

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2017

TEREZA SOJKOVÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agromická fakulta
Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin



Mikrobiální kontaminace medů
Diplomová práce

Vedoucí práce:
Ing. Libor Kalhotka, Ph.D.

Vypracovala:
Bc. Tereza Sojková

Místo pro zadání

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Mikrobiální kontaminace medů vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala panu Ing. Liboru Kalhotkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, ochotu a čas, který mi věnoval v průběhu zpracování diplomové práce. Mé poděkování patří rovněž celému Ústavu agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin, stejně jako panu Ing. Miroslavu Jůzlovi, Ph.D. za poskytnutí odborných materiálů, pomoc při měření barvy vzorků medů a zpracování konečných výsledků.

ABSTRAKT

Diplomová práce Mikrobiální kontaminace medů se v literární rešerši věnuje chemickému složení medu, jeho vlastnostem a účinky na lidské zdraví. Podstatná část se zabývá mikrobiální kontaminací medu, charakteristikou významných skupin mikroorganismů a popisem vad medu vznikajících jejich činností. Dále uvádí možné způsoby boje proti těmto nežádoucím změnám.

Experimentální část je zaměřena na mikrobiologickou analýzu a spektrofotometrické měření barvy květových a medovicových medů zakoupených od včelařů z kraje Vysočina prodejem ze dvora. Zkoumá změny v počtech mikroorganismů a změny barvy v závislosti na čase.

Klíčová slova: med, mikroorganismy, kvasinky, plísně, bakterie, barva

ABSTRACT

The diploma thesis Microbial contamination of honeys in the literature recherche presenting chemical composition of honey, it's properties and effects to human health. The major part deal with microbial contamination of honey, characterization of important groups of microorganisms and describing defects of honey produced their activities. Further it shows with possible ways of precaution against these undesirable changes.

The experimental part is focused on microbiological analysis and spectrophotometric measurement of floral and honeydew color, purchased directly from beekeepers from the region Vysočina. Investigating changes in numbers of microorganisms and changes color over time.

Key words: honey, microorganisms, yeast, moulds, bacteria, colour

Obsah

1 ÚVOD.....	12
2 CÍL PRÁCE	13
3 LITERÁRNÍ REŠERŠE	14
3.1 Obecná definice medu	14
3.2 Pohled do historie	14
3.3 Zdroje medu	15
3.3.1 Nektar.....	15
3.3.2 Medovice	16
3.4 Vznik medu	17
3.5 Chemické složení medu	18
3.6 Fyzikální vlastnosti medu	21
3.7 Med a jeho účinky na zdraví člověka	23
3.8 Mikrobiální kontaminace medu.....	25
3.8.1 Primární kontaminace medu.....	26
3.8.2 Sekundární kontaminace medu.....	28
3.8.3 Bakterie vyskytující se v medu.....	30
3.8.3.1 Koliformní bakterie	31
3.8.3.2 Rod Bacillus.....	31
3.8.3.3 Bakterie mléčného kvašení	32
3.8.3.4 Rod Pseudomonas	33
3.8.4 Mikroskopické houby (mikromycety) v medu	33
3.8.4.1 Kvasinky.....	33
3.8.4.2 Plísně	34
3.9 Vady medu mikrobiálního původu	36

3.10 Antibakteriální aktivita medu	38
4 MATERIÁL A METODIKA	42
4.1 Charakteristika materiálu	42
4.2 Mikrobiologická analýza	43
4.2.1 Příprava laboratorních pomůcek	43
4.2.2 Metodika mikrobiologické analýzy	43
4.2.3 Stanovované skupiny mikroorganismů	44
4.2.4 Složení a příprava živných půd	44
4.2.5 Vyjádření výsledků	46
4.3 Měření barvy medu pomocí CIE L*a*b*	47
4.3.1 Vyjádření výsledků	49
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	50
5.1 Mikrobiologická analýza	50
5.1.1 Celkový počet mikroorganismů	53
5.1.2 Koliformní bakterie	56
5.1.3 Aerobní sporulující bakterie	57
5.1.4 Kvasinky	59
5.1.5 Plísně	62
5.1.6 Bakterie mléčného kvašení (BMK)	65
5.2 Spektrofotometrické měření barvy	67
6 ZÁVĚR	78
7 POUŽITÁ LITERATURA	80
8 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK A OBRÁZKŮ	89
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	92

1 ÚVOD

Včelí med je nejznámějším a zároveň nejdůležitějším včelím produktem. Je to přírodní potravina vytvořená společenstvím včel ze sesbíraných rostlinných šťáv, k nimž přidávají výměšky svých vnitřních žláz. Podle rostlinného původu se dělí na květový a medovicový.

Med se používá pro průmyslové účely, nutriční a léčivé účinky, které jsou předmětem mnoha zkoumání. Obsahuje spoustu prospěšných látek, a proto je už od pradávna využíván nejen jako potravina, ale i jako lék.

Vhledem ke svému složení je med mikrobiálně velice stálý, přesto se v něm může objevit několik desítek druhů mikroorganismů. Patří mezi ně ty, které se v medu běžně vyskytují (některé druhy kvasinek a sporotvorné bakterie), které jsou ukazatelem sanitace nebo obchodní jakosti (koliformní bakterie nebo kvasinky), které mohou za určitých podmínek způsobit onemocnění člověka (např. *Clostridium botulinum*) a ty, které způsobují nemoci včel (Snowdon, Cliver, 1996). Celkový počet mikroorganismů je závislý na zeměpisném původu a květinových zdrojích, lišit se ale mohou mezi sebou i medy stejného typu (Gradvol et al., 2015).

Mikroorganismy se do medu mohou dostat primární a sekundární cestou. Primární zdroje zahrnují včely a vnější prostředí. Tyto zdroje obvykle nijak neovlivní. K sekundární kontaminaci dochází až v průběhu manipulace s medem a lze ji omezit prostřednictvím správného zpracování a skladování medu.

Mikroorganismy nemohou v medu růst, s výjimkou kvasinek a plísní, ani se v něm rozmnožovat. Některé z nich ale dokážou v medu přežít díky schopnosti odolávat vysoké koncentraci sacharidů, kyselému prostředí a dalším antimikrobiálním vlastnostem (Olaitan et al., 2007). Každý med má ale jedinečné složení a na stejné mikroorganismy může tedy reagovat jiným způsobem.

Na kvalitu a zdravotní nezávadnost medu je kladen velký důraz. Je proto nutné, aby splňoval kritéria určená legislativou. Negativní vliv na jeho jakost a bezpečnost mohou mít mikroorganismy v něm obsažené. Jejich působením může dojít k nežádoucím mikrobiologickým procesům, především ke kvašení způsobenému činností kvasinek. K řízení kažení medu je proto důležitá znalost vlhkosti a teplotních podmínek, které ovlivňují jejich růst (Snowdon, Cliver, 1996). Pro zachování dlouhodobé trvanlivosti, která se obvykle stanovuje na dva roky, je rovněž nutné med skladovat ve vhodných podmínkách.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši na téma Mikrobiální kontaminace medů. V tomto úseku med charakterizovat, popsat jeho složení, vlastnosti a mikrobiální kontaminaci včetně nejvýznamnějších mikroorganismů. Cílem praktické části bylo experimentálně stanovit vybrané skupiny mikroorganismů, získaná data vyhodnotit a výsledky porovnat s údaji v literatuře. Dále změřit barvu medu a výsledky statistiky zpracovat.

3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1 Obecná definice medu

Medem se rozumí potravina přírodního sacharidového charakteru, složená převážně z glukózy, fruktózy, organických kyselin, enzymů a pevných částic zachycených při sběru sladkých šťáv květů rostlin (nektar), výměšků hmyzu na povrchu rostlin (medovice), nebo na živých částech rostlin včelami (*Apis mellifera*), které sbírají, přetvářejí, kombinují se svými specifickými látkami, uskladňují a nechávají dehydratovat a zrát v plástvích (Vyhláška č. 76/2003 Sb.).

Medem květovým (nektarovým) se rozumí – med pocházející zejména z nektaru květů (Vyhláška č. 76/2003 Sb.).

Medem medovicovým – med pocházející zejména z výměšků hmyzu (*Hemiptera*) sajícího z rostlin na živých částech rostlin nebo ze sekretů živých částí rostlin (Vyhláška č. 76/2003 Sb.).

3.2 Pohled do historie

Již ve velmi dávných dobách člověk zjistil, že včely mohou poskytnout chutnou součást potravy – med. Nejstarší kreslený doklad je z paleolitu, tj. asi před 15 000 lety. Kresba pochází z Pavoučí jeskyně (Cauveas de la Arana) nacházející se u vesnice Bicorp ve Španělsku. Med byl od pradávna velmi ceněn. Písemné zprávy o jeho využití zanechali Egypťané, kteří ho využívali jako slavnostního pokrmu dodávaného do chrámů, při výrobě léků i při balzamování těl zemřelých. V Egyptských pyramidách byl nalezen med starý 3 000 let, byl zkrystalizovaný, ale po hygienické stránce absolutně nezávadný (Přidal, 2003). Je-li med dobře uskladněn ve stálé teplotě okolo 0 °C, nezmění se jeho vzhled ani ostatní vlastnosti po dobu mnoha let. V Muzeu zemědělství v Dokki v Egyptě jsou uchovány džbány medu, který lze dosud konzumovat, z doby okolo roku 1400 př. n. l. (Blahová, 2010). V antickém období byl med uznávaný jako pokrm bohů a jako takový jej také obětovali při svých náboženských obřadech (Přidal, 2003).

Podle písemných zpráv se med na území dnešního Česka získává již od 5. století n. l. Historickou existenci včelařství potvrzují zřizovací listiny klášterů od doby Přemyslovců v 10. století. Již v 16. století se upravovalo medařské právo smluvními vztahy. Včelařské patenty Marie Terezie byly vydány pro Moravu a Slezsko roku 1755

a pro Čechy roku 1776. Na základě těchto patentů byly založeny včelařské školy (Čermáková et al., 2010).

3.3 Zdroje medu

Základním materiálem pro tvorbu medu je především nektar a medovice. Oba tyto materiály pocházejí původně ze šťáv rostlin a včely je stejným způsobem zpracovávají (Dobrovoda, 1986).

3.3.1 Nektar

Nektar je výměšek aktivních žláz květů rostlin, tzv. nektarií, jejichž úlohou je lákat hmyz. Tím si rostlina zajišťuje opylení. Nektar je vodný roztok cukrů, jehož vylučování je ovlivněno jak vnějšími vlivy prostředí, tak rostlinou samotnou (Přidal, 2003). Z vnějších činitelů ovlivňujících nektarodárnost rostlin jsou nejvýznamnější: stav a vlastnosti půdy, zásobování vodou, teplota, vlhkost a tlak vzduchu, sluneční svit, vítr, mlha, rosa, srážky, denní a roční doba (Veselý et al., 2003).

Mezi vnitřní činitele ovlivňující nektarodárnost se počítají: dědičné založení rostliny, velikost a typ nektarií, typ květu, fenologická fáze květu, zdravotní stav rostliny (Veselý et al., 2003).

Včely upřednostňují nektar s větším obsahem cukru. O nektar s malým množstvím cukru nejeví velký zájem. Nektar s nižší koncentrací cukrů jak 10 % včely nesbírají (Veselý et al., 2003). Běžná koncentrace cukrů kolísá mezi 3 až 80 %. V průměru nektar obsahuje 40 % cukrů. Z cukrů převládá v čerstvém nektaru sacharóza, glukóza, fruktóza v různém poměru (Přidal, 2003).

Nektar lze rozdělit do 3 skupin:

- a) nektar obsahující v převaze hexózy (typické pro květy s volnými nektarií),
- b) nektar s vyrovnaným obsahem hexóz a disacharidu sacharózy,
- c) nektar s převládajícím obsahem sacharózy (typické pro rostliny s těžko přístupnými nektarií) (Přidal, 2003).

Obsah a poměr cukrů v nektaru má vliv na kvalitu medu. Např. v nektarech řepkových a pampeliškových je málo fruktózy, v nektarech akátu a hluchavky má převahu fruktóza, a proto tyto medy zůstávají dlouho tekuté (Veselý et al., 2003).

V nektaru téměř chybí dusíkaté látky, v malém množství se nacházejí minerální látky (0,02–0,45 % sušiny). Udává se, že nektar obsahuje i kyseliny, a to kyselinu jablečnou, vinnou, citrónovou, jantarovou, šťavelovou a některé aminokyseliny a

amidy. Nejbohatší na aminokyseliny je nektar řepky olejky ($9,8 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ sušiny), následuje akátový nektar a dále nektar jateliny plazivé. Další důležitou složkou nektaru jsou pryskyřice, oleje, silice a terpeny, které nektaru dodávají specifickou vůni a chuť. Z barviv jsou přítomny flavony, pH nektaru se pohybuje mezi 2,7–6,4, málokdy je zásadité reakce. V nektaru jsou přítomny i pevné příměsi, zvláště pylová zrna, buňky rostlinných tkání aj. (Dobrovoda, 1986). Z vitamínů byly v nektaru zjištěny: tiamin, riboflavin, pyridoxin, kyselina nikotinová, kyselina listová, biotin a kyselina askorbová. Jejich obsah je však z hlediska biologické potřeby člověka málo významný (Veselý et al., 2003).

Mezi hlavní rostliny zajišťující dostatečný zdroj nektaru patří lípa malolistá, svazenka, vojtěška, jetel luční a plazivý, v teplejších oblastech slunečnice. V lesích kvete ostružiník, cenná je také vrba úzkolistá, větší plochy bodláku, čekanky a zlatobýlu (Sláma, 2007).

3.3.2 Medovice

Medovice je hustá sladká tekutina, kterou vylučuje stejnokřídlý hmyz (*Homoptera*). Včelařsky nejvýznamnější z tohoto hmyzu jsou mšice a červci, zatímco méry mají význam menší. Na našich stromech a keřích žije více jak 800 druhů mšic a okolo 250 druhů červců, mэр několik stovek druhů. Včelařský význam má však pouze asi 40 druhů tohoto hmyzu (Přidal, 2003; Haragsim, 2016).

Základní složkou medovice je floémová šťáva (míza) rostlin, kterou vysávají producenti medovice pomocí svých ústních orgánů, kudy proudí často pasivně vlivem vysokého turgoru (vnitřní tlak) v rostlinných tkáních. Producenti ji však mohou také aktivně nasávat pomocí podtlaku vyvinutého v hltanu. Míza sítkovic prochází do těla producentů medovice ve velkém množství, ale obsahuje málo živin a v nevhodném poměru. Rostlinná šťáva proto prochází zvláště uzpůsobeným zažívacím ústrojím s filtrační komorou, která mízu upravuje před vlastním trávením. Filtrační komora je tvořena tenkou blankou, přes kterou osmoticky pronikají látky s nízkou molekulární hmotností (hlavně jednoduché cukry) a také přebytečná voda, která prolíná přes blanku vlivem vznikajícího osmotického tlaku. Dále do žaludku producentů jde pouze koncentrát s vyšším relativním podílem proteinů a naopak nižším relativním i absolutním obsahem cukrů a vody. Filtrát je vyloučen do výkalového vaku, odkud jej producenti vylučují ve formě medovice z těla ven na listy či jehličí odkud jej sbírají včely (Přidal, 2003).

Množství medovice závisí na přemnožení hmyzu produkujícího medovici (Veselý et al., 2003). Dále množství medovice ovlivňuje denní doba, kdy jí nejvíce vzniká v noci díky nejvyššímu pohybu šťáv v rostlině. Medovice za suchého počasí velmi rychle zasychá. Takto zahuštěnou medovici včely už nemohou sbírat (Čavojský et al., 1981).

Vhodné podmínky k produkci medovice jsou dány počasím a velkým rozmnožováním hmyzu, který medovici vylučuje (Čavojský et al., 1981). Odhaduje se, že produkce medovice na 1 ha smrkového lesa je průměrně 700 kg, na 1 ha bukového 210 kg, borového 500 kg, dubového 400 kg a na 1 ha smíšených porostů 200 kg medovice (Haragsim, 2016).

Podstatnou část medovice tvoří cukry, z nichž je nejvíce zastoupena opět sacharóza, glukóza a fruktóza, dále maltóza, melecitóza, rafinóza, trehalóza a rovněž polysacharidy. Z aminokyselin nacházejících se v medovici byly zjištěny: alanin, kyselina asparagová, arginin, cystin, cystein, kyselina glutamová, glycin, histidin, leucin, lyzin, metionin, prolin, serin, treonin, tryptofan, tyrozin a valin (Haragsim, 2016). Aminokyseliny se nacházejí v medovici v podstatně nižší koncentraci než v míze sítkovic, ale v širokém druhovém zastoupení. Z dalších látek vyskytujících se v medovici jsou to různé minerální látky, vitamíny a barviva. pH medovice se pohybuje okolo 6,7–7,5. Nejznámější a technologicky nejvýznamnější je přítomnost melecitózy v medu. Melecitóza ve větším množství způsobuje velmi rychlou krystalizaci medu už v plástvích. Bylo však zjištěno, že vlastní míza modřínů melecitózu neobsahuje. Melecitóza vzniká biochemickým procesem transglukosidace přímo v trávicím traktu producentů. K podobným změnám dochází i u ostatních cukrů (Přidal, 2003). Obsah vody v medovici po vyloučení trávicím ústrojím producentů je průměrně 50 %, zatímco rostlinná míza obsahuje více jak 98 % vody (Dobrovoda, 1986).

3.4 Vznik medu

Vznik medu je velmi složitý proces a závisí na celém včelstvu (Vorlová et al., 2002). Proces tvorby medu začíná již při sběru, protože létavka obohacuje sbíraný nektar výměšky svých žláz v medném volátku, které vykazují vysokou enzymatickou aktivitu (Titěra, 2006). Včely přinášejí sladinu do úlu a ihned ji předávají úlovým včelám a tím je sladina zařazena do koloběhu potravy v celém včelstvu (Vorlová et al., 2002). Sladká šťáva přijde do styku ještě s mnoha včelami, které zásoby přemísťují z buňky do buňky a z plástve do plástve. Přidané včelí enzymy (invertáza, diastáza a glukózooxidáza) mezitím v medu katalyzují biochemické reakce, např. štěpení

některých cukrů (Titěra, 2006). Dalším krokem při vzniku medu je zahušťování, které je důležité k vytvoření vysokého osmotického tlaku (Přidal, 2013). K zahuštění dochází tak, že včely vyvrhují sladinu na zadní stranu hlavy a ohnutý sosák. Během celé této akce pracuje i česlo, které pomocí chloupků na svých chlopních vychytává část pylových zrn ze sladiny a posouvá je do žaludku (Vorlová et al., 2002). Tento proces probíhá do té doby až je obsah vody v rozmezí 28–32 %, což trvá asi 20 minut (Přidal, 2013). Při této koncentraci včela tekutinu protlačí s obtížemi jícnem, a proto ji uloží do buňky, kde probíhá další zahuštění pomocí odvětrávání celého úlu na 18–20 %. Teprve po patřičném zahuštění je med znovu přemísťován a ukládán do buněk (Vorlová et al., 2002). Proces zrání medu ve včelstvu trvá několik dnů. Je-li med téměř zralý a buňky plné, včely med zavíčkují v buňkách voskovými víčky. Zrání poté ještě nějakou dobu pokračuje (Titěra, 2006).

3.5 Chemické složení medu

Med je složen z několika hlavních komponentů a mnoha dalších látek s různým složením, které jsou přítomny ve stopovém množství (Titěra, 2006). Chemické složení se mění v závislosti na klimatických podmínkách a geografickém původu (Bakier, 2007).

Voda

Obsah vody u medů kolísá v širokém rozmezí. Jako průměrné množství vody je udávána hodnota 17,6 % s rozsahem 13,4–22,9 % (Lunerová, Pažout, 2012). Nevyzrálé medy mají až okolo 25 % vody (Drašar, 1978). Dle normy Český med (SN ČSV 1/1999) nesmí její množství překročit 18 %. Čím méně vody med obsahuje, tím se zvyšuje jeho kvalita (Titěra, 2006). Obsah vody ovlivňuje především jeho uchovatelnost (White, Doner, 1980). Vyzrálé medy, díky poměrně nízkému obsahu vody, jsou mikrobiálně velmi stabilní (Titěra, 2006).

Cukry

Med je přesyceným roztokem sacharidů (Dupal, 2011). Ty dodávají medu sladkou chuť, hygroskopičnost a určují jeho fyzikální vlastnosti (Steinhauserová, 2003).

Glukóza a fruktóza tvoří 85–92 % veškeré sušiny medu. Vzájemný poměr těchto dvou cukrů je jedním z kritérií, podle kterých odhadujeme náchylnost medu ke krystalizaci (Drašar, 1978; Dupal, 2011). Složitější cukry se v medu vyskytují také, ale

v malém množství. Sacharózy je ve většině medů okolo 1 %, norma připouští do 5 % (Titěra, 2006). Vyšší cukry a dextriny se vyskytují také v malém množství. Na dextriny jsou bohaté medovicové medy. Dextriny zpravidla brzdí krystalizaci. Platí to zejména o maltóze, ale výjimku tvoří melecitóza, která je naopak příčinou rychlé krystalizace některých medovicových medů v plástvích (Drašar, 1978).

Bílkoviny

Med obsahuje asi 0,5 % bílkovin, mezi které patří hlavně enzymy a volné aminokyseliny (Bogdanov et al., 2008). Z aminokyselin se v medu nachází především prolin, alanin, izoleucin, valin, kyselina glutamová a další (Steinhauserová, 2003). Nejsložitějšími bílkovinami v medu jsou enzymy (Titěra, 2006). Enzymy vytváří biologickou aktivitu medu (Drašar, 1978). V kvalitních medech je vysoká aktivita enzymů. Nejčastěji se uvádí normovaná diastáza, která štěpí škroby (Titěra, 2006). Zásadní význam má enzym invertáza, která je důležitá z hlediska tvorby medu a změny jeho složení během skladování. Štěpí řepný cukr na tzv. invertní cukr, tedy na glukózu a fruktózu (Drašar, 1978). Dalším významným enzymem je glukózooxidáza, která je potřebná k tvorbě peroxidu vodíku a kyseliny glukonové. Vyskytovat se mohou amylázy a fosfatázy (Bogdanov et al., 2008).

Minerální látky

Med obsahuje ve stopových množstvích velké spektrum prvků, ale je pouze doplňkovým zdrojem minerálů (Titěra, 2006). Obsah minerálních látek v medu je průměrně 0,3 %. Obecně je jejich zastoupení vyšší v medovicových medech (Steinhauserová, 2003). Nejvíce je zastoupen draslík, dále sodík, síra, fosfor, vápník a hořčík. Železo, mangan a měď se vyskytují spíše v tmavých medovicových medech (Dupal, 2011). Minerální látky v medu ovlivňují jeho kyselost, a tím i chuťové vlastnosti (Drašar, 1978). Obsah minerálních látek také ovlivňuje barvu medu. Čím vyšší je obsah minerálních látek, tím je med tmavší (Frank, 2010).

Barviva

V medu se vyskytují převážně látky rostlinného původu, jedná se především o flavonoidy. Část barviv v medu vzniká rozkladnými reakcemi cukrů a reakcemi volných aminokyselin s cukry – Maillardovy reakce neenzymatického hnědnutí (Drašar, 1978).

Barvu medu také ovlivňuje množství minerálních látek a organických kyselin (Vorlová et al., 2002).

Organické kyseliny

Organické kyseliny jsou důležitou součástí medu. Ovlivňují jeho chuť, stabilitu a další cenné vlastnosti. Některé tyto kyseliny řadíme mezi přirozené antioxidanty (Titěra, 2006). V medu největší část tvoří kyselina glukonová, která vzniká enzymatickou oxidací glukózy (Drašar, 1978). Dále jsou obsaženy kyseliny citrónová, jablečná, octová, jantarová, mravenčí, máselná, šťavelová, protokatechová, benzoová, gentisová, vanilová, kumarová, nerulová, swingová, anisinová, salicylová, skořicová a také deriváty těchto kyselin (Titěra, 2006).

Aromatické látky

V medu bylo zaznamenáno více než 150 aromatických látek (Titěra, 2006). Po chemické stránce jsou to různé estery, aldehydy, ketony (Drašar, 1978). Významné jsou obzvláště β -damascenon a fenylacetaldehyd, které dávají medu charakteristickou vůni a chuť (Vorlová et al., 2002).

Vitaminy

Většina vitaminů pochází z mateří kašičky a pylu (Steinhauserová, 2003). V medu se vyskytují pouze ve stopovém množství, takže by nestačily pokrýt potřebu vitaminů lidského organismu (Drašar, 1978). V největším množství se nachází vitaminy skupiny B, hlavně tiamin, riboflavin a kyselina pantotenová. Zcela nepatrná je koncentrace vitamínu C (Steinhauserová, 2003).

Tuky

Obsah tuků v medu je pouze 150 g v 1 kg medu. Z toho je asi 45 % esterů cholesterolu, 22 % triglyceridů, 18 % volných kyselin, 17 % volného cholesterolu. Do medu se dostanou pravděpodobně z mateří kašičky a jiných žlázových produktů mladých včel, které med zpracovávají (Titěra, 2006; Veselý et al., 2003).

Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky, které neutralizují účinek volných radikálů. Volné radikály jsou kyslíkaté sloučeniny vznikající jako vedlejší produkty buněčného metabolismu. Pokud nejsou inaktivovány, mohou poškodit buněčný aparát. Analytické studie popsaly několik desítek různých antioxidantů v medu, mezi které patří organické kyseliny a jejich estery, dále látky ze skupiny flavonoidů a flavanonů (Titěra, 2006).

Přírodní toxické látky

Hlavním zdrojem toxických medů jsou vřesovité rostliny (*Ericaceae*), zahrnující různé druhy pěnišníků, azalek, kyhanek a kalmií. Dalším zdrojem toxických medů jsou keře *Coriaria arborea* z Nového Zélandu, přesněji medovice z tohoto keře. Toxické medy byly zjištěny i v Maďarsku z rulíku zlomocného nebo durmanu. Pyrrolizidinové alkaloidy se vyskytují v medech ze starčeku přímětníku, ale otravy zatím nebyly popsány (Veselý et al., 2003).

Ostatní

V medu bylo identifikováno několik antimikrobiálních a antifungálních faktorů včelího původu. Jde o látky citlivé na světlo, ale poměrně termostabilní. Tyto látky jsou schopny inhibovat růst některých mikroorganismů, např. *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* aj. Z dalších sloučenin med obsahuje např. acetylcholin a adrenalin (Vorlová et al., 2002).

3.6 Fyzikální vlastnosti medu

Viskozita

Čerstvě vytočený med má vlastnosti viskózní tekutiny. Viskozitu ovlivňuje hlavně teplota a obsah vody. Ovšem i přítomnost melecitózy viskozitu medu výrazně zvyšuje (Bakier, 2007). Jedinou a nejjednodušší možností jak snížit viskozitu medu během jeho zpracování je zvýšení teploty. Technologický postup musí být ale šetrný, aby nebyla znehodnocena kvalita medu (Přidal, 2013).

Hygroskopicita

Hygroskopicita je schopnost látek pohlcovat a udržovat vlhkost (Vorlová et al., 2002). Med je díky svému vysokému obsahu cukrů velice hygroskopický (Přidal, 2013).

Tento jev je způsoben hlavně přítomností fruktózy, neboť jde o velmi hygroskopický sacharid, kdežto glukóza ani sacharóza nejsou výrazně hygroskopické (Vorlová et al., 2002). Med při nedokonalém uzavření přijímá nadměrnou vlhkost, dále přijímá i pachy, a proto se ke skladování doporučují využívat zásadně hermeticky uzavíratelné nádoby. Pozitivním významem hygroskopicity je, že zvyšuje jemnost pečiva a snižuje jeho vysychání. (Přídal, 2013).

Krystalizace

Krystalizace je přirozenou fyzikální vlastností, kdy se cukry z rozpuštěné formy mění na formu nerozpuštěnou. Med je přesycený roztok cukrů, tzn., že obsahuje více cukrů, než kolik jich může zůstat rozpuštěných v roztoku při teplotě 4–28 °C. Nejméně rozpustitelným cukrem je glukóza, od které se proto odvozuje stupeň nasycenosti. Roztok glukózy je nasycený, když hmotnostní poměr glukózy a vody při 25 °C je roven 0,3 (Přídal, 2013). Čím vyšší je obsah glukózy a nižší obsah vody, tím med krystalizuje rychleji, protože molekuly glukózy mají tendenci se seskupovat a rychleji tvořit krystaly (Dobre et al., 2012). Výzkum Smanalieva a Senge (2009) ukázal, že krystalizace medu závisí především na botanickém původu, teplotě a době skladování. Hajdušková (2006) uvádí, že květové medy obsahují větší množství glukózy a díky malým krystalkům glukózy a četným pylovým zrnkům krystalizují poměrně brzy. Často už za několik týdnů po vytočení. Medovicové medy obsahují více fruktózy, a proto krystalizují později.

Nezávisle na původu by měl ale každý med zhruba do roku ztuhnout, tedy zkrystalizovat. Pokud k tomu nedojde, existuje vážné podezření, že byl proces zrání medu zastavený a kvalita medu proto utrpěla. Nejčastěji se tak může stát vystavením medu vysokým teplotám nebo po drastické filtraci medu, při které byla odstraněna pylová zrna (krystalizační centra). Tím se ovšem bohužel odstraní nebo zničí řada prospěšných látek, pro které si medu ceníme (Hajdušková, 2006).

Hustota

Hustota je hmotnost medu na jednotku jeho objemu. Hustota medu se mění zejména v závislosti na obsahu vody v medu. 1 litr medu váží přibližně 1,4 kg (Přídal, 2013).

Povrchové napětí

Med má nízké povrchové napětí, které je závislé na původu medu. Spolu s vysokou viskozitou je povrchové napětí zodpovědné za tvorbu charakteristické pěny na povrchu medu, která obsahuje především bílkoviny, ale také pylová zrna a nečistoty (Přidal, 2013).

Barva

Žádná jiná potravina se nevyskytuje v takové rozmanitosti barev jako med (Frank, 2010). Barva medu se mění od téměř vodojasné, přes jantarovou až po téměř černou. Záleží na původu medu, stáří, podmínkách skladování, stáří pláství. Med vytočený ze starších pláství je tmavší (Dobrovoda, 1986). Jakmile med zkrystalizuje, stává se vždy světlejším oproti tekuté fázi, protože krystaly glukózy jsou bílé (Přidal, 2003). Průhlednost medu také závisí na přítomnosti různých částic, hlavně pylu. Barva medu chrání některé jeho málo odolné složky (např. některé enzymy) před slunečním zářením (Dobrovoda, 1986). Výjimkou, kdy může souviset barva s kvalitou, jsou medy přehřáté, tedy znehodnocené. Vlivem vysoké teploty dochází působením kyselin k rozkladu přítomných cukrů za vzniku MHF (hydroxymethylfurfural), který je velice reaktivní a na vzduchu okamžitě hnědne (Titěra, 2006; Veselý et al., 2003). Jeho maximální přípustné množství stanovené Vyhláškou 76/200 Sb. je 40 mg/kg.

Barva je často vyjadřována v mililitrech Pfundovy stupnice nebo podle klasifikace navržené U. S. Department of Agriculture (Přidal, 2003). Pro velmi přesná stanovení se používají profesionální přístroje (např. spektrofotometr Konica Minolta CM – 3500d).

Optická rotace

Květové medy obsahují převážně levotočivou fruktózu. Naopak medy medovicové mají vyšší obsah cukrů pravotočivých (glukóza), a proto stáčí rovinu polarizovaného světla doprava i po inverzi. Medy smíšené mají polarizaci různou (Přidal, 2013).

3.7 Med a jeho účinky na zdraví člověka

Med je vysoce hodnotná, lehce stravitelná potravina, která povzbuzuje chuť k jídlu. Med je vhodný jako rychlý přísun energie. Uvádí se, že energetická hodnota 100 g medu je kolem 325 kcal (Čavojský et al., 1981). Někdy se můžeme setkat s názorem, že med je pouze koncentrovaný roztok cukrů a je tedy vyloučeno, aby byl vnímán jako potravina. Prý je med i škodlivý. Takový názor je třeba odmítnout, neboť žádná vědecká

studie tuto domněnku nepotvrdila. Naopak existují stovky vědeckých studií, které dokazují pravý opak. Med má vynikající nutriční a dietetické vlastnosti jako doplněk výživy lidí i zvířat a dokonce má i léčivé účinky (Přidal, 2003).

Celkově lze med označit za potravinu s výrazným dietetickým účinkem zlepšující fyzickou kondici jedince, bránící vzniku nadměrné únavy během nárazových zátěží. Výrazný pozitivní účinek se projevuje u problémů spojených se zažívacími potížemi. Výborné výsledky byly dosaženy při indikaci medu u zácpy či různých vředových chorob. Med díky svým antibakteriálním účinkům, vysoké viskozitě a pufrací aktivitě dokáže velmi úspěšně chránit stěnu žaludku před trávicími šťávami. Dále se potvrdilo, že při různých onemocněních ledvin je med vynikajícím podpůrným prostředkem, poněvadž téměř neobsahuje bílkoviny, které by ledviny zatěžovaly a přitom má dostatek energie a různé biologicky účinné látky (Přidal, 2003). Výzkumy také ukázaly, že u pacientů s vysokou hladinou cholesterolu došlo po 16denním užívání medového roztoku k 8% poklesu hodnot LDL cholesterolu (Křenková, 2009). Dále bylo zjištěno, že kojenci, kteří nebyli kojeni, ale byl jim podáván med, byli v průkazně lepším stavu ve srovnání s kojenci, kterým med podáváný nebyl. Bylo zjištěno, že med pozitivně působí na fixaci vápníku v kostech a pozitivně působí při anemii (Přidal, 2003).

Med zlepšuje krevní oběh, prokrvení věnčitých cév a celého srdečního svalu (Zentrich, 2003). Bylo také prokázáno, že zlepšuje koncentraci hemoglobinu, zvyšuje počet červených krvinek a zvyšuje hodnoty hematokritu (Ajibola, 2015). Odjakživa se med používal při zánětech horních cest dýchacích. Med se doporučuje při onemocnění jater, zánětu žlučníku aj. Uklidňujícího účinku medu se využívá při nespavosti s doporučením jedné až dvou lžiček medu před spaním. Med tím, že obsahuje jednoduché cukry, se doporučuje v rekonvalescenci po onemocnění a vyčerpanosti organismu. Při nadbytečném příjmu medu se sacharidy ukládají jako glykogen, který vylepšuje svalovou činnost a podporuje činnost jater. Med aplikovaný na hnisavé rány pomáhá odlučovat odumřelé tkáně a rány oživuje. Žvýkání odvíčkovaných voskových víček při vytáčení medu působí příznivě u zánětu horních cest dýchacích i u senné rýmy (Kareš, 2004). Med dále zvyšuje detoxikační činnost organismu, čistí pleť, je vhodným podpůrným prostředkem při léčbě bolesti hlavy, ovšem podávat ho během migrény není vhodné (Zentrich, 2003; Čavojský et al., 1981). Bylo uvedeno, že med zmírňuje bolest spojenou s extrakcí zubů a brání vzniku zubní infekce. Zabraňuje také vzniku zubního kazu, zánětu dásní, jakož i dalším ústním onemocněním (Ajibola, 2015).

Dále se uvádí, že včelí med je vydatným zdrojem probiotik. Probiotika jsou bakterie, které příznivě ovlivňují střevní mikroflóru člověka a prospívají lidskému zdraví. Brání např. rozvoji choroboplodných zárodků nebo tlumí nežádoucí reakce imunitního systému (Petr, 2012). Bylo také zjištěno, že pacienti se srdečním onemocněním mohou konzumovat med, na rozdíl od rafinovaného cukru, bez jakéhokoliv nebezpečí. V této studii bylo dále zjištěno, že takto nemocným pacientům, kteří konzumovali med, se zvýšila koncentrace antioxidantů v krvi (Ajibola, 2015). Využití medu je také spojeno s léčbou očních onemocnění, hlavně očních zánětů, kdy se med aplikuje přímo na rohovku. Jsou známy zprávy, že Afričané v Mali používali med pro terapeutickou kontrolu spalniček. Med byl poté většinou aplikován na oči pro prevenci zjizvení rohovky následkem spalniček a jiných očních infekcí (Ajibola, 2015). Med můžeme používat zevně i vnitřně. Zevně se používají hlavně medovicové medy, které obsahují téměř 12 % dextrinů. Medovicovým medům dáváme také přednost u pacientů s nemocnými ledvinami, protože obsahují více silic s mukolytickým účinkem. Květové medy upřednostňujeme u dětí, v případě, kdy je potřeba rychlé obnovy tkání např. v případě pooperačních a porážkových stavů. Uvádí se, že květové medy jsou také lépe stravitelné (Hubač, 2005).

Léčivé účinky medu jsou spojeny hlavně s medy jednodruhovými, které včely vytvořily z rostlin, u nichž byl prokázán léčivý účinek. Nejvíce známé jsou hojivé účinky na kůži, a proto je med často součástí kosmetických hydratačních a výživných krémů. Med má však vynikající účinky při aplikaci přímo do rány při různých odřeninách či dokonce popáleninách (Přidal, 2003). Alergie na med je poměrně neobvyklá. U pacientů, kteří jsou alergičtí na pyl, se zřídka objeví alergie na med (Bogdanov et al., 2008).

Pro naše užívání je nejvhodnější český med, protože obsahuje pyl z rostlin, které jsou pro nás přirozené. Med z ČR neobsahuje antibiotika ani sulfonamidy, jejich používání je u nás zakázáno (Křenková, 2009). Pokud má být med lékem, pak všechny jeho složky musí být zachovány v původní podobě (Titěra, 2006).

3.8 Mikrobiální kontaminace medu

Všechny mikroorganismy potřebují ke svému životu zdroje uhlíku, dusíku, minerálních látek a vody, přičemž omezení živin vede ke změně mikrobiálního metabolismu (Cooper, 2005). Z toho vyplývá, že se v medu nacházejí mikroorganismy,

kterým med poskytuje dostatek živin k přežití (Iurlina, Fritz, 2005). Přesto však med představuje nevhodné prostředí pro růst bakterií (Vorlová et al., 2002).

Ve zralém medu se mikroorganismy nerozmnožují díky vysokému obsahu cukrů a tím osmotickému tlaku, který vytváří v medu tzv. „fyziologické sucho“. Fyziologické sucho však není jediným důvodem samoudržnosti medu. Faktory, které působí na samoudržnost jsou:

- a) vysoký obsah cukrů = limitovaný obsah vody = vysoký osmotický tlak = fyziologické sucho,
- b) nefyziologická acidita medu pro většinu mikroorganismů,
- c) glukózo-oxidázový systém,
- d) nedostatek kyslíku,
- e) obsah některých chemických látek a enzymů v medu s antimikrobiálním účinkem (těkavé látky, lysozym, fenolové kyseliny, defensin aj.),
- f) redukující cukry vytvářející nepříznivý elektrický náboj pro množení mikroorganismů (Přidal, 2013).

I přesto, že je med pro mikroorganismy nevhodným prostředím, jeho mikroflóra může být velmi rozmanitá. Olaitan et al. (2007) z medu izolovali 16 druhů bakterií (např. *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*), 13 druhů kvasinek (*Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Torula*, *Torulopsis* ad.) a 12 druhů plísní (např. *Hormiscium*, *Triposporium*, *Peyronelia*).

3.8.1 Primární kontaminace medu

Mikroorganismy nalezené v medu jsou hlavně sporotvorné bakterie nebo kvasinky pocházející ze včel, jejich trávicího traktu, pylu, prachu, půdy, vzduchu, nektaru a medovice (Přidal, 2013; Snowdon, Cliver, 1996). Tyto přírodní zdroje mikroorganismů je velice těžké kontrolovat (Róžaňska, 2011). Dá se předpokládat, že mikroorganismy nalezené v prostředí okolo včelích úlů se budou vyskytovat také v medu a jejich celkové množství se může pohybovat od 0 až do desítek tisíc na gram. Mezi mikroorganismy, které se mohou do medu dostat z rostliny a rostlinných produktů, patří hlavně *Citrobacter*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* a *Pediococcus*, z půdy především *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* a *Psychrobakter* (Snowdon, Cliver, 1996).

Bylo zjištěno, že včely přinášejí s nektarem a pylem do úlu i velmi nebezpečné bakterie, kvasinky a plísně, které dokážou velmi rychle zničit zásoby včel (Petr, 2012). Z pláství a dospělých včel mohou být snadno izolovány bakterie z rodu *Bacillus*, *Micrococcus* a kvasinky z rodu *Saccharomyces* (Snowdon, Cliver, 1996).

Trávicí trakt včel zabírá z více jak 99 % 8 hlavních mikrobiálních skupin. Hlavními skupinami jsou beta-proteobakterie, gamma-proteobakterie 1 a 2, alfa-proteobakterie 1 a 2, firmikuty 4 a 5 a bifidobakterie. Zástupci dvou největších skupin beta a gamma-proteobakterií 1 (*Gilliamella apicola* a *Snodgrassella alvi*) patří mezi nejdůležitější a nejvíce zastoupené druhy (Engel, Moran, 2013).

Každá část traktu včely medonosné je charakteristická svým osídlením a jeho složení se mění v průběhu roku. Trávicí trakt včel je tvořen 3 částmi. První část je hltan, jícen a medný váček, druhou částí je žaludek a třetí část tvoří tenké střevo a konečník neboli výkalový vak. Mikrobiálně nejbohatší u včel je výkalový vak. Kromě toho jsou ale bakterie i v žaludku a specifické bakterie byly také objeveny v medném váčku. Některé mikroorganismy jsou přítomny ve všech těchto částech a mohou mezi nimi migrovat (Hroncová et al., 2014).

Včela medonosná hostí v medném váčku 13 různých druhů bakterií mléčného kvašení. Nejpočetněji jsou zastoupeny bakterie rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Petr, 2012). Jedná se o symbionty, které jsou neustále doplňovány stravou, kromě toho se ale v medném váčku, případně jiné části traktu, množí. Tyto druhy se potom uplatňují při fermentaci pylu na včelí chléb. Za důkaz tohoto tvrzení se považuje fakt, že spektrum laktobacilů se nelišilo v závislosti na kvetoucích rostlinách v okolí zkoumaného včelstva. Z toho je usuzováno, že létavkami přinášený nektar si předávají úlové včely, které ho bakteriemi naočkují a začíná tak proces semifermentace. Během zrání medu se snižuje obsah vody, na kterém jsou laktobacily životně závislé a postupně hynou. Přežijí jenom ty bakterie, které jsou schopny vytvořit spory (Vasquez et al., 2012).

Žaludek a výkalový vak hostí více než 100 milionů živých mikrobů v jednom gramu střevního obsahu. Kromě bakterií se zde objevují i kvasinky a mikroskopické plísně. Jako hlavní mikroorganismy byly nalezeny blíže neidentifikované gramvariabilní, pleomorfní bakterie a také sporotvorné bakterie rodu *Bacillus*. Pravidelně byly nalezeny opět laktobacily, koliformní bakterie, stafylokoky, kvasinky a zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* (Hroncová et al., 2014). Také z výkalů včelích larev bylo izolováno

určité množství mikrobiálních druhů, ovšem vnitřnosti larev, kukly a nově vylíhnuté včely jsou často sterilní (Snowdon, Cliver, 1996).

Střeva včel obsahují 1 % kvasinek, 29 % grampozitivních bakterií, včetně *Bacillus*, *Streptococcus* a *Clostridium* a 70 % gramnegativních nebo gramvariabilních bakterií, včetně *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Klebsilla*, *Flavobacterium*, *Proteus* a *Pseudomonas*. Dále plísňe z rodu *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. a někdy i kvasinky (Olaitan et al., 2007). Gilliam (1978) naznačuje, že pyl je hlavním zdrojem osídlení střevní mikroflóry včel. Kačániová et al. (2004) vyčíslila počet aerobních a anaerobních bakterií ve střevě včel. Zjistila, že počty aerobních mikroorganismů byly výrazně nižší, než počty anaerobních (10^5 – 10^6 životaschopných buněk/g střevního obsahu, oproti 10^8 – 10^9 životaschopných buněk/g střevního obsahu).

Někteří autoři naznačují, že také sladidla používaná ke krmení včel, mohou být zdrojem spor v medu (Snowdon, Cliver, 1996).

3.8.2 Sekundární kontaminace medu

Sekundární kontaminace je dána správnou výrobní praxí a dostatečnou hygienou. Mikrobiální kontaminace je častější až v průběhu zpracování, manipulace a skladování medu, než v samotném úlu. Vegetativní formy mikroorganismů se do medu dostanou pouze sekundární kontaminací (Snowdon, Cliver, 1996; Róžańska, 2011). Mezi nejdůležitější sekundární zdroje kontaminace podle Tysseta et Rousseaura (1981) patří lidé, znečištěné vybavení a náradí, vítr, prach, hmyz, voda a zvířata. Kvasinky se do medu mohou dostat z různého zařízení, kontaminovaného vybavení. Podlahy, stěny a stropy mohou být také zdrojem mikrobů (Snowdon, Cliver, 1996). Možné cesty přenosu do vytočeného medu zahrnuje vzduch (při balení medu), manipulaci s medem, kdy je med možné kontaminovat kýchním, kožními infekcemi apod. (Olaitan et al., 2007). Při stáčení za nevhodných hygienických podmínek se v medu mohou vyskytnout také koliformní bakterie. Jejich pomnožování je však většinou znemožněno přítomnými antimikrobiálními látkami přírodního charakteru (Vorlová et al., 2002).

Předpokládalo se, že i lidské exkrementy by mohly být zdrojem patogenních mikroorganismů vyskytujících se v medu. Sackett naočkoval 10 druhů nesporetvorných střevních bakterií do medu a bylo zjištěno, že tyto bakterie jsou schopny v medu přežít pouze několik hodin nebo dní (Snowdon, Cliver, 1996).

Dalším zdrojem mikroorganismů v medu mohou být mikrobiální původci onemocnění včel, jako např.:

a) *Peanibacillus larvae* – vyvolává mor včelího plodu, což je nejnebezpečnější onemocnění a to díky vysoké odolnosti spor a invazivnímu šíření (Vorlová et al., 2002, Hrabák, 2014). Původce moru včelího plodu může být do úlu zanesen přes plástve, rámy, mezistěny vyrobené z nedezinfikovaného vosku, loupežící včely a škůdce (Drašar, 1978). Tímto způsobem se mohou dostat spory této bakterie i do medu (Vorlová et al., 2002).

Onemocnění ovšem není přenosné na člověka. Z hlediska konzumace medu, který obsahuje spory *Peanibacillus larvae*, nehrozí člověku žádné zdravotní problémy, ani další následky. Med infikovaný sporami této bakterie není z hlediska lidské spotřeby závadný (Vondrka, 2007).

b) *Melissococcus plutonius* – je označován za hlavního původce onemocnění zvaného hniloba včelího plodu. Dalšími příležitostnými patogeny jsou např. *Peanibacillus alvei*, *Enterococcus faecium* a další. Tito mikroby se v malých množstvích vyskytují běžně ve střevní mikroflóře včel a jsou pod kontrolou imunitního systému včel. Pouze za určitých podmínek se přemnoží, stávají se patogenními a propukne tak hniloba včelího plodu (Titěra et al., 2016). Spory *Peanibacillus alvei* vydrží v medu více jak jeden a půl roku (Cempírková et al., 1997).

c) *Aspergillus* spp. – způsobuje zkamenění včelího plodu. U nás je toto onemocnění vzácné. Výtrusy houby se do včelstva dostávají s potravou, kterou se nakazí larvy. Tato houba napadá i dospělé včely, a může se přenést až na člověka (Drašar, 1978). Spory *Aspergillus flavus*, *Pericystis apis*, *Penicillium stoloniferum* jsou schopny vyklíčit z medu i po 15 letech. (Cempírková et al., 1997)

d) *Ascospaera apis* – způsobuje onemocnění zvané zvápenatění včelího plodu. Výtrusy houby přinesou včely do úlu s potravou. Při výskytu onemocnění se plástve s napadeným plodem ze včelstva odstraní a spálí. Zvápenatění včelího plodu se dá předejít udržováním čistoty na dnech úlů (Drašar, 1978).

e) *Nosema apis* – způsobuje onemocnění zažívacího traktu (nosemózu) dospělých včel. Dokáže se množit v žaludku včel. Kvůli tomu včely nedokážou řádně strávit potravu a v důsledku průjmu kálí i v úlu. Výkaly obsahují mnoho nestrávené sladiny, která láká další včely a tím se onemocnění šíří. Jako prevence se doporučuje udržovat

neustálou čistotu v úlech (Báchor, 2012). *Nosema apis* byla v několika posledních letech nahrazena mikrosporidii *Nosema ceranae* (Hubač, 2012).

3.8.3 Bakterie vyskytující se v medu

Při kvalitativním hodnocení můžeme v medu nalézt bakterie rodu *Bacteridium*, *Bacterium*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Staphylococcus* a *Alcaligenes*. V největším zastoupení se nachází *Bacillus* (spory se v medu objevují v pravidelných intervalech), zejména *Bacillus cereus* a *Bacillus pumilus*. Následuje *Micrococcus*, *Pseudomonas* a *Staphylococcus*, který se však ve zralém medu neobjevuje, jelikož z pravidla nepřežívá medobraní a nedokáže v medu růst, stejně jako ostatní bakterie (Snowdon, Cliver, 1996).

S patogenními bakteriemi se můžeme v medu setkat pouze zřídka, k nejzávažnějším patří *Clostridium botulinum*, přítomny občas bývají i spory příbuzného *Clostridium perfringens* (Vorlová et al., 2002). V medu se však žádný ze dvou druhů bakterií nemnoží, takže pokud byly v medu zjištěny, do medu se dostaly sekundárně a nemnožily se v něm, a proto žádné botulotoxiny nebyly doposud v medu prokázány (Přidal, 2013). Med obsahující tyto spory může u dětí vyvolat botulismus. Med obsahující spory *Clostridium botulinum*, ale prostý toxinu vyvolává onemocnění dětí po požití tím, že spory ve střevě vyklíčí, začnou se množit a přitom produkují nebezpečný toxin (Vorlová et al., 2002).

Většinou se spory bakterie *Clostridium botulinum* v medu nenacházejí. Pokud se v medu objeví, hodnoty jsou obvykle menší jak $0,01 \text{ spor} \cdot \text{g}^{-1}$ medu. Ve vzácných případech však med může obsahovat 5 až $80 \text{ spor} \cdot \text{g}^{-1}$ medu. Občas tedy z neznámých důvodů obsahuje med větší množství těchto spor – nejspíše ve včelstvech, které trpí hnilobou včelího plodu, pro které je typická přítomnost doprovodné mikroflóry. V uhynulých larvách se tak může *Clostridium botulinum* namnožit a med z takových včelstev může být silně infikován. Během skladování a následného zpracování medu zřejmě dochází ke snížení životnosti spor (Přidal, 2013).

Některé bakterie v medu dokážou přežít, ale jejich růst je omezený (Snowdon, Cliver, 1996). Např. salmonely a shigely v medu vydrží naživu pouze 24 hodin (Cempírková et al., 1997). Nicméně, spory mikroorganismů mohou v medu přežít při nízkých teplotách velmi dlouhou dobu (Al-Waili et al., 2012).

Kňazovická et al. (2011), uvádějí jako průměrnou hodnotu výskytu bakterií v medu $1,4 \cdot 10^2$ KTJ·g⁻¹ a jako průměrnou hodnotu anaerobních sporotvorných bakterií 2,60 log KTJ·g⁻¹. Podle Omafuvbe et Akanabi (2009) je průměrný počet aerobních bakterií v rozmezí od $1,0 \cdot 10^3$ do $5,0 \cdot 10^3$ KTJ·g⁻¹.

O výskytu virů či parazitů v medu nejsou žádné záznamy (Snowdon, Cliver, 1996).

3.8.3.1 Koliformní bakterie

Koliformní bakterie jsou gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinky, laktózapozitivní, oxidázanegativní (Cupáková et al., 2010). Mezi koliformní bakterie patří čtyři rody z čeledi *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* a *Klebsiella* (Jay et al., 2005). Koliformní bakterie jsou součástí střevní mikroflóry člověka a hospodářských zvířat a současně se vyskytují i ve vnějším prostředí. Jsou to nesporotvorné tyčinky zkvašující laktózu s tvorbou kyseliny a plynu při teplotě 30 °C do 48 hod. (Cupáková et al., 2010).

Pro svůj dobrý růst slouží i jako indikátor sekundární kontaminace potravin. Obsah koliformních bakterií v potravinách se hodnotí jako indikátor správnosti zachování směrných technologických postupů, jejich získávání, opracování a zpracování, případně chlazení a správnost čištění a dekontaminace technologického nářadí a zařízení (Görner, Valík, 2004). Vysoké počty koliformních bakterií jsou v potravinách nežádoucí, je ovšem prakticky nemožné jejich výskyt eliminovat, a to především u potravin, které neprošly procesem tepleného opracování (Bursová et al., 2014).

Za hlavního představitele koliformních bakterií se považuje *Escherichia coli*. Je součástí střevní mikroflóry člověka a teplokrevných zvířat. Její výskyt v potravinách a surovinách živočišného původu a v prostředí výrobních podniků je považován za indikátor fekálního znečištění, a tedy nízké úrovně hygieny a sanitačního režimu (Cupáková et al., 2010).

3.8.3.2 Rod *Bacillus*

Bakterie z rodu *Bacillus* jsou sporulující aerobní nebo fakultativně anaerobní, katalázapozitivní (Görner, Valík, 2004). Jeho druhy většinou tvoří grampozitivní, peritrichní tyčinky, které mají bohaté enzymové vybavení. Většina druhů má velmi aktivní amylolytické enzymy, které štěpí škrob, řada druhů má pektolytické vlastnosti, díky nim jsou schopni štěpit rostlinné pektiny a většina druhů má velmi aktivní proteolytické enzymy, které se uplatňují při rozkladu bílkovin (Šilhánková, 2009).

Bílkoviny štěpí za vzniku amoniaku, sacharidy fermentují obvykle s méně výraznou tvorbou kyselin, některé i s tvorbou plynu. Dobře roste v rozmezí pH 5,5–8,5 (Görner, Valík, 2004).

3.8.3.3 *Bakterie mléčného kvašení*

Pod pojmem bakterie mléčného kvašení (BMK) se obecně rozumí skupiny bakterií kokovitých i tyčinkovitých, zahrnující některé druhy rodů: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* (Görner, Valík, 2004).

Mezi mezofilní, pro které se optimální teplota pohybuje mezi 20–40 °C, BMK patří zejména bakterie rodu *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* a *Pediococcus* (Burdychová, Sládková, 2007).

Jsou to hlavně grampozitivní, katalázanegativní, nesporotvorné bakterie (Forsythe, 2000). Při fermentaci produkují látky a vytvářejí podmínky, které jsou pro jiné bakterie zpravidla škodlivé. Podle vznikajících produktů fermentace se dělí na homofermentativní a heterofermentativní. Homofermentativní BMK (např. *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*) produkují primárně kyselinu mléčnou, zatímco heterofermentativní (např. *Leuconostoc*, *Weissella*) produkují ekvimolární množství kyseliny mléčné, CO₂ a etanolu (Strobová, 2015).

Jejich metabolismus může za aerobních podmínek vést k oxidační disimilaci za vzniku CO₂ a kyseliny octové. Přitom se jako meziprodukt tvoří mikrobicidní peroxid vodíku. Dalším významným faktorem bakterií mléčného kvašení je rychlé snížení pH prostředí na hodnoty pH 4 a nižší. Mnohé nežádoucí bakterie v potravinách nesou takto nízké hodnoty pH, stejně jako prostředí s obsahem kyseliny mléčné či octové (Görner, Valík, 2004). Pro většinu bakterií mléčného kvašení není vzdušný kyslík toxický, rostou proto i za přítomnosti vzduchu (jsou aerotolerantní, mikroaerofilní nebo fakultativně anaerobní). Výjimku tvoří přísně anaerobní bifidobakterie. BMK jsou i proteolyticky aktivní, výsledkem jsou peptidy, aminokyseliny a další nebílkovinné dusíkaté látky, které jsou buňkami užitelné (Görner, Valík, 2004).

Ve studii Aween et al. (2012) bylo izolováno 32 druhů BMK ze 13 vzorků medu. 6 druhů bylo identifikováno jako *Lactobacillus acidophilus* API CHL50. Autoři naznačují, že přítomnost různých druhů této bakterie může mít vliv na různorodou antimikrobiální aktivitu medů.

3.8.3.4 Rod *Pseudomonas*

Tento rod zahrnuje gramnegativní, přísně aerobní, monotrichní nebo lofotrichní, oxidázapozitivní i negativní, kataláza pozitivní bakterie bez kvasných schopností. Na prostředí a živiny jsou pseudomonády velice přizpůsobivé. Jako zdroj energie a uhlíku využívají organické sloučeniny. Řada druhů tvoří fenazinová barviva žlutých, zelených, modrých nebo červených odstínů, která uvolňují do růstového prostředí. Tím způsobují nežádoucí zabarvení potravin. Některé druhy uvolňují do prostředí fluoreskující žlutozelené barvivo. Určité druhy vyvolávají v potravinách cizí vůně nebo pachy (ovocné, rybí) nebo pachuti (mýdlovou, hořkou apod.). Silné proteolytické schopnosti jim umožňují rozklad bílkovinných potravin, lipolytické vlastnosti se uplatňují při kažení tuk. Většinou jsou psychofilní povahy, takže jejich nežádoucí činnost v potravinách probíhá i při poměrně nízkých skladovacích teplotách. Některé druhy (např. *Pseudomonas aeruginosa*) jsou patogenní pro člověka, zvířata i rostliny (Görner, Valík, 2004; Šilhánková, 2009; Burdychová, Sládková, 2007).

3.8.4 Mikroskopické houby (mikromycety) v medu

Mezi mikromycety patří vláknité mikromycety (plísňe) a kvasinky. Ty jsou původci kažení potravin a tím se stávají spolehlivými indikátory mikrobiologické jakosti potravin. Kvasinky a plísňe se vyznačují výraznou proteolytickou, lipolytickou a sacharolytickou činností, malou náročností na složení živin, oproti bakteriím, menšími nároky na přítomnost využitelné vody a mají nižší optimální teploty a někdy značnou termorezistenci (Görner, Valík, 2004). Plísňe a kvasinky patří mezi jediné mikroorganismy, které jsou schopny v medu růst (Snowdon, Cliver, 1996).

3.8.4.1 Kvasinky

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní mikroorganismy, náležící mezi houby – *Fungi* (Šilhánková, 2009). Rostou především v koloniích z jednotlivých buněk s průměrem 5–10 µm (Görner, Valík, 2004).

Podle způsobu rozmnožování se dělí na 3 hlavní třídy:

- a) *Ascomycotina* – rody tvořící endospory (askospory),
- b) *Basidiomycotina* – rody tvořící exospory (sporidie, bazidiospory),
- c) *Deuteromycotina* – u těchto rodů není známá tvorba pohlavních spor (Bursová et al., 2014).

Kvasinky vyžadují pro svůj růst, podobně jako plísně, vzdušný kyslík. Mají ale schopnost přeměnit svůj metabolismus za anaerobních podmínek na fermentační. Kvasinky mají schopnost štěpit sacharidy na CO₂ a etanol, který se může za aerobních podmínek dále oxidovat, pomocí bakterií octového kvašení, na kyselinu octovou (Görner, Valík, 2004). Kvasinky rostou v širokém rozmezí hodnot pH (3 až 11) i teplot (0 až 45 °C). Minimální aktivita vody je 0,91 až 0,88. Některé kvasinky, např. *Zygosaccharomyces rouxii*, rostou pouze v prostředí s vysokým obsahem cukru (Šilhánková, 2009).

Kvasinky jsou v přírodě velmi rozšířené (Bursová et al., 2014). Vyskytují se hlavně v potravinách obsahující cukry. Především na ovoci, v nektaru, půdě, ve vzduchu, střevním traktu lidí, zvířat, některého hmyzu (včely). Šíří se různými přenašeči, hlavně hmyzem, větrem apod. V květních nektarech bývají nejčastěji přítomny oxidační typy – nejvíce *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, méně potom *Candida* (Šilhánková, 2009). Kvasinky mohou být také škůdci na mase, rybách, mléčných produktech aj. (Görner, Valík, 2004).

V medu jsou nejčastěji detekovány osmofilní kvasinky (Vorlová et al., 2002). Jejich obsah závisí na původu medu, typu úlu, síle včelstva, zrání medu, době vytáčení, podmínkách a délce skladování (Lunerová, Pažout, 2012). Dále se uvádí, že koncentrace kvasinek je úměrná obsahu vody v medu. Med pocházející z květů vlhkých oblastí obsahuje více kvasinek a může začít kvasit už v plástvích (Snowdon, Cliver, 1996).

Dominantní kvasinkou medu je rod *Saccharomyces*. Mezi další identifikované kvasinky v medu se řadí: *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Oosporoidium*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Trichospora*, *Nematospora*, *Schizosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, *Torula* a *Zygosaccharomyces* (Snowdon, Cliver, 1996). Tchoumboue et al. (2007) uvádějí jako často se vyskytující kvasinky zástupce rodu *Candida*. V jedné studii byly nalezeny osmofilní kvasinky pouze ve vzorcích, kde byla vodní aktivita vyšší než 0,65. Předpokládá se, že ve zralém medu nebude počet kvasinek vyšší než několik set KTJ·g⁻¹ (Snowdon, Cliver, 1996).

3.8.4.2 Plísně

Jako plísně označujeme mikroskopické vláknité eukaryotní mikroorganismy, náležící mezi houby – *Fungi* (Cempírková et al., 1997). Plísně jsou jednobuněčné až

mnohobuněčné organismy, tvořící vláknité povlaky na povrchu nebo uvnitř substrátů (Schindler, 2010).

Podle přítomnosti a typu pohlavního rozmnožování náleží technicky důležité plísně do těchto taxonomických jednotek:

a) Do třídy *Zygomycetes*, jež patří mezi *Zygomycotina* a je charakterizována jednobuněčným, tj. nepřehrádkovaným myceliem a pohlavním rozmnožováním s tvorbou zygospor. Nepohlavní rozmnožování se děje endosporami.

b) Do podkmenu *Ascomycotina*, charakterizovaného přehrádkovaným myceliem a pohlavním rozmnožováním za tvorby askospor tvořených v asku. Nepohlavní rozmnožování se děje exosporami.

c) Do kmenu *Deuteromycotina* (houby nedokonalé) s přehrádkovaným myceliem, avšak pouze s nepohlavním rozmnožováním pomocí exospor (Šilhánková, 2009).

Plísně jsou aerobní a potřebují pro svůj růst vzdušný kyslík. Na rozdíl od některých bakterií jsou všeobecně přizpůsobivější na určité extrémní podmínky prostředí, lépe snášejí nižší hodnoty pH, nižší obsah využitelné vody a nižší teploty (Görner, Valík, 2004).

Hlavním rezervoárem plísni je půda, z níž se dostávají do vzduchu, na organický materiál převážně rostlinného původu, na průmyslové předměty umístěné ve vlhku. Vzhledem k přísně aerobní povaze se mohou rozmnožovat pouze na povrchu napadeného materiálu. Řada plísni se může v napadených potravinách rozvíjet ještě při 15 % obsahu vody, zatímco většina bakterií a kvasinek potřebuje pro svůj rozvoj alespoň 30 % vody. Schopnost rozmnožovat se i za velmi nízkého pH umožňuje plísním uplatnit se i tam, kde většina bakterií již není schopna metabolismu. Mimořádně negativní význam mají plísně z hlediska tvorby mykotoxinů (Šilhánková, 2009).

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity, které patří mezi významné přírodní toxiny. Jsou to látky nebílkovinné povahy, toxické pro člověka a živé organismy (Malíř et al., 2003). Nejvýznamnějšími producenty toxikologicky závažných mykotoxinů jsou mikroskopické vláknité houby rodů *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* (Heredia et al., 2009).

Mezi nejčastěji se vyskytující plísně v medu patří: *Ascosphaera*, *Aspergillus*, *Cephalosporium* a *Penicillium* (Snowdon, Cliver, 1996). V medovicových medech se

nacházejí i spory hub ze třídy *Phycomycetes*, kmene *Ascomycetes* a *Basidiomycetes* (Veselý et al., 2003).

Adenekana et al. (2012) uvádí, že ve vzorcích různých medů ze státu Ogun byly identifikovány plísně *Penicillium oxalicum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* a *Fusarium oxysporum*. Zatímco Tchoumboe et al. (2007) izoloval osm druhů plísní, s převahou plísní z rodu *Aspergillus*, *Geotrichum* a *Rhizopus* spp.

3.9 Vady medu mikrobiálního původu

Mikroorganismy se účastní hlavně kvašení a hniloby medu. Jednou z příčin kvašení medu bývají osmofilní kvasinky (Cempírková et al., 1997). *Saccharomyces* a *Zygosaccharomyces* fermentují med na povrchu, zatímco *Torulopsis* a *Turola* patří mezi kvasinky, které způsobují kvašení v celém objemu medu (Snowdon, Cliver, 1996; Přidal, 2013). Hygroskopicitata a viskozita medu umožňuje vznik ložisek (gradient voda – cukr), ve kterých je dostatečně vysoká a_w (aktivita vody) pro jejich růst. Pokud mají tyto kvasinky vhodné podmínky (obsah vody vyšší než 20 %) dochází k jejich pomnožování a postupnému zkvašení medu a jeho znehodnocení (Vorlová et al., 2002).

Med rovněž snadno absorbuje vlhkost z prostředí, pokud je uložen v prostředí s relativní vlhkostí nad 60 %. Obsah vody se tak zvyšuje především na povrchu, čímž se na něm snadno množí kvasinky, zatímco pod povrchem je jejich růst pomalejší (White, Doner, 1980). Medovicové medy obsahují zpravidla méně vody než medy květové, ale díky své hustotě absorbují vzdušnou vlhkost snadněji. Zadržují ji převážně na povrchu, a proto mají větší sklon ke kvašení (Haragsim, 2016).

K fermentaci může také dojít při falšování medu přidáním vody. Toto nepochopitelné porušení kvalitního medu se nabízí v případech, kdy má vytočený med například jen 15 % vody, avšak norma připouští 18 %. Po přidání vody ale hrozí, že se med nepodaří dokonale promíchat a tam, kde je zředění lokálně větší, začne med kvasit a znehodnotí se docela. Pokud je med zkrystalizovaný, neměly by v něm být žádné bublinky plynu, protože to znamená, že je již nakvašený (Titěra, 2006).

Fermentace medu je charakterizována pěnou na povrchu (White, Doner, 1980). Během fermentace medu rozkládají kvasinky cukry za vzniku alkoholu a CO_2 . Za přítomnosti kyslíku může být alkohol přeměněn na kyselinu octovou (Snowdon, Cliver, 1996). Snowdon et Cliver (1996) dále uvádějí, že během fermentace medu osmofilními kvasinkami vznikají také polyoly (např. glycerol). Při tomto nežádoucím procesu jsou limitujícími parametry obsah vody a teplota. Med vytočený nezralý a řídký snadno

podléhá fermentaci. Ale i dobře vyžralý med přijímá na povrchu atmosférickou vlhkost. Horní vrstva tak může dosáhnout obsahu vody, který je vhodný pro růst kvasinek (Vorlová et al., 2002). Činností kvasinek se stává povrch medu zpěněným, vůně a chuť má charakter kvašeného výrobku (Cempírková et al., 1997).

Fermentaci medu lze předejít skladováním při teplotě 10 °C nebo nižší, relativní vlhkosti pod 50 %, nebo pasterizací (Tysset, Rousseau, 1981).

Fermentaci lze zabránit několika způsoby. Prvním z nich je snížení obsahu vody neboli maturizace. Provádí se pouze v oblastech, kde vlhkost vzduchu přesahuje 60 % RV – tj. v tropických oblastech. V těchto oblastech totiž med obvykle bývá třeba již zralý, ale fyzikální proces – tedy snížení obsahu vody pod 18 % nemůže být dokončen tak rychle, protože odpar vody ve vzduchu se zvýšenou RV je velmi pomalý. V našich podmínkách není dodatečné snížení obsahu vody považováno za standardní technologii. Její použití totiž obvykle signalizuje, že byl vytočen med nezralý. Nejde tedy jen o nedokončené změny fyzikální (přirozené snížení obsahu vody), ale i nedostatečné obohacení medu enzymy a dalšími specifickými látkami. Proto ani změny biochemické nemohou probíhat v plném rozsahu (Přidal, 2013).

Snížení obsahu vody v medu lze provést snížením relativní vzdušné vlhkosti nad hladinou medu, což se dá provést buď ohřátím medu anebo přivedením chladného vzduchu nad med (Přidal, 2013).

Pokud je vytočený med již v nádobách, může se snížit vlhkost rovněž ve vytápěných místnostech (35–40 °C) s proudícím vzduchem a nízkou RV vzduchu, ale nádoby je zapotřebí nechat otevřené a medem se musí míchat. Tím se stále rozrušuje již sušší horní vrstva medu, která by dalšímu odpařování bránila.

Mezi další možnosti maturizace medu patří především:

- a) umístění pláství do vysušovaného prostředí,
- b) manipulace s medem v suchém prostředí,
- c) zahřívání medu v chladném prostředí,
- d) zahřívání medu ve vysušované místnosti,
- e) vysoušení medu v maturizátorech.

Dalším způsobem, jak zabránit fermentaci medu je jeho pasterizace. Pasterizace medu je značně nešetrným technologickým postupem. Používá se jen tehdy, pokud má med vlhkost nad 18 % a je možnost nežádoucí fermentace medu. Je však třeba počítat se znehodnocením medu. Zahřátím medu nad 65 °C po dobu 3 min. se usmrtí všechny

osmofilní kvasinky a zcela rozpustí krystalizační centra, čímž je krystalizace výrazně zpomalena či zcela zastavena (Přidal, 2013). Komerční med je často zahříván na 71 °C po dobu asi 30 minut (Snowdon, Cliver, 1996). V ČR není pasterace medu žádoucí a i jiné země ji nedoporučují a označují za nouzové řešení při zvýšené vlhkosti medu (Přidal, 2013).

Další vadou medu mikrobiálního původu je hniloba, kterou vyvolává původce moru včelího plodu, který způsobuje úhyn larev, a ty po svém rozkladu vyvolávají organoleptické změny medu, které jsou charakterizovány jako hnilobný zápach, zápach po shnilých jablkách nebo zkaženém oleji (Cempírková et al., 1997).

Snowdon et Cliver (1996) uvádějí, že se pro regulaci mikrobů v medu mohou použít konzervační činidla, jako je kyselina sorbová nebo sorbát draselný a sodný nebo benzoan draselný. Podle nich je ale zapotřebí v této oblasti dalších výzkumů.

Další možností snížení počtu mikroorganismů poskytuje gama záření. Je známo, že gama záření inaktivuje mikroorganismy v různých potravinách a tím zajišťuje jejich mikrobiální bezpečnost. Na toto téma byla provedena studie za účelem dosažení mikrobiální dekontaminace medu indického původu. Bylo zjištěno, že gama záření v dávce 15 kGy, je dostatečné pro úplnou mikrobiální dekontaminaci medu, včetně spor, čímž se zvýšila mikrobiální bezpečnost bez ovlivnění jeho kvality (Saxena et al., 2010). Postmes (1995) uvádí, že ani po dávce 25 kGy gama záření nebyla změněna antibakteriální aktivita medu. Cheorun et al. (2005) zkoumal účinnost gama záření (0, 5 a 10 kGy) u 4 druhů medu. Výsledky ukázaly, že akátový a květový smíšený med byl zcela sterilní při dávce 5 kGy. U zbývajících dvou došlo k výraznému snížení obsahu mikroorganismů. Ozařování medu tedy může být účinným nástrojem k jeho dezinfekci (Cheorun et al., 2005).

V boji proti mikroorganismům v medu je přesto nejdůležitější dodržovat technologické zásady při zpracování medu, zabezpečovat dostatečnou hygienu v celém procesu zacházení s medem a dodržovat podmínky skladování (Cempírková et al., 1997).

3.10 Antibakteriální aktivita medu

Antibakteriální aktivita medu byla poprvé popsána v roce 1982 a od té doby se řada vědců snažila objevit princip antibakteriálního účinku (Molan, 1992a; Weston, 2000).

Drtivá většina antibakteriálních látek pochází ze včel. Antibakteriální aktivita medu je také závislá na typu medu, a proto je pravděpodobné, že za antibakteriální účinky

medu odpovídají rovněž látky pocházející z rostlin (Přidal, 2013). Velkou roli také hraje botanický původ medu (Omafuvbe, Akanbi, 2009).

Med je díky této vlastnosti schopný potlačovat růst mikroorganismů, a to zejména bakterií z rodu *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacteroides*, *Salmonella*, *Shigella* spp. a některých dalších enteropatogenů, jako je *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* a jiné gramnegativní a grampozitivní mikroorganismy (Haragsim, 2016; Vorlová et al., 2002; Olaitan et al., 2007).

Antibakteriální aktivita medu je dána obsahem tzv. peroxidázových a neperoxidázových faktorů (Vorlová et al., 2002). Přímý důkaz o existenci neperoxidázových antibakteriálních faktorech je vidět ve zprávách, kdy tato vlastnost medu byla zachována i po ošetření katalázou, čímž došlo k rozkladu peroxidu vodíku na vodu a kyslík (Olaitan et al., 2007).

Mezi antibakteriální faktory medu patří:

a) Osmotický efekt – osmotický účinek sacharidů patří mezi nejdůležitější neperoxidázové faktory (Vorlová et al., 2002). Med je přesycený roztokem cukrů. Silné interakce mezi molekulami cukrů a vody ponechávají pro mikroorganismy jen velmi malé množství vody. Hodnoty a_w pro med se pohybují od 0,54 do 0,63, což je hodnota, která zabraňuje růstu téměř všech mikroorganismů. Např. plísně jsou schopny růst při a_w okolo 0,7, kvasinky při hodnotě a_w 0,8 (Bittner et al., 2006).

b) Kyselé pH – pro med je charakteristické kyselé pH a to v rozmezí 3,2–4,5. (Bittner et al., 2006). Květové medy vykazují obvykle hodnotu pH výrazně nižší než 4,0. Výjimečně se můžeme setkat s hodnotou pH až do 4,3. Medovicové medy mají hodnotu pH běžně vyšší než 4,2 (Dupal, 2011). To je dostatečně nízká hodnota pro inhibici růstu většiny lidských patogenů, jejichž optimum je mezi pH 7,2–7,4 (Bittner et al., 2006). Kyselost medu ovlivňuje také přítomnost kyselin (Dupal, 2011). V medu se nachází kolem 20 různých kyselin (Haragsim, 2016).

c) Peroxidázová aktivita – za nejdůležitější antimikrobiální efekt medu je považována enzymatická produkce peroxidu vodíku. Glukózooxidáza je enzym produkovaný hypofaryngální žlázou včel, který katalyzuje přeměnu glukózy, vody a kyslíku na glukonovou kyselinu a peroxid vodíku. Produkovaný peroxid vodíku působí jako inhibiční látka při zrání medu. Peroxid vodíku inhibuje růst bakterií a snižuje možnost poškození tkání volnými radikály, stejně jako v medu přítomné antioxidační faktory (Bittner et al., 2006). Ve zralém medu je ovšem aktivita glukózooxidázy téměř

nulová, med proto obsahuje pouze malé množství peroxidu, které není dostatečné pro inhibici růstu bakterií, a proto jsou neperoxidázové antibakteriální faktory důležitější (Přidal, 2013; Bogdanov, 1997). Glukózooxidáza je aktivní pouze ve zředěném nebo nezralém medu a její aktivita je vyšší, když se koncentrace sacharidů pohybuje kolem 25–30 % a je redukována, když se koncentrace invertních sacharidů zvyšuje (Vorlová et al., 2002).

Peroxid vodíku také může být zničen některými složkami medu. Může být degradován reakcí s kyselinou askorbovou a kovovými ionty a působením katalázy, která pochází z pylu a nektaru rostlin. Obecně platí, že čím méně katalázy med obsahuje, tím je vyšší obsah peroxidu vodíku (Olaitan et al., 2007). Dále může být zničen pasterací, protože je tepelně labilní (Snowdon, Cliver, 1996). Proto je důležité uchovávat med v chladu a temnu (Bogdanov et al., 2008).

d) Fytochemické faktory – fytochemické faktory patří mezi neperoxidázové antibakteriální faktory. Jedná se především o flavonoidy (Olaitan et al., 2007). Ty jsou skupinou chemických substancí (tzv. pyrolových barviv), vyskytujících se pouze v rostlinné říši a řadí se mezi sekundární rostlinné látky (Frank, 2010). Celkové množství flavonoidů se pohybuje mezi 0,5 a 2 mg·100 g⁻¹ medu (Frank, 2012). Z těchto látek se v medu nachází např. pinocembrin, quercetin, apigenin, galantin a další (Bogdanov et al., 2008). Dále do této skupiny řadíme terpeny, benzol, 3,5-dimetoxy-4-hydroxybenzoovou kyselinu a další (Bittner et al., 2006).

e) Zvýšená aktivita lymfocytů a fagocytů – tkáňové kultury B a T lymfocytů z periferní krve jsou aktivovány v přítomnosti medu již při koncentraci 0,1 %. Med při koncentraci 1 % také stimuluje monocyty k tvorbě cytokinů jako TNF-alfa, IL-1, IL-6, které aktivují imunitní odpověď. Vysoká osmotická aktivita cukrů a nízké pH napomáhají makrofágů, ničit bakterie (Bittner et al., 2006; Olaitan et al., 2007).

Molan (1992) zjistil, že manukový med, z 26 různých druhů květových medů, má nejsilnější antibakteriální účinek proti *Escherichia coli.*, *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*.

Antibakteriální účinek medu je také prokázán proti mnoha druhům mikroskopických hub, včetně *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida*, a *Saccharomyces* (Snowdon, Cliver, 1996).

Další příklad antibakteriální aktivity medu popisuje Olaitan et al. (2007). Ve své publikaci uvádějí, že rány, které byly infikovány bakteriemi z rodu *Pseudomonas* a nereagovaly na léčbu, byly při použití medu zbaveny infekce a došlo k úspěšnému obnovení kůže.

Vzorky nigerijského medu ukázaly inhibiční aktivitu proti *Salmonella* spp, *Shigella* spp. a *Escherichia coli*. Průměr inhibičních zón byl v rozmezí 12–27 mm, 14–25 mm a 19–38 mm. Ovšem všechny vzorky medu nebyly účinné proti *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* a *Pseudomonas aeruginosa* (Omafuvbe, Akanbi, 2009).

Gradvol et al. (2015) zkoumali antimikrobiální aktivitu 20 vzorků chorvatských medů proti šesti patogenním bakteriím (tři z nich byly gramnegativní: *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Yersinia enterocolitica* a tři grampozitivní: *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*). Medovicový a kaštanový med vykazoval nejsilnější inhibiční účinek proti testovaným bakteriím, zatímco nejnižší inhibiční účinek měl med lipový. Výsledky také ukázaly, že nejcitlivější bakterií byl *Staphylococcus aureus* a nejodolnější *Enterococcus faecalis*, jehož dokázal inhibovat pouze med medovicový.

Tysset et Durand (1976) ve své studii zkoumali přežití gramnegativních bakterií, při 10 °C v čerstvě vytočeném smíšeném medu. Bakterie přežily od 6 měsíců do téměř 2,5 let. Autoři proto zdůraznili, že je třeba dbát ostražitosti, aby se bakterie do medu nedostaly a varovali před přeceňováním antibakteriální aktivity medu.

Přírodní med vykazuje velmi rozdílnou antimikrobiální aktivitu, která závisí na typu rostliny a v ní obsažených biologicky aktivních látek. Tato nepředvídatelná antimikrobiální aktivita může být překážkou v zavedení medu jako antimikrobiálního činidla (Gradvol et al., 2015).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Charakteristika materiálů

Experimentální část této práce byla zaměřena na mikrobiologickou analýzu a měření barvy 6 květových a 6 medovicových medů zakoupených od včelařů z kraje Vysočina prodejem ze dvora. Vzorky byly označeny čísly 1–12, přičemž vzorky 1–6 byly medy květové, 7–12 medy medovicové. Bližší popis je uveden v následujících tabulkách (1, 2).

Tabulka č. 1 – Charakteristika květových medů

Květové medy			
Číslo vzorku	Lokalita úlu	Datum stočení	Pozn.
1	Velké Meziříčí	27. 6. 2016	
2	Velký Beranov	1. 6. 2016	
3	Křižanov	23. 6. 2016	
4	Blížkov (Dědkovská hora)	3. 6. 2016	pastový
5	Jívoví	28. 5. 2016	krystalický
6	Martinice	28. 5. 2016	pastový

Tabulka č. 2 – Charakteristika medovicových medů

Medovicové medy		
Číslo vzorku	Lokalita úlu	Datum stočení
7	Křižanov	23. 6. 2016
8	Martinice	25. 6. 2016
9	Velký Beranov	4. 7. 2016
10	Blížkov (Dědkovská hora)	6. 7. 2016
11	Velké Meziříčí	28. 7. 2016
12	Jívoví	16. 7. 2016



Obr. č. 1 – Květový med (vzorek č. 3)



Obr. č. 2 – Medovicový med (vzorek č. 7)

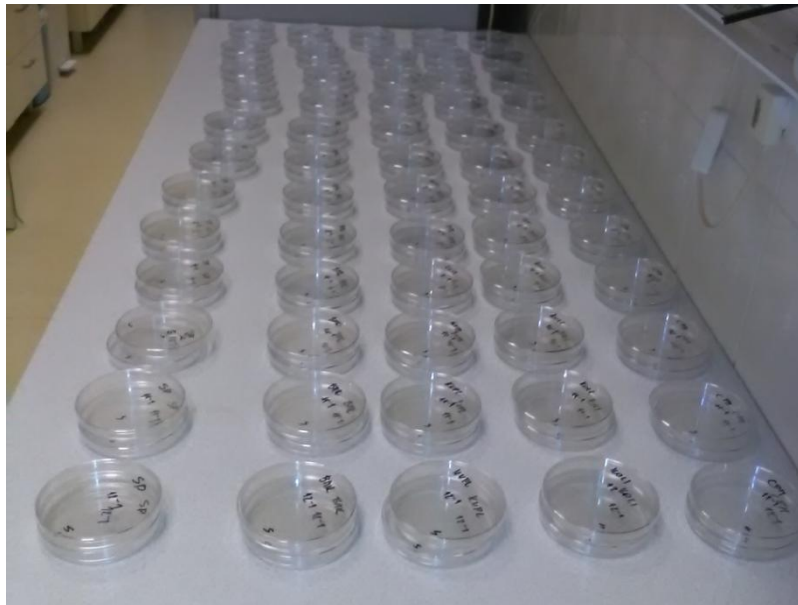
4.2 Mikrobiologická analýza

4.2.1 Příprava laboratorních pomůcek

Laboratorní sklo bylo sterilizováno v horkovzdušném sterilizátoru při 165 °C po dobu 60 minut. Živné půdy v Erlenmayerových baňkách a fyziologický roztok v reagenčních lahvích byly sterilizovány v parním sterilizátoru při 121 °C po dobu 20 minut. K laboratorní analýze byly použity jednorázové špičky na automatické pipety a jednorázové Petriho misky. Veškeré pomůcky a nástroje byly do doby použití uchovány sterilně.

4.2.2 Metodika mikrobiologické analýzy

Při zpracování vzorků byla použita plotnová metoda se zalitím inokula příslušnou živnou půdou.



Obr. č. 3 – Petriho misky připravené k inokulaci

Bylo naváženo 5 g medu a smícháno s 45 ml fyziologického roztoku. Následně byl vzorek homogenizován na přístroji Multi Speed Vortex MSV–3500 Biosan po dobu 1 minuty při 3000 otáčkách za minutu. Pro stanovení sporulujících mikroorganismů byly vzorky před očkovaním zahřívány ve zkumavce při 85 °C po dobu 10 min, aby došlo k devitalizaci vegetativních forem mikroorganismů.

Jednotlivé vzorky byly naočkovány do jednorázových Petriho misek automatickou pipetou a následně zality příslušnou živnou půdou zchlazenou na 45 °C. Po promíchání inokula s živnou půdou a po zatuhnutí byly misky umístěny do termostatu a inkubovány

při dané teplotě a daném čase. Po uplynutí inkubační doby byly spočítány typické kolonie stanovených mikroorganismů.

4.2.3 Stanovované skupiny mikroorganismů

a) Celkový počet mikroorganismů (CPM) na PCA (Plate Count Agar). Misky byly inkubovány v termostatu při 30 °C po dobu 72 hodin.

b) Koliformních bakterie na selektivní živné půdě VRBL (Violet Red Bile Lactose Agar). Misky byly inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

c) Bakterie mléčného kvašení na živné půdě MRS (De Man, Rogosa a Sharpe). Misky byly v termostatu inkubovány při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin.

d) Kvasinky a plísňe na živné půdě Chloramfenicol Glucose Yeast Agar. Misky byly inkubovány v termostatu při teplotě 25 °C po dobu 120 hodin.

e) Aerobních sporotvorné bakterie na živné půdě PCA po předchozím zahřátí na 85 °C po dobu 10 min. Misky byly inkubovány v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin.

4.2.4 Složení a příprava živných půd

Pro mikrobiologickou analýzu byla použita následující živná média:

a) PCA (Plate Count Agar) – 20,5 g dehydratované půdy se rozpustilo v 1 l destilované vody a následně se upravilo pH na $7\pm 0,2$ při 25 °C. Půda byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Obsahové složky živné půdy PCA:

- trypton 5,0 g
- kvasničný extrakt 2,5 g
- glukóza 1,0 g
- agar 12,0 g

Výrobce: Biokar Diagnostics, Francie

b) VRBL (Violet Red Bile Lactose Agar) – 38,5 g dehydratované půdy se rozpustilo v 1 l destilované vody s následnou úpravou pH na $7,4\pm 0,2$ při 25 °C. Takto připravená půda byla následně ve vodní lázni zahřívána do rozvaření, půda není sterilizována.

Obsahové složky živné půdy VRBL:

- pepton 7 g
- kvasniční extrakt 3 g

- laktóza 10 g
- NaCl 5 g
- žlučové soli 1,5 g
- neutrální červeň 0,03 g
- krystalová violet' 0,002 g
- agar 12 g

Výrobce: Biokar Diagnostics, Francie

c) MRS (De Man, Rogosa a Sharpe) – 70,3 g dehydratované půdy se rozpustilo v 1 l destilované vody a pH se upravilo na $5,7 \pm 0,1$ při 25 °C. Půda byla následně sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Obsahové složky živné půdy MRS:

- polypepton 10 g
- tween 80 1,08 g
- masový extrakt 10 g
- kvasniční extrakt 5 g
- hydrogenfosforečnan draselný 2 g
- glukóza 20 g
- octan sodný 5 g
- bakteriologický agar 15 g
- citran amonný 2 g
- síran hořečnatý 0,2 g
- síran manganatý 0,05 g

Výrobce: Biokar Diagnostics, Francie

d) Chloramfenicol Glucose Yeast Agar (agar s chloramfenikolem, kvasničním extraktem a glukózou) – 40,1 g dehydratované půdy se rozpustilo v 1 l destilované vody a pH se upravilo na $6,6 \pm 0,2$ při 25 °C. Půda byla následně sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Obsahové složky živné půdy s chloramfenikolem:

- kvasniční extrakt 5 g
- glukóza 20 g
- chloramfenikol 0,1 g
- agar 15 g

Výrobce: Biokar Diagnostics, Francie

4.2.5 Vyjádření výsledků

Po ukončení inkubace byly na Petriho miskách spočítány narostlé typické kolonie mikroorganismů (obr. č. 4).



Obr. č. 4 – Počítání typických kolonií

Po přepočtení podle níže uvedeného vzorce byly výsledky vyjádřeny jako kolonie tvořící jednotky (KTJ) na 1 gram medu.

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

Kde:

N je počet kolonií tvořící jednotky (KTJ) na 1 gram vzorku,

$\sum C$ je součet kolonií vyrostlých na Petriho miskách při dvou po sobě jdoucích ředěních,

V je objem inokula v ml očkovaného na každou z ploten,

n₁ je počet ploten vybraných k výpočtu z prvního ředění,

n₂ je počet ploten vybraných k výpočtu z druhého ředění,

d je faktor prvního ředění použitého pro výpočet.

Výsledky mikrobiologické analýzy byly vyjádřeny jako aritmetický průměr a zapsány jako číslo 1,0 až 9,9 násobené 10^x , kde x je příslušná mocnina 10, nebo jako úplná číslovka obsahující dvě platné číslice.

Pro vyhodnocení základních statistických údajů (průměr, směrodatná odchylka, medián) a grafické znázornění byl použit program Microsoft Excel Starter 2010. Pro statistickou analýzu byl použit program STATISTICA 12.

Pro všechny statistické testy byla zvolena hladina významnosti $p < 0,05$. K určení, zda lze rozdělení dat považovat za normální, byl použit Shapiro-Wilkův test, vhodný pro soubory o malém množství dat. Při nesplnění normality byla dále použita neparametrická statistika. Pokud data měla normální rozdělení, byla zvolena statistika parametrická.

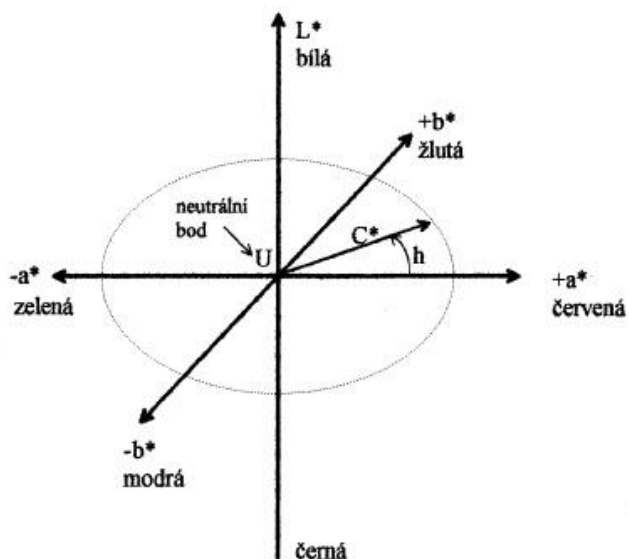
Statistické testování rozdílů v počtu jednotlivých skupin mikroorganismů mezi jednotlivými vzorky bylo provedeno Kruskal-Wallisovým testem. Při statistickém testování rozdílů v počtu jednotlivých skupin mikroorganismů mezi první, druhou a třetí analýzou u obou druhů medů, byla použita Friedmanova ANOVA, určená pro opakovaná měření ve více jak dvou skupinách. Statistické testování rozdílů v počtu jednotlivých skupin mikroorganismů mezi květovými a medovicovými medy a dále rozdílů v počtu jednotlivých skupin mikroorganismů mezi jednotlivými analýzami mezi květovými a medovicovými medy, bylo provedeno při splnění normality dvouvýběrovým T-testem (dle skupin), při nesplnění normality dvouvýběrovým Mann-Whitneyovým testem. Dle výsledné p-hodnoty se daná hypotéza potvrdila nebo vyvrátila.

4.3 Měření barvy medu pomocí CIE L*a*b*

Barva medu byla ve spolupráci s Ústavem technologie potravin AF MENDELU měřena ve dvou opakováních, zároveň s jednotlivými mikrobiologickými analýzami.

K měření barvy byl použit spektrofotometr Konica Minolta CM-3500d s geometrií (úhel měření) $d/8^\circ$ (obr. č. 6). Spektrofotometr je připojený na počítač, ve kterém je nainstalovaný program CMS-100w SpectraMagic NX. Software CMS-100w umožňuje dle Mezinárodní komise pro osvětlování vyjádření barvy v barevném prostoru CIELAB. Hodnoty L^* (světlost) představují rozmezí od 0 (černá) do 100 (bílá). Barevné souřadnice a^* a b^* nabývají kladných nebo záporných hodnot podle umístění v trojrozměrném systému CIELAB (obr. č. 5). Na základě odchylky ΔE^* lze poté popsat právě znatelný rozdíl mezi dvěma měřeními.

Barva u vzorku č. 4, 5 a 6 (pevné vzorky) byla měřena pomocí reflektance, za použití Petriho misky, u zbylých vzorků pomocí transmittance za použití 1cm kyvety. Měření probíhalo při osvětlení D65. Z naměřených hodnot byla vypočtena celková diference ΔE^*_{ab} , jako předloha sloužily hodnoty získané z prvního měření.



Obr. č. 5 – Pravoúhlé a cylindrické souřadnice CIELAB prostoru (Vik, 1999)



Obr. č. 6 – Spektrofotometr Konica Minolta CM-3500d

4.3.1 Vyjádření výsledků

Ze získaných hodnot byla vypočtena celková diference ΔE^*_{ab} (1976), dle rovnice:

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

ΔE^* je míra velikosti barevného rozdílu mezi předlohou a vzorkem, může však indikovat povahu této diference. Tuto informaci poskytuje rozdělení ΔE^* na 3 složky:

$$\Delta L^* = L^*_{\text{vzorku}} - L^*_{\text{předlohy}}$$

$$\Delta a^* = a^*_{\text{vzorku}} - a^*_{\text{předlohy}}$$

$$\Delta b^* = b^*_{\text{vzorku}} - b^*_{\text{předlohy}}$$

Kde:

ΔL^* je jasová odchylka,

Δa^* a Δb^* znázorňuje rozdíly pozic v a^*b^* diagramu (Vik, 1995).

Pro vyhodnocení základních statistických údajů (průměr, směrodatná odchylka, medián) a grafické znázornění byl použit program Microsoft Excel Starter 2010. Výsledky byly zpracovány pomocí programu STATISTICA 12. Pro všechny statistické testy byla zvolena hladina významnosti $p < 0,05$. Testování statisticky významného rozdílu u hodnot L^* , a^* , b^* a ΔE^* mezi květovými a medovicovými medy a dále rozdílu u L^* , a^* a b^* mezi květovými a medovicovými medy v jednotlivých analýzách, bylo provedeno pomocí dvouvýběrového T-testu nebo pomocí Mann-Whitneyova testu. Friedmanova ANOVA byla použita pro testování rozdílu mezi prvním, druhým a třetím měřením u květových a medovicových medů. Statisticky průkazný rozdíl hodnoty ΔE^* u květových a medovicových medů mezi předlohou a následnými měřeními, byl testován párovým Wilcoxonovým testem.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Předmětem mikrobiologického rozboru a měření barvy bylo 6 květových a 6 medovicových medů. Medy byly během analýz skladovány při pokojové teplotě v temnu.

5.1 Mikrobiologická analýza

V průběhu skladování byly ve vzorcích květových a medovicových medů sledovány tyto skupiny mikroorganismů: celkový počet mikroorganismů (CPM), koliformní bakterie, bakterie mléčného kvašení (BMK), sporulující aerobní mikroorganismy, kvasinky a plísňe. U každého vzorku medu byly provedeny tři mikrobiologické analýzy. První stanovení proběhlo v červenci roku 2016, druhé stanovení na přelomu října a listopadu roku 2016 a třetí v únoru roku 2017. Z každého medu byly připraveny 2 vzorky, každý vzorek byl naočkován souběžně na 2 Petriho misky pro stanovení příslušné skupiny mikroorganismů. Pro všechny mikroorganismy bylo použito první ředění.

Výsledky provedených analýz jsou uvedeny v tabulkách a graficky v KTJ/g medu. Pro lepší přehlednost grafického znázornění byly KTJ/g převedeny na log KTJ/g. Celkové výsledky jsou uvedeny v tabulkách 3, 4, 5.

Tabulka č. 3 – Počty významných skupin mikroorganismů v první analýze vzorků medů v KTJ/g (průměrné výsledky ze dvou opakování)

Květové medy						
Číslo vzorku	CPM	KOLI	SPA	KV	PL	BMK
1	50	ND	33	40	33	65
2	2,1·10 ²	ND	10	1,8·10 ²	38	1,8·10 ²
3	63	ND	1,2·10 ²	58	1,9·10 ²	1,4·10 ²
4	8,8·10 ²	ND	18	1,2·10 ²	78	78
5	1,8·10 ²	ND	88	2,1·10 ²	1,2·10 ²	2,4·10 ²
6	2,7·10 ²	ND	30	1,4·10 ²	3,6·10 ²	1,2·10 ²
Průměr	2,7·10 ²	0	50	1,2·10 ²	1,4·10 ²	1,4·10 ²
Směrodatná odchylka	3,1·10 ²	0	44	67	1,2·10 ²	65
Medián	1,9·10 ²	0	32	1,3·10 ²	99	1,3·10 ²
Medovicové medy						
Číslo vzorku	CPM	KOLI	SPA	KV	PL	BMK
7	2,1·10 ²	ND	1,6·10 ²	ND	8	13
8	1,0·10 ²	ND	13	1,4·10 ²	35	1,1·10 ²
9	93	ND	20	1,1·10 ²	15	85
10	1,7·10 ²	ND	1,2·10 ²	18	18	1,3·10 ²
11	5,1·10 ²	ND	78	83	45	2,9·10 ²
12	1,2·10 ²	ND	3	3	8	5
Průměr	2,0·10 ²	0	66	59	22	1,1·10 ²
Směrodatná odchylka	1,6·10 ²	0	64	60	15	1,0·10 ²
Medián	1,4·10 ²	0	49	51	17	98

Legenda: CPM – celkový počet mikroorganismů, KOLI – koliformní bakterie, SPA – sporotvorné aerobní bakterie, KV – kvasinky, PL – plísně, BMK – bakterie mléčného kvašení, ND – nedetekováno.

Tabulka č. 4 – Počty významných skupin mikroorganismů ve druhé analýze vzorků medů v KTJ/g (průměrné výsledky ze dvou opakování)

Květové medy						
Číslo vzorku	CPM	KOLI	SPA	KV	PL	BMK
1	15	ND	48	5	8	ND
2	8	ND	18	5	10	ND
3	$1,0 \cdot 10^2$	ND	ND	ND	13	ND
4	50	ND	10	18	10	10
5	35	ND	58	3	10	8
6	33	ND	10	5	13	ND
Průměr	40	0	24	6	11	3
Směrodatná odchylka	33	0	23	6	2	5
Medián	34	0	14	5	10	0
Medovicové medy						
Číslo vzorku	CPM	KOLI	SPA	KV	PL	BMK
7	20	ND	$4,3 \cdot 10^2$	ND	3	ND
8	68	$9,1 \cdot 10^2$	18	10	10	3
9	$2,9 \cdot 10^3$	45	$1,9 \cdot 10^4$	20	8	30
10	30	ND	$1,1 \cdot 10^2$	18	3	5
11	$2,7 \cdot 10^2$	ND	8	13	ND	13
12	8	ND	3	ND	5	ND
Průměr	$5,5 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^2$	$3,3 \cdot 10^3$	10	5	9
Směrodatná odchylka	$1,2 \cdot 10^3$	$3,7 \cdot 10^2$	$7,7 \cdot 10^3$	9	4	12
Medián	49	0	64	12	4	4

Legenda: CPM – celkový počet mikroorganismů, KOLI – koliformní bakterie, SPA – sporotvorné aerobní bakterie, KV – kvasinky, PL – plísně, BMK – bakterie mléčného kvašení, ND – nedetekováno.

Tabulka č. 5 – Počty významných skupin mikroorganismů ve třetí analýze vzorků medů v KTJ/g (průměrné výsledky ze dvou opakování)

Květové medy						
Číslo vzorku	CPM	KOLI	SPA	KV	PL	BMK
1	3	ND	ND	ND	ND	5
2	80	ND	65	ND	3	3
3	58	ND	3	ND	3	ND
4	$6,4 \cdot 10^2$	ND	8	8	3	13
5	90	ND	ND	3	5	ND
6	8	ND	3	ND	10	13
Průměr	$1,5 \cdot 10^2$	0	13	2	4	6
Směrodatná odchylka	$2,4 \cdot 10^2$	0	26	3	3	6
Medián	69	0	3	0	3	4
Medovicové medy						
Číslo vzorku	CPM	KOLI	SPA	KV	PL	BMK
7	10	ND	ND	ND	3	5
8	23	ND	5	ND	5	15
9	3	ND	ND	ND	5	ND
10	3	ND	3	3	3	3
11	60	ND	28	8	ND	ND
12	10	ND	3	ND	ND	8
Průměr	18	0	7	2	3	5
Směrodatná odchylka	22	0	11	3	2	6
Medián	10	0	3	0	3	4

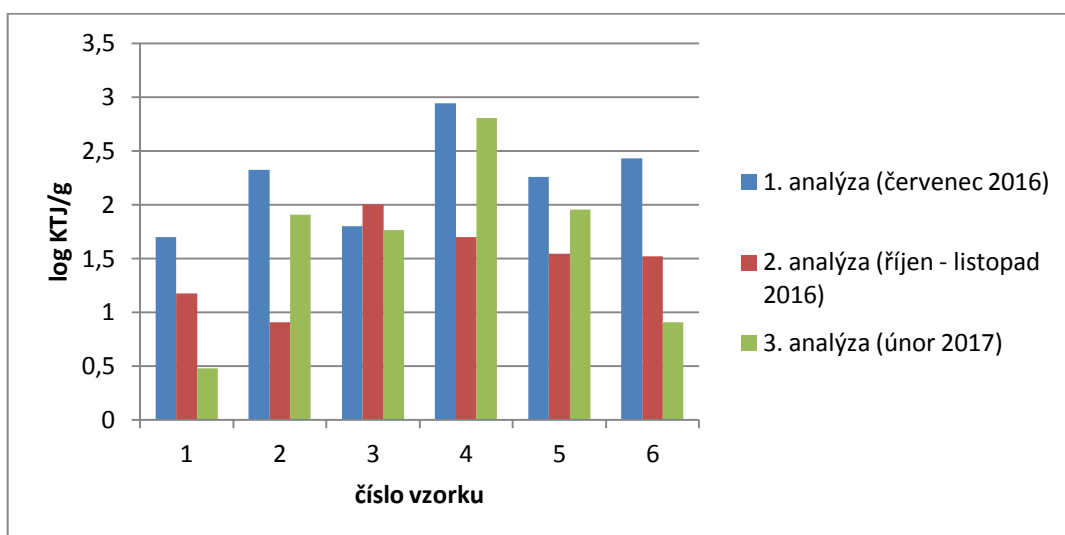
Legenda: CPM – celkový počet mikroorganismů, KOLI – koliformní bakterie, SPA – sporotvorné aerobní bakterie, KV – kvasinky, PL – plísně, BMK – bakterie mléčného kvašení, ND – nedetekováno.

5.1.1 Celkový počet mikroorganismů

CPM tvoří aerobní a fakultativně anaerobní mikroorganismy (bakterie, kvasinky a plísně). Tato skupina se nejvíce přibližuje absolutnímu celkovému počtu a nejlépe vystihuje stupeň mikrobiálního znečištění daného substrátu. CPM poskytuje základní informaci o stupni mikrobiální kontaminace surovin, hotových výrobků a prostředí provozoven. Z výsledků lze usuzovat na úroveň technologie a dodržování hygienických směrnic při výrobě, přepravě a uskladnění (Šilhánková, 2002).

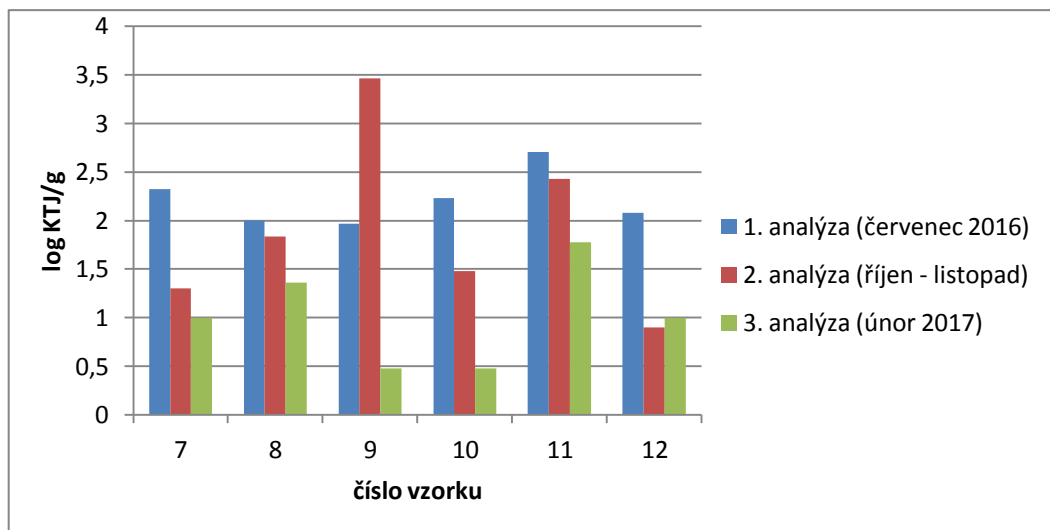


Obr. č. 7 – Petriho miska s nárůstem CPM ve druhé analýze u vzorku č. 9



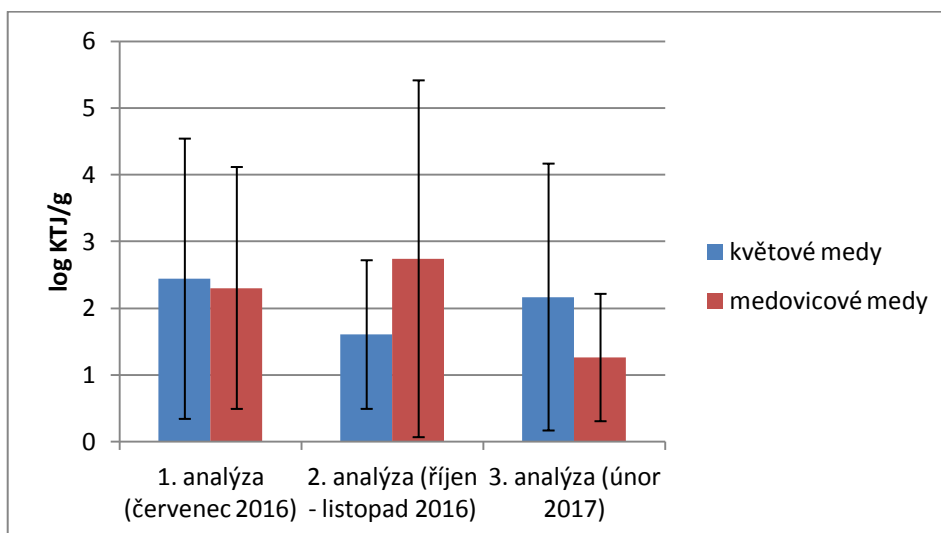
Obr. č. 8 – Graf vývoje CPM u květových medů v závislosti na čase

Vývoj CPM u květových medů v průběhu skladování je znázorněn na obr. č. 8. U všech vzorků květových medů byly zjištěny relativně nízké počty CPM v rozpětí od několika bakterií po řádově 10^2 KTJ/g medu. U žádného ze vzorků nebyla překročena hodnota 10^3 KTJ/g. Z výsledků je patrné, že i přes určité výkyvy docházelo v průběhu skladování ke snižování počtu CPM. Zvláště dobře patrné je to u vzorků 1 a 6.



Obr. č. 9 – Graf vývoje CPM u medovicových medů v závislosti na čase

Ve vzorcích medovicových medů byly zjištěny podobné hodnoty CPM jako u medů květových, řádově 10^2 KTJ/g (viz obr. č. 9). Výjimkou byl vzorek č. 9 (obr. č. 7), u kterého byla ve druhé analýze (podzim 2016) překročena hodnota 10^3 KTJ/g. Z výsledků však vyplývá, že v průběhu skladování došlo u vzorků medovicových medů ke snížení počtu CPM.



Obr. č. 10 – Srovnání průměrného počtu CPM mezi květovými a medovicovými medy v průběhu skladování

Srovnání průměrných CPM květových a medovicových medů je znázorněno na obr. č. 10. Statistickou analýzou nebyl zjištěn průkazný rozdíl mezi oběma druhy medu

v jednotlivých analýzách, ani za celé období skladování ($p > 0,05$). V průběhu skladování však došlo ke statisticky významnému snížení CPM u medovicových medů, a to o 91 % v porovnání s počáteční hodnotou ($p < 0,05$). U medů květových byl CPM průkazně nižší ve druhé analýze na podzim roku 2016 ($p < 0,05$).

Zjištěné hodnoty CPM se pohybovaly u námi analyzovaných medů v rozmezí od 3 do $2,9 \cdot 10^3$ KTJ/g. Kňazovická et al. (2010) ve své studii zjistili podobné rozmezí hodnot pro CPM ve vzorcích medů ze Slovenska, a to od 24 KTJ/g do $1,4 \cdot 10^3$ KTJ/g. Nižší rozmezí uvádějí Haščík et al. (2012) u medovicových medů, a to od 67 do 217 KTJ/g, zatímco ve studii Róžaňské (2011) se počty CPM pohybovaly od 10 až do $7,5 \cdot 10^4$ KTJ/g. Iurlina et Fritz (2005) zjistili jako průměrnou hodnotu CPM 244 KTJ/g, Tysset et Rousseau (1981) u vzorků medů z Francie 227 KTJ/g. Uvedené průměry jsou podobné s námi zjištěnou průměrnou hodnotou, která byla 205 KTJ/g. Lace (2008) ve své studii zjistil jako maximální počet CPM $2,7 \cdot 10^3$ KTJ/g, ten je ovšem nižší než maximální počet v našich analýzách ($2,9 \cdot 10^3$ KTJ/g). Ve studii Iurlina et Fritz (2005) bylo zjištěno, že CPM u žádného z argentinských medů nepřesáhl $1,0 \cdot 10^3$ KTJ/g. Snowdon et Cliver (1996) se domnívají, že variabilita v počtu CPM u různých medů může být způsobena typem vzorku, obdobím sběru, dobou skladování a použitými analytickými metodami.

5.1.2 Koliformní bakterie

Koliformní bakterie byly detekovány pouze u vzorků č. 8 ($9,1 \cdot 10^2$ KTJ/g) a 9 (45 KTJ/g) ve druhé analýze na podzim roku 2016. V ostatních případech nebyly tyto bakterie detekovány. Nepřítomnost koliformních bakterií ve vzorcích medů je ve shodě s výsledky studie Sondré et al. (2007), Rall et al. (2003) a Gomes et al. (2009). Naopak Dümen et al. (2013) při analýze 500 vzorků medu zjistili, že 80 z nich bylo pozitivních na koliformní bakterie. Jejich počet se pohyboval v rozmezí od $1,2 \cdot 10^1$ do $6,2 \cdot 10^2$ KTJ/g. Obdobně Adenekan et al. (2012) v medu detekoval koliformy, a to v rozmezí od $3,0 \cdot 10^2$ do $2,0 \cdot 10^3$ KTJ/g. Námi zjištěné hodnoty odpovídaly těmto výsledkům.

Dle právně nezávazné ČSN 56 9609 může med při odběru 5 vzorků obsahovat v jednom z nich maximálně $1,0 \cdot 10^2$ KTJ/g koliformních bakterií. Všechny analyzované vzorky, s výjimkou vzorku č. 8, vyhověly uvedenému kritériu. Vysoké hodnoty koliformních bakterií pravděpodobně souvisí s nedostatečnými hygienickými podmínkami při zacházení s medem či fekální kontaminací.

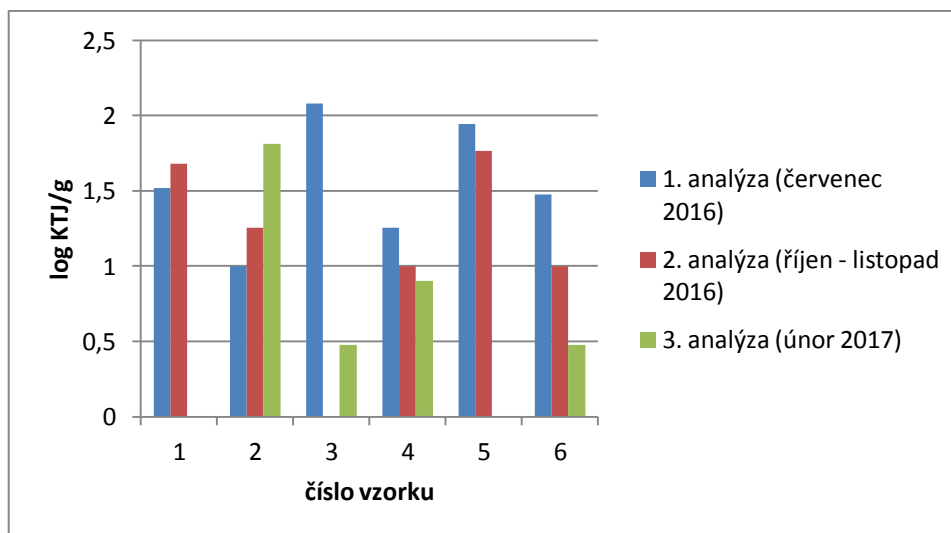
5.1.3 Aerobní sporulující bakterie

Nejčastěji se vyskytující aerobní sporotvorné bakterie patří do rodu *Bacillus*. Jejich přítomnost a počet indikuje stupeň primární a sekundární kontaminace potravin a předmětů denního užívání z vnějšího prostředí (Görner, Valík, 2004).

Aerobní sporulující bakterie se v medu mohou nacházet pouze jako spory, které jsou schopné přetrvávat po dlouhou dobu díky vysoké odolnosti vůči inhibičním účinkům medu.

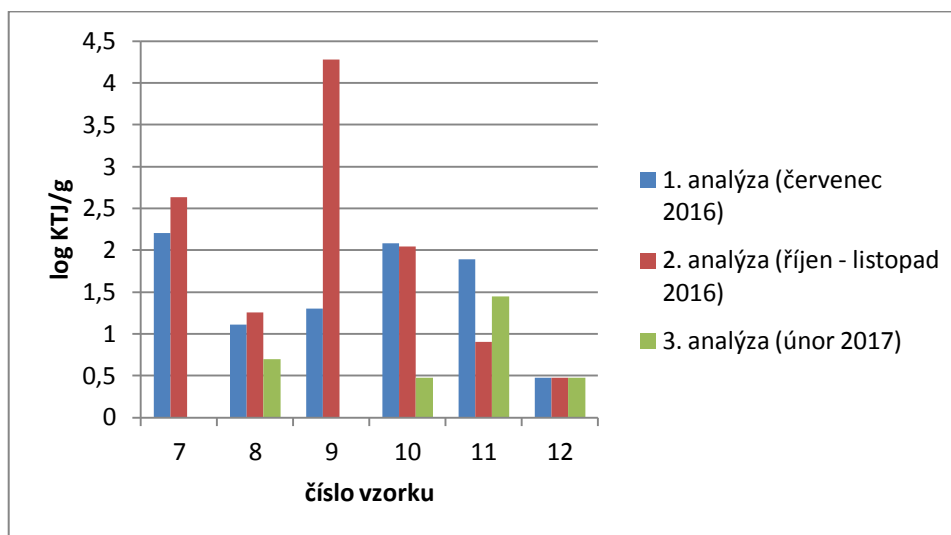


Obr. č. 11 – Petriho miska s nárůstem aerobních sporotvorných bakterií ve druhé analýze u vzorku č. 9



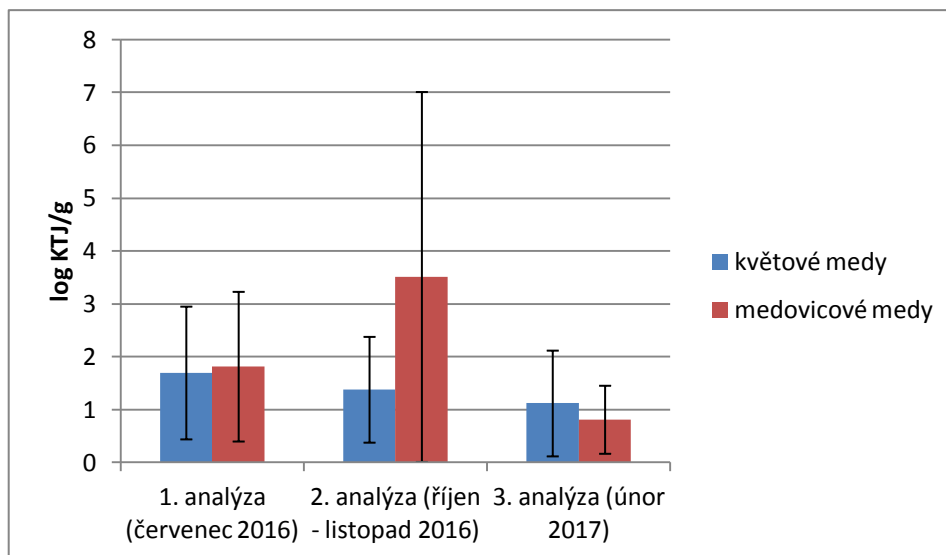
Obr. č. 12 – Graf vývoje počtů aerobních sporotvorných bakterií u květových medů v závislosti na čase

Přítomnost sporulujících aerobních bakterií byla zjištěna ve všech analyzovaných vzorcích medů. Na obr. č. 12 je znázorněn vývoj jejich počtů v průběhu skladování květových medů. Počty aerobních sporulujících bakterií byly opět relativně nízké (max. $1,2 \cdot 10^2$ KTJ/g). U všech vzorků květových medů došlo k snížení jejich počtu v průběhu skladování. Výjimku zde tvořil pouze vzorek č. 2, u kterého došlo k zvýšení.



Obr. č. 13 – Graf vývoje počtů aerobních sporotvorných bakterií u medovicových medů v závislosti na čase

Podobné hodnoty jako u medů květových, byly zjištěny i u medů medovicových (viz obr. č. 13). Výjimkou zde byl vzorek č. 9, u kterého byla ve druhé analýze (podzim 2016) zjištěna nejvyšší hodnota ze všech, počet sporotvorných aerobních bakterií zde přesáhl řádově 10^4 KTJ/g (obr. č. 11). To bylo pravděpodobně způsobeno kontaminací medu z okolního prostředí, ale i samotnými včelami, jejichž střeva osidlují bakterie z rodu *Bacillus*, které touto cestou snadno přestupují do medu. Z výsledků je patrné, že i přes značné výkyvy došlo v průběhu skladování ke snižování počtu sporotvorných aerobních bakterií, pouze u vzorku č. 12 byl jejich počet neměnný.



Obr. č. 14 – Srovnání průměrného počtu SPA v závislosti na čase mezi květovými a medovicovými medy

Srovnání průměrného počtu sporulujících aerobních bakterií u květových a medovicových medů je znázorněn na obr. č. 14. V průběhu skladování došlo u květových medů k postupnému snižování jejich počtu, které však nebylo statisticky průkazné ($p > 0,05$). U medovicových medů se počet sporotvorných aerobních bakterií zvýšil ve druhé analýze, ve třetí analýze došlo k výraznému snížení, tyto rozdíly ale rovněž nebyly významné ($p > 0,05$). Rozdílný počet sporotvorných aerobních bakterií dále nebyl prokázán mezi květovými a medovicovými medy v jednotlivých analýzách ($p > 0,05$), stejně jako za celé období skladování ($p > 0,05$).

Nízké počty sporulujících aerobních bakterií uvádějí také Gradvol et al. (2015), a to v rozmezí od 15 do 30 KTJ/g u květových medů. U medovicových medů pak autoři uvádějí střední hodnotu 53 KTJ/g. Tato hodnota je výrazně nižší než námi zjištěná střední hodnota $1,1 \cdot 10^3$ KTJ/g u medovicových medů. Iurlina et Fritz (2005) detekovali sporotvorné aerobní bakterie ve 23 % analyzovaných argentinských medů, zatímco my jsme SPA detekovali ve všech vzorcích, jak již bylo výše zmíněno.

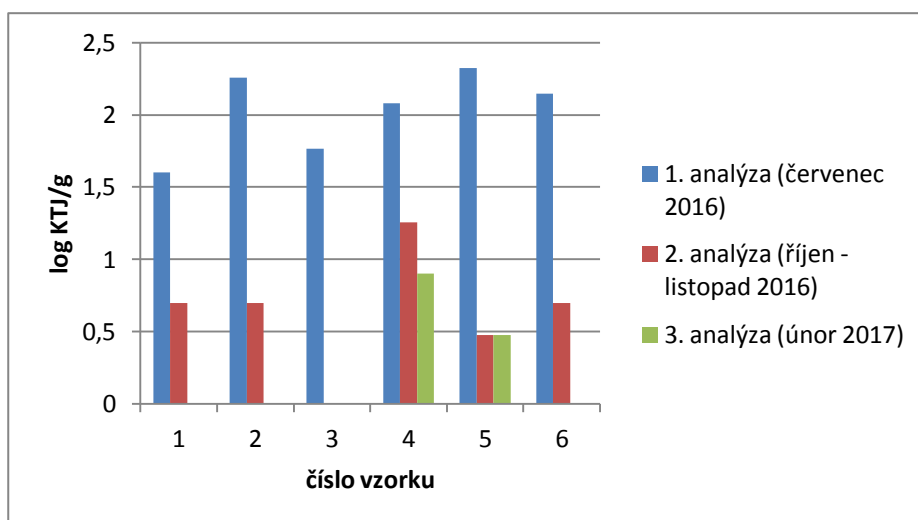
5.1.4 Kvasinky

Významnou skupinou mikroorganismů, která kontaminuje medy a může se podílet na jejich kvašení, jsou kvasinky, z nichž se některé druhy vyznačují schopností přežít v prostředí s vysokým osmotickým tlakem, jak uvádějí Görner et Valík (2004). U námi

analyzovaných květových i medovicových medů byly zjištěny poměrně nízké počty kvasinek. Příklad nárůstu kolonií kvasinek na Petriho misce je zobrazen na obr. č. 15.

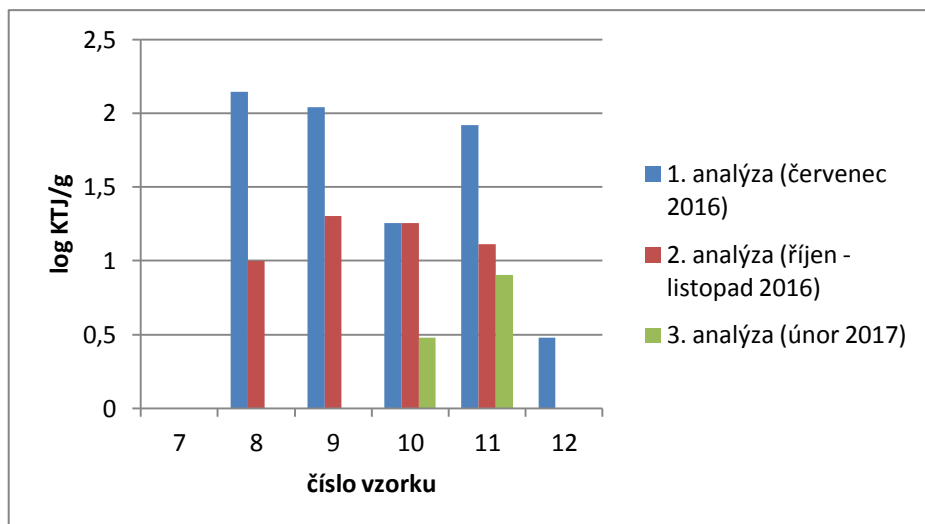


Obr. č. 15 – Petriho miska s nárůstem kvasinek a plísní v první analýze u vzorku č. 4



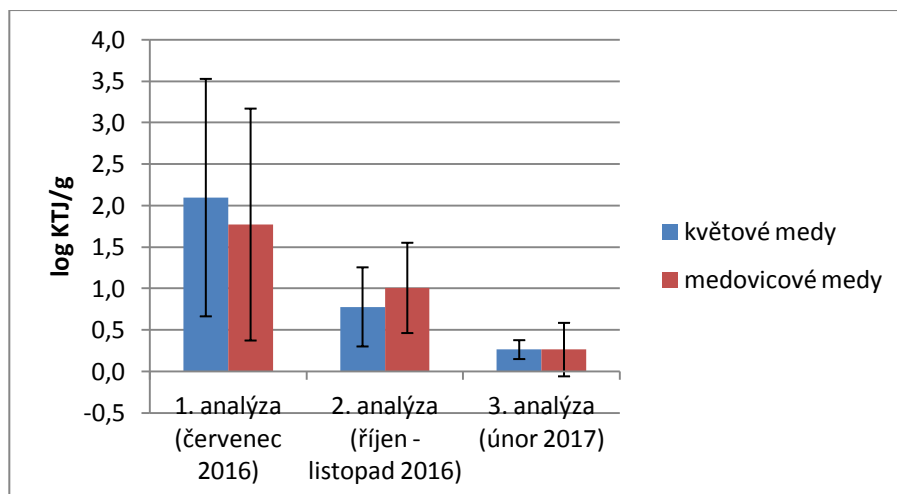
Obr. č. 16 – Graf vývoje počtů kvasinek u květových medů v závislosti na čase

U květových medů došlo k nejvyššímu nárůstu kvasinek u vzorku č. 5 ($2,1 \cdot 10^2$ KTJ/g). V průběhu skladování pak docházelo ke snižování jejich počtu u všech analyzovaných vzorků květových medů (viz obr. č. 16).



Obr. č. 17 – Graf vývoje počtů kvasinek u medovicových medů v závislosti na čase

Ve vzorcích medovicových medů byly zjištěny podobné počty kvasinek jako u medů květových. Nejvyšší počet byl zjištěn u vzorku č. 8 ($1,4 \cdot 10^2$ KTJ/g), zatímco u vzorku č. 7 nebyly kvasinky detekovány v žádné z analýz. Z výsledků vyplývá, že u vzorků medovicových medů došlo v průběhu skladování rovněž ke snižování jejich počtu (viz obr. č. 17).



Obr. č. 18 – Srovnání průměrného počtu kvasinek mezi květovými a medovicovými medy v závislosti na čase

Srovnání průměrných počtů kvasinek u květových a medovicových medů je znázorněno na obr. č. 18. Statisticky významný rozdíl v jejich počtu mezi oběma druhy medu nebyl v jednotlivých analýzách ani za celé období skladování průkazný ($p >$

0,05). V průběhu skladování však došlo ke statisticky průkaznému snížení počtu kvasinek u medovicových medů o 97 % a u květových medů o 98 % oproti počáteční hodnotě ($p < 0,05$).

Podobně nízké hodnoty kvasinek uvádějí Kňazovická et al. (2010), a to od 0,5 do 2,1 log KTJ/g. Mnohem vyšší počty jsou uvedeny ve studii Erkan et al. (2015), kteří zjistili počty kvasinek v rozmezí od $3,8 \cdot 10^3$ do $6,8 \cdot 10^4$ KTJ/g, podobné počty v rozmezí od $1,0 \cdot 10^3$ do $6,4 \cdot 10^3$ KTJ/g stanovili také Adenekan et al. (2012). Gradvol et al. (2015) uvádějí jako průměrnou hodnotu kvasinek u květových medů 32 KTJ/g, ta je velmi blízká námi zjištěné průměrné hodnotě (44 KTJ/g). Autoři ale kvasinky nedetekovali u žádného z medovicových medů, zatímco v našem případě byla zjištěna jako střední hodnota ze všech vzorků medovicových medů 24 KTJ/g. Variabilita v počtu kvasinek přímo souvisí s obsahem vody v medu, která závisí především na době vytáčení.

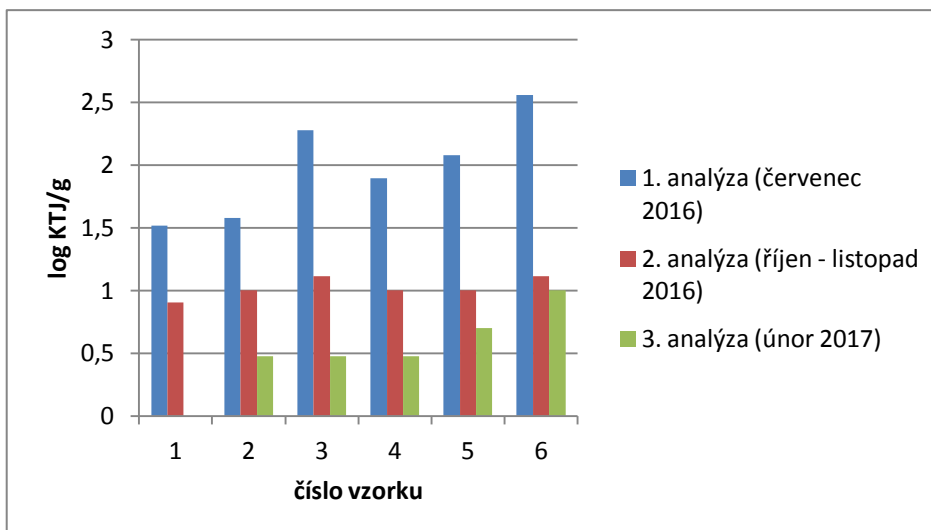
Dle ČSN 56 9609 nejvyšší mezní hodnota pro kvasinky v potravinách určených k přímé spotřebě v nezměněném stavu je 10^7 na gram. V porovnání s našimi výsledky lze konstatovat, že všechny analyzované vzorky splnily toto mikrobiologické kritérium.

5.1.5 Plísně

Rovněž plísně resp. jejich spory mohou být často nalézány v medu. Také v našem experimentu byly plísně detekovány ve všech analyzovaných vzorcích medů. Jejich počty byly rovněž relativně nízké. Nárůst na Petriho misce je zobrazen na obr. č. 19.

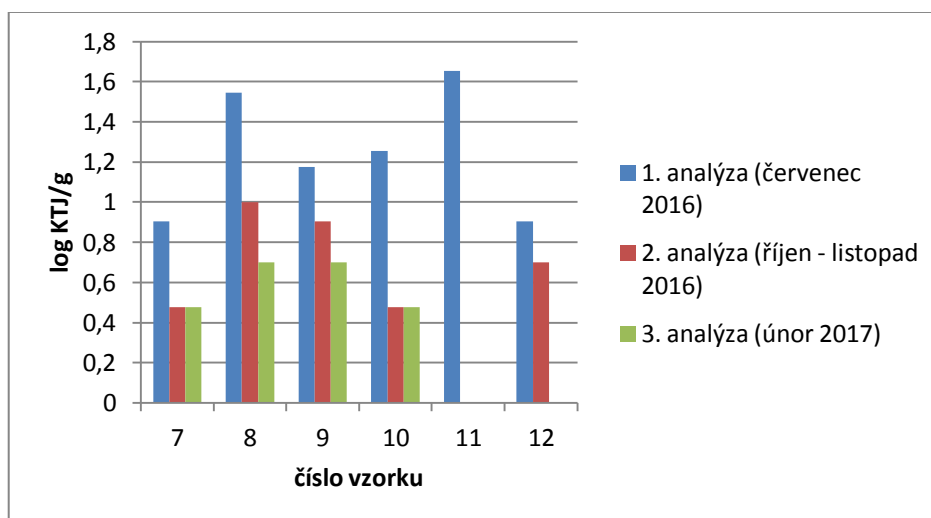


Obr. č. 19 – Petriho miska s nárůstem plísní a kvasinek v první analýze u vzorku č. 6



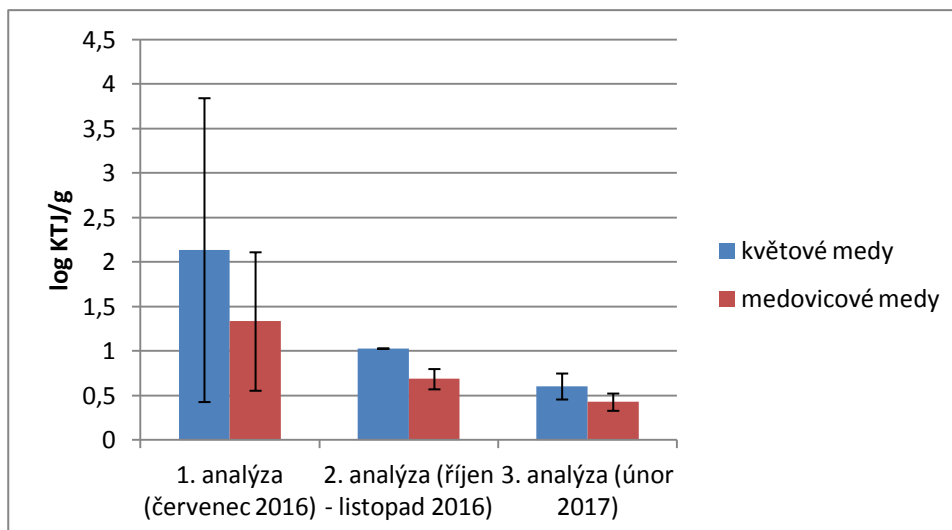
Obr. č. 20 – Graf vývoje počtů plísní u květových medů v závislosti na čase

Počet plísní u květových medů se pohyboval v rozpětí od několika plísní po $3,6 \cdot 10^2$ KTJ/g. V průběhu skladování došlo ke snižování jejich počtu u všech analyzovaných vzorků medů (obr. č. 20).



Obr. č. 21 – Graf vývoje počtů plísní u medovicových medů v závislosti na čase

Ve vzorcích medovicových medů byly zjištěny nižší počáteční hodnoty plísní než u medů květových. V průběhu skladování medovicových medů opět došlo ke snižování jejich počtu u všech analyzovaných vzorků (viz obr. č. 21).



Obr. č. 22 – Srovnání průměrného počtu plísni mezi květovými a medovicovými medy v závislosti na čase

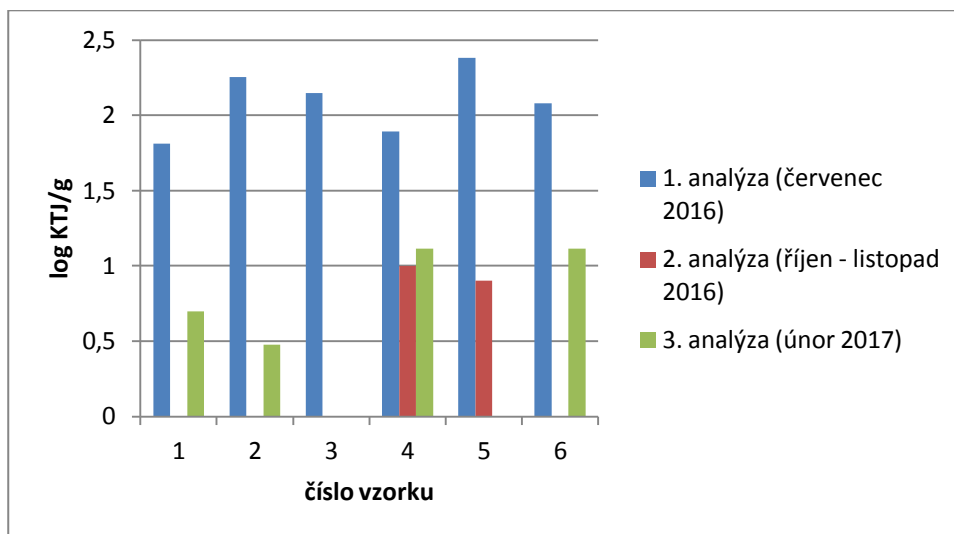
Srovnáním průměrných počtů plísni ve vzorcích květových a medovicových medů byl zjištěn vyšší počet u medů květových (obr. č. 22). V první a druhé analýze byl tento rozdíl statisticky průkazný ($p < 0,05$). Průkazně nižší počet plísni byl také zjištěn u medovicových medů za celé období skladování ($p < 0,05$). U obou druhů medu také došlo ke statisticky významnému poklesu plísni v průběhu skladování ($p < 0,05$). U medovicových medů se jejich počet snížil o 84 %, u květových medů až o 97 % ve srovnání s počátečním stavem.

Námi zjištěné počty plísni byly poměrně nízké. Erkan et al. (2015) uvádějí širší rozmezí hodnot u plísni, a to od $1,0 \cdot 10^2$ do $2,7 \cdot 10^3$ KTJ/g. Ve studii Martins et al. (2003) byly identifikovány plísně *Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Mucor* spp., *Penicillium* spp. s hodnotami od 10^1 do 10^2 KTJ/g. Snowdon et Cliver (1996) detekovali plísně pouze v 10 vzorcích z 50 s méně než 15 KTJ/g, zatímco námi byly plísně detekovány ve všech analyzovaných medech. Gradvol et al. (2015) uvádějí jako průměrnou hodnotu plísni u květových medů 18 KTJ/g, u medovicových medů 34 KTJ/g. Kňazovická et al. (2010) uvádějí u medovicových medů průměrnou hodnotu 0,52 log KTJ/g. Námi zjištěná průměrná hodnota u květových medů byla 50 KTJ/g (1,7 log KTJ/g), u medovicových medů 10 KTJ/g (1,0 log KTJ/g). Piana et al. (1991) se domnívají, že plísně mohou v medu přežít, ale nemají tendenci růst, čemuž nasvědčují i námi zjištěné snižující se počty.

Dle ČSN 56 9609 u potravin určených k přímé spotřebě v nezměněném stavu je mezní hodnotou pro plísň růst viditelný pouhým okem. Tento parametr splňovaly všechny námi analyzované medy.

5.1.6 Bakterie mléčného kvašení (BMK)

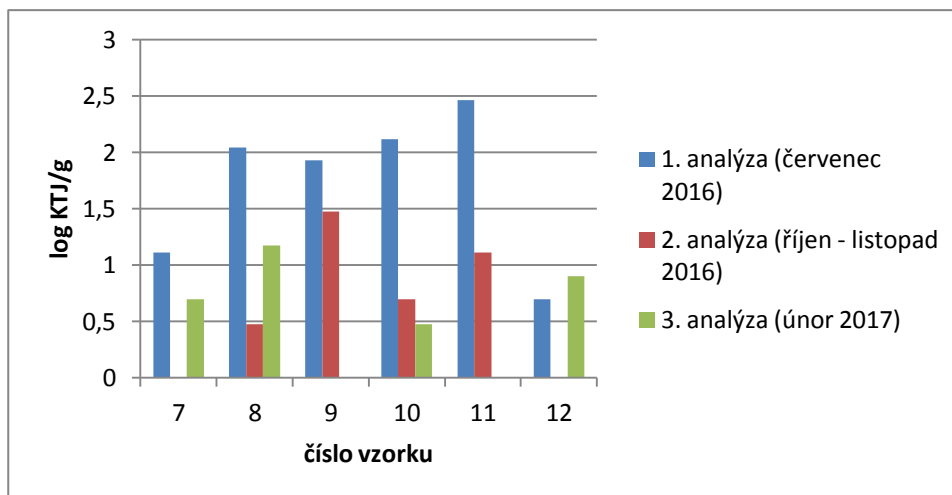
Počty bakterií mléčného kvašení (BMK) byly opět relativně nízké. Na následujících obrázcích (23, 24) je vyobrazen vývoj jejich počtu v průběhu skladování.



Obr. č. 23 – Graf vývoje počtů BMK u květových medů v závislosti na čase

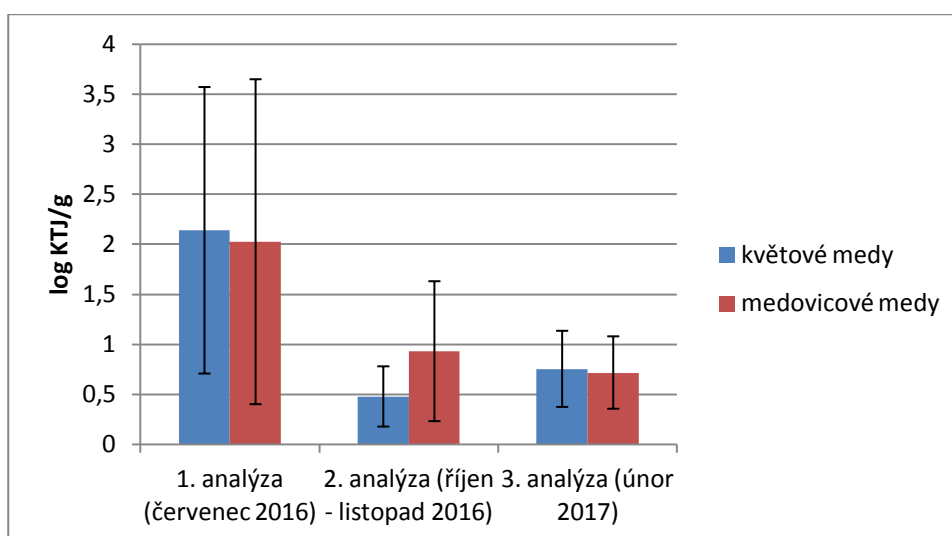
Ve vzorcích květových medů byly BMK detekovány v množství od několika bakterií po řádově 10^2 KTJ/g medu. V rámci jednotlivých analýz byla v počtech BMK, ale i dalších skupin mikroorganismů, zjištěna vysoká variabilita. Ta byla pravděpodobně způsobena tím, že medy v původním balení nejsou zcela homogenní a může tak dojít ke vzniku bakteriálních ložisek.

I přesto lze usuzovat, že v průběhu skladování docházelo u květových medů k postupnému odbourávání BMK. Zvláště dobře patrné je to u vzorku č. 3 a 5 (viz obr. č. 23).



Obr. č. 24 – Graf vývoje počtů BMK medovicových medů v závislosti na čase

U medovicových medů byly zjištěny podobné hodnoty BMK jako u medů květových. V průběhu skladování medovicových medů došlo rovněž ke snižování jejich počtu (obr. č. 24). Výjimku zde tvořil vzorek č. 12, u kterého naopak došlo k zvýšení počtu BMK ve srovnání s počáteční hodnotou.



Obr. č. 25 - Srovnání průměrného počtu BMK mezi květovými a medovicovými medy v závislosti na čase

V rámci jednotlivých analýz nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi květovými a medovicovými medy ($p > 0,05$), obdobně jako za celé období skladování ($p > 0,05$). Z výsledků však vyplývá, že v průběhu skladování došlo u obou druhů medu

ke snižování počtu BMK, které bylo statisticky průkazné ($p < 0,05$). U medovicových medů se jejich počet snížil o 95 %, u květových medů o 96 %.

Počty BMK u analyzovaných vzorků se pohybovaly v rozmezí od 0 do $2,9 \cdot 10^2$ KTJ/g. Ve studii Aween et al. (2012) bylo u medů z Libye, Saudské Arábie a Nového Zélandu zjištěno významně širší rozmezí počtů, a to od 0 do 10^5 KTJ/ml. U medů z Malajsie však byly hodnoty nižší jak 10 KTJ/ml. Rozdílné hodnoty mohou být závislé především na odlišných přírodních zdrojích a na osídlení trávicího traktu včel.

5.2 Spektrofotometrické měření barvy

U vzorků medů bylo v průběhu skladování, kromě sledování mikrobiální kontaminace, provedeno rovněž měření barvy na spektrofotometru Konica Minolta ve spolupráci s pracovníky Ústavu technologie potravin. Výsledky měření jsou uvedeny v následujících tabulkách (6, 7, 8).

Tabulka č. 6 – Výsledné hodnoty při prvním měření barvy jednotlivých vzorků medů (průměr ze dvou opakování)

Vzorek č.	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)
1	85,14	1,78	47,68
2	96,03	-1,57	15,11
3	89,44	-0,75	37,83
4	69,40	1,08	23,87
5	62,30	2,12	38,35
6	74,56	-0,84	19,63
Průměr	79,48	0,30	30,41
Směrodatná odchylka	12,85	1,55	12,72
Medián	79,85	0,16	30,85
7	65,59	15,06	75,00
8	83,60	4,10	52,50
9	85,71	2,16	43,46
10	81,84	3,78	47,80
11	80,50	4,45	56,22
12	72,99	11,60	62,58
Průměr	78,37	6,86	56,26
Směrodatná odchylka	7,62	5,19	11,32
Medián	81,17	4,28	54,36

Legenda: L* – světlost (zastoupení bílé až černé), a* – zastoupení zelené až červené, b* – zastoupení modré až žluté, vzorek č. 1 až 6 – květové medy, vzorek č. 7 až 12 – medovicové medy.

Tabulka č. 7 – Výsledné hodnoty při druhém měření barvy jednotlivých vzorků medů
(průměr ze dvou opakování)

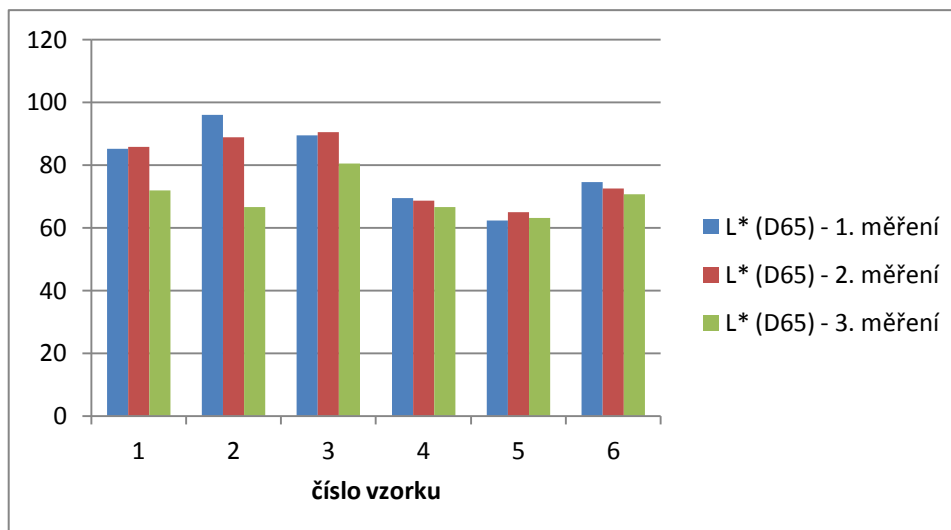
Vzorek č.	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)	ΔE^*ab
1	85,80	1,94	54,48	6,83
2	88,87	-1,05	19,82	8,59
3	90,54	-1,08	40,43	2,85
4	68,56	1,27	25,59	1,93
5	64,96	2,31	35,83	3,67
6	72,39	-0,31	23,16	4,18
Průměr	78,52	0,51	33,22	4,67
Směrodatná odchylka	11,18	1,51	13,04	2,53
Medián	79,10	0,48	30,71	3,92
7	42,98	8,36	53,70	31,78
8	39,55	-0,50	29,51	49,90
9	40,31	-2,06	21,66	50,54
10	37,05	-1,47	25,00	50,53
11	70,68	5,58	57,60	9,98
12	59,18	10,93	59,65	14,14
Průměr	48,29	3,47	41,18	34,48
Směrodatná odchylka	13,53	5,56	17,58	18,84
Medián	41,64	2,54	41,60	40,84

Legenda: L* – světllost (zastoupení bílé až černé), a* – zastoupení zelené až červené, b* – zastoupení modré až žluté, ΔE^*ab – míra velikosti barevného rozdílu mezi předlohou a vzorkem, vzorek č. 1 až 6 – květové medy, vzorek č. 7 až 12 – medovicové medy.

Tabulka č. 8 – Výsledné hodnoty při třetím měření barvy jednotlivých vzorků medů
(průměr ze dvou opakování)

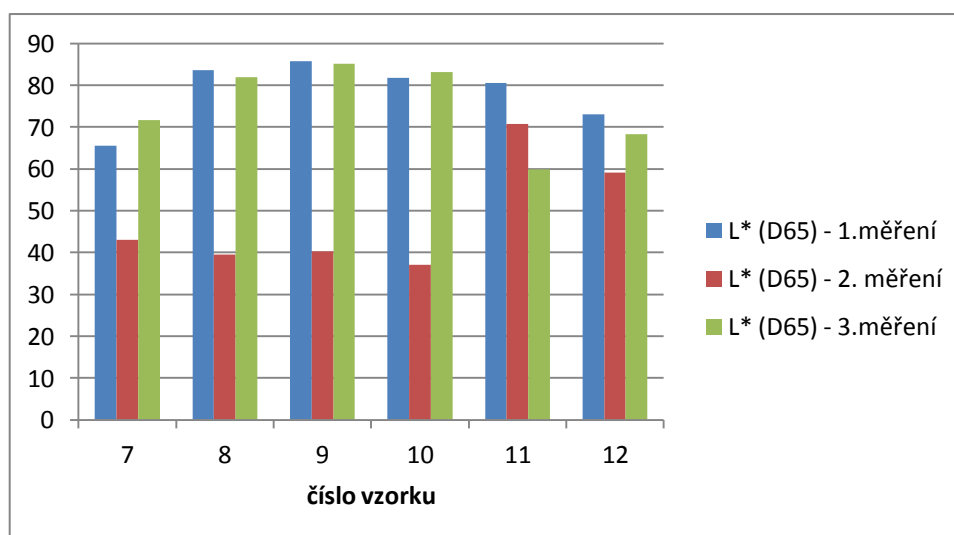
Vzorek č.	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)	ΔE^*ab
1	71,86	3,66	52,73	14,34
2	66,55	-0,06	20,63	30,03
3	80,41	0,32	40,64	9,52
4	66,63	1,24	25,69	3,32
5	63,05	2,53	38,05	0,90
6	70,56	-0,34	23,82	5,82
Průměr	69,84	1,22	33,59	10,66
Směrodatná odchylka	6,06	1,58	12,34	10,61
Medián	68,59	0,78	31,87	7,67
7	71,66	17,27	84,39	11,40
8	81,94	5,83	62,73	10,51
9	85,17	2,77	50,89	7,47
10	83,15	4,68	58,95	11,26
11	59,87	6,04	53,93	20,82
12	68,25	14,00	70,53	9,57
Průměr	75,00	8,43	63,57	11,84
Směrodatná odchylka	10,04	5,79	12,31	4,63
Medián	76,80	5,93	60,84	10,89

Legenda: viz tabulka č. 7



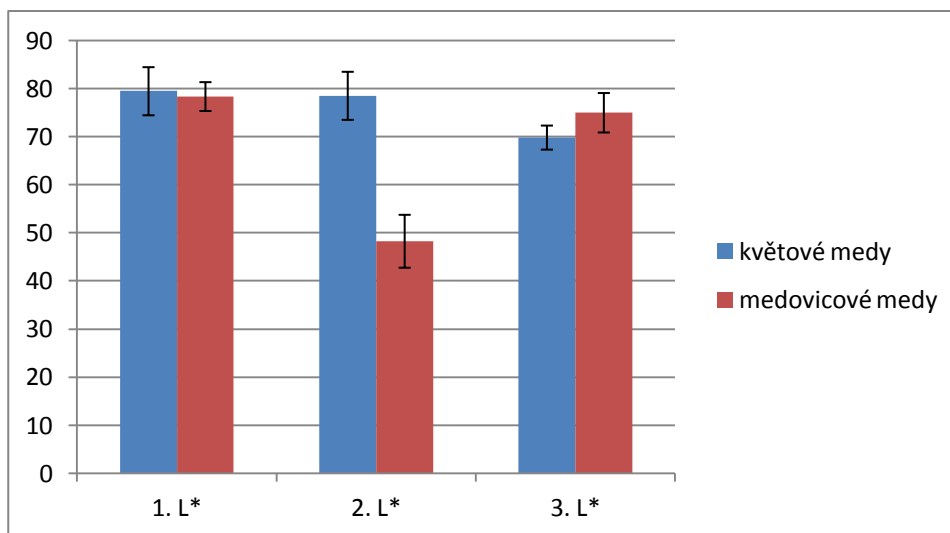
Obr. č. 26 – Graf znázorňující změny L^* (D65) u květových medů v průběhu skladování

Změna u hodnoty L^* (světlost) květových medů je znázorněna na obr. č. 26. Tato hodnota se pohybovala od 62,30 do 96,03. Z výsledků je patrné, že u květových medů docházelo v průběhu skladování k tmavnutí. Výjimku zde tvořil vzorek č. 5, u kterého naopak došlo k mírnému zvýšení světlosti. Předpokládalo se, že vzorky č. 4, 5 a 6 budou nejsvětlejší, v důsledku již proběhlé krystalizace a pastování. Tento předpoklad se ovšem nepotvrdil a tyto vzorky byly naopak jedny z nejtmavších, což mohlo být způsobené měřením barvy pomocí reflektance na rozdíl od jinak měřené transmitance.



Obr. č. 27 – Graf znázorňující změny L^* (D65) u medovicových medů v průběhu skladování

Na obr. č. 27 je vyobrazena změna hodnoty L^* v průběhu skladování medovicových medů v rozmezí od 37,05 do 85,71. Vysoká variabilita u této hodnoty byla pravděpodobně způsobena probíhajícími Maillardovými reakcemi a krystalizací medů.

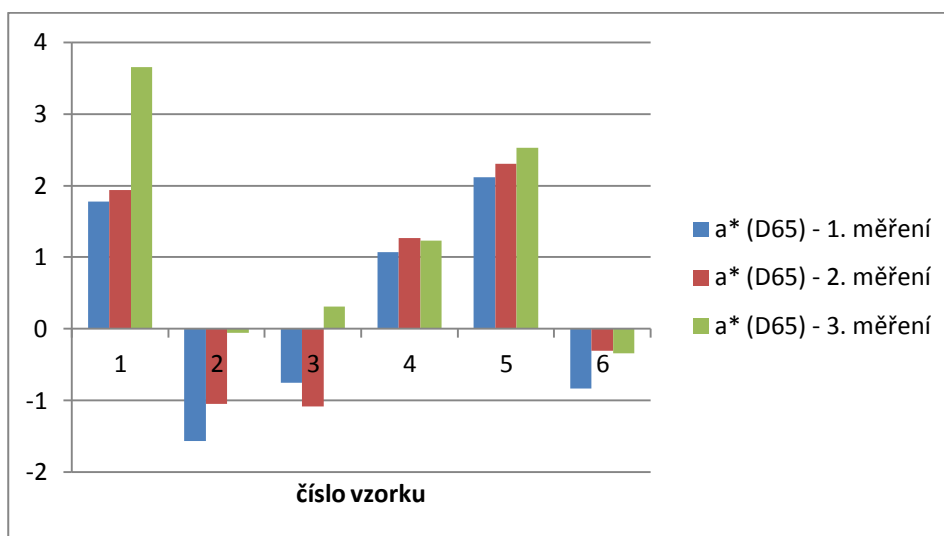


Obr. č. 28 – Srovnání průměrné hodnoty L^* u květových a medovicových medů v průběhu skladování

Srovnání průměrných hodnot L^* květových a medovicových medů je znázorněno na obr. č. 28. Bylo zjištěno, že v průběhu skladování došlo u květových medů ke statisticky průkaznému tmavnutí ($p < 0,05$). U medovicových medů bylo L^* průkazně nižší při druhém měření ($p < 0,05$) ve srovnání s medy květovými. Statisticky významný rozdíl však nebyl prokázán mezi květovými a medovicovými medy za celé období skladování ($p > 0,05$).

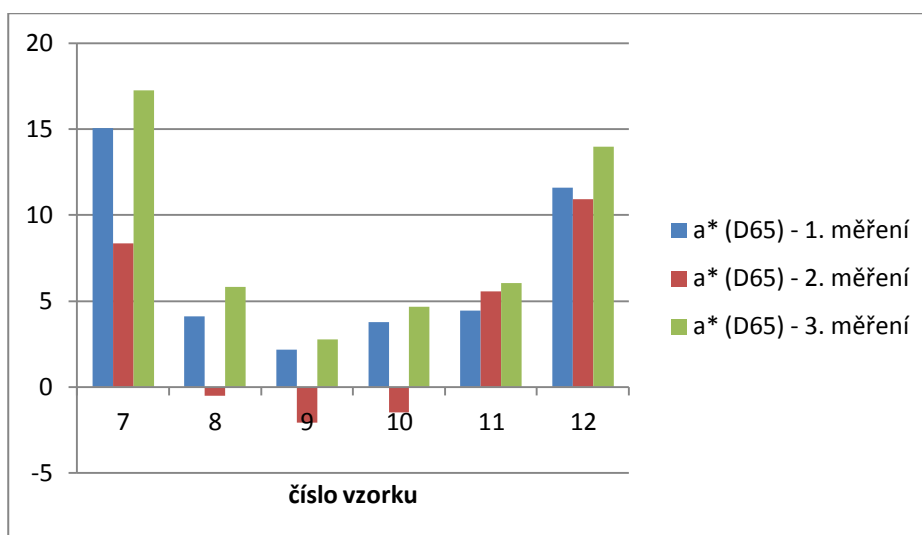
Piotraszewska-Pajak et Gliszczyńska-Świgło (2015) uvádějí rozmezí L^* u čerstvých květových medů 45,75 až 68,63 (průměr $60,15 \pm 12,54$). Námi zjištěné hodnoty byly vyšší, a to od 62,30 do 96,03 (průměr $79,48 \pm 12,85$). V této studii je dále uvedena průměrná hodnota L^* po třech a devíti měsících skladování květových medů ve tmě ($61,49 \pm 5,88$ a $67,08 \pm 3,07$). Námi zjištěné hodnoty při obdobném způsobu skladování byly vyšší, a to $78,52 \pm 11,18$ a $69,84 \pm 6,06$. Námi analyzované medy byly tedy světlejší než v uvedené studii v průběhu celé doby skladování. Ve zmíněné studii došlo ke zvýšení L^* , zatímco naše květové medy se v průběhu skladování staly průkazně tmavšími ($p < 0,05$). Gonzales et al. (1999) uvádějí, že výsledná barva medu silně souvisí s jeho počáteční barvou a domnívají se, že u tmavých medů je rychlost tmavnutí

vyšší. Toto tvrzení koresponduje s provedeným druhým měřením u medovicových medů.



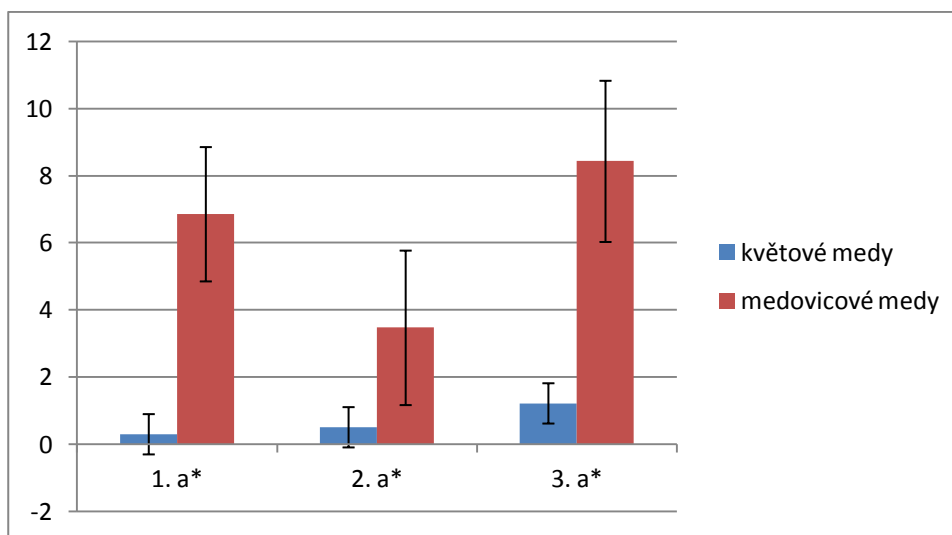
Obr. č. 29 – Graf znázorňující změny a^* (D65) u květových medů v průběhu skladování

Hodnota a^* se u květových medů pohybovala od -1,57 do 3,66. V průběhu skladování došlo u vzorků č. 1, 3, 4 a 5 ke zvýšení podílu červených odstínů, zatímco u vzorků č. 2 a 6 došlo ke snížení podílu zelených odstínů (obr. č. 29). U vzorků č. 2, 3 a 6 byly zjištěny záporné hodnoty, které podle Tuberoso et al. (2014) ukazují na velmi světlé medy.



Obr. č. 30 – Graf znázorňující změny a^* (D65) u medovicových medů v průběhu skladování

Ve vzorcích medovicových medů bylo naměřeno širší rozmezí a^* oproti medům květovým (viz obr. č. 29, 30), pohybující se od -2,06 do 17,27. Nejnižší podíl červených odstínů byl zjištěn u vzorku č. 9. V průběhu skladování došlo u všech vzorků medovicových medů ke zvýšení podílu červené barvy.

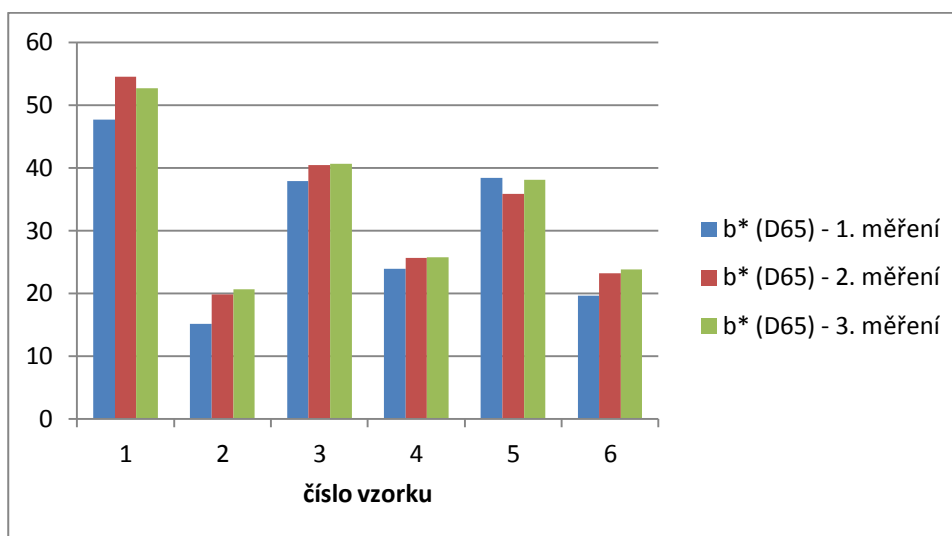


Obr. č. 31 – Srovnání průměrné hodnoty a^* u květových a medovicových medů v průběhu skladování

U květových medů došlo v průběhu skladování ke statisticky významnému zvýšení podílu červených odstínů ($p < 0,05$) z hodnoty $0,30 \pm 1,55$ na hodnotu $1,22 \pm 1,58$. Zatímco u medovicových medů došlo k průkaznému snížení podílu červené barvy ve druhém měření ($p < 0,05$). Z výsledků vyplývá, že medovicové medy měly vyšší zastoupení červených odstínů ve srovnání s medy květovými (obr. č. 31), které bylo statisticky průkazné při prvním a třetím měření ($p < 0,05$), stejně jako za celé období skladování ($p < 0,05$).

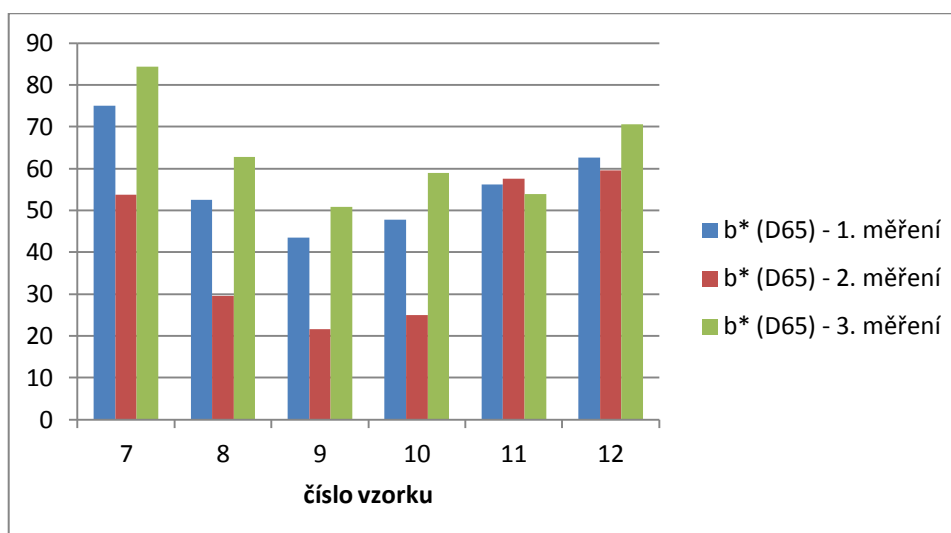
Zjištěné rozmezí a^* u květových medů se v prvním měření pohybovalo od -1,56 do 2,12 (průměr $0,30 \pm 1,55$), ve druhém měření průměr činil $0,51 \pm 1,51$ a ve třetím měření $1,22 \pm 1,58$. Z uvedených hodnot lze usuzovat na zvyšování a^* v průběhu skladování, došlo tedy ke zvýšení podílu červených odstínů, které bylo statisticky průkazné ($p < 0,05$). Toto zjištění potvrzují výsledky studie Piotraszewska-Pajak et Gliszczyńska-Świągło (2015), ve které došlo ke statisticky významnému zvyšování a^* z hodnoty $-2,40 \pm 2,18$ až na $5,03 \pm 2,55$. Zapotoczny et al. (2010) u medovicových medů zjistili průměrnou hodnotu a^* -0,01. U námi provedených stanovení, byla zjištěna jako

průměrná hodnota a^* medovicových medů 6,25 a analyzované medy tedy měly vyšší zastoupení červených odstínů než medy v uvedené studii.



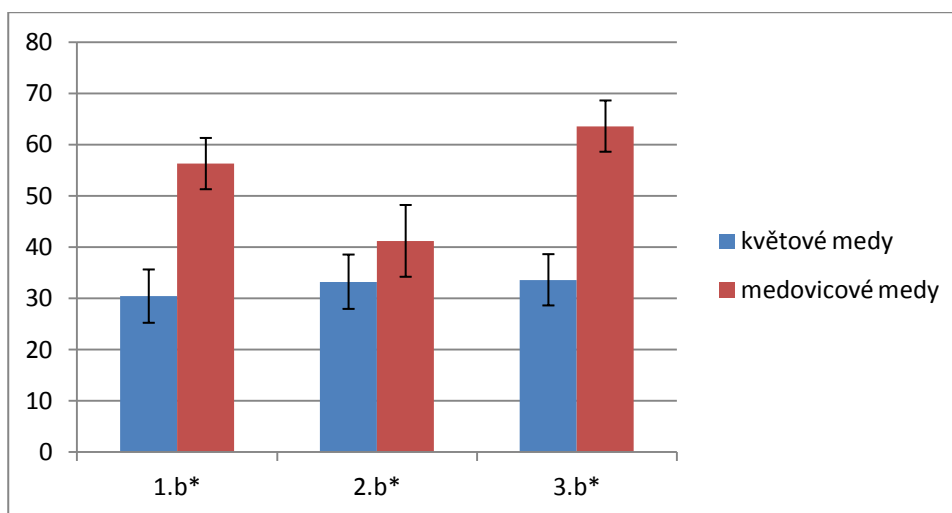
Obr. č. 32 – Graf znázorňující změny b^* (D65) u květových medů v průběhu skladování

Na obrázku č. 32 je zobrazena změna hodnoty b^* v průběhu skladování květových medů. Tato hodnota se pohybovala od 15,11 do 54,48. Z výsledků je patrné, že nejvyšší podíl žlutých odstínů ve všech měřeních byl u vzorku č. 1, naopak nejnižší u vzorku č. 2. V průběhu skladování došlo u všech vzorků květových medů ke zvýšení podílu žlutých odstínů, s výjimkou vzorku č. 5, u kterého naopak došlo k mírnému snížení.



Obr. č. 33 – Graf znázorňující změny b^* (D65) u medovicových medů v průběhu skladování

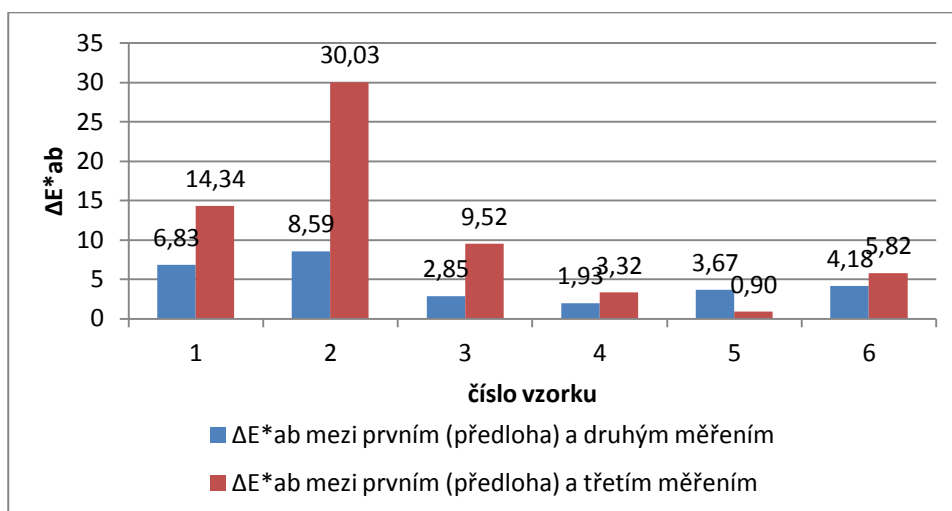
U medovicových medů byly naměřeny vyšší hodnoty b^* než u medů květových, v rozmezí od 21,66 do 84,39. Nejnižší zastoupení žlutých odstínů ve všech měřeních byl zjištěn u vzorku č. 9. U všech vzorků medovicových medů, s výjimkou vzorku č. 11, došlo v průběhu skladování ke zvýšení podílu žluté barvy (viz obr. č. 33).



Obr. č. 34 – Srovnání průměrné hodnoty b^* u květových a medovicových medů v průběhu skladování

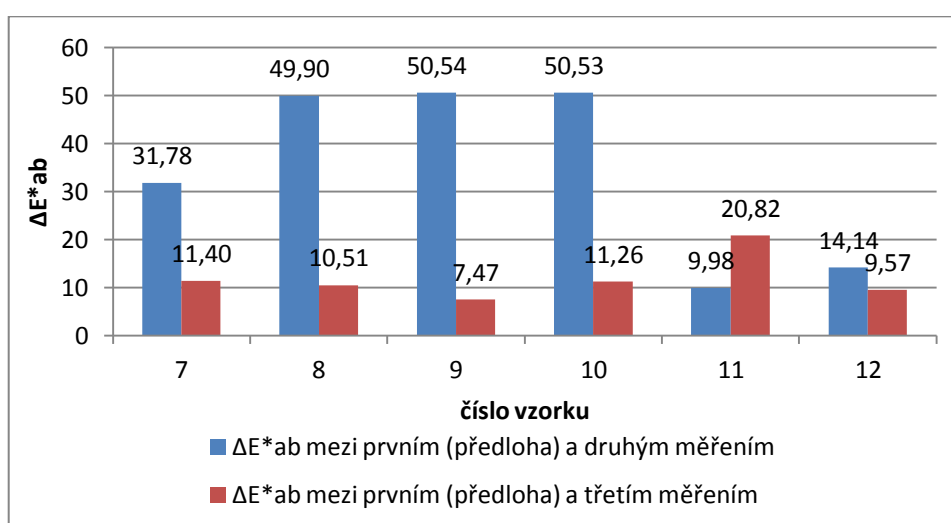
Na obr. č. 34 je znázorněno srovnání průměrné hodnoty b^* u květových a medovicových medů. V průběhu skladování obou druhů medu nedošlo ke statisticky průkazné změně hodnoty b^* ($p > 0,05$). Statisticky významně vyšší podíl žlutých odstínů byl zjištěn při prvním a třetím měření u medovicových medů ve srovnání s medy květovými ($p < 0,05$), stejně jako za celé období skladování ($p < 0,05$).

Piotraszewska-Pajak et Gliszczyńska-Świgło (2015) uvádějí jako rozmezí b^* u čerstvých květových medů hodnoty od 15,03 do 32,22, s průměrem $22,89 \pm 8,69$. Po třech měsících skladování zjistily jako průměrnou hodnotu $25,15 \pm 6,82$ a po devíti měsících $32,20 \pm 3,86$. Námi zjištěné rozmezí u čerstvých květových medů bylo širší, a to od 15,11 do 47,68 (průměr $30,41 \pm 12,72$). Ve druhém měření byl průměr $33,22 \pm 13,04$ a ve třetím měření $33,59 \pm 12,34$. V uvedené studii i při námi provedených měřeních, došlo v průběhu skladování k zvyšování b^* , tedy k zvýšení podílu žluté barvy. Zvyšování b^* u květových medů však nebylo statisticky průkazné ($p > 0,05$). Zapotoczny et al. (2010) zjistili jako průměrnou hodnotu b^* u medovicových medů 0,84, zatímco námi zjištěná průměrná hodnota činila 53,67. Lze tedy tvrdit, že námi analyzované medovicové medy měly vyšší zastoupení žlutých odstínů.



Obr. č. 35 – Míra velikosti barevného rozdílu mezi předlohou a vzorky květových medů

ΔE^* byla u všech vzorků květových medů, s výjimkou vzorku č. 5 při třetím měření a vzorku č. 4 při druhém měření, vyšší než 2, což je hranice postřehnutelná lidským okem. Tyto barevné rozdíly by měly být pro konzumenta zřetelné. K největší barevné změně došlo u vzorku č. 2, který se v průběhu skladování stal výrazně tmavším. U všech vzorků květových medů docházelo ke zvětšování barevného rozdílu oproti předloze. Pouze u vzorku č. 5 došlo k opačnému jevu, pravděpodobně způsobenému chybou v měření, kdy nebyl rozdíl na konci měření postřehnutelný. Rozdíl mezi druhým a třetím měřením u květových medů nebyl statisticky průkazný ($p > 0,05$).



Obr. č. 36 – Míra velikosti barevného rozdílu mezi předlohou a vzorky medovicových medů

U všech medovicových medů byla ΔE^* znatelně vyšší než 2, rozdíl by měl být opět postřehnutelný lidským okem. Při druhém měření byl vysoký barevný rozdíl způsoben statisticky průkazným ztmavnutím a snížením podílu červených odstínů ($p < 0,05$), jak již bylo zmíněno. V průběhu skladování se tento rozdíl, s výjimkou vzorku č. 11, snižoval. Rozdíl mezi ΔE^* přesto nebyl statisticky průkazný ($p > 0,05$).

Ke statisticky významnější změně došlo u medovicových medů ve druhém měření ($p < 0,05$) ve srovnání s medy květovými, ovšem ve třetím měření byl barevný rozdíl u obou druhů medu přibližně stejný ($p > 0,05$).

Obecně je rozdílná barva medů ovlivněna typem nektaru, přítomnými karotenoidy, chlorofylem, fenoly, minerálními látkami, pylem apod. (Piotraszewska-Pajak et Gliszczyńska-Świgło, 2015).

Piotraszewska-Pajak et Gliszczyńska-Świgło (2015) zjistily, že na velikost barevné změny má podstatný vliv teplota. Ve své studii uvádějí, že u medů uskladněných při pokojové teplotě bez přístupu světla dochází k největším změnám a^* i b^* , ve srovnání s jinými podmínkami uchování (např. v chladu či za přístupu světla). Při nízké skladovací teplotě ale dochází k největšímu zvyšování L^* (světlní) v důsledku krystalizace, která je nízkou teplotou podpořena. Barva skladovaného medu je také ovlivněna probíhajícími Maillardovými reakcemi mezi aminosloučeninami a sacharidy, při kterých dochází ke vzniku melanoidů (pigment hnědé barvy). Tmavé medy obvykle vykazují mnohem vyšší obsah melanoidů než medy světlé. Piotraszewska-Pajak et Gliszczyńska-Świgło (2015) se domnívají, že skladováním medu za přístupu světla, se vznik melanoidů může oddálit a sníží se tak změny v barvě nektarových medů.

Brudzynski et Kim (2011) zjistili, že dlouhodobé skladování medu při pokojové teplotě a bez přístupu světla, má za následek snížení antibakteriální a antioxidační aktivity. Dochází tak k zvýšení odolnosti *Bacillus subtilis* a částečné ztrátě citlivosti *E. coli* vůči těmto vlastnostem medu. Bylo zjištěno, že to přímo souvisí se změnami v barvě a s tvorbou melanoidů. Některé studie uvádějí, že dlouhodobé skladování medu má za následek ztrátu antibakteriální aktivity (Radwan et al., 1984), zatímco v jiných studiích, stejně jako v našich analýzách, nebyla korelace mezi stářím medu a ztrátou antibakteriální aktivity prokázána (Allen et al., 1991; Rio set al., 2001). Došlo se k závěru, že podstatnější vliv na antibakteriální aktivitu má fytochemické složení medu než skladovací podmínky (Allen et al., 1991). Zdá se, že antibakteriální aktivita by

mohla souviset s přítomností a koncentrací účinných látek a jejich citlivostí na podmínky skladování (Brudzynski et Kim, 2011).

6 ZÁVĚR

Med patří mezi poživatiny, jejichž znehodnocení nebývá často způsobeno mikrobiální činností. Některé mikroorganismy, především sporotvorné bakterie, kvasinky a plísně, jsou v něm však detekovány v pravidelných intervalech. Různorodost mikroorganismů, stejně jako jejich počty v medu jsou proměnlivé údaje, které jsou specifické pro konkrétní analyzovaný vzorek.

Praktická část diplomové práce byla zaměřena především na mikrobiologickou analýzu 6 květových a 6 medovicových medů zakoupených od včelařů ze dvora. Vzorky byly označeny čísly 1 až 12 a u každého z nich následně provedeny tři analýzy. V průběhu skladování byly sledovány změny celkového počtu mikroorganismů, kvasinek, plísní, aerobních sporulujících bakterií, koliformních bakterií a bakterií mléčného kvašení.

U všech vzorků medů byly zjištěny poměrně nízké počty mikroorganismů, které s výjimkou vzorku č. 9, nepřesáhly řádově 10^3 KTJ/g. Dodržení této hodnoty ukazuje, podle Snowdon et Cliver (1996), na kvalitní medy. Dále bylo zjištěno, že pouze vzorek č. 8 nespĺňoval hygienické kritérium v počtu koliformů uvedené v ČSN 56 9609. U ostatních vzorků nebyl limit $1,0 \cdot 10^2$ KTJ/g překročen, což svědčí o dodržení hygienických požadavků při manipulaci s medem a o jeho jakosti. Všechny analyzované vzorky splnily mikrobiologické kritérium pro potraviny určené k přímé spotřebě v nezměněném stavu, v počtu kvasinek a výskytu plísní, uvedené ve výše zmíněné normě.

Bylo také zjištěno, že v průběhu skladování došlo k významnému snížení počtu kvasinek, plísní a BMK u květových i medovicových medů, počet CPM se průkazně snížil pouze u medů medovicových ($p < 0,05$). Výjimku tvořily aerobní sporotvorné bakterie, jejichž počet se v průběhu skladování průkazně nezměnil ($p > 0,05$). U medovicových byl ale prokázán nižší počet plísní v první a druhé analýze, i za celé období skladování ve srovnání s medy květovými ($p < 0,05$). U ostatních skupin mikroorganismů nebyl rozdíl v počtu mezi druhy medu průkazný ($p > 0,05$). Rozdíl dále nebyl významný u žádného vzorku medu v počtu jednotlivých skupin mikroorganismů ($p > 0,05$).

V dalším úseku experimentální části byla současně s mikrobiologickými analýzami měřena barva těchto vzorků medů. Bylo zjištěno, že u květových medů v průběhu skladování došlo ke statisticky průkaznému ztmavnutí a zvýšení podílu červených

odstínů ($p < 0,05$). U medovicových medů došlo k průkaznému ztmavnutí a snížení podílu červených odstínů ve druhém měření ($p < 0,05$). Změna hodnoty b^* nebyla v průběhu skladování významná ($p > 0,05$). Dále bylo zjištěno, že medovicové medy měly za celé období skladování průkazně vyšší zastoupení červených a žlutých odstínů ve srovnání s medy květovými ($p < 0,05$). Zatímco rozdíl u hodnoty L^* nebyl mezi medy významný ($p > 0,05$). V průběhu skladování docházelo u všech vzorků medů ke změnám v jejich barvě. Míra velikosti barevného rozdílu mezi předlohou a vzorky byla u všech analyzovaných medů vyšší než 2 a tento rozdíl by měl být pro konzumenta postřehnutelný. Korelace mezi barvou medů a počtem jednotlivých skupin mikroorganismů nebyla prokázána.

Z výsledků vyplývá, že pro med je charakteristický nízký počet mikroorganismů. Bylo ale zjištěno, že se v něm, v důsledku sekundární kontaminace, mohou objevit i vysoké počty mikroorganismů, především koliformních bakterií. Kvalita medů je tedy dána správnou výrobní praxí a dodržováním hygienických podmínek.

7 POUŽITÁ LITERATURA

ADENEKAN M. O., AMUSA N. A., OKPEZE V. E., OWOSIBO A. O., 2012: Nutritional and Microbiological Components of Honey Samples Obtained from Ogun State, Southwestern Nigeria. *European Journal of Sustainable Development*. 1, 271–286. ISSN 2239-5938.

AJIBOLA A., 2015: Novel Insights into the Health Importance of Natural Honey. *Malaysian Journal of Medical Sciences*. 5, 7–22. ISSN 1394-195X.

ALLEN K. L., MOLAN P. C., REID G. M., 1991: A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 43, 817–822.

AL-WAILI N., SALOM K., AL-GHAMBI A., ANSARI M. J., 2012: Antibiotic, Pesticide, and Microbial Contaminants of Honey: Human Health Hazards. *The Scientific World Journal*. 9.

AWEEN M. M., HASSAN Z., MUHIALDIN B. J., ELJAMEL Y. A., AL-MABROK A. S. W., 2012: Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from honey marketed in Malaysia against selected multiple antibiotic resistant (MAR) Gram-positive bacteria. *Journal of Food Science*. 77, 364–371.

BÁCHOR E., 2012: Nemoci včel. *Včelařství*. 11, 368–369.

BAKIER S., 2007: Influence of temperature and water content on the rheological properties of Polish honeys. *Polish journal of food and nutrition science*. 2, 17–23.

BITTNER L., TITĚRA D., URBAN M., GRILL R., HERÁĚK J., NOVOTNÝ T., OTAVA Z., 2006: Použití medu při léčbě infikovaných ran. *Urologie pro praxi*. 6, 274–275.

BLAHOVÁ K., 2010: *Med – užitečné rady*. 1. vyd. Praha: SUN, 80 s. ISBN 978-80-7371-342-3.

BOGDANOV S., 1997: Nature and Origin of the Antibacterial Substances in Honey. *Food Science and Technology*. 7, 748–753.

BOGDANOV S., JURENDIC T., SIEBER R., GALLMANN P., 2008: Honey for Nutrition and Health: a Review. *American Journal of the College of Nutrition*. 27, 677–689.

BRUDZYNSKI K., KIM L., 2011: Storage-induced chemical changes in active components of honey de-regulate its antibacterial activity. *Food Chemistry*. 3, 1155–1163.

BURDYCHOVÁ R., SLÁDKOVÁ P., 2007: *Mikrobiologická analýza potravin*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělské a lesnická univerzita v Brně. ISBN 978-80-7375-116-6.

BURSOVÁ Š., NECODIVÁ L., DOŠKOVÁ M., 2014: *Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody. Obecná mikrobiologie*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 114 s. ISBN 978-80-7305-742-8.

CEMPÍRKOVÁ R., LUKÁŠKOVÁ J., HEJLOVÁ Š., 1997: *Mikrobiologie potravin*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 165 s. ISBN 80-7040-254-7.

COOPER R., 2005: *The antimicrobial activity of honey*. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.509.1595&rep=rep1&type=pdf>

CUPÁKOVÁ Š., KARPÍŠKOVÁ R., NECIDOVÁ L., 2010: *Mikrobiologie potravin – praktická cvičení II.: metody stanovení mikroorganismů v potravinách*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 180 s. ISBN 978-80-7305-126-6.

ČAVOJSKÝ V. et al., 1981: *Včelárstvo*. 1. vyd. Bratislava: Příroda, 628 s.

ČERMÁKOVÁ T., CHLEBO R., HUSÁRIKOVÁ M., 2010: *Kniha o medu*. Eastone Books, 278 s. ISBN 978-80-8109-132-2.

ČSN 56 9609 Pravidla správné hygienické a výrobní praxe. *Mikrobiologická kritéria pro potraviny: principy stanovení a aplikace.*

DOBRE I., GEORGESCU L. A., ALEXE P., ESCUREDO O., SEIJO M. C., 2012: Rheological behavior of different honey types from Romania. *Food Research International Journal*. 1, 126–132. ISSN 0963-9969.

DOBROVODA I., 1986: *Včelie produkty a zdravie*. 1. vyd. Bratislava: Príroda, 307 s.

DRAŠAR J., 1978: *Včelařství*. Státní zemědělské nakladatelství, 312 s. ISBN 07-079-78.

DÜMEN E., AKKAYA H., ÖZ G. M., SEZGİN F. H., 2013: Microbiological and parasitological quality of honey produced in İstanbul. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 37, 602–607.

DUPAL L., 2011: Med – kvalita, vady, znehodnocení. *Včelařství*. 10, 330–331.

ERKAN M. E., VULAR A., GURAN H. S., DURMOSOGLU H., 2015: Microbiological investigation of honey collected from Şırnak province of Turkey. *Journal Of The Hellenic Veterinary Medical Society*. 66, 22–26.

FORSYTHE S. J., 2000: *The Microbiology of Safe Food*. 1. vyd. Londýn: Blackwell Science, 412 s. ISBN 0-632-05487-5.

FRANK R., 2010: *Zázračný med*. Víkend. ISBN 978-80-7433-024-7.

GOMES S., DIAS L. G., MOREIRA L. L., RODRIGUES P., ESTEVINHO L., 2009: Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and chemical toxicology*. 2, 544–548.

GONZALES A. P., BURIN L., BILAR BUERA M., 1999: Color changes during storage of honeys in relation to their composition and initial color. *Food Research International*. 3, 185–191.

GÖRNER F., VALÍK L., 2004: *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum, 528 s. ISBN 80-967064-9-7.

GRADVOL V., ATLABAN N., LENART L., PAVLOVIĆ H., 2015: Microbial quality and inhibitory potential of selected Croatian apiary honeys. *Croatian journal of food science and technology*. 2, 40–46.

HAJDUŠKOVÁ J., 2006: *Včelí produkty očima lékaře*. Praha: Český svaz včelařů. ISBN 80-903309-2-4.

HARAGSIM O., 2016: *Medovice a včely*. 3. vyd. Praha: Brázda, 175 s. ISBN 80-209-0332-1.

HEREDIA N., WESLEY I., GARCIA S., 2009: *Microbiologically safe foods*. Hoboken: John Wiley & Sons, 667 s. ISBN 978-0-470-05333-1.

HRABÁK J., 2014: Mor včelího plodu a jeho klinické příznaky. *Včelařství*. 9, 258-259.

HRONCOVÁ Z., HAVLÍK J., KILLER J., KAMLER M., 2014: Vztahy včel a mikroorganismů. *Včelařství*. 1, 7–9.

HUBAČ R. Využití včelích produktů v léčebné praxi. *Včelařství*. 2005, č. 8, s. 206–207.

HUBAČ R., 2012: Zkušenosti s *Nosema ceranae*, možnosti prevence. *Včelařství*. 9, 294–295.

CHEORUN J., KIM J. K., KANG H. J., LEE Y. E., BYUN M. W., 2005: Irradiation Effects on the Decontamination of Microorganisms in Honey. *Radiation Food Science*. 21.

IURLINA M. O., FRITZ R., 2005: Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *International Journal of Food Microbiology*. 3, 297–304. ISSN 0168-1605.

JAY J. M., LOESSNER M. J., GOLDEN D. A., 2005: *Modern Food Microbiology*. New York: Springer, 790 s.

KAČÁNIOVÁ M., CHLEBO R., KOPERNICKÝ M., TRAKOVICKÁ A., 2004: Microfloral of the honeybee gastrointestinal tract. *Folia Microbiologica*. 49, 169–171. Dostupné z:
https://www.researchgate.net/publication/8480247_Microflora_of_the_honeybee_gastrointestinal_tract_Folia_Microbiol_492_169-171

KAREŠ J., 2004: *Med jako lék*. 1. vyd. Praha: Agentura VPK, 61 s. ISBN 80-7334-041-0.

KŇAZOVICKÁ V., KAČÁNIOVÁ M., DOVIČIČOVÁ M., MELICH M., KADÁSI – HORÁKOVÁ M., BARBORÁKOVÁ Z., MAREČEK J., 2011: Microbial quality of honey mixture with pollen. *Potravinárstvo*. 5, 27–32.

KŇAZOVICKÁ V., KAČÁNIOVÁ M., FELŠÖCIOVÁ S., TONKOVÁ M., MELICH M., KADÁSI-HORÁKOVÁ M., HAŠČÍK P., 2010: Posúdenie mikrobiologickej kvality vzoriek zmiešaných medov zo SR a iných krajín EU. *Potravinárstvo*. 4, 410–416. Dostupné z:
http://www.potravinarstvo.com/dokumenty/mc_februar_2010/pdf/4/Knazovicka.pdf

KŘENKOVÁ E., 2009: Používání včelích produktů. *Včelařství*. 1, 12.

LACE J., VALDOVSKA A., KONOSONOKA I. H., 2008: *Microbial contamination in honey*. International Scientific Conference: Implication of Different Production Technologies on Animal Health and Food Products Quality Indices. Latvia.

LUNEROVÁ J., PAŽOUT V., 2012: Obsah vody v medu. *Včelařství*. 6, 190–191. ISSN 0042-2924.

MALÍŘ F., OSTRÝ V., 2003: *Vláknité mikromycety (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. 1. vyd. ISBN 80-7013-395-3.

MARTINS H. M., MARTINS M. L., BERNARDO F. M. A., 2003: Bacillaceae spores, fungi and aflatoxins determination in honey. *Revista Portuguesa De Ciências Veterinária*. 98, 85–88.

OLAITAN P. B., ADELEKE O. E., OLA I. O., 2007: Honey: a reservoir for microorganisms and inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences*. 7, 159–165 s.

OMAFUVBE B. O., AKANBI O. O., 2009: Microbiological and physico-chemical properties of some commercial Nigerian honey. *African Journal of Microbiology Research*. 3, 891–896.

PETR J., 2012: Včely, med a probiotika. *Včelařství*. 6, 186.

PIOTRASZEWSKA-PAJAK A., GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO A., 2015: Directions of colour changes of nectar honeys depending on honey type and storage. *The Journal of Research Institute of Horticulture and Apicultural Research Association*. 2, 51–61, ISSN 2299-4831.

POSTMES T., 1995: The sterilization of honey with cobalt 60 gamma radiation: a study of honey spiked with spores of *Clostridium botulinum* and *Bacillus subtilis*. *Experientia*. ISSN 0014-4754.

PŘIDAL A., 2003: *Včelí produkty*. 1. vyd. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 102 s., ISBN 80-7157-717-0.

PŘIDAL A., 2013: *Vznik, získávání, zpracování a kontrola medu*. 1. vyd. Brno: Mendelova univerzita, 90 s. ISBN 978-80-7375-737-3.

RADWAN S. S., EL-ESSAWY A. A., SARHAN M. M., 1984: Experimental evidence for the occurrence in honey of specific substances aktive against microorganisms. *Zentralblatt für Mikrobiologie*. 139, 249–255.

RALL V., BOMBO A. J., LOPES T. F., CARVALHO L. R., SILVA M., 2003: Honey consumption in the state of São Paulo: a risk to human health? *Anaerobe*. 9, 299–303.

RÍOS A. M., NOVOA M. L., VIT P., 2001: Effect of extraction, storage conditions and raring treatment on antibacterial activity of *Zanthoxylum fagara* honey from Cojedes, Venezuela. *Revista científica de veterinaria*. 11, 397–402.

RÓŽAŇSKA H., 2011: Microbiological Quality of Polish Honey. *Bull Vet Inst Pulawy*. 55, 443–445. Dostupné z:

<http://www.piwet.pulawy.pl/jvetres/images/stories/pdf/20113/20113443446.pdf>

SAXENA S., GAUTAM S., SHARMA A., 2010: Microbial Decontamination of Honey of Indian Origin Using Gamma Radiation and Its Biochemical and Organoleptic Properties. *Journal of Food Science*. 1, M19–M27.

SCHINDLER J., 2010: *Mikrobiologie: Pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a. s., 248 s. ISBN 978-80-247-3170-4.

SLÁMA J., 2007: Červenec – měsíc plného léta. *Včelařství*. 7, 183–184.

SMANALIEVA J., SENGE B., 2009: Analytical and rheological investigations into selected unifloral German honey. *European Food Research and Technology*. 1, 107–113. ISSN 1438-2377.

SNOWDON J. A., CLIVER D. O., 1996: Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*. 1, 1–26.

SONDRÉ G. S., MARCHINI L. C., MORETI A. C. C. C., ROSA V. P., CARVALHO C. A. L., 2007: Conteúdo microbiológico de méis de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) dos Estados do Ceará e Piauí. *Boletim de Indústria Animal*. 1, 39–42.

STEINHAUSEROVÁ I., 2003: *Produkce a zpracování drůbeže, vajec a medu*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 82 s. ISBN 80-7305-462-0.

STROBLOVÁ M., 2015: *Mikrobiologie – pracovní sešit*. Brno: Mendelova univerzita, 56 s. ISBN 978-80-7509-212-0.

ŠILHÁNKOVÁ L., 2009: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*, 364 s. ISBN 978-80-200-1703-1.

TCHOUMBOUE J., AWAH-NDUKUM J., FONTEH F. A., DONGOCK N D., PINTA J., MVONDO ZE A., 2007: Physico – chemical and microbiological characteristics of honey form the sudano-guinean zone of West Cameroon. *African Journal of Biotechnology*. 908–913. ISSN 1684-5315.

TITĚRA D. et al., 2016: Hniloba včelího plodu po 40 letech. *Včelařství*. 5, 158–159.

TITĚRA D., 2006: *Včelí produkty mýtů zbavené*. Praha: Brázda, 175 s. ISBN 80-2090-34-7X.

TUBEROSO C. I., JERKOVIĆ I., SARAIS G., CONQIU F., MARIANOVIĆ Z., KUŠ P. M., 2014: Color evaluation of seventeen European unifloral honey types by means of spectrophotometrically determined CIE L**a*b**h*(ab)^o chromaticity coordinates. *Food Chemistry*. 145, 284–291.

TYSSET C., ROUSSEAU M., 1981: *Problem of microbes and hygiene of commercial honey*. *Rev. Med. Vet.* 132, 591–600.

VESELÝ V. et al., 2003: *Včelařství*. Praha: Brázda, 272 s. ISBN 80-209-0320-8.

VIK M., 1995: *Základy měření barevnosti I. díl*. Technická univerzita v Liberci. Liberec, 109 s. ISBN 80-7083-162-6.

VONDRKA K., 2007: Mor včelího plodu a jeho tlumení. *Včelařství*. 7, 187.

VORLOVÁ L., GÁLKOVÁ H., PŘIDAL A., NAVRÁTIL S., KARPÍŠKOVÁ R., 2002: *Med: Souborná analýza*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, 67 s. ISBN 80-7305-450-7.

Vyhláška č. 76/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládou a čokoládové bonbony.

WHITE J. W., DONER L. W., 1980: Honey Composition and Properties. *Beekeeping in the United States*. 335, 82–91.

ZAPOTOCZNY P., KAWAŁKO T., BAKIER S., 2010: Determination of the physical characteristics of food raw materials by spectrophotometry – the example of honey. *Technical Sciences*. 13, 40–52.

ZENTRICH J. A., 2003: *Apiterapie: přírodní léčba včelími produkty*. Praha: Eminent, 173 s. ISBN 80-7281-104-5.

8 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK A OBRÁZKŮ

Tabulka č. 1 – Charakteristika květových medů.....	42
Tabulka č. 2 – Charakteristika medovicových medů	42
Tabulka č. 3 – Počty významných skupin mikroorganismů v první analýze vzorků medů v KTJ/g (průměrné výsledky ze dvou opakování)	51
Tabulka č. 4 – Počty významných skupin mikroorganismů ve druhé analýze vzorků medů v KTJ/g (průměrné výsledky ze dvou opakování).....	52
Tabulka č. 5 – Počty významných skupin mikroorganismů ve třetí analýze vzorků medů v KTJ/g (průměrné výsledky ze dvou opakování)	53
Tabulka č. 6 – Výsledné hodnoty při prvním měření barvy jednotlivých vzorků medů (průměr ze dvou opakování)	67
Tabulka č. 7 – Výsledné hodnoty při druhém měření barvy jednotlivých vzorků medů (průměr ze dvou opakování)	68
Tabulka č. 8 – Výsledné hodnoty při třetím měření barvy jednotlivých vzorků medů (průměr ze dvou opakování)	68
Obr. č. 1 – Květový med (vzorek č. 3).....	43
Obr. č. 2 – Medovicový med (vzorek č. 7).....	42
Obr. č. 3 – Petriho misky připravené k inokulaci	43
Obr. č. 4 – Počítání typických kolonií.....	46
Obr. č. 5 – Pravoúhlé a cylindrické souřadnice CIELAB prostoru (Vik, 1999).....	48
Obr. č. 6 – Spektrofotometr Konica Minolta CM-3500d	48
Obr. č. 7 – Petriho miska s nárůstem CPM ve druhé analýze u vzorku č. 9	54
Obr. č. 8 – Graf vývoje CPM u květových medů v závislosti na čase	54
Obr. č. 9 – Graf vývoje CPM u medovicových medů v závislosti na čase	55
Obr. č. 10 – Srovnání průměrného počtu CPM mezi květovými a medovicovými medy v průběhu skladování.....	55
Obr. č. 11 – Petriho miska s nárůstem aerobních sporotvorných bakterií ve druhé analýze u vzorku č. 9.....	57
Obr. č. 12 – Graf vývoje počtů aerobních sporotvorných bakterií u květových medů v závislosti na čase	57

Obr. č. 13 – Graf vývoje počtů aerobních sporotvorných bakterií u medovicových medů v závislosti na čase	58
Obr. č. 14 – Srovnání průměrného počtu SPA v závislosti na čase mezi květovými a medovicovými medy	59
Obr. č. 15 – Petriho miska s nárůstem kvasinek a plísní v první analýze u vzorku č. 4 .	60
Obr. č. 16 – Graf vývoje počtů kvasinek u květových medů v závislosti na čase	60
Obr. č. 17 – Graf vývoje počtů kvasinek u medovicových medů v závislosti na čase ...	61
Obr. č. 18 – Srovnání průměrného počtu kvasinek mezi květovými a medovicovými medy v závislosti na čase.....	61
Obr. č. 19 – Petriho miska s nárůstem plísní a kvasinek v první analýze u vzorku č. 6 .	62
Obr. č. 20 – Graf vývoje počtů plísní u květových medů v závislosti na čase	63
Obr. č. 21 – Graf vývoje počtů plísní u medovicových medů v závislosti na čase	63
Obr. č. 22 – Srovnání průměrného počtu plísní mezi květovými a medovicovými medy v závislosti na čase	64
Obr. č. 23 – Graf vývoje počtů BMK u květových medů v závislosti na čase.....	65
Obr. č. 24 – Graf vývoje počtů BMK medovicových medů v závislosti na čase	66
Obr. č. 25 - Srovnání průměrného počtu BMK mezi květovými a medovicovými medy v závislosti na čase	66
Obr. č. 26 – Graf znázorňující změny L^* (D65) u květových medů v průběhu skladování.....	69
Obr. č. 27 – Graf znázorňující změny L^* (D65) u medovicových medů v průběhu skladování.....	69
Obr. č. 28 – Srovnání průměrné hodnoty L^* u květových a medovicových medů v průběhu skladování.....	70
Obr. č. 29 – Graf znázorňující změny a^* (D65) u květových medů v průběhu skladování	71
Obr. č. 30 – Graf znázorňující změny a^* (D65) u medovicových medů v průběhu skladování.....	71
Obr. č. 31 – Srovnání průměrné hodnoty a^* u květových a medovicových medů v průběhu skladování.....	72
Obr. č. 32 – Graf znázorňující změny b^* (D65) u květových medů v průběhu skladování	73

Obr. č. 33 – Graf znázorňující změny b^* (D65) u medovicových medů v průběhu skladování.....	73
Obr. č. 34 – Srovnání průměrné hodnoty b^* u květových a medovicových medů v průběhu skladování.....	74
Obr. č. 35 – Míra velikosti barevného rozdílu mezi předlohou a vzorky květových medů	75
Obr. č. 36 – Míra velikosti barevného rozdílu mezi předlohou a vzorky medovicových medů	75

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

a_w – vodní aktivita

BMK – bakterie mléčného kvašení

CMP – celkový počet mikroorganismů

CO₂ – oxid uhličitý

KTJ – kolonie tvořící jednotky

MRS – De Man, Rogosa a Sharpe

PCA – Place Count Agar

RV – relativní vlhkost vzduchu

SPA – sporotvorné aerobní bakterie

VRBL – Violet Red Bile Lactose Agar