsahem silice dobromyslu v 1% koncentraci jsme místo kokosového oleje, použitého ve všech ostatních povoskovaných obalech, použili jojobový olej. Oproti obalu se stejným druhem i koncentrací silice, ale s kokosovým olejem, vykazoval obal s jojobovým olejem mírně vyšší antimykotickou aktivitu. Naopak úbytky hmotností vzorků zabalených v obalech s jojobovým olejem byly vyšší.

Ve studii Szulc et al 2020 zaměřené na antimikrobiální aktivitu látkových obalů se včelím voskem bylo prokázáno, že i samotné použití obalu se včelím voskem bez přídavku silic mělo určité antimykotické účinky (především proti plísní *Aspergillus niger*) oproti kontrolní tkanině bez vosku. V pokusu bylo na tkaniny nanášeno inokulum s obsahem mikroorganismů a byla sledována jejich inhibice. Počty mikroorganismů byly hodnoceny po 24 hodinách od aplikace. V našem 1. pokusu kontrola (povoskovaný látkový pytlík) vykazovala lepší odolnost vůči plísním oproti látkovému pytlíku hnědému, ale rozdíl v účinku nebyl významný. Bylo by potřeba provést další testování porovnávání látkového pytlíku a povoskovaného látkového obalu bez silic, protože v našem pokusu byly látkové pytlíky pouze v jednom opakování. Studie Beck et al 2021 porovnávala účinek obalu s obsahem včelího vosku, povoskovaného

papírového obalu a plastového obalu proti výskytu plísní na chlebu po dobu skladování 15 dní při teplotě 18°C. V této studii, podobné provedením našemu výzkumu, nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými obaly a prodloužením trvanlivosti pečiva. Pinto et al 2017 zkoumali účinek povoskovaného papíru na výskyt plísní *in vitro*. Kousek papíru se včelím voskem byl položen na živné médium naočkované plísněmi i bakteriemi a byla sledována inhibiční zóna. Zde také nebyl prokázán významný rozdíl mezi nepovoskovaným obalem a obalem s obsahem včelího vosku proti výskytu plísní.

Z hlediska průměrného dne výskytu plísní v prvním pokusu vycházely obaly s obsahem silic lépe než jiné obaly. S výjimkou látkového obalu černobílého, u kterého sice nebyl v prvním pokusu během 14 dní zaznamenán výskyt plísní, ale po senzoričké stránce byl chléb již po pár dnech na první pohled téměř nepoživatelný. U tohoto obalu byl zaznamenán nejvyšší úbytek hmotnosti, tudíž v tomto obalu chléb nejrychleji vysychal a byl již po pár dnech tvrdý. Prodyšnost tohoto obalu byla pravděpodobně nejvyšší ze všech hodnocených obalů. Díky nízkému obsahu vody ve vzorku tak plísně neměly vhodné podmínky pro růst. Ve druhém měření se nejpozději plíseň objevila u dobromyslu 1% s jojobovým olejem s průměrným dnem výskytu plísní 10,67 dní a skořice 1% s průměrným výskytem plísně po 11 dnech. Nejhůře na tom byla citrónová tráva 0,1%, u které se plíseň průměrně vyskytla po 5,25 dnech a kontrola po 6 dnech. Vzorky v povoskovaných obalech ve druhém měření dopadly hůře než mikrotenové pytlíky, pravděpodobně z důvodu použití čistých mikrotenových pytlíků, které nebyly kontaminované plísněmi oproti použití již kontaminovaných voskových obalů.

Účinnost silic proti plísním zkoumala i studie Cíсарová et al 2020, která se zaměřovala na inhibici plísní rodu *Aspergillus* metodou plynové difuze v *in vitro* a *in situ* podmínkách. Celkem studie zkoumala 10 různých druhů silic. Během *in situ* testování na chlebu byly silice aplikovány parou na vzorek chleba, inokulovány plísněmi a hermeticky uzavřeny ve sklenici. Vzorky byly ponechány při pokojové teplotě ve tmě po dobu 14 dní. Nejsilnější inhibiční účinek proti plísním v *in vivo* i *in situ* testování na chlebu vykazovaly silice z tymiánu, hřebíčku, dobromysl, skořice a citrónové trávy. V našem pokusu byl potvrzen antimykotický účinek dobromyslu, skořice a tymiánu. Citrónová tráva inhibovala plísně nejhůře ze všech testovaných silic, ale její účinek na výskyt plísní byl oproti kontrole a mikrotenovému pytlíku statisticky významný. Ve druhém pokusu citrónová tráva inhibovala plísně nejhůře ze všech testovaných obalů. Pravděpodobně právě proto, že naše vzorky nebyly hermeticky uzavřené jako ve zmíněné studii, účinek silic na výskyt plísní mohl být ovlivněn mnoha vnějšími faktory a vytěkáním silic. Ve studii Cíсарová et al 2020 byl zkoumán také vliv použitých silic na senzoričké vlastnosti chleba. Použité silice podle všeho neovlivnily senzoričké vlastnosti testovaného chleba.

Ve studii Clemente et al 2019 byl zkoumán účinek skořicové silice *in vitro* a na španělském chlebu. Plátky chleba byly inokulovány plísněmi rodu *Penicillium*, *Aspergillus* a *Rhizopus stolonifer* a byla aplikována skořicová silice. Poté byly plátky chleba uzavřeny v petriho misce, zalepeny páskou a vloženy do sáčku, aby byly imitovány skutečné podmínky skladování. Skořicová silice úspěšně inhibovala růst plísní, především rodu *Penicillium*. Oproti hořčičné silici měla skořicová silice slabší účinek, ale oproti hořčičné silici byla skořicová silice na vzorku chleba senzoričce přijatelnější. I v této studii byl tedy účinek skořicové silice proti plísním potvrzen. Studie Valková et al 2022 také potvrdila inhibiční účinky skořicové silice proti plísním na chlebu. Byly zkoumány celkem 3 druhy skořicové silice (*Cinnamomum cassia*

z kůry rostliny, *Cinnamomum verum* z listů a *Cinnamomum verum* z kůry). Ukázalo se, že při použití skořicové silice závisí nejen na dávce silice, ale také na druhu a části rostliny, ze které je silice získána. Nejsilnější antifungální účinek při *in vitro* testování vykazovaly všechny analyzované silice v koncentraci 500  $\mu\text{L/L}$  proti *Penicillium crustosum*. I podle našeho pokusu může být skořicová silice účinný prostředek pro prodloužení trvanlivosti pekařských výrobků.

Plísně, které se vyskytovaly na našich vzorcích, měli nejčastěji zelenou barvu. Mohlo by se jednat o plíseň rodu *Penicillium*. Další častou plísní byla bílá, sametová plíseň tvořící malé kulaté kolonie podobající se plísní rodu *Mucor*. Občas se objevila plíseň žlutá s černými konidii, pravděpodobně rodu *Aspergillus* (obrázky č. 11 a 12). Podle Pandey et al. 2021; Rüegg et al. 2022 a Valková et al. 2022 jsou tyto plísně nejčastěji se vyskytujícími plísněmi na pečivu.

## 6.2 Stanovení reziduí silic v obalech

Podle výsledků chromatografie (viz tabulka 12) byl nejvyšší úbytek množství silic v obalech u obou koncentrací citrónové trávy a skořice (přes 99 %). Je zajímavé, že skořicová silice měla téměř nejvyšší úbytek silice v obalu, ale její účinek proti výskytu plísní byl jeden z nejlepších. Je možné, že většina skořicové silice nevyrchala do prostředí, ale přešla do vzorku chleba, kde byla účinná proti výskytu plísní. Naopak citrónová tráva, podle výsledků chromatografického stanovení ve vosku před pokusem, z části vyrchala již při výrobě obalů a vyznačovala se nejnižší účinností proti plísní ze všech druhů použitých silic.

Obaly s dobromyslem a tymiánem vykazovaly v 0,1% koncentraci nejnižší úbytek obsahu silic. Tymián 0,1% měl úbytek silic 15,33 % a dobromysl 0,1% vykazoval úbytek koncentrace silice o 23,92 %. 1% koncentrace těchto silic vykazovala úbytek průměrně okolo 70 % u tymiánu i dobromyslu. Thymol i karvakrol, jakožto hlavní komponenty silice tymiánu a dobromyslu, mají velice podobné struktury, proto pravděpodobně vykazují i podobné výsledky měření. Je možné, že množství těchto silic klesá do určité koncentrace a dále již ne. Proto mohl být u nižších koncentrací tymiánové a dobromyslové silice nejnižší úbytek z obalů, naopak u vyšších koncentrací klesala koncentrace silic rychleji. V opačném případě mohlo dojít při skladování obalů ke kontaminaci obalů s nižší koncentrací obaly s vyšší koncentrací silice, což je více pravděpodobné.

## 7 Závěr

Podle nalezených informací ze studií zabývajících se účinkem silic na prodloužení trvanlivosti pečiva a na základě našeho pokusu bylo zjištěno, že obaly povoskované včelím voskem s obsahem silic mohou být v budoucnu dobrým řešením pro prodloužení trvanlivosti pečiva z hlediska výskytu plísní. Výrazné antimykotické účinky vykazovali v obalu se včelím voskem skořicová silice v 0,1% a 1% koncentraci, dobromysl silice 1% a dobromysl s jojobovým olejem 1%. Úbytky hmotnosti vzorků v obalech byly u povoskovaných obalů nižší než u látkových pytlíků, ale naopak vyšší než u mikrotenového pytlíku. I přes to můžeme uvést, že vrstva vosku dokáže do určité míry zabránit vysychání chleba.

Co se týká sensorických vlastností takto skladovaného pečiva, budou potřeba provést další výzkumy v této oblasti. Z našeho výzkumu nevíme, jak byly vzorky chleba silicemi chuťově ovlivněny a zda se o něco rychlejší vysychání chleba oproti mikrotenovým pytlíkům výrazně nepodílelo na zkrácení doby použitelnosti chleba z hlediska struktury a chuti. Chléb sice vydržel déle bez výskytu plísní, ale o to se mohla zkrátit právě doba požitelnosti v souvislosti se zhoršením sensorických vlastností. Budou potřeba i další výzkumy s jinými druhy pečiva či dalšími druhy silic. V jiných studiích svůj výrazný účinek proti plísním prokázala i například hřebíčková nebo badyánová silice, ty ale vykazovaly zhoršené sensorické vlastnosti pečiva. Pro každý druh pečiva může být sensoricky přijatelný jiný druh použité silice, proto bude potřeba tuto skutečnost v budoucnu prozkoumat. Zvážit musíme také délku použitelnosti obalů. Z druhého skladovacího pokusu jasně vyšlo najevo, že jakmile je obal jednou kontaminován plísněmi, při jeho použití se plíseň objeví rychleji. I u obalů, kde se viditelná plíseň v předchozím pokusu nevyskytla vůbec a na obalu se mohly vyskytovat okem neviditelné spory plísní.

Díky obsaženým silicím v našem obalu se na základě provedených statistických metod okem pozorovatelné plísně na pečivu objevili výrazně později než na běžně baleném pečivu, čímž jsme potvrdili naši hypotézu. Naš obal, oproti mikrotenovému pytlíku, dostatečně nezabránil vysychání pečiva, proto jsme tuto hypotézu vyvrátili. Celkově náš povoskovaný obal s obsahem silic výrazně prodloužil trvanlivost testovaného pečiva, tudíž jsme tuto hypotézu potvrdili. Zamítli jsme i hypotézu, že povoskovaný obal se silicemi zachová svou účinnost po delší dobu používání, jelikož při druhém pokusu po 112 dnech od výroby se výsledky výskytu plísní na vzorcích výrazně zhoršily. Zhoršila se také schopnost zabránit vysychání vzorků. Do budoucna bude vhodné zvážit technologickou úpravu obalů. Například přidání vnější, méně prodyšné, vrstvy na povoskovaný obal by mohlo zabránit rychlému úbytku vlhkosti pečiva a zároveň by došlo k zabránění ušpinění rukou a ploch od vosku na obalu.

## 8 Literatura

- 1) Abdi-Moghadam Z et al. 2023. The significance of essential oils and their antifungal properties in the food industry: A systematic review. *Heliyon* **9**: e21386. Available at <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21386>
- 2) Alpers T et al. 2021. Impact of Storing Condition on Staling and Microbial Spoilage Behavior of Bread and Their Contribution to Prevent Food Waste. *Foods* **10**: 76. Available at <https://doi.org/10.3390/foods10010076>
- 3) Ananda J, Karunasena GG, Pearson D. 2022. Identifying interventions to reduce household food waste based on food categories. *Food Policy* **111**: 102324. Available at <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2022.102324>
- 4) Atapattu SN, Azamat A. 2023. Recent advances in gas chromatography injection port derivatization in analytical method development. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **168**: 117334. Available at <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117334>
- 5) Balan GC et al. 2021. Production of Wheat Flour/PBAT Active Films Incorporated with Oregano Oil Microparticles and Its Application in Fresh Pastry Conservation. *Food and Bioprocess Technology* **14**:1587–1599. Available at <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02659-2>
- 6) Bao Z et al. 2023. Antifungal activity of star anise extract against *Penicillium roqueforti* and *Aspergillus niger* for bread shelf life. *Food Research International* **172**: 113225. Available at <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113225>
- 7) Bartholomai BM et al. 2022. Safety evaluation of *Neurospora crassa* mycoprotein for use as a novel meat alternative and enhancer. *Food and Chemical Toxicology* **168**: 113342. Available at <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113342>
- 8) Beck DE, Lane KM, Shiel CA, Welke KF. 2021. Food spoilage in beeswax impregnated cotton cloth wraps compared to standar o standard storage methods age methods. *Beekeeping Certificate Program*. Available at <https://scholarworks.umt.edu/beekeeping/1/>

- 9) Caldeira C, Laurentiis VD, Corrado S, Holsteijn F, Sala S. 2019. Quantification of food waste per product group along the food supply chain in the European Union: a mass flow analysis. *Resources, Conservation and Recycling* **149**: 479-488. Available at <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.06.011>
- 10) Caron T et al. 2021. Strong effect of *Penicillium roqueforti* populations on volatile and metabolic compounds responsible for aromas, flavor and texture in blue cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **354**: 109174. Available at <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109174>
- 11) Cisarová M et al. 2020. The in vitro and in situ effect of selected essential oils in vapour phase against bread spoilage toxicogenic aspergilli. *Food Control* **110**: 107007. Available at <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107007>
- 12) Clemente I, Aznar M, Nerín C. 2019. Synergistic properties of mustard and cinnamon essential oils for the inactivation of foodborne moulds in vitro and on Spanish bread. *International Journal of Food Microbiology*. **298**:44-50. Available at <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.012>
- 13) Commission Europa. Eurostat: Food waste. Available from [https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/cei\\_pc035/default/table?lang=en](https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/cei_pc035/default/table?lang=en) (accessed January 3, 2024)
- 14) Coton et al. 2020. *Penicillium roqueforti*: an overview of its genetics, physiology, metabolism and biotechnological applications. *Fungal Biology Reviews* **34**: 59-73. Available at <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.03.001>
- 15) Cruz EP et al. 2023. Encapsulation of lemongrass essential oil into cassava starch fibers for application as antifungal agents in bread. *Food Hydrocolloids* **145**: 109105. Available at <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109105>
- 16) Duan WY et al. 2024. Antifungal effects of carvacrol, the main volatile compound in *Origanum vulgare* L. essential oil, against *Aspergillus flavus* in postharvest wheat. *International Journal of Food Microbiology* **410**: 110514. Available at <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110514>

- 17) Eur-lex. 2013. Regulation - 1334/2008. Available from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=celex%3A32008R1334> (accessed March 4, 2024)
- 18) Fernandez CM, Alves J, Gaspar PD, Lima TM, Silva PD. 2022. Innovative processes in smart packaging. A systematic review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 103: 977-1599. Available at <https://doi.org/10.1002/jsfa.11863>
- 19) Filho PJS et al. 2024. Development of a SPE/GC/MS method for simultaneous determination of UV filters (Oxybenzone and Octocrylene) and hormones (Estrone, Beta-Estradiol, and Estriol) in aqueous matrices. *Microchemical Journal*: 110143. Available at <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110143>
- 20) Fonseca LM et al. 2021. Suitability of starch/carvacrol nanofibers as biopreservatives for minimizing the fungal spoilage of bread. *Carbohydrate Polymers* **252**: 117166. Available at <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117166>
- 21) Gaida M, Stefanuto PH, Focant JF. 2023. Theoretical modeling and machine learning-based data processing workflows in comprehensive two-dimensional gas chromatography—A review. *Journal of Chromatography A* **1711**: 464467. Available at <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464467>
- 22) Galanakis CM, Tsatalas P, Charalambous Z, Galanakis IM. 2018. Control of microbial growth in bakery products fortified with polyphenols recovered from olive mill wastewater. *Environmental Technology & Innovation* **49**:1-15. Available at <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.01.006>
- 23) Garcia MV et al. 2019. Effect of temperature on inactivation kinetics of three strains of *Penicillium paneum* and *P. roqueforti* during bread baking. *Food Control* **96**:456-462. Available at <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.10.002>
- 24) Gengatharan A, Rahim MHA. 2023. The application of clove extracts as a potential functional component in active food packaging materials and model food systems: A mini-review. *Applied Food Research* **3**: 100283. Available at <https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100283>

- 25) Gil-Serna J et al. 2019. Significance of *Aspergillus niger* aggregate species as contaminants of food products in Spain regarding their occurrence and their ability to produce mycotoxins. *Food Microbiology* **82**: 240-248. Available at <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.02.013>
- 26) Chouhan KBS, Mukherjee S, Mandal V. 2023. A Deeper Learning approach in exploring the eventualities of solvent-free microwave-based extraction of lemongrass essential oil: Understanding milky emulsion, biomass temperature, first drop appearance, oil quality and biorefinery. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* **33**: 101113. Available at <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101113>
- 27) Ju J et al. 2018. Inhibitory effects of cinnamon and clove essential oils on mold growth on baked foods. *Food Chemistry*. **240**: 850-855. Available at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.120>
- 28) Katekar VP, Rao AB, Sardeshpande VR. 2023. A hydrodistillation-based essential oils extraction: A quest for the most effective and cleaner technology. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* **36**: 101270. Available at <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101270>
- 29) Kidd S, Halliday C, Ellis D. 2023. *Descriptions of Medical Fungi*. CAB International, Great Britain
- 30) Klinmalai P et al. 2021. Antifungal and plasticization effects of carvacrol in biodegradable poly(lactic acid) and poly(butylene adipate terephthalate) blend films for bakery packaging. *LWT* **152**:112356. Available at <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112356>
- 31) Kubičková L. 2021. Plýtvání potravinami v českých domácnostech. *Statistika a my* **11**: 28–29. Dostupné z <https://www.statistikaamy.cz/wp-content/uploads/2021/04/18042104.pdf>
- 32) Lasram S et al. 2019. Antifungal and antiaflatoxinogenic activities of *Carum carvi* L., *Coriandrum sativum* L. seed essential oils and their major terpene component against



- Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products* 134: 11-18. Available at <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.03.037>
- 33) Li C et al. 2020. Developing *Aspergillus niger* as a cell factory for food enzyme production. *Biotechnology Advances* **44**: 107630. Available at <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107630>
- 34) Maurya A et al. 2021. Mechanistic investigations on antifungal and antiaflatoxigenic activities of chemically characterised *Carum carvi* L. essential oil against fungal infestation and aflatoxin contamination of herbal raw materials. *Natural Product Research* **36**: 4563-4568. Available at <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1994566>
- 35) Morshedloo MR et al. 2018. Essential oil profile of oregano (*Origanum vulgare* L.) populations grown under similar soil and climate conditions. *Industrial Crops and Products* **119**:183-190. Available at <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.049>
- 36) Pandey AK, Chávez-González ML, Silva AS, Singh P. 2021. Essential oils from the genus *Thymus* as antimicrobial food preservatives: Progress in their use as nanoemulsions-a new paradigm. *Trends in Food Science & Technology* **111**:426-441. Available at <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.076>
- 37) Pandey VK et al. 2023. Bioactive properties of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil nanoemulsion: A comprehensive review. *Heliyon* **10**: e22437. Available at <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22437>
- 38) Phyo HM, Ju J, Al-Maqtari QA, Yao W. 2023. Evaluation of the synergistic antifungal effects of thymol and cinnamaldehyde combination and its mechanism of action against *Rhizopus stolonifer* in vitro and in vivo. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **49**: 102658. Available at <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102658>
- 39) Pinto C, Pankowski J, Nano F. 2017. The anti-microbial effect of food wrap containing beeswax products. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* **7 (2)**: 145–148. Available at <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2017.7.2.145-148>

- 40) Pitt JI, Hocking AD. 2022. Fungi and Food Spoilage. Springer International Publishing AG, Switzerland
- 41) Qian M et al. 2021. A review of active packaging in bakery products: Applications and future trends. Trends in Food Science & Technology **114**:459-471. Available at <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.009>
- 42) Rout S et al. 2022. Recent trends in the application of essential oils: The next generation of food preservation and food packaging. Trends in Food Science & Technology **129**:421-439. Available at <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.10.012>
- 43) Rüegg N, Röcker B, Yildirim S. 2022. Application of palladium-based oxygen scavenger to extend the mould free shelf life of bakery products. Food Packaging and Shelf Life **31**: 100771. Available at <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100771>
- 44) Sharma S, Barkauskaite S, Jaiswal AK, Jaiswal S. 2021. Essential oils as additives in active food packaging. Food Chemistry **343**: 128403. Available at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128403>
- 45) Shrirame B et al. 2022. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of caraway (*Carum carvi* L.) seed: Optimization and parametric interaction studies using design of experiments. Journal of CO<sub>2</sub> Utilization **65**: 102195. Available at <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2022.102195>
- 46) Stroski KM, Sapozhnikova Y. 2023. Analysis of per – and polyfluoroalkyl substances in plastic food storage bags by different analytical approaches. Journal of Chromatography Open **4**: 100106. Available at <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2023.100106>
- 47) Szulc et al. 2020. Beeswax-Modified Textiles: Method of Preparation and Assessment of Antimicrobial Properties. Polymers **12(2)**: 344. Available at <https://doi.org/10.3390/polym12020344>
- 48) Tvrzová L, Chumchalová J, Němec M, Páčová Z, Savická D, Kubátová A, Patáková P. 2006. Miniaturized atlas of microorganisms. Available from <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/index.html>

- 49) Valková V et al. 2022. Application of Three Types of Cinnamon Essential Oils as Natural Antifungal Preservatives in Wheat Bread. *Applied Sciences* **12**:10888. Available at <https://doi.org/10.3390/app122110888>
- 50) Vijayan SP, Aparna S, Sahoo SK. 2023. Effect of Beeswax on hydrophobicity, moisture resistance and transparency of UV curable linseed oil based coating for compostable paper packaging. *Industrial Crops and Products* **197**: 116645. Available at <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116645>
- 51) Wieczorek MN, Zhou W, Jeleń HH, Pawliszyn J. 2024. Automated sequential SPME addressing the displacement effect in food samples. *Food Chemistry* **439**: 138093. Available at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138093>
- 52) Wu VW, Thieme N, Huberman LB, Louise NG. 2020. The regulatory and transcriptional landscape associated with carbon utilization in a filamentous fungus. *PNAS* **117 (11)**: 6003-6013. Available at <https://doi.org/10.1073/pnas.1915611117>
- 53) Yang Z et al. 2022. Review and prospect on portable mass spectrometer for recent applications. *Vacuum* **199**: 110889. Available at <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2022.110889>
- 54) Zhao et al. 2023. Synergistic antifungal mechanism of effective components from essential oil against *Penicillium roqueforti*. *Engineering Microbiology* **3**: 100057. Available at <https://doi.org/10.1016/j.engmic.2022.100057>
- 55) Zhao F, Huang J, Qi J, Li Q, Wu H, Ju J. 2022. Proteomic analysis of antifungal mechanism of star anise essential oil against *Aspergillus niger* and its application potential in prolonging bread shelf life. *LWT - Food Science & Technology* **169**: 114023. Available at <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114023>



