

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Prodloužení doby úchovy vybraných čerstvých šťáv
pomocí rostlinných silic**

Diplomová práce

Bc. Tereza Gonová

Kvalita a zpracování zemědělských produktů

Ing. Matěj Božik, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci Prodloužení doby úchovy vybraných čerstvých šťáv pomocí rostlinných silic jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor(ka) uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24.7.2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Matěji Božikovi, Ph.D. za odborné vedení, podporu a čas, který mi při psaní této práce věnoval. Dále společnosti Fruitisimo Fresh s.r.o za poskytnutí šňáv k výzkumu. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat za psychickou podporu svému partnerovi Marku Kozelkovi a své rodině.

Prodloužení doby úchovy vybraných čerstvých šťáv pomocí rostlinných silic

Souhrn

Čerstvé ovocné a zeleninové šťávy obsahují mnoho zdravích prospěšných látek, a proto zájem o jejich konzumaci stoupá. Jelikož je doba úchovy čerstvých šťáv velmi krátká, průměrně kolem 3 dní, dochází u průmyslových výrobců šťáv i v gastronomických provozech k ekonomickým ztrátám. Současně mohou být neošetřené šťávy zdrojem přenosu patogenních bakterií nebo mykotoxinů a působit u lidí závažná zdravotní rizika.

Pasterace je nejpoužívanější metodou konzervace rostlinných šťáv, současně však při tomto ošetření dochází k velkým nutričním i organoleptickým ztrátám. Řešením tohoto problému jsou netepelné metody, ale vysoké pořizovací náklady těchto technologií mohou být pro výrobce překážkou. Alternativou by mohlo být ošetření šťáv přírodními antimikrobiálními látkami, jako jsou silice, které při vhodně zvolených koncentracích mohou prodloužit dobu úchovy, a zachovat nebo minimálně ovlivnit nutriční a sensorické vlastnosti šťáv.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda dokáží vybrané druhy silic inhibovat mikrobiální růst a prodloužit trvanlivost čerstvých šťáv. Dále provést sensorickou analýzu přijatelnosti koncentrací silic a zhodnotit možnost využití této metody v praxi.

Vybrány byly silice hřebíčkovce a voňatky o koncentraci 0,0064 % a kombinace těchto silic o koncentraci 0,005 %. Těmito silicemi byly ošetřeny jablečno-pomerančovo-mrkvové a celerovo-řepovo-mrkvové šťávy, následně byly spirálově zaočkovány na Petriho misky s kultivační půdou PCA a SDA, a inkubovány po dobu 48 hodin při 37 °C. Mikrobiologické rozbory byly provedeny v den ošetření a dále 3., 5. a 7. den.

U jablečno-pomerančovo-mrkvové šťávy byla nejefektivnější hřebíčková silice, jelikož 7. den od ošetření snížila celkový počet mikroorganismů na hodnotu 3,6 log₁₀ KTJ/ml. Současně byla hřebíčkovou silicí nejvíce potlačena přítomnost plísní a kvasinek. Oproti tomu u celerovo-řepovo-mrkvové šťávy byl 5. den od ošetření celkový počet mikroorganismů nejlépe inhibován na hodnotu 3,84 log₁₀ KTJ/ml kombinací hřebíčkové a voňatkové silice. Ačkoli plísně a kvasinky byly nejvíce zredukovány ošetřením silicí voňatky.

Z výsledků sensorické analýzy vyplývá, že jablečno-pomerančovo-mrkvová šťáva byla z hlediska příjemnosti barvy, vůně, chuti nejlépe hodnocena šťáva bez ošetření. Avšak z ošetřených vzorků byla na stupnici příjemnosti barvy a vůně nejvýše hodnocena šťáva ošetřená hřebíčkovou silicí, a na stupnici příjemnosti chuti šťáva ošetřená kombinací silic.

U celerovo-řepovo-mrkvové šťávy byla příjemnost barvy neošetřené a ošetřené šťávy hřebíčkovou silicí hodnocena velmi podobně. Příjemnost vůně a chuti byla u šťávy ošetřené hřebíčkovou silicí ohodnocena na stupnici výše než neošetřená šťáva.

Klíčová slova: silice, čerstvé šťávy, prodloužení trvanlivosti, sensorická analýza, konzervace

Shelf life extension of selected fresh juices with essential oils

Summary

Fresh fruit and vegetable juices can be excellent source of health-promoting substances, and therefore interest in their consumption has been increasing. The safe storage time of fresh juices is very short, on average around 3 days, because of this problem there are economic losses for industrial juice producers and in the food establishments. At the same time, untreated juices can be a source of transmission of pathogenic bacteria or mycotoxins and cause a serious health risks to humans. Pasteurization is the most used method of preserving fruit and vegetable juices, but at the same time this treatment causes large nutritional and organoleptic losses. The solution to this problem are non-thermal methods, but the high initial costs of these technologies can be an obstacle for juice producers. An alternative for this could be to treat juices with natural antimicrobials, such as essential oils, which can prolong the shelf life and maintain or minimally affect the nutritional and sensory properties at suitably selected concentrations, of the juices.

The diploma thesis is aimed at finding out which selected types of essential oils can inhibit microbial growth and extend the shelf life of fresh juices. Furthermore, to perform a sensory analysis of the acceptability of essential oil concentrations and evaluate the possibility of using this method in the industry. The essential oils that had been selected are clove and lemongrass with a concentrations of 0.0064 % and combination of these oils with a concentration of 0.005 %. Apple-orange-carrot and celery-beet-carrot juices were treated with these essential oils, then spirally inoculated onto Petri dishes with PCA and SDA culture medium, and incubated for 48 hours at 37 ° C. Microbiological analyzes were performed on the day of treatment and on the 3rd, 5th and 7th day.

Clove essential oil was the most effective for apple-orange-carrot juice, as it reduced the total number of microorganisms to 3.6 log₁₀ CFU/ml on day 7 after treatment. At the same time, the presence of molds and yeasts was most suppressed by clove essential oil. On the contrary, in celery-beet-carrot juice, on day 5 after treatment, the total number of microorganisms was best inhibited to 3.84 log₁₀ CFU/ml by a combination of clove and lemongrass essential oil. Although molds and yeasts in this juice had been most reduced by lemongrass essential oil.

The apple-orange-carrot juice had been evaluated as the best sample of juice without treatment in terms of pleasantness of color, smell, taste as the results of sensory analysis showed. However, of the treated samples, clove essential oil treated juice was evaluated the highest on the color and odor pleasantness scale, and juice treated with a combination of essential oils was evaluated the highest on the taste and aroma pleasantness scale. In the case of celery-beet-carrot juice, the pleasantness of the color of the untreated and treated juice with clove essential oil was evaluated very similarly. The pleasantness of the aroma and taste of the juice treated with clove essential oil was evaluated on a scale higher than the untreated juice.

Keywords: essential oils, fresh juices, extended shelf-life, sensory analysis, preservation

Obsah

1 Úvod	1
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3 Literární rešerše	3
3.1 Rostlinné šťávy ve výživě člověka	3
3.2 Negativní působení mikroorganismů v rostlinných šťávách	5
3.3 Pozitivní působení mikroorganismů v rostlinných šťávách	6
3.4 Metody konzervace rostlinných šťáv	6
3.4.1 Fyzikální metody konzervace	7
3.4.2 Chemické konzervační látky	13
3.4.3 Přírodní konzervační látky	14
3.4.3.1 Nisin	14
3.4.3.2 Laktoperoxidáza	14
3.4.3.3 Natamycin.....	15
3.4.3.4 Lysozym	15
3.4.3.5 Chitosin.....	15
3.5 Silice	16
3.5.1 Chemické složení silic	17
3.5.2 Využití silic v průmyslu.....	18
3.5.3 Princip antimikrobiální aktivity silic	19
3.5.4 Nanoenkapsulace silic.....	20
3.5.5 Silice skořicovníku cejlonského (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	21
3.5.6 Silice voňatky citronové (<i>Cymbopogon citratus</i>)	23
3.5.7 Silice tymiánu obecného (<i>Thymus vulgaris</i>) a dalších rodu <i>Thymus</i>	24
3.5.8 Silice hřebíčkovce kořeného (<i>Eugenia caryophyllata</i>).....	26
3.5.9 Silice citroníku limonového (<i>Citrus limon</i>)	27
4 Materiál a metody	29
4.1 Šťávy	29
4.2 Kultivační půdy	29
4.3 Silice	29
4.4 Mikrobiologické stanovení	29
4.5 Senzorické hodnocení	30
5 Výsledky	31
5.1 Výsledky mikrobiologického stanovení	31
5.1.1 Výsledky stanovení celkového počtu mikroorganismů	31
5.1.2 Výsledky stanovení kvasinek a plísní	32

5.2	Výsledky sensorického hodnocení	35
6	Diskuze	40
7	Závěr	44
8	Literatura.....	45
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	66

1 Úvod

Zájem spotřebitelů o čerstvé nebo minimálně zpracované potraviny poskytující zdraví prospěšné látky neustále roste. Mezi ně patří například rostlinné šťávy, které jsou bohatým zdrojem některých vitaminů a polyfenolů (Lima Tribst et al. 2009). Antioxidačními účinky vitaminů a polyfenolů jsou z těla odstraňovány volné radikály (hydroxylový radikál, superoxid) i látky podobných vlastností (singletový kyslík, peroxid vodíku a kyselina chlorná), které jsou častou příčinou chronických onemocnění, jako jsou srdeční choroby, kardiovaskulární onemocnění, diabetes a různé typy rakoviny (Halliwell 1996).

Ovocné a zeleninové šťávy, které nejsou ošetřeny konzervační metodou nebo neobsahují konzervační látky, mohou být během několika dní kontaminovány mikroorganismy, zejména plísněmi, kvasinkami a acidotolerantními bakteriemi. Protože je ovoce a zelenina vhodným substrátem pro růst těchto mikroorganismů, mohou v rostlinné šťávě produkovat nežádoucí sensorické změny chuti, vůně nebo barvy (Tournas et al. 2006). Kromě změn organoleptických vlastností může přítomnost některých mikroorganismů způsobit závažná zdravotní rizika, zejména patogenní bakterie a látky produkované plísněmi, tzv. mykotoxiny. Infekce z konzumace čerstvých šťáv, které jsou často doprovázeny průjmami a zvracením a mohou vést v několika případech i k úmrtí, jsou především způsobovány těmito patogeny: *Escherichia coli* sérovar O157:H7, *Salmonella* spp., *Cryptosporidium parvum* a *Listeria monocytogenes*, a mykotoxinem patulinem (Kalia & Gupta 2006).

Nejbežnější metodou konzervace šťáv, pasteurací, lze snadno prodloužit jejich trvanlivost a zajistit zdravotní bezpečnost. Zároveň však vede k nutričním, fyzikálně-chemickým a organoleptickým ztrátám (Esteve & Frígola 2007). Proto jsou v současné době využívány nové netepelné metody, jako je vysoký hydrostatický tlak a pulzní elektrické pole. I přesto, že z velké míry eliminují nedostatky pasteurace, vysoké pořizovací náklady jsou hlavní překážkou pro aplikaci v průmyslu. Řešením by mohlo být ošetření šťáv silicemi nebo jinými antimikrobiálními látkami, které působí proti širokému spektru mikroorganismů (Gómez et al. 2011).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem této práce je otestovat účinnost vybraných druhů rostlinných silic za účelem prodloužení trvanlivosti čerstvých šťáv. Dalším cílem je i sensorická analýza přijatelnosti koncentrací silic a zhodnocení možnosti využití této metody v praxi.

Hypotéza:

Pomocí různých druhů rostlinných silic lze prodloužit trvanlivost čerstvých šťáv a současně zachovat nebo zlepšit sensorické vlastnosti.

3 Literární rešerše

3.1 Rostlinné šťávy ve výživě člověka

Konzumace ovocných a zeleninových šťáv je v poslední době velmi populární, zvláště těch čerstvých, s minimálním tepelným ošetřením. Podle Světové zdravotnické organizace by měl být denní příjem tvořen 2 porcemi ovoce a 5 porcemi zeleniny, jelikož představují bohatý zdroj vitaminů, minerálních látek a několika biologicky aktivních látek (WHO 2003; Li et al. 2014).

Mezi nejznámější vitaminy obsažené v ovoci a zelenině patří **vitamin C**. Vitamin C je vysoce biologicky dostupný a je jedním z nejdůležitějších antioxidantů rozpustných ve vodě. Hlavním zdrojem vitaminu C ze skupiny ovoce jsou citrusové plody, jahody, ananas nebo mango. Ze zeleniny vykazují nejvyšší obsah vitaminu C papriky a brokolice (Leong & Oey 2012).

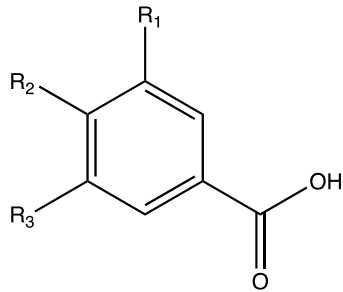
Působením vitaminu C jsou účinně odstraňovány volné radikály (hydroxylový radikál, superoxid) i látky podobných vlastností (singletový kyslík, peroxid vodíku a kyselina chlorná), které jsou častou příčinou srdečních onemocnění a různých typů rakoviny (Halliwell 1996). Některé vnější vlivy mohou toto pozitivní působení degradovat. Ve studii El-Ishaq & Obrinakem (2015) byl zkoumán vliv teploty při ošetření ovocných šťáv, přičemž platí, že čím je teplota záhřevu nižší, tím je obsah vitaminu C lépe zachován. Dle Johnson et al. (2013) také souvisí obsah vitaminu C s dobou skladování, čím je doba od dne výroby delší, tím více dochází ke snižování tohoto vitaminu.

Další skupinou nutričně významných látek jsou **polyfenoly**. Tyto sekundární metabolity rostlin můžeme rozdělit do různých skupin podle počtu fenolových kruhů a na základě strukturních prvků, které jsou v kruzích vázány: fenolické kyseliny, flavonoidy, stilbeny, taniny a lignany (Pandey & Rizvi 2009). Chemické struktury jsou uvedeny na obrázku 1. Složení polyfenolových látek daného ovoce nebo zeleniny se liší v závislosti na druhu, genetickém rodokmenu, podmínkách pěstování a posklizňovém procesu. Tmavě zbarvené ovoce obsahuje anthokyany, flavonoly a flavan-3-oly. Konkrétně byly vysoké obsahy zjištěny v borůvkách, černém rybízu nebo v modrých a červených hroznech. Zatímco citrusové plody jsou nejznámější pro přítomnost flavanonů (Tiwari & Cummins 2013).

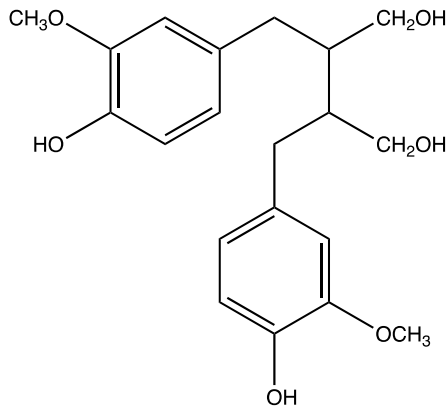
Při každodenní konzumaci (750 ml/den) ovocné šťávy s vysokým podílem flavonoidů byla významně snížena hladina LDL a celkového cholesterolu již během prvního týdne studie. Současně byla potvrzena lepší integrita DNA, která souvisí s pohlavní neplodností nebo neurologickými chorobami (Bakuradze et al. 2019). Příjem šťáv z citrusových plodů je spojen s pozitivními účinky na výkonné funkce a paměť, zejména pak pomerančová šťáva bohatá na hesperidin a grapefruitová šťáva bohatá na naringin zmírňuje pokles kognitivních funkcí u staších osob (Cancalon 2016). Kromě ovoce a zeleniny je hlavním zdrojem polyfenolů ve stravě káva a čaj. Káva především obsahuje kyselinu chlorogenovou, zatímco v čaji se nejvíce nachází katechiny (Ferruzzi 2010).

Glukosinoláty jsou sírné glykosidy, které se při mechanickém porušení (krájení, drcení) rostlinného pletiva, enzymovou hydrolýzou katalyzovanou myrosinase, rozkládají za vzniku isothiokyanátů a nitrilů. Isothiokyanáty jsou látky s ostrým aroma a pálivou chutí (Fahey et al. 2001). Studií bylo zjištěno, že rostliny z čeledi brukvovitých (brokolice, kapusta, zelí), které

obsahují isothiokyanáty, vykazují silnou ochranu proti vzniku rakoviny plic a rakoviny zažívacího traktu. Nejvýznamnějším isothiokyanátem je sulforafan, u kterého jsou prokázány antikarcinogenní účinky (Steinmetz et Potter 1996).

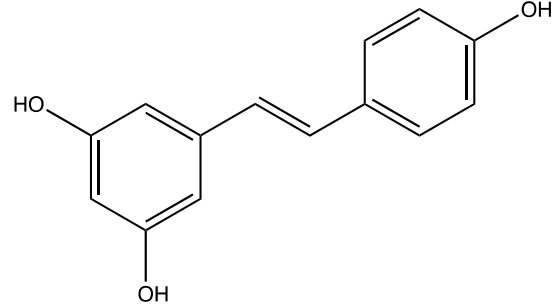


Fenolické kyseliny



Lignany

Flavonoidy



Stilbeny

Obrázek 1: Různé skupiny polyfenolů a jejich chemické stuktury. Převzato a přeloženo z: (Li et al. 2014).

Také u skupiny **karotenoidů**, což jsou pigmenty přirozeně se vyskytující ve většině druhů ovoce a zeleniny, rostlin, řas a fotosyntetických bakterií, byly zkoumány protektivní účinky proti oxidativnímu poškození buňky. Nejvýznamějším zástupcem karotenoidů je β -karoten, který se spolu s α -karotenem nachází především v ovoci a zelenině žluté, oranžové nebo červené barvy. Například v dýni, mrkvi a mangu. Vyšší obsahy karotenoidů luteinu a zeaxanthinu můžeme nalézt ve špenátu a brokolici. Karotenoid lykopen je primárně získáván z rajčat, zatímco β -kryptoxanthin z jablek (Bidlack et al. 2000; Eggersdorfer & Wyss 2018).

Vyšší aktivita oproti β -karotenu k potlačení tumorigeneze v kůži, plicích, játrech a tlustém střevě byla pozorována u α -karotenu (Rowles & Erdman 2020). Současně oba tyto karoteny plní funkci provitaminu A. Jelikož se makulární pigment v oku tvoří luteinem a zeaxanthinem, lze pravidelným příjmem těchto látek předejít očním chorobám, jako je katarakta nebo makulární degenerace (Eggersdorfer & Wyss 2018).

Ovoce a zelenina jsou také významným zdrojem **vlákniny**. Vlákninu můžeme rozdělit do dvou skupin na základě její rozpustnosti ve vodě na: rozpustnou a nerozpustnou. Rozpustná vláknina známá také jako fermentovatelná, je zastoupena v ovoci a zelenině pektinem, jehož nejvyšší množství nalezneme v jablkách, citrusových plodech a brokolici. Lignin, celulóza a hemicelulóza tvoří většinu vlákniny nerozpustné, která je především v mrkvi a celeru (Maphosa & Jideani 2016). Jelikož vlákninu nalezneme zejména ve slupkách a dužině, jsou vhodným zdrojem šťávy s dužinou tzv. smoothies. Na rozdíl od šťáv lisovaných, kde je obsah vlákniny velmi nízký (Ruxton 2008).

Příjem vlákniny je spojen se sníženým rizikem kardiovaskulárních chorob, diabetu mellitu 2. typu a některých forem rakoviny (Dahl et al. 2017). Ve studii Henning et al. (2017) byla třídní dieta ovocno-zeleninových šťáv s dužinou podávána dospělým osobám, čtvrtý den měření byl pozorován výrazný pokles kmenů bakterií *Firmicutes* a *Proteobacteria*, a naopak nárůst kmenů *Bacteroidetes* a *Cyanobacteria*.

3.2 Negativní působení mikroorganismů v rostlinných šťávách

Ovocné a zeleninové šťávy obsahují mikroflóru, která je běžně přítomna na povrchu plodů během růstu, sklizně a dále při posklizňovém zpracování (doprava, skladování, mytí, výroba). Přítomnost mikroorganismů ve šťávách je ovlivňována těmito kritickými faktory: pH, vodní aktivitou, oxidačně-redukčním potenciálem, využitelností živin, přítomností antimikrobiálních látek a konkurenční mikroflórou (ICMSF 2005; Lawlor et al. 2009).

Degradace šťáv se projevuje vznikem nebo ztrátou zákalu, vznikem nepříjemných chutí, oxidu uhličitého a změnami barvy nebo textury. Kromě organoleptických změn mohou po konzumaci nastat závažná zdravotní rizika (přítomností mykotoxinů nebo patogenních bakterií). Současně tyto nežádoucí změny vedou k ekonomickým ztrátám, a z tohoto důvodu jsou k zamezení mikrobiálního růstu využívány různé metody konzervace (Lawlor et al. 2009).

Zdrojem znehodnocení šťáv je shnilé nebo padané ovoce, na kterém se mohou nacházet patogenní bakterie (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Cryptosporidium parvum*, *Listeria monocytogenes*), kvasinky (*Zygosaccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*), plísňe (*Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Botrytis* sp., *Aureobasidium pullulans*) nebo mykotoxiny (Vasavada 2003).

Vzhledem k tomu, že jsou patogenní bakterie schopny růstu při teplotě do 45 °C, jsou lidské infekce spojeny se spotřebou čerstvě krájeného ovoce a nepasterovaných šťáv. Počty těchto infekcí způsobující průjemy a zvracení (v několika případech končí smrtí) byly v posledních dvou desetiletích několikanásobně zvýšeny, a to především v rozvojových zemích, jako je Indie (Titarmare et al. 2009; Salomão 2018).

Patulin je mykotoxin produkován některými druhy plísňí rodů: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* a *Byssosclamyces* (Cole & Cox 1981). Druhem *Penicillium expansum* jsou především infikována jablka a hrušky, jiné druhy produkující patulin byly detekovány i např. u broskví, meruněk, hroznového vína, třešní a dalších drobných bobulovin (Cheraghali et al. 2005; Larsen et al. 1998).

Ve studii Welke et al. (2009) bylo hlášeno, že patulin je mutagenní, dále byly u hlodavců potvrzeny imunotoxické, genotoxické, neurotoxické a gastrointestinální účinky. Existují však obavy, že podobné účinky by se při dlouhodobější konzumaci potravin a nápojů mohly objevit

i u člověka (Murillo-Arbizu et al. 2009). Proto byl Evropskou unií a organizací WHO zaveden v ovocných šťávách maximální obsah patulinu 50 µg/kg (WHO 1995; Nařízení komise (ES) č. 1881/2006). Mezi další mykotoxiny, které mohou být přítomny v rostlinných šťávách patří: ochratoxin A, citrinin a kyselina penicilinová (Foster & Purnendu 2003).

Ovocné šťávy jsou kvůli svým vlastnostem (nízké pH, vysoký podíl cukrů) ideálním prostředím pro život kvasinek. Přítomnost kvasinek způsobí přirozenou fermentaci produktu, což je u šťáv nežádoucí (Fleet 2003). V některých případech je fermentace natolik intenzivní, že může dojít k poškození obalových materiálů, ve kterých jsou šťávy baleny (Ashurst 2016).

3.3 Pozitivní působení mikroorganismů v rostlinných šťávách

Nevšechny bakterie konzumované lidmi musí být zdraví škodlivé, existuje celá řada zdraví prospěšných bakterií, které označujeme jako probiotické nebo také jako probiotika. Mezi nejznámější z nich patří rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Přirozeně se vyskytují v jogurtech a dalších fermentovaných mléčných výrobcích. Ale i ovocné a zeleninové šťávy mohou sloužit jako vhodná nosná média (Fonteles et al. 2011). Pravidelná konzumace probiotických mikroorganismů zajišťuje správnou funkci střev a stimulaci imunitního systému (Ouwehand & Salminen 1998). Zajímavou skutečností je, že se ve střevech nachází až 80 % imunitních buněk lidského těla (Abbas et al. 2017).

Jedním z pokusů bylo obohacení ananasové šťávy o *Lactobacillus casei* B-442. Při skladování v chladu byla doba trvanlivosti 21 dní s počtem laktobacilů 6,03 log₁₀ KTJ/ml a sensoricky byla konzumenty velmi dobře přijata (Costa et al. 2013). Kvasinky několika rodů a druhů jsou schopny převádět sacharidy na ethanol a oxid uhličitý, tento biochemický proces je známý jako alkoholové kvašení, které je žádoucí v případě výroby vína a dalších ovocných vín (např. cider). Především se jedná o kvasinku *Saccharomyces cerevisiae*, která je kromě vína využívána v pivovarském a pekárenském průmyslu (Albergaria & Arneborg 2016; Fleet 2003).

3.4 Metody konzervace rostlinných šťáv

Již po třech dnech skladování při teplotě 0 – 5 °C se celková mikrobiální kontaminace u čerstvých šťáv (tzv. fresh šťáv) většinou pohybuje od 3 do 5 log₁₀ KTJ/ml (kolonie tvořící jednotky). Především se jedná o přítomnost kvasinek a bakterií mléčného kvašení, které produkují nežádoucí chuť a aroma fermentace (Ashurst 2016). V původní vyhlášce č. 132/2004 Sb. (zrušena v roce 2006) byla u čerstvých ovocných a zeleninových šťáv přípustná hodnota celkového počtu mikroorganismů (CPM) 10⁶. V současné době podle nařízení komise EU 2073/2005 není maximální CPM regulován a platí pouze limity pro *E. coli* a *Salmonellu*. V pěti testovaných vzorcích (25 g) musí být nulová přítomnost bakterie *Salmonella*. Pro *E. coli* je stanoven limit 100 KTJ/g u pěti vyšetřovaných vzorků, a zároveň může být 1000 KTJ/g u dvou vzorků z pěti (Vyhláška č. 132/2004 Sb.; Nařízení komise (EU) č. 2073/2005).

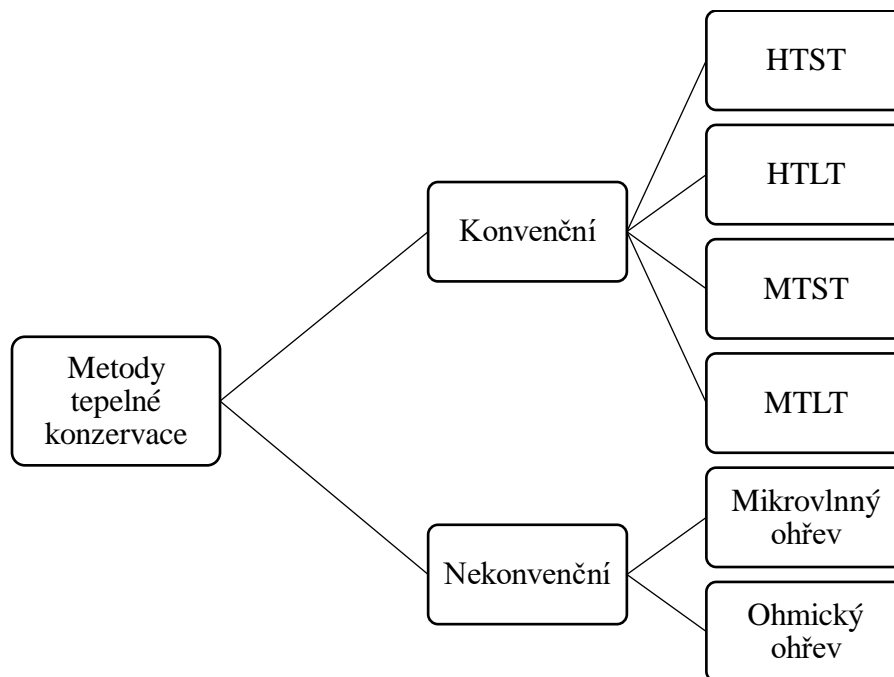
Obvykle je konzervace ovocných a zeleninových šťáv primárně prováděna pasterací, kterou jsou degradovány nutriční a sensorické vlastnosti. Oproti tomu nevýhodou čerstvých šťáv je, že během skladování dochází k rychlé mikrobiální zkáze, což často vede k velkým ekonomickým ztrátám v průmyslu. Proto vědci provádějí studie s cílem nalézt a uplatnit v praxi

nové konzervační techniky, jako jsou mikrovlnný a ohmický ohřev, přírodní antimikrobiální látky, pulzní elektrické pole, vysoký hydrostatický tlak, vysokotlaká homogenizace, ultrafialové záření, a ultrazvuk kterými jsou zachovány původní vlastnosti čerstvé šťávy (Lima Tribst et al. 2009)

3.4.1 Fyzikální metody konzervace

Metody tepelné konzervace

Tepelná ošetření se rozdělují do dvou skupin: konvenční a nekonvenční, a dále do šesti podskupin, viz Obrázek 2 (Petruzzi et al. 2017).



Obrázek 2: Metody tepelné konzervace. Převzato a přeloženo z: (Petruzzi et al. 2017).

- ***Konvenční tepelná ošetření***

Tepelné konvenční metody, známé také jako pasterace se mohou dle Petruzzi et al. (2017) rozřadit do čtyř podskupin dle délky záhřevu a doby působení:

- Ošetření vyšší teplotou po krátkou dobu (HTST), $\geq 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\leq 30\text{ s}$
- Ošetření vyšší teplotou po dlouhou dobu (HTLT), $\geq 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $> 30\text{ s}$
- Ošetření nižší teplotou po krátkou dobu (MTST), $< 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\leq 30\text{ s}$
- Ošetření nižší teplotou po dlouhou dobu (MTLT), $< 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $> 30\text{ s}$

- Ošetření vyšší teplotou po krátkou dobu (HTST)

Ke konzervaci rostlinných šťáv je HTST aplikováno častěji než MTLT a MTST, ale současně méně než HTLT (Miller & Silva 2012; Koutchma et al. 2016). Konkrétně pro pomerančovou šťávu jsou používány teploty v rozmezí 90 – 99 °C a čase 1 – 30 s (Braddock 1999). Ve studii Tiwari et al. (2009a) byla část pomerančové šťávy ošetřena teplotou 98 °C, po dobu 21 s a část působením ultrazvuku (US), dále byl sledován obsah vitamínu C v průběhu

skladování. Vzhledem k tomu, že je kyselina askorbová termolabilní, bylo množství zredukováno o 67 % u HTST a pouze o 5 % u US, po 30 dnech skladování.

b) Ošetření vyšší teplotou po dlouhou dobu (HTLT)

Vystavení vysokým teplotám může vést ke zvýšení propustnosti buněčné membrány a po delší době působení k buněčné smrti. Pokud je pH vyšší než 4,5 je požadováno silnější ošetření k dosažení žádoucí trvanlivosti, která odpovídá 90 dnům (Gonzalez & Barrett 2010). Saeeduddin et al. (2015) uvádí, že záhřátím hruškové šťávy teplotou 95 °C, 2 min bylo docíleno úplné inaktivace mikroorganismů a enzymů, konkrétně polyfenoloxidas (PPO), peroxidasy (POD), pektinmethylesterasy (PME). Aktivita těchto enzymů způsobuje nežádoucí změny sensorických vlastností a výživových hodnot produktů (Miller & Silva 2012). PPO je enzym zodpovědný za hnědnutí a degradaci anthokyanů a dalších polyfenolů. POD se účastní několika metabolických procesů rostlin (např. lignifikace buněčné stěny a hnědnutí. PME se podílí na rozkladu pektinu a dalších součástí buněčné stěny, což vede k produktu se sníženou viskozitou a nežádoucími organoleptickými vlastnostmi (Marszałek et al. 2016).

Negativem HTLT ošetření jsou vysoké ztráty kyseliny askorbové, celkový obsah fenolických látek, flavonoidů a antioxidační kapacity. Kombinace US a HTLT při 65 °C po dobu 10 minut ukázala nejlepší výsledky v zachování kyseliny askorbové a polyfenolových látek; současně byla zaznamenána významná redukce aktivity enzymů a úplná inaktivace mikroorganismů (Saeeduddin et al. 2015).

c) Ošetření nižší teplotou po krátkou dobu (MTST)

I přesto, že je tato metoda šetrnější než ostatní tepelné metody, mohou být fyzikálně-chemické, sensorické a nutriční vlastnosti šťáv rovněž negativně ovlivňovány (Ağçam et al. 2017). Například obsah polyfenolických látek byl během skladování (28 dní) po MTST snížen o 20 % (Queirós et al. 2015). Při porovnání MTST a MTLT u šťávy z granátového jablka, jsou mikroorganismy pomocí MTLT redukovány ve větší míře. K úplné eliminaci došlo po ošetření HTST (Mena et al. 2013).

d) Ošetření nižší teplotou po dlouhou dobu (MTLT)

V posledních letech je MTLT ošetření zkoumáno za účelem prodloužení trvanlivosti minimálně zpracovaných produktů (Petruzzi et al. 2017). Studie Saeeduddin et al. (2015) dokládá, že pokud je šťáva ošetřena HTLT je kompletně potlačena aktivita enzymů PPO, POD a PME; zatímco ošetřením MTLT se sníží aktivita těchto enzymů pouze na polovinu.

Rovněž bylo potvrzeno, že při působení teploty 65 °C po 10 minut nebylo dosaženo úplné inaktivace mikroorganismů ve srovnání s HTLT. V případě kombinace MTLT s působením US byla pozorována nulová přítomnost mikroorganismů a pouze minimální aktivita (do 5 %) enzymů, zároveň byl výrazně lépe zachován obsah kyseliny askorbové a polyfenolů oproti HTLT (Saeeduddin et al. 2015).

- ***Nekonvenční tepelná ošetření***

Nové tepelné technologie, jako je mikrovlnný a ohmický ohřev, jsou zkoumány jako alternativní řešení konvečních tepelných ošetření (Jiménez-Sánchez et al. 2017).

- a) Mikrovlnný ohřev (MWH)

Princip MWH spočívá ve schopnosti materiálu absorbovat mikrovlnnou energii a přeměnit ji na tepelnou. Přítomnost vlhkosti nebo vody v potravine způsobuje dielektrické zahřívání, vzhledem k dipolární povaze vody (Datta & Davidson 2000). Saikia et al. (2015) uvádí, že zachování nebo zvýšení obsahu fenolických látek po ošetření MWH závisí na druhu ovoce. Například u šťávy z vodního melounu byl zaznamenán trojnásobný nárůst původního obsahu po MWH (600 W); kdežto po působení US se zvýšil pouze 1,5 x. Zatímco u šťávy z liči obsah poklesl o 20 % po MWH a po aplikaci US vzrostl o 23 %.

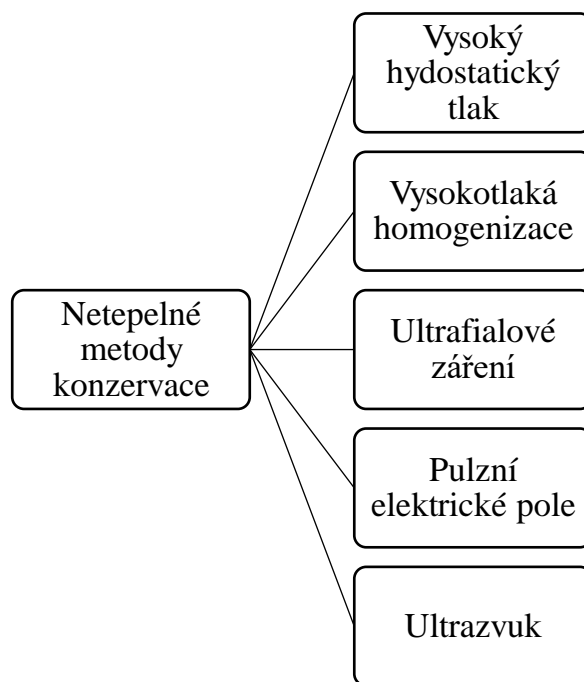
- b) Ohmický (odporový) ohřev (OH)

OH je založen na průchodu střídavého proudu potravinou, pomocí něhož je vytvářeno vnitřní teplo v důsledku elektrického odporu jednotlivých složek potraviny (Reznick 1996). Výhodou této metody je vysoká rychlost záhřevu (rovnoměrná v celém objemu produktu), díky tomu poskytuje příznivé účinky na nutriční a organoleptické vlastnosti. Dále bylo potvrzeno, že významným parametrem inaktivace mikroorganismů je tepelný účinek, ať už se jedná o pasteraci nebo ohmický ohřev (Leizerson Shimoni 2005). Faktor, který je třeba vzít v úvahu při aplikaci OH ke konzervaci rostlinných šťáv je typ elektrody. Při použití Cu/Cu i Cu/Al elektrod by mohlo dojít k takové elektrolýze, že by kovy mohly vstupovat do roztoku šťávy, čímž by se stal produkt nebezpečným pro konzumaci. Doporučovány jsou elektrody pokovené platinou nebo titanem (Onwuka & Ejikeme 2005).

Metody netepelné konzervace

Jak bylo již zmíněno výše, konvenčním tepelným ošetřením může dojít ke ztrátě některých senzorických (textura, aroma, barva, chuť) a nutričních vlastností (vitaminy, fytochemikálie) šťáv. Z tohoto důvodu začaly být zkoumány nové fyzikální metody, které jsou souhrnně klasifikovány jako netepelná ošetření, i přesto, že u některých z nich dochází k tvorbě tepla během procesu jejich užívání (Gonzalez & Barrett 2010).

Mezi netepelná ošetření, která by mohly být potenciálně využívány ke konzervaci rostlinných šťáv jsou: vysoký hydrostatický tlak (HHP), vysokotlaká homogenizace (HPH), ultrafialové záření (UV), pulzní elektrické pole (PEF) a ultrazvuk (US), viz Obrázek 3. Tyto metody umožňují zachovat všechny vlastnosti čerstvých rostlinných šťáv a současně prodloužit dobu trvanlivosti. Vzhledem k tomu, že jsou pořizovací náklady vysoké, je zastoupení těchto netepelných metod, ve srovnání s aplikací pasterace, ještě poměrně malé (Vasanth Rupasinghe & Juan Yu 2012).



Obrázek 3: Neteplné metody konzervace (Bevilacqua et al. 2017).

a) Vysoký hydrostatický tlak (HHP)

HHP je pravděpodobně nejvíce rozšířená neteplná metoda aplikovaná v potravinářském průmyslu. Je prokázáno, že pomocí HHP je dosaženo požadavku FDA na redukcii 5 log₁₀ patogenních mikroorganismů, a to již během několika minut působení. I při době trvanlivosti 30 až 45 dní, je možné zachovat nutriční a sensorické vlastnosti čerstvého produktu, u kterého běžně dochází ke kažení po 3 dnech (San Martín et al. 2002; Bello et al. 2014). Kromě toho je tento proces šetrný k životnímu prostředí a nevznikají žádné vedlejší produkty (Ramaswamy et al. 2005). „V České republice je technologie v současné době využívána dvěma výrobci: akciovou společností Kofola – šťávy UGO a Beskyd Fryčovice – šťávy REFIT“ (Vondráčková & Houška 2017).

Rozsah HHP se pohybuje mezi 100 až 900 MPa, přičemž ke konzervaci šťáv je v komerční sféře používán tlak od 400 do 700 MPa (San Martín et al. 2002). Mezi potraviny ošetřené HHP dostupných na trhu patří například: ovocné džemy, rostlinné šťávy, omáčky, dochucovadla, guacamole, maso, šunka a další masné výrobky. Během aplikace tlaku se může teplota potraviny zvýšit o 3 až 9 °C/100 MPa (v závislosti na složení produktu), což nepoškozuje termolabilní látky, jako je vitamin C a sulforafan (Patterson 2005; McKay et al. 2011).

Sulforafan je jedním z nejvýznamnějších isothiokyanátů a nachází se především v brukvovité zelenině. Experimentální studie potvrdily, že zvýšená konzumace sulforafanu má protektivní účinek proti několika typům rakoviny (Fahey et al. 2001). Obsah sulforafanu při zahřátí šťávy, vyrobené z brukvovité zeleniny, na teplotu vyšší než 60 °C výrazně klesá. Výsledky studie ukázaly, že při ošetření šťávy paskalizací zůstává obsah této biologicky aktivní látky nezměněn (Totušek et al. 2011).

Podle Rao et al. (2014) mohou být za určitých podmínek HHP ošetřením zcela inaktivovány enzymy PPO a PME. Oproti tomu, když chceme potlačit aktivitu

mikroorganismů, jsou vyžadovány vyšší hodnoty tlaku. U broskvové šťávy byla po HHP (600 MPa, 25 min) reziduální aktivita (RA) enzymu PPO 18 %, kdežto u PME se snížila RA pouze na 49 %. Ve výzkumu Boulekou et al. (2010) bylo zjištěno, že je k úplné inaktivaci PME nezbytné působení tlaku 800 MPa a teploty 70 °C, 90 s.

b) Vysokotlaká homogenizace (HPH)

Princip mechanismu HPH spočívá v protlačování kapaliny úzkými otvory za vysokého tlaku. Konzervační účinek HPH závisí na mnoha parametrech, jako je tlak, teplota, počet otvorů a druh šťávy (Vasanth Rupasinghe et al. 2012). Leite et al. (2015) uvedli, že každá rostlinná buněčná stěna měla při ošetření HPH odlišné chování. Zatímco mrkvová tkáň je porušena až při velmi vysokém tlaku, u rajčatové tkáně může dojít k výraznému poškození již při nižších hodnotách. Vzhledem k tomu, je potřeba porozumět odlišným procesům u různých druhů šťáv. Pro tyto účely byla nedávno navržena nukleární magnetická rezonance (NMR) (Betoret et al. 2017).

Mezi vzorky čerstvé a HPH (200 MPa) ošetřené pomerančové šťávy nebyly zaznamenány žádné významné rozdíly v celkovém obsahu polyfenolů a antioxidační aktivitě. Po HTLT (90 °C, 1 min) se tyto parametry významně snížily. Navíc u vzorků po HPH (200 a 300 MPa) byl obsah hesperidinu dvojnásobně vyšší než v čerstvé šťávě (Velázquez-Estrada et al. 2013).

Hesperidin je flavanon, vyskytující se v citrusových plodech. V několika studiích u něj byly prokázány kardioprotektivní, neuroprotektivní a chemopreventivní účinky (Hwang et al. 2012).

c) Ultrafialové záření (UV)

UV je již dlouhou dobu využíváno k dezinfekci vody a sterilaci povrchů (například prostory aseptického balení potravin). Také čerstvost rostlinných šťáv by mohla být prodloužena působením germicidní lampy, která vyzařuje UV s vlnovou délkou 254 nm (Murakami et al. 2006; Keyser et al. 2008). Tato vlnová délka vede k nejúčinnějšímu letálnímu efektu mikroorganismů tím, že je jejich DNA poškozena. Působením viditelného světla (370-730 nm) může však dojít k fotoreaktivaci, kdy je poškozená DNA opravena pomocí proteinových faktorů (Yajima et al. 1995; Murakami et al. 2006). Použitím lahví tmavší barvy nebo tzv. vaku v krabici (bag in box) by se dalo tomuto jevu vyvarovat (Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas 2004).

Výhodami UV ošetření v porovnání s pasterací jsou nízké provozní náklady a lépe zachované senzorycké vlastnosti čerstvé šťávy (Keyser et al. 2008). Obtížná aplikace UV záření nastává u šťáv s vysokým množstvím pevných suspendovaných látek (např. pomerančová s dužinou) kvůli jejich nízké propustnosti, a tím vyšší odolnosti mikroorganismů (Akgün & Ünlütürk 2017). Oteiza et al. (2010) uvedli, že absorpční koeficient UV se zvyšuje s rostoucí koncentrací kvasinek, naopak k inaktivaci bakterií jsou nutné vyšší dávky UV.

Některé nutriční látky jsou velmi citlivé na UV záření. Mezi možné nežádoucí účinky UV patří poškození vitaminů, destrukce antioxidantů a oxidace lipidů (Koutchma et al. 2009). U mrkvové šťávy byly provedeny testy, které ukázaly destrukci obsahu β -karotenu o 50 %,

vitaminu C a A o 16 % a 11 %. Současně během zpracování šťávy UV nastaly změny barvy a tvorba nežádoucí chuti a aroma (Anonymous 1999).

d) Pulzní elektrické pole (PEF)

Ošetření PEF je založeno na krátkých impulzech vysokého napětí, které je vytvořeno mezi dvěma elektrodami. Obvykle se pohybuje v rozmezí 20-80 kV po dobu několika mikrosekund (Knorr et al. 1994).

Mechanismus potlačení růstu mikroorganismů pomocí PEF je vysvětlen několika teoriemi. Jedna z nejvíce přijímaných teorií je spojena s elektroporací buněčných membrán. PEF vede ke zvýšené permeabilitě membrán mikrobiálních a rostlinných buněk, čímž jsou vytvořeny ireverzibilní póry ve struktuře lipidové membrány (Raso & Barbosa-Canovas 2003).

Díky krátké době působení PEF při pokojové teplotě se mohou zachovat původní senzorycké a nutriční vlastnosti čerstvé šťávy (Toepfl et al. 2006). Ve studii Esteve & Frigola (2008) byl pozorován vliv PEF na obsah vitaminu C ve šťávě a bylo zjištěno, že po ošetření PEF se retence vitaminu C pohybovala mezi 87-98 %, v závislosti na délce působení PEF a intenzitě elektrického pole. Po aplikaci tepelného ošetření (90 °C, 1 min) byla retence vitaminu C pouze 82 %. Dále bylo prokázáno, že retence vitaminu C byla vyšší při bipolárních impulzech.

Zajištění mikrobiální kvality působením PEF bylo zkoumáno u jahodové, pomerančové, jablečné, hruškové a rajčatové šťávy. Šťáva z jahod a pomerančů nevykazovala žádný mikrobiální růst po 91 dnů, pokud byla skladována při teplotě 5 °C. U šťávy jablečné, hruškové a rajčatové byla doba trvanlivosti nižší; konkrétně 27, 37 a 44 dní (Mosqueda-melgar et al. 2011). Důvodem může být klíčení přežívajících spor během doby skladování, jelikož samotné působení PEF neúčinně inaktivuje bakteriální spory a askospory plísní (Raso et al. 1998).

e) Ultrazvuk (US)

US je mechanické vlnění pohybující se vyšší frekvencí než 20 kHz a je využíván v různých oblastech včetně zpracování a analýzy potravin (Demirdöven & Baysal 2009). Antimikrobiální účinky US spočívají v tom, že ultrazvukové vlny se šíří jako série kompresí a prořídnutí molekul kapaliny, za současného vzniku bublin (kavit). Touto skutečností se vytvoří nepravidelné pole, kavity jsou nestabilní a následně kolabují, což vede k lokálnímu vzniku vysokých teplot a tlaku, které poškozují DNA mikroorganismů (Vasanth Rupasinghe & Juan Yu 2012).

Samotné působení US však nestačí k úplné inaktivaci mikroorganismů a je třeba US kombinovat s další konzervační metodou, jako je HHP (manosonikace), UV, HTLT (termosonikace) nebo spolu s antimikrobiálními látkami (Saeeduddin et al. 2015; Wang et al. 2020). Obdobně jako u UV, tak i u US nastává problém u šťáv s vyšší viskozitou tím, že se významně snižuje stupeň kavitace (Patil et al. 2009). Souvislé ošetření US+UV mangové šťávy vedlo k úplné sterilizaci patogenních mikroorganismů během 10 min (Wang et al. 2020).

Tiwari et al. (2009b) uvádí, že aktivita enzymu PME v pomerančové šťávě byla po ošetření US (frekvence 20 kHz, 20 min) byla snížena na 38 %. V jiné studii byla také zkoumána činnost enzymu PME v pomerančové šťávě, ovšem spolu s působením US (frekvence 24 kHz;

9,8 min) bylo aplikováno zahřátí na 63 °C. Vzhledem k nepatrně vyšší frekvenci i synergickému efektu US a tepla, byla zvýšena kavitační rychlost, která vedla k potlačení aktivity enzymu PME na 8 % (Koshani et al. 2015).

Výhodou US metody oproti konvenčním metodám konzervace je snadná obsluha, menší spotřeba energie a vody, krátká doba zpracování a výborné zachování nutričních charakteristik i senzoryckého profilu dané šťávy (Rastogi 2011). Abid et al. (2013) potvrdili nárůst vitamínu C po US o 35 % ve srovnání s neošetřenou jablečnou šťávou. Rovněž bylo zaznamenáno zvýšení obsahu polyfenolických látek o 30 %.

3.4.2 Chemické konzervační látky

Vhodné chemické látky jsou využívány jako aditiva s cílem prodloužit trvanlivost potravin nebo zlepšit jejich chuť či barvu. Použití je však povoleno pouze tehdy, pokud je to technologicky zdůvodněno a nepředstavují pro spotřebitele žádné zdravotní riziko (Chichester & Taner 1972). Mezi nejčastěji aplikované chemické konzervační látky ovocných šťáv a nápojů patří kyselina benzoová, kyselina sorbová a jejich soli (např. benzoát sodný, disiřičitan draselný, sorbanu draselný).

Vzhledem k tomu, že jsou s nimi často spojována některá zdravotní rizika (trávicí problémy, poruchy pozornosti s hyperaktivitou, srdeční choroby), spotřebitelé produkty ošetřené touto metodou čím dál více odmítají (Boris & Mandel 1994; Lima Tribst et al. 2009). Na základě několika vědeckých studií upozornil institut – Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) na možnosti vzniku benzenu z kyseliny benzoové u ovocných nápojů, díky přítomnosti vitamínu C. Benzen je látka karcinogenní a je mutagenem zárodečných buněk. Dostupné údaje neumožňují stanovení bezpečné úrovně expozice této látky. Příjem by však měl být minimalizován a obsah v ovocných nápojích musí být porovnán s kontaminací z jiných zdrojů např. pitné vody (Federal Institute for Risk Assessment 2005). Průměrně většina lidí vdechuje 220 µg benzenu denně z emisí výfukových plynů a u kuřáků cigaret se pohybuje tento příjem okolo 7900 µg/den (Falzone et al. 2016). V České republice je pro ochucené nealkoholické nápoje maximální povolené množství kyseliny benzoové a její soli 150 mg/kg (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) 1333/2008).

Dále u soli kyseliny sorbové – sorbanu draselného, Mamur et al. (2010) potvrdili genotoxické účinky na lymfocyty v lidském těle již při koncentraci 250 mg/kg. Zároveň Afshar et al. (2013) prokázali, že při dlouhodobém příjmu této soli hrozí nebezpečí teratogenního působení, konkrétně bylo experimentálně zjištěno u fetálního vývoje zraku myši. Maximální povolený limit sorbanu draselného v ČR pro ochucené nápoje (např. ledové čaje, limonády, kolové nápoje) je 300 mg/kg. Další varianta soli kyseliny sorbové – sorban sodný je v ČR úplně zakázána. Zatímco v USA jsou obě tyto soli zařazeny mezi GRAS (Generally Recognised As Safe) tzn., že jsou americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) obecně považovány za bezpečné (JECFA 1973; Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) 1333/2008).

U ovocných a zeleninových šťáv nejsou akceptovány žádné konzervační látky, až na určité výjimky v příloze II části E bodu 14.1.2 nařízení (ES) č. 1333/2008 (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) 1333/2008).

Ve studii Vasilaki et al. (2019) byla u pomerančového ovocného nápoje sledována možnost nahrazení sorbanu draselného pomocí extraktu z propolisu. Výzkumem se potvrdila

schopnost propolisu potlačit mikrobiální růst až 120 dní, a to dokonce při pokojové teplotě. Zároveň byla v nápoji díky němu zvýšena antioxidační aktivita a celkový obsah polyfenolických látek. Nutností je zhodnotit tento produkt senzoricou analýzou.

3.4.3 Přírodní konzervační látky

I přesto, že by při splnění limitů pro chemická (syntetická) aditiva neměly hrozit žádné zdravotní problémy, spotřebitelé čím dál více odmítají takto ošetřené výrobky, a naopak se zvýšil zájem po konzervačních látkách s přírodním původem (Lima Tribst et al. 2009). Přírodní antimikrobiální látky jsou získávány ze tří přírodních zdrojů: rostlinných (byliny, koření, silice), živočišných (laktoperoxidáza, lysozym, chitosan) a mikrobiálních (bakteriociny) (Raybaudi-Massilia et al. 2009).

3.4.3.1 Nisin

Nisin patří mezi polypeptidy s antimikrobiální aktivitou tzv. bakteriociny a je produkován bakteriemi mléčného kvašení, konkrétně druhem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Gharsallaoui et al. 2016). K prodloužení trvanlivosti potravin je schválen jako jediný z celé skupiny bakteriocinů, účinně inhibuje růst pouze grampozitivních bakterií a některých spor (Delves-Broughton et al. 1999; Ross et al. 2002). Proto je nutné ho kombinovat s některou z fyzikálních metod konzervace nebo s jinou přírodní konzervační látkou (Gharsallaoui et al. 2016).

U kombinace nisinu (200 ppm) se silicí tymiánu obecného (*Thymus vulgaris*; 0,2 ml) bylo dosaženo výrazného úbytku kvasinek a plísní i celkového počtu bakterií. Nižší redukce mikroorganismů (MO) byla pozorována při koncentraci silice tymiánu (0,1 ml), která byla organolepticky přijatelnější. Aby bylo dosaženo požadovaného antibakteriálního účinku samotným použitím silice, musely být použity vyšší koncentrace, které způsobují nežádoucí změny v chuti a aroma (Pandhare et al. 2018). Také Turgis et al. (2012) uvádí synergický efekt nisinu a silice dobromysli obecné (*Origanum vulgare*) proti růstu *L. monocytogenes*, zatímco kombinací nisinu a silice tymiánu obecného byla účinněji zredukována *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium.

Z výsledků studie Alpas & Bozoglu (2000) vyplývá, že MTLT s HHP (345 MPa, 50 °C, 5 min) lze s přídavkem nisinu aplikovat i na potraviny s vyšším pH (např. zeleninové šťávy) ke zničení inokulovaných potravinových patogenů. U šťávy s nízkým pH (pomerančová) došlo k redukci o více než 8 log₁₀.

3.4.3.2 Laktoperoxidáza

Laktoperoxidáza je enzym, který je široce zastoupen v kolostru, syrovém mléce a některých tělesných tekutinách. Jedná se o oxidoreduktázu katalyzující oxidaci thiokyanátu peroxidem vodíku (Corbo et al. 2009). Touto reakcí vznikají meziproducty (hypothiokyanit a kyselina hypothiokyanová) s antimikrobiálními vlastnostmi vůči široké škále grampozitivních a gramnegativních bakterií, zejména při nízkém pH (Tenovuo et al. 1991).

Inhibiční účinky laktoperoxidázy na salmonelu byly sledovány u rostlinných i živočišných produktů, konkrétně u rajčatové šťávy a kuřecího vývaru. Přítomnost *Salmonella*

enteritidis byla snížena o 5,4 log₁₀ ve šťávě z rajčat a po přidání chloridu sodného o koncentraci vyšší než 100 mM se antibakteriální účinek zvýšil. Naopak v případě kuřecího vývaru nebyla *S. enteritidis* téměř potlačena (1 log₁₀) z důvodu obsahu tuku (Touch et al. 2004).

3.4.3.3 Natamycin

Tento přírodní konzervant působící proti růstu plísní a kvasinek, znám také jako pimaricin, je produkován aerobní fermentací *Streptomyces natalensis* ve formě polyenového makrolidu (Thomas & Delves-Broughton 2003).

Jeho antifungální účinek spočívá v integraci sterolů do buněčné stěny kvasinek. Jelikož bakterie steroly ve struktuře buněčné stěny nemají, vykazuje vůči nim velmi nízké působení. Natamycin se také využívá v lékařství jako antimykotikum (Yilmaz & Kurdal 2005). V EU je schválen k ošetření povrchů sýrů a uzenin (EFSA 2009).

Ve šťávě z granátového jablka ošetřené natamycinem byla po 30 dnech skladování (4 °C) zaznamenána přítomnost 4,21 log₁₀ celkového počtu aerobních mikroorganismů a 3,96 log₁₀ bakterií mléčného kvašení. Plísně a kvasinky byly po celou dobu zcela inaktivovány. Při aplikaci natamycinu ve spojení s US (26 kHz, 5 min) nebyly detokovány žádné nežádoucí mikroorganismy a kvalitativní parametry byly srovnatelné s parametry čerstvé šťávy (Yikmiş 2019).

Jablečná šťáva byla inokulována osmofilními kvasinkami *Zygosaccharomyces bailii* a *Z. rouxii*, které během skladování způsobují nežádoucí produkci ethanolu. *Z. rouxii* byla zcela potlačena samotným působením mátové silice (*Mentha piperita*) i natamycinu. *Z. bailii* byla lépe zredukována silicí z máty peprné. Obě tyto metody jsou navrženy jako vhodná alternativa k chemickým konzervantům (kyselina sorbová a benzoová), vůči kterým jsou kvasinky *Zygosaccharomyces* rezistentní (Malfeito-Ferreira et al. 1997; Karaman & Sagdic 2019).

3.4.3.4 Lysozym

Pomocí endogenního enzymu lysozymu je možné potlačit růst patogenních MO a MO, které způsobují kažení (zejména grampozitivních bakterií). Také se ukázalo, že výrazně snižuje tepelnou odolnost spor *Alicyclobacillus acidoterrestris* u nápojů s kyselějším pH (Sokołowska et al. 2012). Vyskytuje se především v mléce, vaječném bílku, slinách, slzách a nosním hlenu (Losso et al. 2000).

Jelikož aplikací lysozymu nebo nisinu není možné odstranit gramnegativní bakterie, je nutné je kombinovat s nějakou fyzikální metodou. Přítomnost *Salmonella* Typhimurium byla nulová po ošetření PEF (90 kV, 2 μs) se směsí nisinu (27,5 U/ml) a lysozymu (690 U/ml). Samotné působení PEF s nisinem (100 U/ml) nebo lysozymu (2400 U/ml) vedlo ke snížení počtu salmonel v pomerančové šťávě pouze o 2,48 log₁₀ (Liang et al. 2002).

3.4.3.5 Chitosin

Tento heteropolysacharid (1→4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glukan se komerčně vyrábí deacetylací chitinu, což je součást schránek korýšů (Rhoades & Roller 2000). Chitosan získaný z krevet byl v roce 2005 přijat jako GRAS (USFDA 2007).

Přidání chitosinu do jablečné šťávy způsobilo druhově specifickou inaktivaci kvasinek. *Kloeckera apiculata* a *Metschnikowia pulcherrima* byly zcela potlačeny, ale u *Saccharomyces cerevisiae* a *Pichia* spp. bylo docíleno pouze pomalejšího růstu. Navíc přežití patogenu *Escherichia coli* O157: H7 bylo po ošetření prodlouženo ze 3 na 5 dnů (Kisko et al. 2005).

3.5 Silice

Další skupinou látek, které se v poslední době dostávají do povědomí jako potenciální konzervanty přírodního původu jsou silice. Silice (označované také jako esenciální oleje) jsou přírodní, těkavé, komplexní rostlinné směsi látek, které se vyznačují silným aroma. Rostliny je prodují jako ochranu před vnějšími vlivy a jejich antimikrobiální účinky působí proti celé řadě mikroorganismů (Burt 2004). Silice a jejich jednotlivé složky se vyskutují například v: listech (rozmarýn lékařský – *Rosmarinus officinalis*), květech a poupatech (heřmánek pravý – *Matricaria rucutita* a hřebíčkovce kořený – *Eugenia caryophyllata*), cibuli (česnek kuchyňský – *Allium sativum*), oddencích (asafoetida – *Ferula assa-foetida*), plodech (pepř černý – *Piper nigrum*) a dalších částech rostlin (Nychas 1995).

Dosud je známo přes 3000 různých druhů silic, z nichž je asi 300 využíváno v komerční sféře (Van de Braak & Leijten 1999). Nejrozšířenější skupinou světové produkce silic tvoří silice z citrusových plodů (Tirado et al. 1995).

Z různých částí rostlin jsou silice získávány pomocí destilace s vodní parou nebo lisováním za studena (u citrusových plodů), zatímco jejich extrakty jsou opatřeny extrakcí rozpouštědlem, superkritickou fluidní extrakcí nebo metodou enfleurage (hlavně u květů) (Bakkali et al. 2008). V čerstvém rostlinném materiálu tvoří silice velmi malý podíl z celkové hmotnosti, obvykle okolo 1 % a méně (Langenheim 1994).

Další charakteristikou těchto látek je, že jsou obvykle kapalné při pokojové teplotě a ve vodě nerozpustné (Lahlou 2004). Hydrofobnost jim umožňuje rozpouštět lipidickou membránu mikroorganismů. Vyšší propustnost membrány způsobí únik iontů a dalších komponent buněk, což vede až k úplné nekróze buňky (Burt 2004).

Aktivita, množství a složení silic může být u rostlin stejného druhu velmi odlišné a záleží na několika faktorech (Croteau 1986). Jedním z faktorů je doba sklizně, zatímco silice z voňatky citronové (*Cymbopogon citratus*) sklizené od května do prosince byla schopna inhibovat 100 % zkoumaných mikroorganismů. Tak v případě sběru rostliny od února do dubna byla silice účinná proti stejným mikroorganismům pouze ze 73 % (López-Malo et al. 2000). Dalšími faktory jsou rostlinný druh, části rostliny, klimatické podmínky, výživa a stres rostliny (Croteau 1986).

Také podle vnitřních vlastností dané potraviny (obsah bílkovin a lipidů, aktivita vody a pH) se liší potřebná koncentrace silic k zajištění zdravotní nezávadnosti (Hyldgaard et al. 2012). Vysoký obsah lipidů u některých druhů masa (hlavně tzv. červené), mléka a mléčných výrobků zajišťuje ochranu bakteriálních buněk před účinky silic (Tassou et al. 1995). Čím více pH klesá, tím více se zvyšuje hydrofobicita silice, což způsobuje lepší difúzi a akumulaci v membráně spor (Juven et al. 1994). S rostoucí vodní aktivitou potraviny je potvrzena silnější inhibice mikroorganismů (Guynot et al. 2005).

3.5.1 Chemické složení silic

Silice mohou být tvořeny až 100 různých složek, ale většina z nich jich obsahuje od dvaceti do šedesáti (Langenheim 1994). Díky nízké molekulové hmotnosti (do 300 Da) lze je snadno destilovat s vodní parou za atmosférického tlaku a další výhodou je jejich těkavost (Hay & Waterman 1993).

a) Terpeny

Terpeny jsou strukturálně různorodou třídou metabolitů, v současné době existuje více než 60 000 známých sloučenin (Köksal et al. 2011). Název této třídy pochází od terpentinu, což je pryskyřice různých poddruhů borovic (*Pinus* spp.), ze které byly izolovány monoterpeny α - a β - pinen (Breitmaier 2006). Základní stavební jednotkou terpenů je isopren (C_5H_8). Převážnou část tvoří v silicích skupiny: monoterpeny (2 isoprenové jednotky) a seskviterpeny (3 isoprenové jednotky). Monoterpeny mají lineární nebo cyklickou strukturu nejvýznamnější zástupci jsou: limonen v silici citroníku (*Citrus limon*) nebo myrcen v silici vavřínu vznešeného (*Laurus nobilis*) (Bakkali et al. 2008).

U seskviterpenů se můžeme setkat s lineární, rozvětvenou i cyklickou strukturou. Důležitým seskviterpenem v průmyslu je humulen vyskytující se v silici chmelu otáčivém (*Humulus lupulus*). Diterpeny nejsou v silicích časté, vysoká molekulová hmotnost a bod varu zabraňuje destilaci vodní parou. Dále zde řadíme hemi-, tri- a tetra-terpeny (Bakkali et al. 2008; Clarke 2008).

Podskupinou terpenů jsou jejich oxidované deriváty – terpenoidy. Dle Clarke (2008) mezi ně řadíme:

- aldehydy – např. citral v silici myrtovníku citrovém (*Backhousia citriodora*)
- ketony – např. karvon v silici kmínu kořeném (*Carum carvi*)
- alkoholy – např. linalool v silici koriandru setém (*Coriandrum sativum*)
- fenoly – např. karvakrol a thymol v silici tymiánu obecném (*Thymus vulgaris*)
- estery – např. geranyl v silici levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*)
- laktony, kumariny a furokumariny – např. bergapten v silici bergamotu (*Citrus bergamia*)
- oxidy – např. cineol v silici blahovičnicku kulatoplodém (*Eucalyptus globulus*)

b) Fenypropanoidy

Fenypropanoidy jsou stejně jako terpenoidy seskupeny na základě biosyntetického původu z kyseliny šikimové. Šikimátová dráha se vyskytuje pouze u mikroorganismů a rostlin, proto sloučeniny ovlivňující tuto cestu mohou být selektivně toxické u lidí a zvířat (Herrmann & Weaver 1999). V silicích se objevují méně často, dosud bylo popsáno pouze 50 sloučenin (Bakkali et al. 2008). Významné podíly obsahuje silice hřebíčkovce kořeného (*Eugenia caryophyllata*), konkrétně eugenol 85-90 % nebo *trans*-cinnamaldehyd tvořící až 98 % silice skořicovníku cejlonského (*Cinnamomum zeylanicum*). Dalšími zástupci jsou myristicin, dillapiol a methyl eugenol (Gang et al. 2001).

c) Sloučeniny síry a dusíku

Ve velmi vzácných případech obsahuje několik sloučenin v silicích jednu nebo více molekul síry nebo dusíku (Boelens 1996). Tyto látky se vyskytují ve formě aglykonů nebo glukosinolátů a jejich produktů rozkladu. Když endogenní rostlinné enzymy myrosinázy působí na glukosinoláty, dojde ke štěpení a uvolnění nestabilního aglykonu, který se přeskupí za vzniku produktů rozkladu: isothiokyanáty, thiokyanáty a nitrily. Přítomnost síry způsobuje charakteristický zápach (Boelens 1996; Halkier & Gershenzon 2006).

Tellez et al. (2002) uvádí, že právě produkty rozkladu mohou být hlavními složkami některých silic. Například fenylacetonitril, který tvoří 86 % silice řeřichy peruánské (*Lepidium meyenii*).

Vysoké obsahy isothiokyanátů jsou zastoupeny v silicích rostlin z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Hlavním složkou silice v semenech hořčice seté (*Leucosinapsis alba*) je allyl isothiokyanát (Turgis et al. 2009).

U rostlin z podčeledi česnekovitých (*Alliaceae*) je také dobře známa přítomnost sirmých sloučenin odpovědných za typické aroma a chuť. Významným zástupcem cysteinových sulfoxidů je alliin, který se při působení enzymů alliináz přemění na těkavý thiosulfinát allicin (Krest et al. 2000).

3.5.2 Využití silic v průmyslu

Největší část produkce silic je využívána v kosmetickém a potravinářském průmyslu, kde jsou především aplikovány jako aromatické látky (Taylor 2016). Také jsou uplatňovány ve všech oborech medicíny, jako je farmacie, balneologie, homeopatie a aromaterapie (Schmidt 2015).

Nadále však stoupá zájem o širší komerční využití silic v dalších oblastech potravinářství pro jejich antimikrobiální vlastnosti. Například by mohly být vhodnou alternativou chemických dezinfekčních prostředků k ošetření povrchů v potravinářských podnicích (Rhoades et al. 2013). Falcó et al. (2019) uvádí, že přírodní dezinfekční prostředek s 2,5 % obsahem silice mateřídouškovce vonného (*Thymbra capitata*) úspěšně dekontaminoval tři různé testované povrchy.

Také se v současné době vyvíjí nové aktivní systémy balení potravin, které mají v sobě zabudované silice nebo jejich hlavní složky. Obaly hrají důležitou roli v bezpečnosti a kvalitě potravin (Maisanaba et al. 2017). U široké škály pekařských výrobků byl zkoumán aktivní obal z mikroperforovaného polypropylenu, který měl v sobě zabudovanou silici skořicovníku cejlonského (*Cinnamomum zeylanicum*), výsledkem bylo prodloužení trvanlivosti ze tří na deset dnů (Gutiérrez et al. 2009).

Antimikrobiální potenciál silic by mohl být rovněž využit k prodloužení trvanlivosti potravin. Činnost silice dobromysli obecné (*Origanum vulgare*) o koncentraci 0,005 % byla u baleného listového salátu (tzv. ready to eat = připravený k přímé konzumaci) srovnatelná s chemickým promývacím roztokem chloru (0,005 %) k inaktivaci *S. Typhimurium* (Gunduz et al. 2010). Ve studii Hayouni et al. (2018) bylo testováno mleté hovězí maso, které bylo smícháno se silicí šalvěže lékařské (*Salvia officinalis*) o koncentraci 1,5 %. Ačkoli byl zjištěn výrazný inhibiční účinek proti *Salmonella* spp., současně silice vykazovala nežádoucí chuťové

účinky. Řešením by byla kombinace s jiným ošetřením. Studie Brnawi et al. (2018) ukazuje, že by silice skořicovníku cejlonského (*Cinnamomum zeylanicum*) mohla být využita jako přírodní antimikrobiální látka i u mléčných nápojů. Mléčný jahodový koktejl byl inokulován 4 log₁₀ KTJ/ml bakterií *S. Typhimurium* a *L. monocytogenes*. Přidáním skořicové silice byla přítomnost obou patogenů zcela zredukována po dobu 8 dní při teplotě 4 °C.

3.5.3 Princip antimikrobiální aktivity silic

Až v posledních deseti letech bylo zjištěno, že princip antimikrobiální aktivity terpenů, fenylypropanoidů a aldehydů spočívá ve zvyšování permeability buněčných membrán (Nazzaro et al. 2013).

Účinnost jednotlivých druhů silic se u bakterií liší v závislosti na struktuře buněčné stěny (grampozitivní a gramnegativní). Například silice vousatky draslavé (*Vetiveria zizanioides*) vykazuje vyšší antibakteriální efekt proti G+ než proti G- bakteriím. To lze vysvětlit tím, že G- bakterie mají relativně nepropustnou vnější membránu (Raut & Karuppaiyil 2014). Řešením by mohlo být synergické působení kombinací různých silic nebo jejich hlavních složek. Jak již uvádí Semeniuc et al. (2017) ošetřením tymiánovou (*Thymus vulgaris*) a petrželovou silicí (*Petroselinum crispum*) bylo dosaženo úplné inaktivace *E. coli* (G-) i *S. aureus* (G+), kdežto samotná tymiánová silice *S. aureus* (G+) téměř neinhibovala.

Moghimi et al. (2016) popsali, že hydrofobní molekuly silice tymiánu (*Thymus daenensis*) narušili buněčnou membránu *E. coli* poškozením aktivního transportu proteinů zabudovaných do fosfolipidové dvojvrstvy. Únik nukleových kyselin, proteinů a draslíku narušenou membránou vedl k apoptóze. Navíc byly účinky nanoemulze silice výrazně silnější, oproti běžné silici snadněji interagoval s buněčnou membránou. I Bajpai et al. (2014) uvádí, že k permeabilizaci buněčné membrány spojené s dalšími následky, jako je ztráta látek, které absorbují při 260 nm a snížená zásoba extracelulárního ATP, došlo u několika potravinových patogenů (*Bacillus cereus*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *S. Typhimurium* a *E. coli*) při přítomnosti silice cypřišku tupolistého (*Chamaecyparis obtusa*).

Podle Nychas et al. (2003) je také způsob účinku silic závislý na jejich koncentraci – nízké koncentrace inhibují enzymy spojené s produkcí energie, zatímco vyšší množství silic mohou precipitovat celé proteiny. Nazzaro et al. (2013) současně potvrdili, že přítomnost hydroxylové skupiny v thymolu, eugenolu a karvakrolu ovlivňuje inaktivaci mikrobiálních enzymů. Tato skupina interaguje s buněčnou membránou, což způsobí únik buněčných organel, změnu mastných kyselin a fosfolipidů a následně i poškození energetického metabolismu. Krepker et al. (2017) tvrdí, že silice mohou mít rozdílnou účinnost i v závislosti na poloze hydroxylové skupiny ve své struktuře. Oproti tomu García-Salinas et al. (2018) toto tvrzení popírají, jelikož testované složky silic karvakrol a thymol vykazovaly velmi podobné účinky na strukturu bakteriální membrány.

Konkrétně složky silic thymol a karvakrol narušili integritu membrány u čtyř potravinových patogenů, což dále vedlo k úniku protonů a draslíku, ztrátě membránového potenciálu a buněčné smrti (Lv et al. 2011). Také u složek karveolu, citronellalu a karvonu byla zaznamenána schopnost modifikovat hydrofobicitu a narušit celistvost buněčné membrány, tímto ošetřením rovněž došlo k narušení funkce iontové pumpy, a kvůli tomu byl spuštěn nekontrolovatelný tok iontů K⁺ (Swamy et al. 2016).

Antifungální účinek silic je téměř totožný s antibakteriálními mechanismy. Obecně mají silice schopnost poškodit buněčnou stěnu a cytoplazmatickou membránu, dále i mitochondriální membránu ovlivněním iontových kanálů, zejména Ca^{2+} , protonové pumpy a ATP, vedoucí k buněčné smrti (Swamy et al. 2016). Například aktivita silice kurkumovníku dlouhého (*Curcuma longa*) proti plísni *A. flavus* zahrnovala narušení integrity plazmatické membrány a mitochondriální dysfunkci, což vyvolalo celkovou metabolickou stagnaci buňky (Hu et al. 2017).

3.5.4 Nanoenkapsulace silic

Jak již bylo zmíněno výše, silice jsou nerozpustné ve vodě a hydrofobní vlastnosti jim tak umožňují vstupovat do lipidových částí buněčných membrán a mitochondrií, narušovat jejich strukturu a učinit je méně propustnými (Knobloch 1986). Tímto je aplikace silic do potravinářských výrobků omezena na produkty s vysokým obsahem tuků (Aisyah et al. 2018).

U ovocných a zeleninových šťáv jsou k vyvolání inhibičních účinků na bakterie potřebná vysoká množství silic, což může mít negativní vliv na aroma a chuť. To lze úspěšně vyřešit nanoenkapsulací a nanoemulzifikací. Díky těmto metodám získají silice vyšší antibakteriální aktivitu (Valizadeh et al. 2018).

Velká část vědeckých studií je zaměřena na výrobu nanokapslí a nanoemulzí silic, které se kromě silných antimikrobiálních vlastností používají k ochraně účinných látek před vlivy prostředí (např. kyslíkem, vlhkostí, pH) (Gavini et al. 2005).

K výrobě nanokapslí jsou široce využívány přírodní polysacharidy např. chitosanu, maltodextrinu, cyclodextrinu a arabské gumy (Xiao & Grinstaff 2017). Skořicová silice byla enkapsulována pomocí β -cyclodextrinu by mohla být v budoucnu aplikována jako aktivní obalový materiál, jelikož byla zjištěna vysoká antimykotická aktivita proti šedé plísni (*Botrytis cinerea*), která často napadá plody granátového jablka (Munhuwey et al. 2018). Také rozmarýnová silice (*Rosmarinus officinalis*) uzavřena v nanokapslích β -cyclodextrinu zajistila antimikrobiální ochranu rajčatové šťávy proti *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *Candida tropicalis* a *Saccharomyces pastorianus* (Garcia-Sotelo et al. 2019).

Nanoemulze je jemná disperze dvou nemísitelných kapalin (oleje a vody), přičemž každá olejová kapička je obklopena tenkou mezifázovou vrstvou tvořenou molekulami povrchově aktivních látek (Tadros et al. 2004). Malá velikost částic (obvykle 20 až 1000 nm) zvyšuje biologickou dostupnost, účinnost a stabilitu silic (Dávila-Rodríguez et al. 2019).

Formulovat kapaliny do nanoemulzí můžeme dvěma způsoby, pomocí: metod s nízkou energií a metod s vysokou energií. U nízkoenergetických metod se využívá chemických vlastností emulzního systému a díky tomu můžeme přeměnit mikroemulzi na nanoemulzi. Například pomocí spontánní emulgace, emulzním inverzním bodem nebo teplotní fázovou inverzí. Metody s vysokou energií zahrnují vysokotlakou homogenizaci, mikrofluidizaci a ultrazvuk (Tang et al. 2013).

Povrchově aktivní látky jsou látky, které slouží ke snížení mezifázového napětí mezi dvěma nemísitelnými kapalinami. Při přípravě nanoemulzí mezi ně zahrnujeme: Tween 80, Tween 20, Span 20, PEG 400 monostearát a další (Setya et al. 2014).

Studie Franklyne et al. (2019) prokázala silnou antibakteriální aktivitu nanoemulzí skořicové silice (*Cinnamomum zeylanicum*) a silice hřebíčkovce (*Eugenia caryophyllata*) proti

bakteriálním patogenům způsobujícím infekce gastrointestinálního traktu. Minimální baktericidní koncentrace (MBC) 15-31 $\mu\text{l/ml}$ skořicové silice způsobila již po 8 hodinách pokles 6 \log_{10} životaschopných počtů bakterií a zajistila sterilitu ovocných šťáv (mango, jablko) po dobu 7 dnů při pokojové teplotě.

Nanoemulze směsi sezamového oleje se silicí hřebíčkovce (koncentrace 3 $\mu\text{l/ml}$) byla stabilní déle než 1 měsíc a u pomerančové šťávy vyvolala redukcii 5 \log_{10} populace *Staphylococcus aureus*, ale pouze po dobu 6 hodin při pokojové teplotě. V případě skladovací teploty 4 °C bylo dosaženo výrazně lepších výsledků (Ghosh et al. 2014).

Hrušková a pomerančová šťáva byly inokulovány bakterií *Lactobacillus delbrueckii* a k její inaktivaci byla použita nanoemulze směsi terpenů kajeputu střídavolistého (*Melaleuca alternifolia*). Vzhledem k tomu, že organoleptické vlastnosti byly minimálně ovlivněny, mohla by být tato metoda využita k prodloužení trvanlivosti šťáv v průmyslu (Donsì et al. 2011).

3.5.5 Silice skořicovníku cejlonského (*Cinnamomum zeylanicum*)

Všechny druhy skořicovníků (*Cinnamomum* sp.) řadíme do čeledi vavřínovitých (*Lauraceae*). V potravinářském a farmaceutickém průmyslu se používá sušená vnitřní kůra stromu. Skořicový oleoresin získaný extrakcí kůry rozpouštědlem se využívá hlavně k aromatizaci potravinářských výrobků, jako jsou dorty, cukrovinky, nealkoholické nápoje a další (Leela 2008).

Skořicovou silici lze získat z listů i kůry, a to pomocí hydrodestilace, extrakce rozpouštědlem nebo působením mikrovln. Složení silic se liší v závislosti na části rostliny a metodě (Cardoso-Ugarte et al. 2016).

Silice skořicových listů je cenově dostupnější a v potravinářství je aplikována jako aroma. Její hlavní složkou listů skořicovníku je eugenol (87,3 %), také je tvořen bicyclogermacrenem, α -phellandrenem, β -caryophyllenem, aromadendrenem a dalšími. Naopak u silice skořicové kůry je největším komponentem *trans*-cinnamaldehyd (97,7 %), dále obsahuje δ -cadinen, α -copaen, α -amorphen a několik dalších složek pod 0,01 %. Současně se u silice z kůry potvrdila vysoká antimikrobiální aktivita i při velmi nízkých koncentracích. Nejčastěji se k potlačení růstu mikroorganismů v potravinách využívá skořicovník cejlonský (*Cinnamomum zeylanicum*) (Singh et al. 2007; Leela 2008).

Ve studii Raybaudi-Massilia et al. (2006) skořicová silice ze šesti testovaných silic nejučinněji inhibovala mikrobiální růst *Salmonella* Enteritidis, *E. coli* a *L. monocytogenes*. Konkrétně u šťávy melounové, hruškové a jablečné se při koncentraci silice 0,2-0,8 % snížilo množství životaschopných bakterií o více než 5 \log_{10} KTJ/ml během 24 hodin. Sensorická analýza nebyla provedena.

Jablečná, hrušková, pomerančová a jahodová šťáva byly inokulovány populacemi *Salmonella* Enteritidis a *E. coli* O157:H7. Silice skořicové kůry (koncentrace 0,1-0,3 %) vykazovala statisticky významný rozdíl $P \leq 0.05$, pokles populací o 3,9 \log_{10} KTJ/ml u salmonely a 4,4 \log_{10} KTJ/ml u listerie během 1 hodiny. *E. coli* měla výrazně nižší citlivost vůči silici (pokles o 1,9 \log_{10}) (Mosqueda-Melgar et al. 2008). Podobný výsledek zjistili Helander et al. (1998) ve své studii, kde *Salmonella* Typhimurium měla vyšší citlivost na thymol a karvakrol než *E. coli* O157:H7.

Děvět různých silic bylo zkoumáno pomocí diskových difúzních testů pro stanovení MBC. Pouze silice skořicové kůry (*Cinnamomum zeylanicum*) v koncentraci 0,125 % prokázala široké spektrum antimikrobiální aktivity u gramnegativních a grampozitivních bakterií. Také měla bakteriostatické a bakteriocidní účinky proti *Pseudomonas aeruginosa*. Testy stanovení metabolické aktivity ukázaly, že skořicová silice vykazuje prudké inhibiční účinky za méně než 6 minut při koncentraci vyšší než 0,5 % (Elcocks et al. 2020).

Singh et al. (2007) uvádí, že skořicová silice kůry je také vysoce účinná proti plísním *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium citrinum* a *Penicillium viridicatum*, ale obtížně inhibovala přítomnost *Aspergillus ochraceus*. Zatímco skořicový oleoresin úplně potlačil *Aspergillus ochraceus*.

U několika silic a jejich hlavních složek byla testována antibakteriální aktivita proti potravinovým patogenům. Redukce 50 % celkového počtu bakterií *E. coli* O157:H7 a *Salmonella enterica* serovar Hadar u čiré jablečné šťávy, byla pozorována po přidání silice skořicové kůry o koncentraci 0,089 a 0,014 % nebo *trans*-cinnamaldehydu 0,094 a 0,018 %. V případě zakalené šťávy byly silice adsorbovány na povrch jablečné drti a tím byla snížena účinnost daných koncentrací. Jelikož byla aktivita silice skořicové kůry a *trans*-cinnamaldehydu téměř identická, mohlo by být z ekonomického hlediska výhodnější používat synteticky vyrobený *trans*-cinnamaldehydem než rostlinnou silici (Friedman et al. 2004).

Baskaran et al. (2010) také sledovali antimikrobiální činnost *trans*-cinnamaldehydu u jablečné šťávy inokulované *E. coli* O157:H7 (6 log₁₀ KTJ/ml). Při skladovací teplotě 4 °C byl počet patogenů snížen na nedetekovatelnou úroveň po dobu 3 dnů při koncentraci složky 0,125 % nebo 5 dnů u koncentrace 0,075 %.

Zygosaccharomyces rouxii je jednou z hlavních příčin znehodnocení jablečných šťáv. Koncentrovaná jablečná šťáva (30 °Bx) byla inokulována touto kvasinkou – 6,3 log₁₀ KTJ/ml a u několika složek silic byla zkoumána jejich antimikrobiální aktivita. Maximálního snížení počtu kvasinek (99,65 %) se podařilo dosáhnout aplikací *trans*-cinnamaldehydu, thymolu a karvakrolu o koncentracích 1,28; 0,72; 0,8 mM. Po zředění šťávy na 5 °Bx nebyly v senzorické analýze nalezeny žádné statisticky významné rozdíly P>0.05 u všech antimikrobiálních látek při porovnání s běžnými konzervanty (Wang & Sun 2020).

Účinnost *trans*-cinnamaldehydu na inaktivaci *Salmonella enterica* a *E. coli* O157:H7 byla sledována u mrkvové šťávy (MŠ; 8,5 °Bx) a šťávy z lesního ovoce (ŠLO; 12,3 °Bx). U obou šťáv byl počáteční počet životaschopných mikroorganismů 5,07 log₁₀ KTJ/ml. Prokázalo se, že patogeny v ŠLO byly citlivější na přítomnost *trans*-cinnamaldehydu než v MŠ. Při skladovací teplotě 4 °C byla zcela potlačena *S. enterica* během 2 hodin a *E. coli* během 8 hodin *trans*-cinnamaldehydem 0,15% koncentrací v ŠLO. U MŠ došlo ke stejné redukci po 8 a 24 hodinách při koncentraci 0,2 % hlavní složky silice skořicové kůry (Manu et al. 2017).

Nanoemulze byla vytvořena za použití optimálního hmotnostního poměru *trans*-cinnamaldehydu a Tween 20 (1:3; koncentrace 0,2 % a 0,6 %) pomocí vysokorychlostní a vysokotlaké homogenizace. V melounové šťávě byl růst *S. Typhimurium*, *E. coli* a *S. aureus* účinně potlačen po dobu 48 hodin. Aby tato metoda mohla být využívána v průmyslu je nezbytné provést senzorickou analýzu (Jo et al. 2015).

Enzymatické hnědnutí může negativně ovlivnit barvu a nutriční vlastnosti šťáv, proto Xu et al. (2020) provedli studii ve které byl zkoumán vliv silice skořicovníku na inhibiční aktivity enzymu PPO. Nanoemulze byla vytvořena naředěním silice s deionizovanou vodou a pomocí

přístroje „Nanosizer“. Při koncentraci silice 0,3 % byla aktivita PPO snížena o 85 %, i přesto byla barva u zakalené jablečné šťávy nepříznivě ovlivněna. K úplnému potlačení aktivity PPO bylo dosaženo při kombinaci silice s vitamínem C (koncentrace 0,05 %) po dobu 48 hodin, při skladovací teplotě 4 °C. Spojením těchto dvou látek byla současně odložena degradace celkového obsahu fenolických látek a vitamínu C.

3.5.6 Silice voňatky citronové (*Cymbopogon citratus*)

Voňatka citronová je aromatická rostlina z čeledi lipnicovitých (*Gramineae*) a její silice je již po několik desetiletí široce využívána kvůli farmakologické a biologické (aromaterapie) aktivitě. Kromě toho se také používá v kosmetickém průmyslu a jako látka určená k aromatizaci potravin (Mirghani et al. 2012). Nedávné studie naznačují, že aplikace silice voňatky citronové jakožto inhibitoru enzymatického hnědnutí a mikroorganismů způsobujících kažení potravin, má velký potenciál (Ekpenyong & Akpan 2017).

Silici lze získat z různých částí rostliny (listů, stonků, květů a kořenů), většinou je však extrahována z listů pomocí destilace vodní parou (Koul et al. 2004). Rod voňatek (*Cymbopogon*) zahrnuje okolo 55 druhů, které se liší svým chemickým složením. Hlavním složkou voňatky citronové (*Cymbopogon citratus*) je citral (až 85 %), což je směs aldehydů geranialu a neralu. Dalšími komponenty jsou myrcen, geraniol, limonen, linalool a další. U *Cymbopogon flexuosus* nebyl myrcen detekován a obsahoval vyšší množství citralu. Obě voňatky jsou schopny účinně inhibovat gramnegativní a grampozitivní bakterie (Opdyke 1979; Gonçalves et al. 2018).

Z čerstvě připravených pomerančových a banánových džusů, které byly uchovány v otevřených lahvích po dobu 7 dnů při pokojové teplotě, bylo izolováno 17 různých mikrobiálních druhů a několik silic bylo testováno na jejich inhibici. U silice voňatky citronové, bazalky pravé (*Ocimum basilicum*) a majoránky zahradní (*Origanum majorana*) byla zjištěna nejvyšší antimikrobiální aktivita. Velmi rezistentními mikroorganismy byly *Aspergillus niger*, *A. flavus* a *Saccharomyces cerevisiae* a neúčinněji proti nim působila silice voňatky citronové s minimální inhibiční koncentrací (MIC) 0,15 % (Helal et al. 2006).

Plísňe a kvasinky byly také separovány z čerstvé pomerančové šťávy ve studii Ebabhi et al. (2016), konkrétně druhy *A. flavus*, *A. niger*, *Candida* sp., *S. cerevisiae* a *Trichoderma* sp. Zkoumány byly konzervační účinky silice voňatky citronové a blahovičnicku kulatoplodého a podle inhibičních zón se ukázalo, že obě silice byly velmi účinné v potlačení růstu a aktivity testovaných mikroorganismů. Navíc byla činnost silice voňatky silnější oproti blahovičnicku kromě působení na *S. cerevisiae*. Hodnota pH a enzymatického hnědnutí se zvyšovala pomaleji u šťávy se silicemi ve srovnání se šťávou bez ošetření.

Adjou et al. (2017) uvádí, že kazící mikroflóra čerstvé pomerančové šťávy je složena převážně plísněmi z rodů *Cladosporium*, *Penicillium* a *Fusarium*. U některých vzorků byly také identifikovány bakterie *Enterobacter cloacae* a *Enterobacter aerogenes*. Antimikrobiální testy odhalily vysokou aktivitu silice voňatky citronové s MBC od 0,01 %. Pomocí diskového difúzního testu bylo zjištěno, že také plísňe jsou citlivé na tuto silici s MFC 0,015 a 0,025 %. Výsledky fyzikálně-chemických vlastností ukázaly na významné snížení pH a obsahu vitamínu C během skladování. Koncentrace silice 0,025 % dokázala po 15 dnech nejlépe zachovat pH a vitamín C.

Silice voňatky citronové, bazalky pravé, rozmarýnu lékařského, šalvěže lékařské a hřebíčkovce kořeného byly testovány pro jejich inhibiční účinky na enzymatické hnědnutí (deaktivaci enzymu PPO) a na dvě plísně produkující mykotoxiny, *Aspergillus flavus* a *Aspergillus ochraceus*. Z výsledků vyplývá, že nejvíce bránily růstu a tvorbě mykotoxinů silice voňatky, hřebíčkovce a rozmarýnu, a to při koncentracích 0,05; 0,2 a 0,3 %. Také bylo prokázáno, že jablečná šťáva ošetřená těmito silicemi měla pozitivní účinky na snižování aktivity enzymu PPO ve srovnání se šťávou bez ošetření nebo silicemi bazalky a šalvěže. Při skladování v lednici (4 °C) byla doba trvanlivosti prodloužena na 4 týdny (Eissa et al. 2008).

Účinky silice voňatky citronové byly hodnoceny proti kvasinkám *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida diversa*, *Pichia fermentans*, *Pichia kluyveri*, *Pichia anomala* a *Hansenula polymorpha* způsobujících kažení šťávy z několika druhů ovoce. MIC se pohybovala od 0,028 do 0,13 % a minimální fungicidní koncentrace (MFC) od 0,056 do 0,45 %. Nejméně rezistentní byly kvasinky *C. diversa* a *P. anomala*, zatímco nejvyšší MIC byla uvedena u *A. pullulans*. Maximální snížení životaschopnosti bylo pozorováno u *S. cerevisiae* (3 log₁₀ KTJ/ml) během 24 hodin expozice silici voňatky citronové (Tyagi et al. 2014).

Antimikrobiální působení voňatky citronové bylo také zkoumány ve vztahu k patogenním bakteriím *Salmonella* Enteritidis, *E. coli* a *Listeria innocua* a porovnány s aktivitou silice skořicovníku cejlonského, hřebíčkovce kořeného, voňatky Martinovy (*Cymbopogon martinii*) a složek silic benzaldehydu a geraniolu. K inaktivaci všech testovaných patogenů v jablečné a hruškové šťávě byla účinná koncentrace 0,2% silice voňatky, skořicovníku nebo geraniolu. U melounové šťávy se podařilo uvedené tři mikroorganismy 7,88 log₁₀ KTJ/ml zredukovat 0,8% koncentrací skořicové silice, zatímco silicí voňatky již při 0,5% koncentraci (Raybaudi-Massilia et al. 2006).

Také (Leite et al. 2016) zkoumali účinnost voňatky citronové k vyvolání redukce 5 log₁₀ KTJ/ml patogenních bakterií *E. coli*, *L. monocytogenes* a *Salmonella* Enteritidis v ananasové šťávě. Pro inokulované bakterie *E. coli* a *L. monocytogenes* nastala inaktivace ≥ 5 log₁₀ KTJ/ml už po 15 minutách expozice silici, a to při koncentraci 0,125 %. *S. Enteritidis* byla odolnější oproti *E. coli* a listerii a potřebná koncentrace byla 0,25 %. Vzorčky šťáv s a bez silice nevykazovaly žádné statisticky významné rozdíly v hodnocených fyzikálně-chemických vlastnostech. Při obou koncentracích silice měla šťáva podobné skóre aroma, vzhledu a viskozity jako šťáva bez silice. Ačkoli nežádoucí změny v chuti a dochuti byly zaznamenány u šťáv obsahující silici.

Baktericidní činnost *in vitro* proti *E. coli* byla studována Salvia-Trujillo et al. (2015) u deseti různých silic včetně voňatky citronové. Hrubé emulze byly získány homogenizací a nanoemulze z hrubých emulzí pomocí mikrofluidizace. Rychlejší a lepší kinetika deaktivace byla pozorována u nanoemulzí. Populace *E. coli* byla snížena během 30 minut kontaktu se silicí voňatky o 4,1; hřebíčkovce 3,6 a tymiánu 2,8 log₁₀ KTJ/ml.

3.5.7 Silice tymiánu obecného (*Thymus vulgaris*) a dalších rodu *Thymus*

Tymián obecný z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*) se používá jako ochucovadlo v široké škále potravin, nápojů a cukrovinek. Dále má své uplatnění v kosmetickém průmyslu

a racionální fytoterapii. V neposlední řadě je významný pro jeho antimikrobiální vlastnosti, a proto se využívá jako konzervační látka (Mandal & DebMandal 2016).

Syntetické antioxidanty butylovaný hydroxyanizol (BHA) a butylovaný hydroxytoluen jsou účinné, ale současně jsou často spojovány s karcinogenitou. Silice tymiánu obecného je biologicky rozložitelná látka s vyšší antioxidační aktivitou než uvedené chemické látky (Lee & Shibamoto 2002).

Podíl jednotlivých složek silice tymiánu obecného se mění podle klimatických podmínek, proto se můžeme setkat s šesti různými chemotypy této rostliny: thymol, geraniol, linalool, γ -terpineol, carvacrol a *trans*-terpinen-4-ol (Piccaglia et al. 1993). Studie provedená Rota et al. (2008) ukázaly, že u nejběžnějšího chemotypu tohoto tymánu – thymolu, je chemické složení následující: thymol (58 %), p-cymen, karvakrol, linalool, myrcen, γ -terpinen, caryophyllen a několik dalších složek s obsahem pod 1 %.

Nikolić et al. (2014) odhalili, že thymol je hlavním komponentem u různých druhů rodu *Thymus*, liší se však procentním podílem. Výsledkem GC/MS (plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem) byly tyto hodnoty thymolu: 56 % u *T. algeriensis*, 49 % u *T. vulgaris* a 38,5 % u *T. serpyllum*. Nejsilnější aktivitu proti bakteriím a kvasinkám ukázala silice *T. serpyllum* s MIC 0,00025 a 0,0001 %, zatímco nejnižší byla u silice *T. vulgaris* MIC 0,008 a 0,002 %.

Vzhledem k tomu, že jsou kvasinky odolné vůči nízkým hodnotám pH (kyselé prostředí) mohou snadno přežívat i růst v ovocných šťávách, ve kterých je *Candida* spp. jedním z nejčastěji izolovaných rodů (Tournas et al. 2006). Přidáním složek silic thymolu, karvakrolu a p-cymenu o koncentraci 1 mM byla přítomnost *Candida lusitaniae* úplně potlačena po dobu 21 dní, 25 °C. Účinek thymolu (0,5 mM) byl potvrzen i u rajčatové šťávy, kdy se populace testované kvasinky snížila z 7,66 log₁₀ na 3,07 log₁₀ KTJ/ml (Aznar et al. 2015).

Synergické působení thymolu a p-cymenu (dvou hlavních složek tymiánu) vedla k vyšší redukci *Bacillus cereus* kmenů INRA-AVTZ415 a INRA-AVZ421 v klidové i exponenciální fázi růstu než v případě samostatné aplikace složek. Tento společný vliv proti buňkám *B. cereus* INRA-AVZ421 v klidové fázi byl prokázán i u mrkvové šťávy (Delgado et al. 2004).

Ve výzkumu Irkin & Korukluoglu (2009) byly hodnoceny antibakteriální a antifungální účinky silic z 10 rostlin: tymiánu (*Thymus vulgaris*), česneku (*Allium sativum*), bobu (*Pimenta racemosa*), pepře (*Piper nigrum*), dobromysli (*Origanum vulgare*), pomerančovníku (*Citrus sinensis*), čajovníku (*Melaleuca alternifolia*), máty (*Mentha longifolia*), hřebíčkovce (*Eugenia caryophyllata*) a kmínu (*Cuminum cyminum*). Nejlépe inhibující byla tymiánová, dobromyslová, hřebíčková a pomerančová silice. Navíc silice tymiánu (koncentrace 0,5 %) potlačila růst v jablečno-mrkvové šťávě inokulované *L. monocytogenes* a *Candida albicans* po dobu 5 dní při skladovací teplotě 4 °C.

Stejně jako tymián obecný patří do rodu *Thymus* i druh *Thymus daenensis*. U nanoemulze z této rostliny byla měřena antibakteriální aktivita proti patogenu *E. coli* a bylo potvrzeno, že inhibiční účinky nanoemulze jsou výrazně vyšší. MIC i MBC u běžné silice byla 0,4 %, zatímco při aplikaci silice ve formě nanoemulze byla potřebná koncentrace desetkrát nižší – 0,04 % (Moghimi et al. 2016).

Antimikrobiální vlastnosti proti bakterii *Leuconostoc citreum* byly zkoumány u 24 silic. Nejlépe snižovaly přítomnost silice rostlin *Cinnamomum zeylanicum*, *Origanum vulgare* a *Thymus zygis* s MIC 0,125 % v agarovém médiu. V rajčatové šťávě obsahující tymiánovou

nebo dobromyslovou silici o koncentraci 0,0157 % byla populace zredukována z 8,6 na 6,8 log₁₀ KTJ/ml. Kombinací silice tymiánu a dobromysli o stejné koncentraci došlo k výrazně nižší redukci na 5,7 log₁₀ KTJ/ml (Lee et al. 2020).

3.5.8 Silice hřebíčkovce kořenného (*Eugenia caryophyllata*)

Známé koření hřebíček jsou aromatická sušená poupata hřebíčkovce kořenného (*Eugenia caryophyllata*, syn. *Syzygium aromaticum*), ze kterých se také získává silice. Patří do čeledi myrtovitých (*Myrtaceae*) s více než 1200 druhy (Goňi et al. 2016).

Silice je využívána pro podporu hojení a při lokální aplikaci k úlevě od bolesti, také nachází uplatnění v kosmetickém a aromatickém průmyslu. Také je významnou antioxidační a antimikrobiální látkou, hlavně kvůli obsahu fenylypropanoidu eugenolu, který tvoří kolem 88 % silice (Chaieb et al. 2007). Jeho baktericidní činnost byla prokázána proti celé řadě mikroorganismů, jako je *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* atd. (Devi et al. 2010).

Kromě eugenolu se ještě v silici hřebíčkovce nachází eugenyl acetát, β -caryophyllen, 2-heptanon, ethyl-hexanoát, α -humulen a mnoho dalších látek s obsah pod 0,1 % (Chaieb et al. 2007).

Ve studii Friedman et al. (2004) bylo testováno několik silic a jejich hlavních složek na potlačení potravinových patogenů v jablečné šťávě. Přítomnost *E. coli* O157:H7 a *Salmonella enterica* serovar Hadar byla zredukována na 50 % po přidání silice hřebíčkovce o koncentraci 0,075 a 0,019 % nebo samotného eugenolu 0,05 a 0,012 %. Při porovnání eugenolu s hlavní složkou skořice byla u čiré jablečné šťávy nutná dvojnásobně vyšší koncentrace *trans*-cinnamaldehydu k inaktivaci *E. coli*.

Nanoemulze hřebíčkové silice o koncentraci 0,3 % byla vytvořena pomocí sezamového oleje a povrchově aktivní látky Tween 80 v poměru 1:3. V pomerančové šťávě se touto metodou podařilo inaktivovat přirozené mikroorganizmy o 3,5 log₁₀ KTJ/ml po dobu 72 hodin při skladovací teplotě 4 °C a o 2,5 log₁₀ KTJ/ml pouze na 6 hodin při 25 °C. Dále výsledky fluorescenční mikroskopie ukázaly, že nanoemulzní ošetření vedlo ke změně propustnosti buněčných membrán (Ghosh et al. 2014).

Ve studii Siddiqua et al. (2015) byla zkoumána antibakteriální aktivita dvou přírodních konzervačních látek, hřebíčkové silice a složky skořicové silice *trans*-cinnamaldehydu. *In vitro* byla zjištěna hodnota MIC 0,45 % u hřebíčkové silice a 0,5 % v případě *trans*-cinnamaldehydu.

Požadovaná množství silic jsou však při použití v potravinách až 100krát vyšší než v *in vitro* prostředí, což může negativně ovlivnit sensorické vlastnosti (Shelef et al. 1984).

Díky synergickému efektu bylo v melounové šťávě po přidání ¼ MIC od obou testovaných látek dosaženo téměř stejné redukce přirozené mikroflóry (více než 5 log₁₀ KTJ/ml) jako při aplikaci samotné hřebíčkové silice o hodnotě 2 MIC po dobu 7 dní (Siddiqua et al. 2015).

Také García-García et al. (2011) hodnotili baktericidní činnost u tří složek silic (eugenolu, thymolu a karvakrolu) při individuální i kombinované (2 až 3 sloučenin) aplikaci. Nejúčinnější samostatnou látkou proti *Listeria innocua* byl karvakrol (MBC 150 mg/kg), následovně thymol (MBC 250 mg/kg) a eugenol (MBC 450 mg/kg). Stejně redukce bylo dosaženo kombinací karvakrolu (MBC 75 mg/kg) s thymolem (MBC 62,5 mg/kg) nebo směsí

tří složek karvakrolu s thymolem a eugenolem (MBC 75; 31,25 a 56,25 mg/kg). Další výzkum synergických směsí silic nebo jejich složek je důležitý, vzhledem k tomu, že jsou mikroorganismy potlačeny při nižších koncentracích, což je senzoricke i ekonomicky výhodné.

3.5.9 Silice citroníku limonového (*Citrus limon*)

Do čeledi rourovitých (*Rutaceae*) patří i rod *Citrus*, který zahrnuje přibližně 16 druhů včetně citroníku limonového, jehož plodem je citron. Silice citrusových plodů tvoří největší část na trhu silic a získávají se převážně lisováním oplodí (Tirado et al. 1995). Okolo jedné třetiny světové produkce citrusů slouží k výrobě šťáv, zejména pak plod pomerančovníku čínského (*Citrus sinensis*) pomeranč (Ashurst 2016).

Citrusové plody a šťávy jsou významným zdrojem antioxidantů, jako jsou vitamin C, flavonoidy a další polyfenolické sloučeniny. Antimikrobiální aktivita jejich silic závisí na konkrétním druhu, kultivaru a extrakční metodě citrusů (Fernandez-Lopez et al. 2005; Nannapaneni et al. 2009).

Chemické složení bylo zkoumáno pomocí GC/MS u silice citronu, pomeranče a mandarinky (*Citrus reticulata*). Limonen byl ve všech případech přítomen v největším množství: v citronové silici 59,1 %, pomerančové 85,5 % a mandarinkové 74,4 %. Kromě limonenu bylo v silici citronu nalezeno dalších 6 složek s koncentrací vyšší než 1 %: γ -terpinen, β -pinen, β -bisabolen, p-cymen, cis-thujopsen a geranial (Espina et al. 2011).

Antifungální účinek proti *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium chrysogenum*, *P. verrucosum* byla hodnocena u silic citronu, mandarinky, grapefruitu a pomeranče pomocí agarové diluční metody. Růst uvedených plísní byl kompletně potlačen všemi citrusovými silicemi o koncentraci 0,94 %. Zdá se tedy, že by citrusové silice mohly být vhodnou alternativou k chemickým konzervačním látkám používaných v potravinářském průmyslu (Viuda-Martos et al. 2008).

Alicyclobacillus acidoterrestris je sporotvorná bakterie, která negativně ovlivňuje organoleptické vlastnosti ovocných šťáv, ale i ledových čajů a výrobků z rajčat. Citronová silice o koncentraci 0,08; 0,12 i 0,16 % zcela inhibovala klíčení *A. acidoterrestris* 10⁶ spor/ml ovocné šťávy z citronů po dobu 11 dnů, a to dokonce ve větší míře než komerčně používaný konzervant sorbát draselný (Maldonado et al. 2013).

Tserennadmid et al. (2011) zkoumali účinky čtyř silic šalvěje (*Salvia sclarea*), jalovce (*Juniperus communis*), citronu (*Citrus lemon*) a majoránky (*Origanum majorana*) na potlačení přítomnosti kvasinek (5 log₁₀ KTJ/ml) *Pichia anomala*, *S. cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe* v jablečné šťávě. Při koncentraci 0,1 % byla v čiré šťávě inaktivována *S. cerevisiae* citronovou i majoránkovou silicí, *Pichia anomala* šalvějovou i majoránkovou silicí a *S. pombe* všemi silicemi. Oproti tomu v zakalené šťávě byly nutné vyšší koncentrace silic, protože buňky kvasinek zachycených na částicích šťávy zabraňovaly jejich přístupnosti. Chuť byla po ošetření pozitivně ovlivněna a posouzena jako osvěžující a harmonická.

Také v případě rajčatové šťávy byla ze čtyř silic, vzhledem k přijatelnosti chuti, nejlépe hodnocena citronová (*Citrus lemon*) a mátová (*Mentha pulegium*) při koncentraci 0,0002 %. Zatímco při vyšší koncentraci těchto látek nebo jakékoli koncentraci tymiánové a rozmarýnové silice byly zaznamenány výrazné chuťové změny (Espina et al. 2014).

Potenciální možností přírodní konzervace šťáv by mohla být úprava pH (pomocí okyselovadla – extraktu šťávy s nízkým pH) se současným začleněním silic jako tzv. překážkový efekt (Chung et al. 2018; Yen et al. 2018).

Antibakteriální účinky extraktů citrusových plodů, limety (*Citrus medica*), citronu (*Citrus limon*) a calamansi (*Citrus microcarpa*), byly testovány v kombinaci se složkami silic (thymol a karvakrol) proti patogenům *E. coli* O157: H7, *S. Typhimurium* a *L. monocytogenes*. Nejsilnější synergismus byl pozorován v kombinovaném ošetření komerční šťávy pomocí 20% extraktu z calamansi s thymolem (2 mM; 0,032 %), přičemž došlo k úplnému potlačení sledovaných bakterií (6,9 log₁₀ KTJ/ml). Následovně byla úspěšná kombinace extraktu z citronu s thymolem. Po sensorické stránce byly však nejlépe vyhodnoceny kombinace extraktu calamansi nebo limety s thymolem (Chung et al. 2018).

Melounová šťáva (pH okolo 5,6) byla ošetřena přírodním okyselovadlem – citronovo-jablečnou šťávou (pH do 4,6) současně se směsí složek silic (eugenol:*trans*-cinnamaldehyd, 1:4). Neošetřená šťáva po 14 dnech zahrnovala 7,7 log₁₀ KTJ/ml, kdežto po ošetření 1,75 log₁₀ KTJ/ml aerobních mikroorganismů při skladovací teplotě 4 °C. Pokud byla šťáva ošetřena pouze okyselovadlem zvýšil se obsah aerobních MO o 3 log₁₀ KTJ/ml. Také šťávy s přítomností složek silic i okyselovadla vykazovaly lepší organoleptické skóre než ty, které obsahovaly pouze složky silic (Yen et al. 2018).

4 Materiál a metody

4.1 Šťávy

K experimentální části této diplomové práce byly použity dvě čerstvé rostlinné šťávy poskytnuté společností Fruitissimo Fresh s.r.o. (Praha, Česká republika). Konkrétně se jednalo o druh Get fresh, vyrobený v poměru 3,5:1:0,5, z jablek odrůdy Gala, pomeranče a mrkve. A dále o druh Re-fresh, skládající se z celeru, řepy a mrkve, vyrobený v poměru 2:1,5:1,5. Obě šťávy byly připraveny pomocí odstředivého odšťavňovače. K získání šťávy z pomeranče byl využit manuální citrusovač.

4.2 Kultivační půdy

Pro stanovení celkového počtu mikroorganismů byl jako živné médium použito Plate count agar (PCA), a pro selektivní kultivaci plísní a kvasinek byl využit Sabouraudův agar (SDA). Obě kultivační půdy byly zakoupeny od firmy Oxoid s.r.o. (Brno, Česká republika). Média byla připravena podle návodu, autoklávována a v laminárním boxu napipetována po 10 ml na Petriho misky.

4.3 Silice

Na základě předchozích výzkumů a diplomové práce Ing. Marka Mazala (Mazal 2018), kde byly testovány inhibiční účinky různých silic, byly vybrány silice hřebíčkovce kořeného (*Eugenia caryophyllata*) a voňatky citronové (*Cymbopogon citratus*). Tyto silice od společnosti Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika) byly před použitím skladovány v temnu a chladu.

4.4 Mikrobiologické stanovení

Čerstvě odstředěné šťávy byly rozděleny na jednotlivé varianty po 25 ml do Erlenmayerových baněk a následně byly ošetřeny silicemi. Oba druhy šťáv byly ošetřeny: silicí voňatky o koncentraci 64 $\mu\text{l/l}$ (0,0064 %), silicí hřebíčkovce o stejné koncentraci, a kombinací silic voňatky a hřebíčkovce (1:1) o koncentraci 50 $\mu\text{l/l}$ (0,005 %). Pomocí ručního homogenizátoru Ultra-Turrax T18 digital firmy IKA (Staufen, Německo) byla ve šťávě silice dispergována v emulzi. Následně byly vzorky (25 ml) napipetovány do sterilních vzorkovnic, uzavřeny víčkem a umístěny do chladničky o teplotě 5 °C. Jako kontrolní vzorek byla použita neošetřená šťáva, která byla rovněž napipetována do vzorkovnic.

Mikrobiologický rozbor byl proveden v den ošetření a následně 3., 5. a 7. den. 0,5 ml vzorku bylo odebráno pipetou do mikrozkuumavek, typu Eppendorf a pomocí spirálového očkovače (Spiral Plater EasySpiral®, Interscience, Nom la Bretèche, Francie) byla šťáva po 50 μl spirálově zaočkována na Petriho misku s kultivační půdou PCA a SDA. Metoda je uvedena na Obrázku 4. Pro každou šťávu byly připraveny tři opakování. Poté byly Petriho misky dnem vzhůru umístěny do termostatu o teplotě 37 °C a temnu po dobu 48 hodin. Po 48 hodinách byl vyhodnocen nárůst kolonií na jednotlivých miskách. Hodnota byla přepočtena na \log_{10} KJTJ/ml.



Obrázek 4: Spirálové zaočkování šťávy na kultivační půdu pomocí přístroje Spiral Plater EasySpiral®.

4.5 Senzorické hodnocení

Šťávy byly ošetřeny v den sensorického hodnocení, které proběhlo na základě normy ČSN ISO 6658 v sensorické laboratoři schválené podle normy ČSN ISO 8589. Panel byl tvořen 10 hodnotiteli (6 žen a 4 muži) z řad studentů a zaměstnanců z Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Hodnotitelé byli seznámeni s pokyny a byly jim předloženy vzorky šťáv (30 ml), označených tříciferným náhodným kódem. Dále byla hodnotitelům poskytnuta pitná voda k neutralizaci chuťových pohárku mezi jednotlivými vzorky.

U vzorků bylo hodnoceno 10 znaků: intenzita barvy, příjemnost barvy, intenzita cizích přípachů, intenzita vůně, příjemnost vůně, intenzita chuti, příjemnost chuti, intenzita sladké chuti, intenzita kyselé chuti, intenzita cizích příchutí. Uvedené znaky byly zaznamenávány do připravených formulářů, přičemž byly použity nestrukturované grafické stupnice se slovním popisem krajních bodů. U intenzity slovy nevýrazná/výrazná a u příjemnosti odporná/příjemná.

5 Výsledky

5.1 Výsledky mikrobiologického stanovení

Po 48 hodinách kultivace vzorků rostlinných šťáv v inkubátoru o teplotě 37 °C, byly spočítány kolonie mikroorganismů a podle tabulek EasySpiral® byly zjištěny hodnoty KTJ/ml, které byly následně převedeny na \log_{10} KTJ/ml. Pokud množství mikroorganismů přesahovala hodnotu $2 \cdot 10^7$ KTJ, jsou v Tabulce 1, 2 a 5 uvedeny jako $>7,5 \log_{10}$ KTJ/ml. Mikrobiologické rozbory celkového počtu mikroorganismů i kvasinek a plísní u ošetřených i neošetřených vzorků šťáv byly provedeny 3., 5. a 7. den. U neošetřených šťáv byla množství mikroorganismů zjišťována i v den přípravy vzorků (1. den).

Statistické zpracování a vyhodnocení výsledků přítomnosti mikroorganismů bylo provedeno pomocí programu Microsoft Excel a Statistica 12. Konkrétně byl zjišťován aritmetický průměr a směrodatná odchylka ze třech opakování každého vzorku. Dále byly výsledky zhodnoceny jednofaktorovou analýzou rozptylu (ANOVA), také byla provedena post hoc analýza, konkrétně Scheffého metoda. Testování hypotéz probíhalo na hladině významnosti $\alpha=0,05$.

5.1.1 Výsledky stanovení celkového počtu mikroorganismů

Celkové počty mikroorganismů byly stanovovány na kultivační půdě Plate count agar (PCA). Silice hřebíčkovce je v tabulkách označena jako hřebíček a silice voňatky jako voňatka. Obě silice byly v koncentraci 64 mg/l. Kombinace silice hřebíčkovce a voňatky je v tabulkách uvedena zkratkou hřeb. + voň., koncentrace byla 50 mg/l.

Tabulka 1 Celkové počty mikroorganismů (\log KTJ/ml) v jednotlivých dnech u jablečno-pomerančovo-mrkvové šťávy (JPM) v závislosti na ošetření silicemi

	1. den	SD	3. den	SD	5. den	SD	7. den	SD
Bez ošetření	4,85	± 0,26	3,53	± 0,21	>7,5	± 0,00	4,22	± 0,43
Voňatka	-	-	4,32	± 0,21	5,57	± 0,11	*	*
Hřebíček	-	-	4,57	± 0,10	5,90	± 0,04	3,60	± 0,08
Hřeb. + voň.	-	-	4,12	± 0,12	6,78	± 0,09	*	*

Poznámka: - = nebylo měřeno, * = hydrolýza kultivační půdy

V Tabulce 1 jsou uvedeny průměrné hodnoty celkového počtu mikroorganismů v jablečno-pomerančovo-mrkvové šťávě na kultivační půdě PCA. Třetí den od ošetření šťáv silicemi byl u kontrolního vzorku pozorován pokles mikroorganismů oproti prvnímu dni, a současně byla hodnota nižší než u šťáv ošetřených. Oproti tomu pátý den byl u neošetřené šťávy pozorován nejvyšší nárůst CPM. Nejúčinněji inhibovala mikroorganismy silice voňatky. V sedmém dni od ošetření došlo u všech vzorků ošetřených silicí voňatky a kombinace silic voňatky a hřebíčkovce k hydrolýze kultivační půdy, proto nemohly být hodnoty CPM určeny.

Na základě analýzy rozptylu byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky

z třetího dne od ošetření. Po provedení Scheffého metody byl potvrzen statisticky významný rozdíl mezi šťávou bez ošetření a šťávou ošetřenou silicemi.

Tabulka 2 Celkové počty mikroorganismů (log KTJ/ml) v jednotlivých dnech u celerovo-řepovo-mrkvové šťávy (ČRM) v závislosti na ošetření silicemi

	0. den	SD	3. den	SD	5. den	SD	7. den	SD
Bez ošetření	5,64	± 0,25	4,52	± 0,04	6,33	± 0,30	>7,5	± 0,00
Voňatka	-	-	4,42	± 0,46	4,34	± 0,20	>7,5	± 0,00
Hřebíček	-	-	4,38	± 0,26	4,04	± 0,12	6,56	± 0,11
Hřeb. + voň.	-	-	4,26	± 0,26	3,84	± 0,10	>7,5	± 0,00

Poznámka: - = nebylo měřeno

U celerovo-řepovo-mrkvové šťávy (Tabulka 2) byl třetí a pátý den experimentu pozorován nejnižší nárůst celkového počtu mikroorganismů po ošetření kombinací hřebíčkové a voňatkové silice. Oproti tomu sedmý den přesáhla hodnota CPM 7,5 log₁₀ KTJ/ml u všech vzorků šťáv, kromě vzorků ošetřených hřebíčkovou silicí.

Výsledky analýzy rozptylu ukázaly, že třetí den experimentu nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly mezi ošetřenou a neošetřenou šťávou. Naopak pátý den statisticky významné rozdíly potvrzeny byly. Následně post hoc analýza Scheffého metodou ukázala statisticky významný rozdíl mezi šťávou bez ošetření a šťávou ošetřenou silicemi.

5.1.2 Výsledky stanovení kvasinek a plísní

Počty kolonií kvasinek a plísní byly stanovovány na kultivační půdě Sabouraudův agar (SDA). Dále byly kolonie kvasinek spočítány a zhodnoceny i na Plate count agaru (PCA). Silice hřebíčkovce je v tabulkách označena jako hřebíček a silice voňatky jako voňatka. Obě silice byly o koncentraci 64 mg/l. Kombinace silice hřebíčkovce a voňatky je v tabulkách uvedena zkratkou hřeb. + voň., koncentrace byla 50 mg/l.

Tabulka 3 Počet kvasinek a plísní (log KTJ/ml) u jablečno-pomerančovo-mrkvové šťávy (JPM) na kultivační půdě SDA v závislosti na ošetření silicemi

	0. den	SD	3. den	SD	5. den	SD	7. den	SD
Bez ošetření	4,68	± 0,06	4,60	± 0,12	7,25	± 0,20	7,04	± 0,11
Voňatka	-	-	4,71	± 0,08	6,49	± 0,26	5,88	± 0,03
Hřebíček	-	-	4,84	± 0,07	5,87	± 0,03	4,61	± 0,02
Hřeb. + voň.	-	-	4,22	± 0,33	6,58	± 0,09	4,91	± 0,04

Poznámka: - = nebylo měřeno

V Tabulce 3 jsou uvedeny průměrné hodnoty kvasinek a plísní v jablečno-pomerančovo-mrkvové šťávě na kultivační půdě SDA. Třetí den experimentu byl nejnižší nárůst kvasinek a plísní pozorován u šťávy ošetřené kombinací silic hřebíčkovce a voňatky. Oproti tomu šťáva ošetřená hřebíčkovou silicí vykazovala vyšší přítomnost mikroorganismů

než šťáva bez ošetření. Pátý a sedmý den však hřebíčková silice potlačila růst mikroorganismů nejlépe.

Třetí den experimentu bylo potvrzeno analýzou rozptylu, že existují statisticky významné rozdíly mezi vzorky. Scheffého metoda ukázala, že rozdíly byly pouze mezi sadou vzorků šťáv ošetřených hřebíčkovou silicí a kombinací silic.

I pátý den experimentu byly mezi vzorky statisticky významné rozdíly, Scheffého metoda je nepotvrdila pouze mezi šťávou ošetřenou voňatkovou silicí a šťávou ošetřenou kombinací silic.

Sedmý den experimentu byly také mezi vzorky statisticky významné rozdíly, kdy největší nárůst byl pozorován u neošetřeného vzorku. Post hoc Scheffého metoda je prokázala mezi neošetřenou a ošetřenou šťávou, ale i vzájemně mezi šťávami ošetřenými silicemi.

Tabulka 4 Počet kvasinek (log KTJ/ml) u jablečno-pomerančovo-mrkvové šťávy (JPM) na kultivační půdě PCA v závislosti na ošetření silicemi

	0. den	SD	3. den	SD	5. den	SD	7. den	SD
Bez ošetření	2,78	± 0,07	3,96	± 0,35	3,06	± 0,04	0,00	± 0,00
Voňatka	-	-	2,97	± 0,12	2,26	± 0,08	*	*
Hřebíček	-	-	2,84	± 0,11	1,86	± 0,44	0,00	± 0,00
Hřeb. + voň.	-	-	3,02	± 0,09	3,03	± 0,04	*	*

Poznámka: - = nebylo měřeno, * = hydrolyza kultivační půdy

Třetí i pátý den experimentu nejlépe potlačila růst kvasinek v jablečno-pomerančovo-mrkvové šťávě na médiu PCA hřebíčková silice (viz Tabulka 4). Následně došlo sedmý den k úplné redukci mikroorganismů.

Statistická analýza potvrdila statisticky významné rozdíly mezi vzorky šťáv třetí i pátý den experimentu. U vzorků z třetího dne experimentu byly statisticky významné rozdíly mezi neošetřenými a ošetřenými vzorky, kdežto u vzorků z pátého dne byly statisticky významné rozdíly zaznamenány mezi šťávou ošetřenou hřebíčkovou nebo voňatkovou silicí a neošetřenou šťávou. Dále pak mezi hřebíčkovou silicí a kombinací silic.

Tabulka 5 Počet kvasinek a plísni (log KTJ/ml) u celerovo-řepovo-mrkvové šťávy (CŘM) na kultivační půdě SDA v závislosti na ošetření silicemi

	0. den	SD	3. den	SD	5. den	SD	7. den	SD
Bez ošetření	5,89	± 0,04	5,97	± 0,04	6,39	± 0,21	6,65	± 0,05
Voňatka	-	-	6,28	± 0,29	4,46	± 0,22	5,93	± 0,05
Hřebíček	-	-	5,62	± 0,09	4,52	± 0,10	6,95	± 0,05
Hřeb. + voň.	-	-	5,98	± 0,02	5,97	± 0,12	>7,5	± 0,00

Poznámka: - = nebylo měřeno

V Tabulce 5 jsou uvedeny průměrné hodnoty počtu kvasinek a plísni u celerovo-řepovo-mrkvové šťávy na kultivační půdě PCA. Třetí den experimentu vykazuje nejvyšší přítomnost mikroorganismů šťáva ošetřená voňatkovou silicí, zatímco pátý den šťáva bez ošetření a sedmý den šťáva ošetřená kombinací silic. Nejmenší nárůst kvasinek a plísni byl třetí den experimentu zaznamenán u šťávy ošetřené hřebíčkovou silicí, zatímco pátý a sedmý den silicí voňatky.

Analýzou rozptylu byly zjištěny statisticky významné rozdíly třetí i pátý den měření. Pomocí Scheffého metody byl u třetího dne měření nalezen statisticky významný rozdíl mezi šťávou ošetřenou voňatkovou silicí a šťávou ošetřenou hřebíčkovou silicí. U pátého dne měření odhalila post hoc analýza statisticky významný rozdíl mezi neošetřenými a ošetřenými šťávami.

Tabulka 6 Počet kvasinek (log KTJ/ml) u celerovo-řepovo-mrkvové šťávy (CŘM) na kultivační půdě PCA v závislosti na ošetření silicemi

	0. den	SD	3. den	SD	5. den	SD	7. den	SD
Bez ošetření	2,62	± 0,10	3,08	± 0,04	3,23	± 0,02	2,7	± 0,15
Voňatka	-	-	3,05	± 0,11	3,16	± 0,03	3,5	± 0,10
Hřebíček	-	-	2,96	± 0,09	2,74	± 0,11	3,24	± 0,13
Hřeb. + voň.	-	-	3,15	± 0,25	2,60	± 0,00	3,35	± 0,05

Poznámka: - = nebylo měřeno

Růst kvasinek během 7 dní v celerovo-řepovo-mrkvové šťávě na kultivační půdě PCA je zaznamenán v Tabulce 6. Třetí a sedmý den měření nejlépe ze všech silic potlačila kvasinky silice hřebíčková, zatímco pátý den byl pozorován nejvyšší pokles u kombinace silic.

U třetího dne měření nebyl analýzou rozptylu nalezen žádný statisticky významný rozdíl. Naopak pátý i sedmý den potvrdila ANOVA statisticky významné rozdíly. Post hoc analýza určila v pátý den měření statisticky významný rozdíl mezi vzorky šťávy ošetřené voňatkovou silicí a kombinací silic i mezi šťávou ošetřenou voňatkovou silicí a hřebíčkovou silicí, dále pak mezi vzorky neošetřené šťávy a šťávou ošetřenou hřebíčkovou nebo voňatkovou silicí. V sedmý den měření byly pomocí post hoc analýzy určeny statisticky významné rozdíly mezi sadou vzorků šťáv bez ošetření a šťáv s ošetřením silicemi.

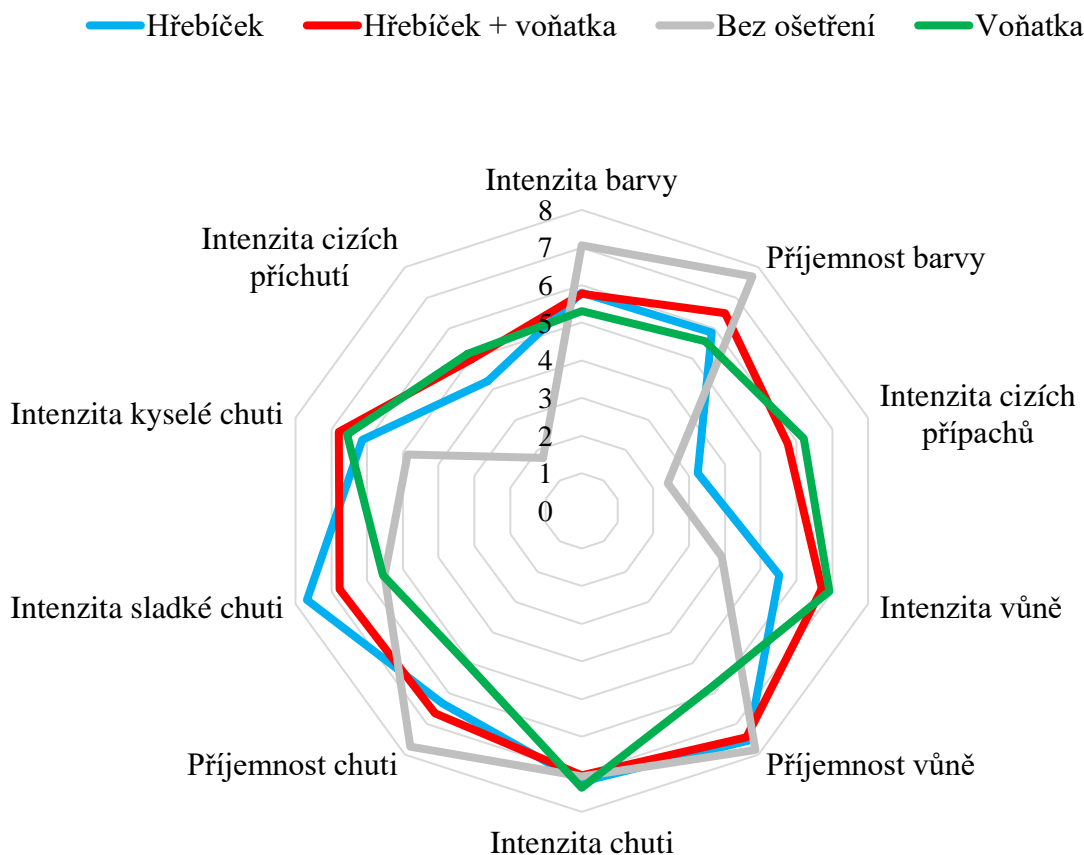
5.2 Výsledky sensorického hodnocení

Z vyplněných dotazníků sensorického hodnocení šťáv byly výsledky každého konzumenta na nestrukturovaných grafických stupnicích změřeny pomocí pravítka a následně zpracovány v programu Microsoft Excel. Konkrétně byly zjišťovány ukazatelé: minimální a maximální hodnota, aritmetický průměr, směrodatná odchylka a variační koeficient vyjádřený v procentech, viz Tabulka 7 a 8. Následně byly hodnoty aritmetických průměru použity pro sestavení paprskových grafů vyjadřujících sensorické profily vzorků šťáv, viz Graf 1 a 2.

Tabulka 7 Vyhodnocení jednotlivých deskriptorů u neošetřené a ošetřené jablečno-pomerančovo-mrkvové šťávy

	Vzorek	Minimum	Maximum	Průměr	SD	Variační koeficient (%)
Intenzita barvy	Bez ošetření	2,30	9,50	7,06	2,25	31,85
	Hřebíček	4,60	8,10	5,80	1,04	17,88
	Voňatka	2,90	8,70	5,31	1,74	32,82
	Hřeb. + voň.	3,80	7,40	5,77	1,31	22,74
Příjemnost barvy	Bez ošetření	5,40	8,90	7,71	1,23	15,96
	Hřebíček	3,20	8,40	5,87	1,80	30,58
	Voňatka	3,20	7,70	5,57	1,47	26,37
	Hřeb. + voň.	4,30	8,90	6,49	1,36	20,91
Intenzita cizích příchutí	Bez ošetření	0,80	7,60	2,40	1,89	78,77
	Hřebíček	0,80	7,20	3,25	2,17	66,72
	Voňatka	3,00	9,60	6,20	2,38	38,39
	Hřeb. + voň.	0,80	9,20	5,76	2,60	45,06
Intenzita vůně	Bez ošetření	0,90	6,70	3,91	1,73	44,17
	Hřebíček	1,20	8,20	5,52	2,09	37,89
	Voňatka	4,30	9,50	6,92	1,58	22,80
	Hřeb. + voň.	4,80	9,00	6,71	1,43	21,29
Příjemnost vůně	Bez ošetření	5,80	9,40	7,85	1,31	16,63
	Hřebíček	4,80	9,40	7,54	1,50	19,90
	Voňatka	2,40	7,60	5,82	1,55	26,72
	Hřeb. + voň.	6,00	8,70	7,44	0,82	11,07
Intenzita chuti	Bez ošetření	4,20	9,00	7,06	1,49	21,04
	Hřebíček	4,10	9,10	7,20	1,27	17,64
	Voňatka	5,30	9,50	7,36	1,25	17,00
	Hřeb. + voň.	4,80	9,60	7,03	1,66	23,61
Příjemnost chuti	Bez ošetření	5,80	9,50	7,74	1,28	16,58
	Hřebíček	2,60	9,10	6,32	2,35	37,14
	Voňatka	1,60	8,40	5,10	2,21	43,26
	Hřeb. + voň.	3,40	8,60	6,64	1,56	23,56
Intenzita sladké chuti	Bez ošetření	1,40	8,80	5,51	2,28	41,40
	Hřebíček	6,40	9,00	7,68	0,96	12,51
	Voňatka	2,30	7,50	5,55	1,64	29,55
	Hřeb. + voň.	4,50	8,80	6,77	1,24	18,31
Intenzita kyselé chuti	Bez ošetření	1,40	8,50	4,86	2,51	51,57
	Hřebíček	1,30	9,50	6,13	2,96	48,28
	Voňatka	2,00	9,20	6,56	2,34	35,60
	Hřeb. + voň.	3,40	9,50	6,79	2,14	31,59
Intenzita cizích příchutí	Bez ošetření	0,50	3,70	1,75	1,02	58,18
	Hřebíček	0,50	8,20	4,26	2,62	61,43
	Voňatka	1,30	9,70	5,16	2,67	51,81
	Hřeb. + voň.	1,60	9,70	4,98	2,24	45,02

Graf 1 Senzorický profil neošetřené a ošetřené jablečno-pomerančovo-mrkvové šťávy

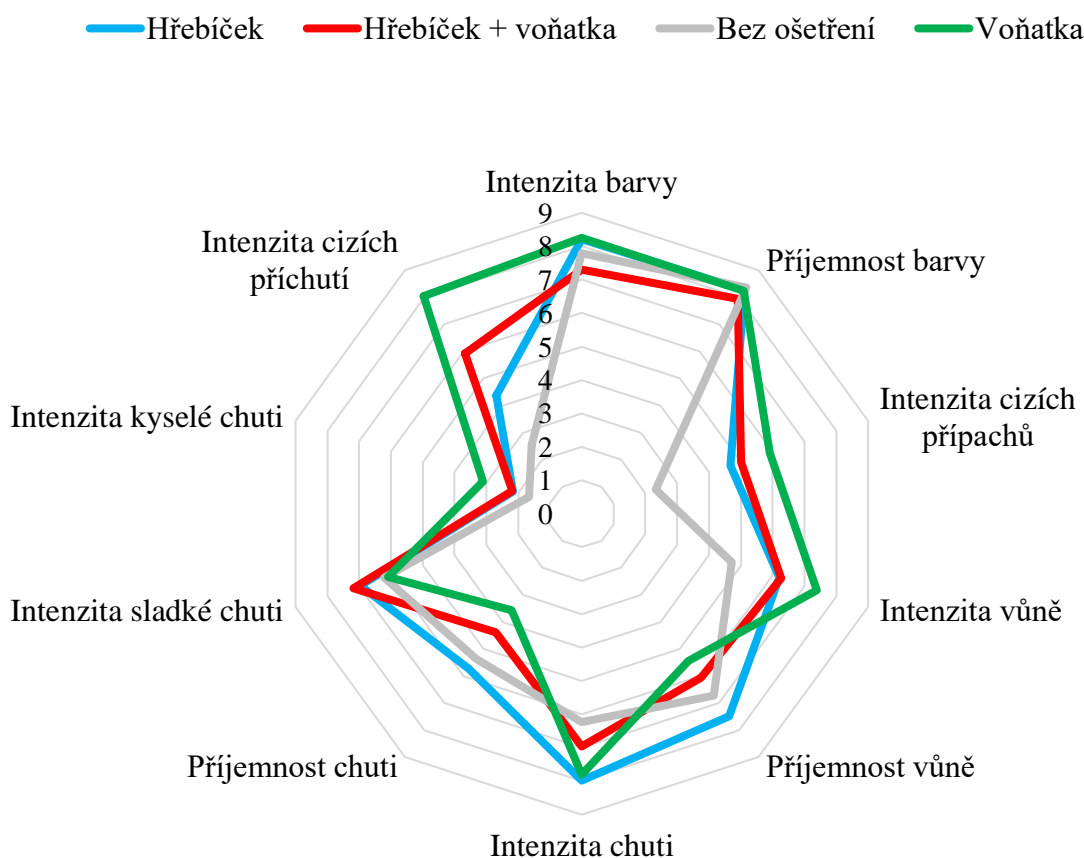


Z výsledků sensorického hodnocení (Tabulka 7 a Graf 1) vyplývá, že u všech vzorků šťáv ošetřených silicemi byla intenzita a příjemnost barvy hodnocena hůře než šťáva neošetřená. Dále je patrné, že intenzita cizích přípachů byla pro konzumenty nejvíce znatelná u šťávy ošetřené voňatkovou silicí. Oproti tomu u šťávy ošetřené hřebíčkovou silicí byla intenzita cizích přípachů téměř porovnatelná se šťávou bez ošetření. Výsledky deskriptoru příjemnosti vůně byly vzájemně velmi podobné. Avšak příjemnost vůně u vzorku ošetřeného silicí voňatky byla hodnocena výrazně hůře. U intenzity chuti nebyly v hodnocení téměř žádné rozdíly mezi vzorkem neošetřené šťávy a vzorky šťáv se silicemi. Chuťově byla pro konzumenty nejpříjemnější šťáva bez přítomnosti silic, avšak kombinace silic a hřebíčková silice ve šťávě byly výrazně lépe hodnoceny oproti šťávě s voňatkovou silicí. Jako vzorek s nejvyšší intenzitou sladké chuti se jevil vzorek s hřebíčkovou silicí. Šťavy ošetřené silicemi byly kyselejší než šťáva bez ošetření, ale zároveň byly pouze lehce nad průměrnou hodnotou kyselosti. Rovněž intenzita cizích příchutí se pohybovala kolem průměru.

Tabulka 8 Vyhodnocení jednotlivých deskriptorů u neošetřené a ošetřené celerovo-řepovo-mrkvové šťávy

	Vzorek	Minimum	Maximum	Průměr	SD	Variační koeficient (%)
Intenzita barvy	Bez ošetření	5,8	9,6	7,79	1,25	16,06
	Hřebíček	6,9	9,8	8,21	1	12,21
	Voňatka	4,6	9,5	8,25	1,41	17,06
	Hřeb. + voň.	3,4	9,6	7,3	1,72	23,58
Příjemnost barvy	Bez ošetření	6,7	9,6	8,37	1,03	12,27
	Hřebíček	6,7	9,8	8,27	1,03	12,41
	Voňatka	6,7	9,8	8,25	1,2	14,58
	Hřeb. + voň.	6,2	9,8	7,94	1,19	14,98
Intenzita cizích přípachů	Bez ošetření	0,9	5,8	2,33	1,39	59,56
	Hřebíček	1,2	9,5	4,67	2,56	54,72
	Voňatka	1,7	9,2	5,91	2,43	41,18
	Hřeb. + voň.	0,8	9,2	5,01	2,95	58,8
Intenzita vůně	Bez ošetření	1,8	8,1	4,72	1,83	38,81
	Hřebíček	2	9,5	6,21	2,24	36,06
	Voňatka	2,3	9,5	7,39	1,92	25,98
	Hřeb. + voň.	3,4	8,6	6,27	1,62	25,77
Příjemnost vůně	Bez ošetření	2,5	9,3	6,73	1,99	29,62
	Hřebíček	5,3	9,7	7,48	1,45	19,4
	Voňatka	0,9	9,1	5,43	2,6	47,85
	Hřeb. + voň.	1,6	8,5	6,06	2,22	36,67
Intenzita chuti	Bez ošetření	4,6	9,2	6,23	1,47	23,56
	Hřebíček	6,8	9,8	7,98	1,04	13,03
	Voňatka	3,1	9,7	7,8	2,17	27,81
	Hřeb. + voň.	3,7	9,3	6,96	1,67	24,04
Příjemnost chuti	Bez ošetření	2,4	8	5,37	1,85	34,44
	Hřebíček	2,1	8,4	5,73	2,02	35,29
	Voňatka	0,8	9,3	3,58	2,17	60,57
	Hřeb. + voň.	0,8	7,2	4,39	1,87	42,52
Intenzita sladké chuti	Bez ošetření	3,2	8,4	6,21	1,8	28,91
	Hřebíček	5,2	8,5	6,96	1,14	16,42
	Voňatka	0,4	9,2	6,09	2,8	45,9
	Hřeb. + voň.	3,2	9,3	7,18	1,75	24,44
Intenzita kyselé chuti	Bez ošetření	0,4	2,7	1,66	0,78	47,22
	Hřebíček	0	8,7	2,16	2,37	86,23
	Voňatka	0,2	7,6	3,11	2,51	80,7
	Hřeb. + voň.	0,7	4,2	2,18	1,06	48,45
Intenzita cizích příchutí	Bez ošetření	0	5,2	2,55	1,63	63,84
	Hřebíček	1	9,5	4,36	2,55	58,4
	Voňatka	4	9,2	8,05	1,39	17,3
	Hřeb. + voň.	3	9,2	5,93	1,97	33,29

Graf 2 Senzorický profil neošetřené a ošetřené celerovo-řepovo-mrkvové šťávy



Oproti jablečno-pomerančovo-mrkvové šťávě (Tabulka 7 a Graf 1) byla intenzita a příjemnost barvy u celerovo-řepovo-mrkvové šťávy (Tabulka 8 a Graf 2) velmi podobně hodnocena u neošetřené i ošetřené šťávy. Také z Tabulky 8 a Grafu 2 vyplývá, že v případě šťávy s hřebíčkovou nebo voňatkovou silicí byla intenzita barvy dokonce vyšší než u šťávy bez silice. Cizí zápachy byly ze vzorků ošetřených šťáv konzumenty nejméně zaznamenány u vzorku s hřebíčkovou silicí, což odpovídalo i nejpozitivněji hodnocené příjemnosti vůně, dokonce lépe než šťáva bez ošetření. Zároveň byla hřebíčková silice ve šťávě chuťově nejvýraznější, což bylo konzumentům příjemnější než šťáva bez přítomnosti silice. Vzorky ošetřené kombinací silic a hřebíčkovou silicí vykazovaly obdobně vyšší hodnoty intenzity sladké chuti. Dále je možné říci, že přítomnost voňatkové silice způsobila kyselejší chuť šťávy, také byla pro většinu konzumentů vnímaná jako velmi výrazná cizí příchuť.

6 Diskuze

Pasterace je nejpoužívanější metodou konzervace rostlinných šťáv, současně však při tomto ošetření dochází k velkým nutričním i organoleptickým ztrátám, proto jsou spotřebitelé stále více upřednostňovány šťavy čerstvé. Jelikož je však jejich trvanlivost velmi nízká, je pro výrobce výzvou, jak požadavek na čerstvé šťavy uspokojit a zároveň předejít ekonomickým ztrátám. Také je u neošetřených šťáv vyšší pravděpodobnost přenosu potravinových patogenů, zatímco při aplikaci tepelných ošetření je jejich přítomnost potlačena. Řešením tohoto problému jsou netepelné metody, jako jsou vysoký hydrostatický tlak, pulzní elektrické pole, ultrazvuk, vysokotlaká homogenizace, ultrafialové záření nebo jejich vzájemné kombinace. I přesto, že můžeme pomocí těchto metod prodloužit dobu trvanlivosti v řádech týdnů a současně zachovat nutriční i organoleptické vlastnosti, jsou vysoké počáteční náklady pro výrobce překážkou (Gutiérrez et al. 2009; Gómez et al. 2011).

Kompromisem by mohlo být ošetření šťáv přírodními antimikrobiálními látkami, jako jsou silice, laktoperoxidáza, lysozym, chitosan nebo některé bakteriociny (Raybaudi-Massilia et al. 2009). Pomocí těchto látek můžeme spotřebitelům poskytnout produkt, který má v porovnání s čerstvým produktem delší trvanlivost, zároveň jsou zachovány nebo minimálně ovlivněny nutriční a organoleptické vlastnosti a také vstupní náklady jsou oproti netepelným metodám uvedeným výše výrazně nižší (Pandey & Negi 2018). Tato diplomová práce je zaměřena na využití antimikrobiálních účinků silice hřebíčkové, voňatkové a kombinace těchto silic k prodloužení úchovy rostlinných šťáv. Konkrétně byla zkoumána jablečno-pomerančovo-mrkvová a celerovo-řepovo-mrkvová šťáva.

Jelikož je ve vědeckých člancích zaměřených na konzervační účinky hřebíčkové a voňatkové silice věnována pozornost pouze ovocným šťávám, a ne šťávám zeleninovým, je složité výsledky porovnávat. Vzhledem k tomu, že v našem experimentu došlo u jablečno-pomerančovo-mrkvové šťávy k hydrolyze kultivační půdy PCA u dvou ze tří sad ošetřených vzorků, a celkovému přirozenému poklesu mikroorganismů v 7. dni po ošetření, byly jako vypovídající výsledky použity hodnoty z pátého dne měření.

Adjou et al. (2017) zkoumali účinky voňatkové silice na inhibici přirozených mikroorganismů v čerstvé pomerančové šťávě. Ke zjištění celkového počtu bakterií (CPB) byly zředěné vzorky šťáv nanášeny na PCA agar v Petriho miskách, které byly následně inkubovány při 30 °C po dobu 72 hodin. Kvasinky a plísně byly identifikovány z Petriho misek inkubovaných při 28 °C 7 dní, na které byla nejprve nanášena šťáva a potom bramboro-dextrózový agar (Potato Dextrose Agar, PDA). Počáteční CPB na PCA byl 5,58 log₁₀ KTJ/ml, v naší jablečno-pomerančovo-mrkvové šťávě byl CPM 4,85 log₁₀ KTJ/ml. Zatímco počet plísní a kvasinek byl ve studii Adjou et al. (2017) 7,3 log₁₀ KTJ/ml, v našem experimentu byl 4,68 log₁₀ KTJ/ml. Po 15 dnech při skladovací teplotě 25 °C, byl u pomerančové šťávy ošetřené různými koncentracemi silic voňatky učiněn mikrobiologický rozbor. U koncentrace 0,0062 % byl počet CPB zredukován na 1 log₁₀ KTJ/ml, rovněž počet kvasinek a plísní byl snížen na tuto hodnotu (Adjou et al. 2017). CPM v naší studii byl z testovaných silic nejlépe potlačen voňatkovou silicí o koncentraci 0,0064 %, a to konkrétně 5. den od ošetření na hodnotu 5,57 log₁₀ KTJ/ml. Stejný den šťáva bez ošetření vykazovala přítomnost více než 7,5 log₁₀ KTJ/ml (Tabulka 1). Oproti tomu byl počet plísní a kvasinek zredukován pouze o 1,16 log₁₀ KTJ/ml ve

srovnání s neošetřenou šťávou v 7. den od ošetření a ze všech testovaných silic byla nejméně účinná (viz Tabulka 3).

Také Helal et al. (2006) zaměřili studii na potlačení růstu kvasinek v pomerančové šťávě pomocí voňatkové silice. Z čerstvé šťávy skladované v otevřených lahvích po dobu 7 dní při pokojové teplotě byly izolovány kvasinky a plísně. Následně byly aplikovány na SDA agar a inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Proti nejvíce rezistentním druhům *A. niger*, *A. flavus* a *S. cerevisiae* působila silice voňatky s MIC 0,15 %. Takto vysoká koncentrace by výrazně negativně ovlivnila sensorické vlastnosti šťávy. Naše testovaná koncentrace 0,0064 % voňatkové silice byla ze všech silic konzumenty označena jako nejintezivnější cizí přípach u obou zkoumaných šťáv. Také příjemnost chuti jablečno-pomerančovo-mrkvové šťávy ošetřené voňatkou byla na nestrukturované grafické stupnici konzumenty hodnocena nejnižší (viz Graf 1 a 2).

Antifungální účinky silice voňatky proti *A. flavus* a *A. ochraceus* byly zkoumány i u šťávy jablečné. Do šťávy v Erlenmayerově baňce byla přidána silice, poté byla inokulována suspenzí testovaných mikroorganismů a inkubována při 25 °C 45 dní. Při koncentraci silice 0,05 % byla přítomnost obou plísní úplně potlačena při skladovací teplotě 4 °C po dobu 4 týdnů (Eissa et al. 2008). V naší studii byly kvasinky a plísně v jablečno-pomerančovo-mrkvové šťávě nejlépe zredukovány hřebíčkovou silicí, současně byly prokázány statisticky významné rozdíly mezi neošetřeným a ošetřenými vzorky šťáv. Zatímco ve šťávě celerovo-řepovo-mrkvové prokázala nejvyšší antifungální aktivitu voňatková silice (viz Tabulka 3 a 5).

Činnost několika silic a jejich hlavních složek byla testována vzhledem ke schopnosti inaktivovat potravinové patogeny v jablečné šťávě. V čirých šťávách inkubovaných při 37 °C 1 hodinu byl počet kolonií *E. coli* O157:H7 byl snížen o 50 % po přidání hřebíčkové nebo voňatkové silice o koncentraci 0,075 a 0,079 % a *S. enterica* serovar Hadar při koncentracích 0,019 a 0,0097 %. Jelikož u zakalené šťávy byly silice adsorbovány na povrch jablečné drti, snížila se účinnost daných koncentrací. Také při porovnání složky silice eugenolu a *trans*-cinnamaldehydu bylo zjištěno, že k potlačení přítomnosti *E. coli* O157:H7 bylo nutné použít dvojnásobně vyšší koncentraci *trans*-cinnamaldehydu než eugenolu.

Raybaudi-Massilia et al. (2006) také studovali inhibiční účinky silic vůči patogenním bakteriím *S. Enteritidis*, *E. coli* a *L. innocua* u jablečné (pH 4,2) a hruškové šťávy (pH 3,97). Uvedené patogeny se podařilo zcela inaktivovat $\geq 5 \log_{10}$ KTJ/ml při přítomnosti 0,2% koncentraci voňatkové silice. Dále byla ve výzkumu použita melounová šťáva (pH 5,91), u které k potlačení růstu stejných mikroorganismů bylo nutné aplikovat vyšší koncentraci 0,5 %. Skutečnost, že čím je hodnota pH nižší, tím má silice vyšší antimikrobiální účinky, ovlivnila i naše výsledky. Po sedmi dnech od ošetření hřebíčkovou silicí byl u jablečno-pomerančovo-mrkvové šťávy CPM 3,6 \log_{10} KTJ/ml, kdežto u celerovo-řepovo-mrkvové šťávy byl CPM 6,56 \log_{10} KTJ/ml (viz Tabulka 1 a 2). Jelikož v původní vyhlášce č. 132/2004 Sb. (zrušena v roce 2006) odpovídala maximální přípustná hodnota CPM 6 \log_{10} KTJ/ml, nemohla by být celerovo-řepovo-mrkvová šťáva nabízena. V současné době podle nařízení komise EU 2073/2005 není přípustná hodnota CPM regulována.

Účinnost silic je kromě nižšího pH také zvýšena, pokud je šťáva se silicí dispergována v nanoemulzi. Ve studii Salvia-Trujillo et al. (2015) byla nejprve připravena homogenizací hrubá emulze z rozpuštěného alginátu sodného se silicí, a poté byla pomocí mikrofluidizace vytvořena nanoemulze. Touto nanoemulzí byla snížena přítomnost patogenní bakterie *E. coli* v *in vitro* podmínkách během 30 minut kontaktu s voňatkovou silicí o 4,1 log₁₀ KTJ/ml.

Další možností, jak snížit koncentraci potřebnou k inaktivaci nežádoucích mikroorganismů je využití synergických účinků dvou a více antimikrobiálních látek. Inhibiční účinky proti nežádoucí přirozené mikroflóře v melounové šťávě byly zkoumány u dvou přírodních konzervačních látek, jak při samostatném působení, tak i jejich kombinace. Konkrétně se jednalo o hřebíčkovou silici a složku *trans*-cinnamaldehyd. V *in vitro* podmínkách byly jako účinné potvrzeny MIC 0,45 % u hřebíčkové silice a 0,5 % u *trans*-cinnamaldehydu. Do melounové šťávy byly výše uvedené látky přidány v koncentracích MIC, dvou MIC při oddělené aplikaci a při kombinovaném ošetření ¼ MIC od každé látky. Jako kontrola byla použita neošetřená šťáva. Celkový počet aerobních bakterií byl stanovován na PCA agaru, přičemž inokulované Petriho misky byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 7 dní a nárůst byl spočítán vždy po 24 hodinách. Z výsledků posledního dne měření je patrné, že účinnost hřebíčkové silice o koncentraci 2 MIC byla stejně efektivní (počet kolonií byl snížen o více než 5 log₁₀ KTJ/ml) jako kombinace obou látek. Vzhledem k tomu, že je koncentrace kombinace látek rovna hodnotě 0,2375 % můžeme tvrdit, že by pravděpodobně nebyla konzumenty sensoricky přijata (Siddiqua et al. 2015). V naší studii jsme také zkoumali synergický účinek dvou antimikrobiálních látek, konkrétně voňatkové a hřebíčkové silice o celkové koncentraci 0,005 %. Synergický efekt látek byl prokázán 3. den od ošetření, kdy byl CPM nejlépe zredukován kombinací silic u obou testovaných šťáv. Další dny však vykazovala kombinace silic nejnižší účinnost (viz Tabulka 1 a 2). Z výsledků sensorického hodnocení vyplývá, že u jablečno-pomerančovo-mrkvové šťávy ošetřené touto kombinací byla příjemnost barvy a chuti ohodnocena lépe než vzorky šťáv ošetřené hřebíčkovou nebo voňatkovou silicí o koncentraci 0,0064 % (viz Graf 1 a 2). Tato skutečnost odpovídá předpokladu, že s nižší koncentrací silice jsou méně ovlivněny sensorické vlastnosti šťávy. V dalším výzkumu by bylo vhodné prozkoumat kombinace silic v koncentraci 0,0064 %.

Ve studii García-García et al. (2011) zkoumali individuální i synergické účinky u třech různých složek silic thymolu, eugenolu a karvakrolu na potlačení bakteriálního růstu v *in vitro* podmínkách. Zatímco při samostatné aplikaci thymolu byla hodnota MBC 250 mg/kg, tak stejné redukce populací bakterie *L. innocua* bylo dosaženo při kombinovaném ošetření karvakrolu s thymolem o celkové hodnotě MBC 137,5 mg/kg. Jelikož je tato koncentrace téměř poloviční než koncentrace samostatně aplikovaných složek, bylo by kombinované ošetření ekonomicky i sensoricky výhodnější.

Závěrem je nutno shrnout, že ve většině vědeckých článků týkajících se aplikace silic k prodloužení trvanlivosti šťáv, jsou sice použité koncentrace účinné vzhledem k potlačení mikrobiálního růstu, ale sensorické analýzy nejsou provedeny. Přesto většina studií uvádí negativní vliv na sensorický profil ošetřeného produktu. Proto by mohlo být vhodné silice kombinovat s další metodou ošetření, a najít tak koncentrace silic, které účinně inhibují mikroorganismy a současně zachovávají nebo minimálně pozmění sensorické a nutriční vlastnosti šťáv. Spotřebitelům by se tak dostala nabídka sensoricky a nutričně atraktivních rostlinných šťáv, které mají prodlouženou dobou trvanlivosti a vlastnosti čerstvé šťávy. Další výzkum je

nutný, i z důvodu toho, že by mohla být takto ošetřená šťáva nabízena i v gastronomických provozech (restaurace, kavárny, bufety), kde je příprava čerstvých šťáv časově náročná, a proto se vyrábí ve větších množstvích do zásoby. Velkým problémem je, že kvůli nízké době trvanlivosti (3 dny) dochází v případě přebytků k ekonomickým ztrátám.

Na druhou stranu dle české legislativy 248/2018 Sb. do čerstvé šťávy nemohou být přidány další složky s výjimkou bylin a semen rostlin a výrobek nesmí být dále ošetřen. Rovněž označení produktu pojmem přírodní ovocná, zeleninová nebo ovocno-zeleninová šťáva může být pouze v případě, pokud je ošetřen šetrnou metodou způsob inaktivace mikroorganismů do teploty šťávy 35 °C, prováděný buď ošetřením vysokým tlakem nebo též paskalizací v řádu 4000 až 8000 barů po dobu výdrže tlaku 1 až 15 minut nebo vysokonapěťovými pulsy procházejícími ošetřovanou šťávou nebo šokovým mražením.

Pokud bysme tedy chtěli v gastronomických provozech nebo průmyslově vyrábět šťávu ošetřenou silicemi, museli bysme ji označovat jako ovocný či zeleninový nápoj, což konzument mohl vnímat jako produkt s nižší kvalitou ve srovnání s čerstvou šťávou.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo otestovat účinnost vybraných druhů rostlinných silic za účelem prodloužení trvanlivosti čerstvých šťáv. Dalším cílem bylo provedení sensorické analýzy přijatelnosti zvolených koncentrací silic a zhodnocení možnosti využití této metody v praxi. Testovány byly silice hřebíčkovce a voňatky o koncentraci 0,0064 % a kombinace těchto silic o koncentraci 0,005 %. Dále pak byly k výzkumu použity šťávy jablečno-pomerančovo-mrkvové a celerovo-řepovo-mrkvové.

Na základě výzkumu bylo prokázáno:

- U jablečno-pomerančovo-mrkvové šťávy byla nejefektivnější hřebíčková silice, jelikož 7. den od ošetření snížila celkový počet mikroorganismů na hodnotu $3,6 \log_{10}$ KTJ/ml.
- Trvanlivost celerovo-řepovo-mrkvové šťávy byla prodloužena na 5 dní, a to ošetřením silicí voňatky, hřebíčkovce i kombinací obou silic.
- Dále byla u obou zkoumaných šťáv přítomnost plísní (na kultivační půdě SDA) a kvasinek (na SDA i PCA agaru) nejlépe inhibována hřebíčkovou silicí. Výjimkou byly plísně a kvasinky kultivované na SDA u celerovo-řepovo-mrkvové šťávy, zde byla nejúčinnější silice voňatky.
- Synergický efekt kombinace hřebíčkové a voňatkové silice byl pozorován 3. den měření, kdy toto ošetření lépe redukovalo CPM v porovnání se samostatným působením hřebíčkové nebo voňatkové silice.
- Z výsledků sensorické analýzy vyplývá, že jablečno-pomerančovo-mrkvová šťáva byla z hlediska příjemnosti barvy, vůně, chuti nejlépe hodnocena šťáva bez ošetření. Současně byla z ošetřených vzorků na stupnici příjemnosti barvy a vůně nejvýše hodnocena šťáva ošetřená hřebíčkovou silicí, a na stupnici příjemnosti chuti šťáva ošetřená kombinací silic.
- Oproti tomu u celerovo-řepovo-mrkvové šťávy byla příjemnost barvy neošetřené a ošetřené šťávy hřebíčkovou silicí hodnocena velmi podobně. Příjemnost vůně a chuti byla u šťávy ošetřené hřebíčkovou silicí ohodnocena na stupnici výše než neošetřená šťáva.

Statisticky významné rozdíly mezi neošetřeným vzorkem a ošetřenými vzorky šťáv byly potvrzeny u 5. dne měření u obou zkoumaných šťáv. U jablečno-pomerančovo-mrkvové šťávy došlo 7. den u dvou sad ošetřených vzorků k hydrolyze kultivační půdy, proto výsledky CPM nejsou zcela vypovídající. U celerovo-řepovo-mrkvové šťáv 7. den nárůst CPM přesahoval přípustnou hodnotu CPM $6 \log_{10}$ KTJ/ml původní vyhlášky č. 132/2004 Sb.

Na základě výsledků mikrobiologických rozborů a sensorické analýzy, můžeme částečně přijmout hypotézu: Pomocí různých druhů rostlinných silic lze prodloužit trvanlivost čerstvých šťáv a současně zachovat nebo zlepšit sensorické vlastnosti, jelikož u šťávy jablečno-pomerančovo-mrkvové se nepodařilo zachovat či zlepšit sensorické vlastnosti.

8 Literatura

Error! Reference source not found.

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2017. Cellular and Molecular Immunology. Elsevier Health Sciences, Amsterdam.

Abid M, Jabbar S, Wu T, Hashim MM, Hu B, Lei S, Zhang X, Zeng X. 2013. Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry* **20**:1182–1187.

Abubakar El-Ishaq SO. 2015. Effect of Temperature and Storage on Vitamin C Content in Fruits Juice. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*. **1**:17–21.

Adjou ES, Dahouenon Ahoussi E, Dègnon RG, Mongazi C, Soumanou MM, Sohounhloue D. 2017. Chemical composition and biological activity of essential oil from *Cymbopogon citratus* leaves on the quality of fresh orange juice during storage. *Int. J. of Health*. **3**:1–12.

Afshar M, Moallem SA, Khayatzadeh J, Shahsavan M. 2013. Teratogenic effects of long term consumption of potassium benzoate on eye development in Balb/c fetal mice. *Iran J Basic Med Sci*. **16(4)**:593–8.

Ağçam E, Akyildiz A, DüNDAR B. 2017. Thermal Pasteurization and Microbial Inactivation of Fruit Juices. Pages 309-339 in Rajauria G, Tiwari BK, editors. *Fruit Juices: Extraction, Composition, Quality and Analysis*. Elsevier, Amsterdam.

Aisyah Y, Haryani S, Safriani N, El Husna N. 2018. Optimization of Emulsification Process Parameters of Cinnamon Oil Nanoemulsion. *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology*. **8**:5.

Albergaria H, Arneborg N. 2016. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **100**:2035–2046.

Alpas H, Bozoglu F. 2000. The combined effect of high hydrostatic pressure, heat and bacteriocins on inactivation of foodborne pathogens in milk and orange juice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **16**:387–392.

Anonymous. 1999. A food additive petition for the use of ultraviolet light in the reduction of microorganisms on juice products. Pages 1-117 in FDA regarding CFR 21 179. Glendore.

Ashurst PR. 2016. *Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices*. John Wiley & Sons, New Jersey.

- Aznar A, Fernández PS, Periago PM, Palop A. 2015. Antimicrobial activity of nisin, thymol, carvacrol and cymene against growth of *Candida lusitanae*. *Food Science and Technology International*. **21**:72–79.
- Bajpai VK, Sharma A, Baek KH. 2014. Antibacterial mode of action of the essential oil obtained from *Chamaecyparis obtusa* sawdust on the membrane integrity of selected foodborne pathogens. *Food Technology and Biotechnology*. **52**:109–118.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils: a review. *Food Chem. Toxicol.* **46**:446–475.
- Bakuradze T, Tausend A, Galan J, Groh IAM, Berry D, Tur JA, Marko D, Richling E. 2019. Antioxidative activity and health benefits of anthocyanin-rich fruit juice in healthy volunteers. *Free Radical Research*. **53**:1045–1055.
- Baskaran SA, Amalaradjou MAR, Hoagland T, Venkitanarayanan K. 2010. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice and apple cider by trans-cinnamaldehyde. *International Journal of Food Microbiology*. **141**:126–129.
- Batish DR, Setia N, Singh HP, Kohli RK. 2004. Phytotoxicity of lemon-scented eucalypt oil and its potential use as a bioherbicide. *Crop Protection*. **23(12)**:1209-1214.
- Bello EFT, González Martínez GG, Ceberio BFK, Rodrigo D, Martínez López A. 2014. High pressure treatment in foods. *Foods*. **3**:476–90.
- Betoret E, Mannozi C, Dellarosa N, Laghi L, Rocculi P, Dalla Rosa M. 2017. Metabolomic studies after high pressure homogenization processed low pulp mandarin juice with trehalose addition. Functional and technological properties. *J Food Eng.* **200**:22–8.
- Bidlack WR, Omaye ST, Meskin MS, Topham DKW. 2000. Phytochemicals as bioactive agents. CRC Press, Cheveland.
- Boelens MH. 1996. Chemical and sensory evaluation of trace compounds in naturals. *Perfum. Flavor*. **21**:25–31.
- Boris M, Mandel FS. 1994. Foods and additives are common causes of the attention deficit hyperactive disorder in children. *Ann. Allergy*. **72**:462-467.
- Boulekou SS, Katsaros GJ, Taoukis PS. 2010. Inactivation kinetics of peach pulp pectin methylesterase as a function of high hydrostatic pressure and temperature process conditions. *Food and Bioprocess Technology*. **3**:699–706.

- Braddock RJ. 1999. Single strength orange juices and concentrate. Pages 53-83 in Braddock RJ, editor. Handbook of citrus by-products and processing technology. Wiley, New York.
- Breitmaier E. 2006. Terpenes. Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones. Wiley-VCH, Weinheim.
- Brnawi WI, Hettiarachchy NS, Horax R, Kumar-Phillips G, Seo HS, Marcy J. 2018. Comparison of Cinnamon Essential Oils from Leaf and Bark with Respect to Antimicrobial Activity and Sensory Acceptability in Strawberry Shake. *Journal of Food Science*. **83**:475–480.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol*. **94(3)**:223–53.
- Canalón PF. 2016. Beverage Impacts on Health and Nutrition. Springer International Publishing, New York.
- Cardoso-Ugarte GA, López-Malo A, Sosa-Morales ME. 2016. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. Elsevier, Amsterdam.
- Clarke S. 2008. Essential Chemistry for Aromatherapy. Elsevier, Amsterdam.
- Cole RJ, Cox RH. 1981. Handbook of Toxic Fungal Metabolites. Academic Press, New York.
- Corbo MR, Bevilacqua A, Campaniello D, D'Amato D, Speranza B, Sinigaglia M. 2009. Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and nonthermal approaches: A review. *International Journal of Food Science and Technology*. **44(2)**:223-241.
- Costa MGM, Fonteles TV, De Jesus ALT, Rodrigues S. 2013. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. *Food Chemistry*. **139**:261–266.
- Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol*. **88**:170–175.
- Croteau R. 1986. Biochemistry of monoterpenes and sesquiterpenes of the essential oils. Pages 81-133 in Craker LE, Simon JE, editors. Herbs, Spices, and Medicinal Plants: Recent Advances in Botany, Horticulture, and Pharmacology. Haworth Press, New York.

ČSN ISO 8589. 2008. Obecné pokyny pro uspořádání senzorického pracoviště. Česká normalizační instituce, Praha.

ČSN ISO 6658. 2010. Senzorická analýza – Metodologie – Všeobecné pokyny. Česká normalizační instituce, Praha.

Dahl WJ, Nicole CA, Åsa ME, Kaley LM, Joseph DO, Carley TR, Carly NY. 2017. Health benefits of fiber fermentation. *Journal of the American College of Nutrition*. **36(2)**:127-136

Datta AK, Davidson PM. 2000. Microwave and radio frequency processing. *J Food Sci*. **65**: 32-41.

Dávila-Rodríguez M, López-Malo A, Palou E, Ramírez-Corona N, Jiménez-Munguía MT. 2019. Antimicrobial activity of nanoemulsions of cinnamon, rosemary, and oregano essential oils on fresh celery. *LWT Food Science and Technology*. **112**:108-247.

Delgado B, Palop A, Fernández PS, Periago PM. 2004. Combined effect of thymol and cymene to control the growth of *Bacillus cereus* vegetative cells. *European Food Research and Technology*. **218**:188–193.

Delves-Broughton J, Evangelia K, Ioannis SB, Davies EA, Martin RA. 1999. Alicyclobacillus acidoterrestris in fruit juices and its control by nisin. *International Journal of Food Science and Technology*. **34**:81-85.

Demirdöven A, Baysal T. 2009. The use of ultrasound and combined technologies in food preservation. *Food Reviews International*. **25**:5–8.

Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R, Pandian SK. 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J. Ethnopharmacol*. **130**:107.

Donsì F, Annunziata M, Sessa M, Ferrari G. 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT Food Science and Technology* **44**:1908–1914.

Ebabhi AM, Adeogun OO, Adekunle AA, Kanife UC, Obadina SV. 2016. Preservation of *Citrus sinensis* L. (sweet orange) juice using essential oil from two medicinal plants. *Egypt. J. Exp. Biol. (Bot.)*. **10**:239–245.

Eggersdorfer M, Wyss A. 2018. Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **652**:18–26.

- Eissa H, Abd-Elfattah S, Abu-Seif F. 2008. Anti-Microbial, Anti-Browning and Anti-Mycotoxigenic Activities of Some Essential Oil Extracts in Apple Juice. *Polish journal of food and nutrition sciences*. **58**:425–432.
- Ekpenyong CE, Akpan EE. 2017. Use of *Cymbopogon citratus* essential oil in food preservation: Recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **57**:2541–2559.
- Elcocks ER, Spencer-Phillips PTN, Adukwu EC. 2020. Rapid bactericidal effect of cinnamon bark essential oil against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*. **128**:1025–1037.
- Espina L, García-Gonzalo D, Pagán R. 2014. Impact of essential oils on the taste acceptance of tomato juice, vegetable soup, or poultry burgers. *Journal of Food Science*. **79**:1575–1583.
- Espina L, Somolinos M, Lorán S, Conchello P, García D, Pagán R. 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*. **22**:896–902.
- Esteve MJ, Frígola A. 2007. Refrigerated Fruit Juices: Quality and Safety Issues. *Advances in Food and Nutrition Research*. **52**:103–139.
- Esteve MJ, Frigola A. 2008. The effects of thermal and non-thermal processing on vitamin C, carotenoids, phenolic compounds and total antioxidant capacity in orange juice. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*. **2**:128–131.
- European Food Safety Authority (EFSA), Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food. 2009. Scientific Opinion on the Use of Natamycin (E 235) as a Food Additive. Parma, Italy.
- Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*. **56**:25-31.
- Falcó I, Verdeguer M, Aznar R, Sánchez G, Randazzo W. 2019. Sanitizing food contact surfaces by the use of essential oils. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **51**:220–228.
- Falzone L, Marconi A, Loreto C, Franco S, Spandidos DA, Libra M. 2016. Occupational exposure to carcinogens: benzene, pesticides and fibers (Review). *Mol Med Rep*. **14**(5):4467–74.

- Federal Institute for Risk Assessment. 2005. Indication of the possible formation of benzene from benzoic acid in foods. Expert Opinion no. 013/206. Berlin, Germany.
- Fernandez-Lopez J, Zhi N, Aleson-Carbonell L, Perez-Alvarez JA, Kuri V. 2005. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*. **69**:371-380.
- Ferruzzi MG. 2010. The influence of beverage composition on delivery of phenolic compounds from coffee and tea. *Physiol Behav*. **100**:33–41.
- Fleet GH. 2003. Yeasts in fruit and fruit products. Behr's Verlag GmbH & Co., Hamburg.
- Fonteles TV, Costa MG, de Jesus ALT, Rodrigues S. 2011. Optimization of the fermentation of cantaloupe juice by *Lactobacillus casei* NRRL B-442. *Food and Bioprocess Technology*. **73**:23-28.
- Foster TV, Purnendu. 2003. Beverage Quality. CRC Press, New York.
- Franklyne JS, Iyer S, Ebenazer A, Mukherjee A, Chandrasekaran N. 2019. Essential oil nanoemulsions: antibacterial activity in contaminated fruit juices. *International Journal of Food Science and Technology*. **10**:87-94.
- Friedman M, Henika PR, Levin CE, Mandrell RE. 2004. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**:6042–6048.
- Gang DR, Wang J, Dudareva N, Nam KH, Simon JE, Lewinsohn E, Pichersky E. 2001. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiol*. **125**:539–555.
- García-García R, López-Malo A, Palou E. 2011. Bactericidal Action of Binary and Ternary Mixtures of Carvacrol, Thymol, and Eugenol against *Listeria innocua*. *Journal of Food Science*. **76**:95–100.
- García-Salinas S, Elizondo-Castillo H, Arruebo M, Mendoza G, Irusta S. 2018. Evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of different components of natural origin present in essential oils. *Molecules*. **23**:1–18.
- Garcia-Sotelo D, Silva-Espinoza B, Perez-Tello M, Olivas I, Alvarez-Parrilla E, González-Aguilar GA, Ayala-Zavala JF. 2019. Antimicrobial activity and thermal stability of rosemary essential oil:β-cyclodextrin capsules applied in tomato juice. *LWT Food Science and Technology*. **111**:837–845.

- Gavini E, Sanna V, Sharma R, Juliano C, Usai M, Marchetti M. 2005. Solid lipid microparticles (SLM) containing juniper oil as anti-acne topical carriers: Preliminary studies. *Pharmaceutical Development and Technology*. **10(4)**:479-487.
- Gharsallaoui A, Oulahal N, Joly C, Degraeve P. 2016. Nisin as a food preservative: part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **56(8)**:1262–1274.
- Ghosh V, Mukherjee A, Chandrasekaran N. 2014. Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against, microbial spoilage. *LWT Food Science and Technology*. **114**:392–397.
- Gill AO, Holley RA. 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lacto-bacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *Int J Food Microbiol*. **108**:1–9.
- Gómez PL, Welti-Chanes J, Alzamora SM. 2011. Hurdle technology in fruit processing. *Annual review of food science and technology*. **2**:447-465.
- Gonçalves MVS, Silva LE da, Amaral WA Do, Quadros DA de, Reis RA, Amaral LDP do, Garcia B, Deschamps C. 2018. Chemical composition and antibacterial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon flexuosus* essential oils. *Ciência e Natura*. **40**:2.
- Goñi MG, Roura SI, Ponce AG, Moreira MR. 2016. Clove (*Syzygium aromaticum*) oils. *Page Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier, Amsterdam.
- Gonzalez ME, Barrett DM. 2010. Thermal, high pressure, and electric field processing effects on plant cell membrane integrity and relevance to fruit and vegetable quality. *J Food Sci*. **75**:121–30.
- Gonzalez ME, Barrett DM. 2010. Thermal, high pressure, and electric field processing effects on plant cell membrane integrity and relevance to fruit and vegetable quality. *Journal of Food Science*. **75**:89-121.
- Guerrero-Beltrán JA, Barbosa-Cánovas GV. 2004. Advantages and limitations on processing foods by UV light. *Food Sci. Technol. Int*. **10**:137-145.
- Gunduz GT, Gonul SA, Karapınar M. 2010. Efficacy of oregano oil in the inactivation of *Salmonella Typhimurium* on lettuce. *Food Control*. **21**:513–517.
- Gutiérrez L, Sánchez C, Batlle R, Nerín C. 2009. New antimicrobial active package for bakery products. *Trends in Food Science and Technology*. **20**:92–99.

- Guynot ME, Marín S, Setu L, Sanchis V, Ramos AJ. 2005. Screening for antifungal activity of some essential oils against common spoilage fungi of bakery products. *Food Science and Technology International*. **11**:25-32.
- Halkier BA, Gershenzon J. 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Ann. Rev. Plant Biol.* **57**:303–333.
- Halliwell B. 1996. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radical Research*. **25**:439-454.
- Hay RKM, Waterman PG. 1993. *Volatile Oil Crops: Their Biology, Biochemistry and Production*. Longman, London.
- Hayouni EA, Chraief I, Abedrabba M, Bouix M, Leveau JY, Mohammed H. 2008. Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*. **125**:242–251.
- Helal GA, Sarhan MM, Abu Shahla ANK, Abou El-Khair EK. 2006. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils Against Microorganisms Deteriorating Fruit Juices. *Mycobiology*. **34**(4):219-29.
- Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM, Wright A. 1998. Characterization of the action of selected essential oils components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **46**:3590–3595.
- Herrmann KM, Weaver LM. 1999. The shikimate pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**:473–503.
- Hu Y, Zhang J, Kong W, Zhao G, Yang M. 2017. Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. *Food Chemistry*. **220**:1–8.
- Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. 2012. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers of Microbiology*. **3**:1–12.
- Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A. 2007. The Chemical Composition and Biological Activity of Clove Essential Oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzgium aromaticum* L. Myrtaceae): A Short Review. *Phytotherapy Research*. **21**:501–506.

- Cheraghali AM, Mohammadi HR, Amirahmadi M, Yazdanpanah H, Abouhossain G, Zamanian F, Ghazi Khansarid M, Afshard M. 2005. Incidence of patulin con-tamination in apple juice produced in Iran. *Food Contr.* **16**:165–167.
- Chichester DF, Taner FW. 1972. Antimicrobial Food Additives. Pages 115-184 in Furia TE, editor. *Handbook of Food Additives*. CRC Press, Cheveland.
- Chung D, Cho TJ, Rhee MS. 2018. Citrus fruit extracts with carvacrol and thymol eliminated 7-log acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes*: A potential of effective natural antibacterial agents. *Food Research International*. **107**:578–588.
- ICMSF. 2005. “Soft drinks, fruit juices, concentrates and food preserves,” in *Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodity*. Kluwer Academic, Philadelphia.
- Irkin R, Korukluoglu M. 2009. Growth inhibition of pathogenic bacteria and some yeasts by selected essential oils and survival of *L. monocytogenes* and *C. albicans* in apple-carrot juice. *Foodborne Pathogens and Disease*. **6**:387–394.
- JECFA. 1973. Seventeenth report of the joint FAO/WHO expert committee on food: Toxicological evaluation of certain food additives with a review of general principles and specifications. FAO nutrition meeting report ser. No. 53. WHO tech. report ser. No. 539, Geneva.
- Jiménez-Sánchez C, Lozano-Sánchez J, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. 2017. Alternatives to conventional thermal treatments in fruit-juice processing. Part 1: Techniques and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **57**:501–523.
- Jo YJ, Chun JY, Kwon YJ, Min SG, Hong GP, Choi MJ. 2015. Physical and antimicrobial properties of trans-cinnamaldehyde nanoemulsions in water melon juice. *LWT Food Sci Technol*. **60**:444–451.
- Johnson OR, Yetu AJ, Oloruntoba AC, Seriki S. 2013. Effects of Nigerian Market Storage Conditions on Ascorbic Acid Contents of Selected Tetrapak Packaged Citrus Fruit Juice. *Journal of Agricultural & Biological Science*. **8**:179.
- Juven BJ, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*. **76**:626–631.
- Karaman K, Sagdic O. 2019. *Zygosaccharomyces bailii* and *Z. rouxii* induced ethanol formation in apple juice supplemented with different natural preservatives: A response surface methodology approach. *Journal of Microbiological Methods* **163**:105659. Elsevier.

- Keyser M, Müller I, Cilliers FP, Nel W, Gouws PA. 2008. UV radiation as a nonthermal treatment for the inactivation microorganisms in fruit juice. *Innovative Food Science on Emerging Technology*. **9**:348–354.
- Kisko G, Sharp R, Roller S. 2005. Chitosan inactivates spoilage yeasts but enhances survival of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *Journal of Applied Microbiology*. **98(4)**:872-880.
- Knobloch K, Weigand H, Weis N, Schwarm HM, Vogenschow H. 1986. Action of terpenoids on energy metabolism. Pages 429-445 in Brunke EJ, editor. *Progress in Essential Oil Research: 16th International Symposium on Essential Oils*. De Gruyter, Berlin.
- Knorr D, Geulen M, Grahl T, Sitzmann W. 1994. Food application of high electric field pulses. *Trends in Food Science and Technology*. **5**:71-75.
- Köksal M, Hu H, Coates RM, Peters RJ, Christianson DW. 2011. Structure and mechanism of the diterpene cyclase ent-copalyl diphosphate synthase. *Nat Chem Biol*. **7(7)**:431-433.
- Koshani R, Ziaee E, Niakousari M, Golmakani MT. 2015. Optimization of thermal and thermosonication treatments on pectin methyl esterase inactivation of sour orange juice (*Citrus aurantium*). *J. Food Process. Preserv.* **39**:567–573.
- Koul VK, Gandotra BM, Koul S, Ghosh S, Tikoo CL, Gupta AK. 2004. Steam distillation of lemongrass (*Cymbopogon* spp.). *Indian J. Chem. Technol.* **24(11)**:134–139.
- Koutchma T, Forney L, Moraru C. 2009. *Ultraviolet light in food technology: principles and applications*. Boca Raton, Florida.
- Koutchma T, Popović V, Ros-Polski V, Popielarz A. 2016. Effects of ultraviolet light and high-pressure processing on quality and health-related constituents of fresh juice products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **15**:844-67.
- Krepker M, Shemesh R, Danin Poleg Y, Kashi Y, Vaxman A, Segal E. 2017. Active food packaging films with synergistic antimicrobial activity. *Food Control*. **76**:117–126.
- Krest I, Glodek J, Keusgen M. 2000. Cysteine sulfoxides and alliinase activity of some *Allium* species. *J. Agric. Food Chem.* **48**:3753–3760.
- Lahlou M. 2004. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother. Res.* **18**:435–448.
- Langenheim JH. 1994. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.* **20**:1223–1280.

- Larsen TO, Frisvad CJ, Raven G, Skaaning T. 1998. Mycotoxin production by *Penicillium expansum* on blackcurrent and cherry juice. *Food Addit. Contam.* **15**:671–5.
- Lawlor KA, Schuman JD, Simpson PG, Taormina PJ. *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. Springer, New York.
- Lee K, Shibamoto T. 2002. Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *J. Agric. Food Chem.* **50**:4947–4952.
- Lee S, Kim H, Beuchat LR, Kim Y, Ryu JH. 2020. Synergistic antimicrobial activity of oregano and thyme thymol essential oils against *Leuconostoc citreum* in a laboratory medium and tomato juice. *Food Microbiology.* **90**:103-489.
- Leela J. 2008. Cinnamon and Cassia. Pages 386-395 in Parthasarathy V, Chempakam B, Zachariah T, editors. *Chemistry of Spices*. CABI, USA.
- Leite CJB, De Sousa JP, Da Costa Medeiros JA, Da Conceição ML, Dos Santos Falcaõ-Silva V, De Souza EL. 2016. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enteritidis* by *Cymbopogon citratus* D.C. *Staph. Essential Oil in pineapple juice*. *Journal of Food Protection.* **79**:213–219.
- Leite TS, Augusto PED, Cristianini M. 2015. Using high pressure homogenization (HPH) to change the physical properties of cashew apple juice. *Food Biophys.* **10**:169–80.
- Leizeron S, Shimoni E. 2005. Effect of ultrahigh-temperature continuous ohmic heating treatment on fresh orange juice. *J Agric Food Chem.* **53**:3519-3524.
- Leong SY, Oey I. 2012. Effects of processing on anthocyanins, carotenoids and vitamin C in summer fruits and vegetables. *Food Chemistry.* **133**:1577–1587.
- Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li H Bin. 2014. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients.* **6**:6020–6047.
- Liang Z, Mittal GS, Griffiths MW. 2002. Inactivation of *Salmonella Typhimurium* in orange juice containing antimicrobial agents by pulsed electric field. *Journal of Food Protection.* **65**:1081–1087.
- Lima Tribst AA, De Souza Santana A, De Massaguer PR. 2009. Review: Microbiological quality and safety of fruit juices past, present and future perspectives *Microbiology of fruit juices* Tribst et al. *Critical Reviews in Microbiology.* **35**:310–339.
- López-Malo A, Alzamora SM, Guerrero S. 2000. Natural antimicrobials from plants. Pages 237-264 in Alzamora SM, Tapia MS, López-Malo A, editors. *Minimally Processed Fruits and Vegetables. Fundamentals Aspects and Applications*. Aspen Publishers, Gaithersburg.

- Losso JN, Nakai S, Charter EA. 2000. Lysozyme. Pages 185–210 in Naidu AS, editor. *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC Press, New York.
- Luckow T, Delahunty C. 2004. Which juice is ‘healthier’? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. *Food Quality and Preference*. **15**:751-759.
- Lv F, Liang H, Yuan Q, Li C. 2011. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Res. Int.* **44**:3057–3064.
- Maisanaba S, Llana-Ruiz-Cabello M, Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Puerto M. 2017. New advances in active packaging incorporated with essential oils or their main components for food preservation. *Food Rev.* **33**:447-515.
- Maldonado MC, Aban MP, Navarro AR. 2013. Chemicals and lemon essential oil effect on *Alicyclobacillus acidoterrestris* viability. *Brazilian Journal of Microbiology*. **44**:1133–1137.
- Malfeito-Ferreira M, Loureiro-Dias MC, Loureiro V. 1997. Weak acid inhibition of fermentation by *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* **36**:145–153.
- Mamur S, Yüzbaşıoğlu D, Ünal F, Yılmaz S. 2010. Does potassium sorbate induce genotoxic or mutagenic effects in lymphocytes? *Toxicology in Vitro*. **24**:790–794.
- Mandal S, DebMandal M. 2016. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier, Amsterdam.
- Manu D, Mendonca AF, Daraba A, Dickson JS, Sebranek J, Shaw A, Wang F, White S. 2017. Antimicrobial Efficacy of Cinnamaldehyde Against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in Carrot Juice and Mixed Berry Juice Held at 4°C and 12°C. *Foodborne Pathogens and Disease*. **14**:302–307.
- Maphosa Y, Jideani VA. 2016. Dietary fiber extraction for human nutrition—A review. *Food Reviews International*. **32**:98–115.
- Marszałek K, Krzyżanowska J, Woźniak L, Skapska S. 2016. Kinetic modelling of polyphenol oxidase, peroxidase, pectin esterase, polygalacturonase, degradation of the main pigments and polyphenols in beetroot juice during high pressure carbon dioxide treatment. *LWT - Food Sci Technol.* **62**:45-57.
- Mazal M. 2018. Shelf-life extension of apple-red beet juice by combination of temperature and essential oils [MSc. Thesis]. Czech University of Life Sciences Prague, Prague.

- McKay AM, Linton M, Stirling J, Mackle A, Patterson MF. 2011. A comparative study of changes in the microbiota of apple juice treated by high hydrostatic pressure (HHP) or high pressure homogenisation (HPH). *Food Microbiology*. **28**:1426–1431.
- Mena P, Vegara S, Marti N, Garcia-Viguera C, Saura D, Valero M. 2013. Changes on indigenous microbiota, colour, bioactive compounds and antioxidant activity of pasteurised pomegranate juice. *Food Chem*. **141**:2122-2129.
- Miller FA, Silva CLM. 2012. Thermal treatment effects in fruit juices. Pages 363-83 in Rodrigues S, Fernandes FAN, editors. *Advances in fruit processing technologies*. Boca Raton, Florida.
- Mirghani MES, Liyana YY, Parveen J. 2012. Bioactivity analysis of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. *International Food Research Journal*. **19(2)**:569-575.
- Moghimi R, Ghaderi L, Rafati H, Aliahmadi A, McClements DJ. 2016. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food Chemistry*. **194**:410–415.
- Mosqueda-Melgar J, Raybaudi-Massilia RM, Martín-Belloso O. 2008. Non-thermal pasteurization of fruit juices by combining high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **9**:328–340.
- Mosqueda-melgar J, Raybaudi-massilia RM, Martín-belloso O. 2011. Microbiological shelf life and sensory evaluation of fruit juices treated by high-intensity pulsed electric fields and antimicrobials. *Food and Bioproducts Processing*. **90**:205–214.
- Munhuweyi K, Caleb OJ, Van Reenen AJ, Opara UL. 2018. Physical and antifungal properties of b-cyclodextrin microcapsules and nanofibre films containing cinnamon and oregano essential oils. *LWT-Food Sci. Technol*. **87**:413–422.
- Murakami EG, Jackson L, Madsen K, Schickedanz B. 2006. Factors affecting the ultraviolet inactivation of *Escherichia coli* in apple juice and a model system. *J Food Process Eng*. **29**: 53-71.
- Murillo-Arbizu M, Amézqueta S, González-Peñas E, de Cerain AL. 2009. Occurrence of patulin and its dietary intake through apple juice consumption by the Spanish population. *Food Chem*. **113**:420–423.
- Nannapaneni R, Chalova VI, Crandall PG, Ricke SC, Johnson MG, O'Bryan CA. 2009. *Campylobacter* and *Arcobacter* species sensitivity to commercial orange oil fractions. *International Journal of Food Microbiology*. **129(1)**:43-49.

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářským přídatných látkách. In: Úřední věstník. L 354, 31. 12. 2006, s. 16. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:02008R1333-20200325&from=EN>

Nařízení Komise (EU) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. In: Úřední věstník. L 364/5, 20. 12. 2006. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0098&qid=1523016818828&from=CS>

Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*. **6**:1451–1474.

Nikolić M, Glamočlija J, Ferreira ICFR, Calhelha RC, Fernandes Â, Marković T, Marković D, Giweli A, Soković M. 2014. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and *Reut* and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*. **52**:183–190.

Nychas GJE, Skandamis PN, Tassou CC. 2003. Antimicrobials from herbs and spices. Pages 177-199 in Roller S, editor. *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*. CRC Press, Washington, D.C.

Nychas GJE. 1995. Natural antimicrobials from plants. Pages 58-89 in Gould GW, editor. *New Methods of Food Preservation*. Blackie Academic and Professional, Glasgow.

Onwuka UN, Ejikeme C. 2005. Influence of voltage and electrode type on the yield and quality of fruit juice extracted by ohmic heating. *Fruits*. **60**:341-349.

Opdyke DJ. 1979. Monographs on fragrance raw materials citral. *Food Cosmet Toxicol*. **17**:259-266.

Oteiza JM, Giannuzzi L, Zaritzky N. 2010. Ultraviolet treatment of orange juice to inactivate *E. coli* O157:H7 as affected by native microflora. *Food and Bioprocess Technology*. **3**:603-614.

Oussalah M, Caillet S, Lacroix M. 2006. Mechanism of action Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membrane and walls of *E. coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot*. **69**:1046–55.

Ouwehand AC, Salminen SJ. 1998. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal*. **8**:749–758.

- Pandey A, Negi PS. 2018. Use of Natural Preservatives for Shelf Life Extension of Fruit Juices. Pages 571-605 in Rajauria G, Tiwari BK, editors. *Fruit Juices*. Elsevier, Amsterdam.
- Pandey KB, Rizvi SI. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2**:270–278.
- Pandhare G, Satwase A, Jaju R, Awalgaonkar G. 2018. Effect of natural preservatives on pineapple juice. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.* **7**:746–750.
- Patil S, Bourke P, Kelly B, Frías JM, Cullen PJ. 2009. The effects of acid adaptation on *Escherichia coli* inactivation using power ultrasound. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* **10**:486-490.
- Patterson MF. 2005. Microbiology of pressure-treated foods. *J Appl Microbiol.* **98**:1400–9.
- Petruzzi L, Campaniello D, Speranza B, Corbo MR, Sinigaglia M, Bevilacqua A. 2017. Thermal Treatments for Fruit and Vegetable Juices and Beverages: A Literature Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* **16**:668–691.
- Piccaglia R, Marotti M, Giovanelli E, Deans SG, Eaglesham E. 1993. Antibacterial and antioxidant properties of Mediterranean aromatic plants. *Industrial Crops and Products.* **2**:7-50.
- Queirós RP, Rainho D, Santos MD, Fidalgo LG, Delgadillo I, Saraiva JA. 2015. High pressure and thermal pasteurization effects on sweet cherry juice microbiological stability and physicochemical properties. *High Pressure Research.* **35**:69–77.
- Ramaswamy HS, Chen C, Marcotte M. 2005. Novel processing technologies for food preservation. Pages 211-214 in Barrett DM, Somogyi LP, Ramaswamy H, editors. *Processing fruits: science and technology*. CRC Press, Florida.
- Rao L, Guo X, Pang X, Tan X, Liao X, Wu J. 2014. Enzyme activity and nutritional quality of peach (*prunus persica*) juice: Effect of high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Properties.* **17**:1406–1417.
- Raso J, Barbosa-Canovas GV. 2003. Non-thermal preservation of foods using combined processing methods. *Crit Rev Food Sci.* **43**:265-85.
- Raso J, Calderón ML, Góngora M, Barbosa-Cánovas G, Swanson BG. 1998. Inactivation of mold ascospores and conidiospores suspended in fruit juices by pulsed electric fields. *LWT.* **31**:668–672.

- Rastogi NK. 2011. Opportunities and challenges in application of ultrasound in food processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **51**:705–722.
- Raut JS, Karuppayil SM. 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products.* **62**:250–264.
- Raybaudi-Massilia RM, Mosqueda-Melgar J, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O. 2009. Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* **8(3)**:157–180.
- Raybaudi-Massilis RM, Mosqueda-Melgar J, Martin-Belloso O. 2006. Antimicrobial activity of essential oils on *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, and *Listeria innocua* in fruit juices. *Journal of Food Protection.* **69(7)**:1579-1586.
- Reznick D. 1996. Ohmic heating of fluid foods. *Food technology.* **5**:250-251.
- Rhoades J, Gialagkolidou K, Gogou M, Mavridou O, Blatsiotis N, Ritzoulis C, Likotrafiti E. 2013. Oregano essential oil as an antimicrobial additive to detergent for hand washing and food contact surface cleaning. *Journal of Applied Microbiology.* **115(4)**:987-994.
- Rhoades J, Roller S. 2000. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Appl Environ Microbiol.* **66**:80–6.
- Ross R, Morgan S, Hill C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology.* **79**:3-16.
- Rota MC, Herrera A, Martínez RM, Sotomayor JA, Jordán MJ. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control.* **19**:681–687.
- Rowles JL, Erdman JW. 2020. Carotenoids and their role in cancer prevention. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids.* Elsevier, Amsterdam.
- Ruxton CHS. 2008. Smoothies : one portion or two ? *Nutrition Bulletin.* **33**:129–132.
- Saeeduddin M, Abid M, Jabbar S, Wu T, Hashim MM, Awad FN, Hu B, Lei S, Zeng X. 2015. Quality assessment of pear juice under ultrasound and commercial pasteurization processing conditions. *LWT - Food Science and Technology.* **64**:452–458.
- Saikia S, Mahnot NK, Mahanta CL. 2015. A comparative study on the effect of conventional thermal pasteurisation, microwave and ultrasound treatments on the antioxidant activity of five fruit juices. *Food Sci Technol Int.* **22**:288–301.

- Salomão B de CM. 2018. Pathogens and spoilage microorganisms in fruit juice. Pages 291-308 in Rajauria G, Tiwari BK, editors. *Fruit Juices*. Elsevier, Amsterdam.
- Salvia-Trujillo L, Rojas-Graü A, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O. 2015. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. *Food Hydrocolloids*. **43**:547–556.
- San Martín M, Barbosa-Cánovas G, Swanson B. 2002. Food processing by high hydrostatic pressure. *Crit Rev Food Sci*. **42**:627–45.
- Semeniuc CA, Pop CR, Rotar AM. 2017. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Food and Drug Analysis*. **25**:403–408.
- Setya S, Talegaonkar S, Razdan BK. 2014. Nanoemulsions: Formulation Methods and Stability Aspects. **3**:2214-2228.
- Shelef LA, Jyothi EK, Bulgarelli MA. 1984. Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage-containing broth and foods. *J Food Sci*. **49**:737–740.
- Schmidt E. 2015. Production of essential oils. Pages 122-164 (chapter 5) in Husnu Can Baser K, Buchbauer G, editors. *Handbook of Essential Oils Science, Technology and Applications*. CRC Press, Florida.
- Siddiqua S, Anusha BA, Ashwini LS, Negi PS. 2015. Antibacterial activity of cinnamaldehyde and clove oil: effect on selected foodborne pathogens in model food systems and watermelon juice. *Journal of Food Science and Technology*. **52**:5834–5841.
- Singh G, Maurya S, deLampasona MP, Catalan CAN. 2007. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology*. **45**:1650–1661.
- Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*. **18**(4):463-470.
- Sokołowska B, Skąpska S, Fonberg-Broczek M, Niezgoda J, Chotkiewicz M, Dekowska A, Rzoska S. 2012. The combined effect of high pressure and nisin or lysozyme on the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. *High Pressure Research*. **32**:119–127.
- Steinmetz KA, Potter JD. 1996. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *Journal of American Diet Association*. **96**:1027–39.

- Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. 2016. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. **16**:35-42.
- Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. 2004. Formation and stability of nanoemulsions. *Adv Colloid Interf Sci*. **108–109**:303–318.
- Tang S, Shridharan P, Sivakumar M. 2013. Impact of process parameters in the generation of novel aspirin nanoemulsions— comparative studies between ultrasound cavitation and microfluidizer. *Ultrason Sonochem*. **20**:485–497.
- Tassou C, Drosinos EH, Nychas G-JE. 1995. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 degrees and 10 degrees C. *Journal of Applied Bacteriology*. **78**:593–600.
- Tassou C, Koutsoumanis K, Nychas GJE. 2000. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*. **33(3-4)**:273-280.
- Taylor B. 2016. Other beverage ingredients. Pages 88-125 in Ashurst PR, editor. *Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices*. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Tellez MR, Khan IA, Kobaisy M, Schrader KK, Dayan F, Osbrink W. 2002. Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (Walp.). *Phytochemistry*. **61**:149–155.
- Tenovuo J, Lumikari M, Soukka T. 1991. Salivary lysozyme, lactoferrin and peroxidases: antibacterial effects of carcinogenic bacteria and clinical applications in preventive dentistry. *Proc Finn Dent Soc*. **87**:197–208.
- Thomas LV, Delves-Broughton J. 2003. Natamycin. Pages 4109-4115 in Caballero B. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier, Amsterdam.
- Tirado CB, Stashenko EE, Combariza MY, Martinez JR. 1995. Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **697**:501-513.
- Titarmare A, Dabholkar P, Godbole S. 2009. Bacteriological analysis of street vended fresh fruit and vegetable juices in Nagpur city, India. *Internet Journal of Food Safety*. **11**:1–3.
- Tiwari BK, Muthukumarappan K, O'Donnell CP, Cullen PJ. 2009b. Inactivation kinetics of pectin methylesterase and cloud retention in sonicated orange juice. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*. **10**:166–171.

- Tiwari BK, O' Donnell CP, Muthukumarappan K, Cullen PJ. 2009. Ascorbic acid degradation kinetics of sonicated orange juice during storage and comparison with thermally pasteurised juice. *LWT - Food Science and Technology*. **42**:700–704.
- Tiwari U, Cummins E. 2013. Factors influencing levels of phytochemicals in selected fruit and vegetables during pre- and post-harvest food processing operations. *Food Res Int*. **50**:497–506.
- Toepfl S, Mathys A, Heinz V, Knorr D. 2006. Review: Potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficient and environmentally friendly food processing. *Food Reviews International*. **22**:405–423.
- Totušek J, Tríska J, Lefnerová D, Strohalm J, Vrchotová N, Zendulka O, Průchová J, Chaloupková J, Novotná P, Houška M. 2011. Contents of sulforaphane and total isothiocyanates, antimutagenic activity, and inhibition of clastogenicity in pulp juices from Cruciferous plants. *Czech Journal of Food Sciences*. **29**:548–556.
- Touch V, Hayakawa S, Yamada S, Kaneko S. 2004. Effects of a lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system on *Salmonella enteritidis* in animal or vegetable foods. *International Journal of Food Microbiology*. **93**:175–183.
- Tournas VH, Heeres J, Burgess L. 2006. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiology*. **23**:684-688.
- Tserennadmid R, Takó M, Galgóczy L, Papp T, Pesti M, Vágvölgyi C, Almássy K, Krisch J. 2011. Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *International Journal of Food Microbiology*. **144**:480–486.
- Turgis M, Han J, Caillet S, Lacroix M. 2009. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhi*. *Food Control*. **20**:1073–1079.
- Turgis M, Vu KD, Dupont C, Lacroix M. 2012. Combined effect of essential oils and bacteriocins against food borne pathogens and spoilage bacteria. *Food Res. Int*. **48**:696-702.
- Tyagi AK, Gottardi D, Malik A, Guerzoni ME. 2014. Chemical composition, invitro anti-yeast activity and fruit juice preservation potential of lemon grass oil. *LWT - Food Science and Technology*. **57**:731–737.
- U. S. Food and Drug Administration (USFDA). 2001. Hazard analysis and critical control point (HACCP); procedures for the safe and sanitary processing and importing of juices; final rule. *Federal Register*. **66**:6138-6202.

U.S. Food and Drug Administration (USFDA). 2007. Summary of all GRAS notices. Maryland, USA. Available from <http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-gras.html> (accessed March 2020).

Valizadeh A, Shirzad M, Esmaeili F, Amani A. 2018. Increased antibacterial activity of cinnamon oil microemulsion in comparison with cinnamon oil bulk and nanoemulsion. *Nanomedicine Research Journal*. **3**:37–43.

Van de Braak SAAJ, Leijten GCJJ. 1999. *Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union*. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam.

Vasantha Rupasinghe HP, Juan L. 2012. Emerging Preservation Methods for Fruit Juices and Beverages. Pages 127-158 in El-Samragy Y, editor. *Food Additive*. IntechOpen, London.

Vasavada PC. 2003. Microbiology of fruit juice and beverages. Pages 95-100 in Foster T, Vasavada CP, editors. *Beverage Quality and Safety*. Boca Raton, Florida.

Vasilaki A, Hatzikamari M, Stagkos-Georgiadis A, Goula AM, Mourtzinis I. 2019. A natural approach in food preservation: Propolis extract as sorbate alternative in non-carbonated beverage. *Food Chemistry*. **298**:125-80.

Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez J. 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*. **19**:1130–1138.

Vondráčková H, Houška M. 2017. Paskalizace – metoda, jak si dopřát ovocné a zeleninové šťávy prémiové kvality. Spolek pro zdravou výživu, Praha. Available from <https://potravinyprotebe.cz/paskalizace-metoda-jak-si-doprata-ovocne-a-zeleninove-stavy-premiove-kvality/> (accessed March 2020).

Vyhláška č. 132/2004 Sb. o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení Ministerstvo zdravotnictví stanoví podle § 19 odst. 1 písm. b) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění zákona č. 146/2002 Sb.

Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 248/2018 Sb. o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí se stanoví podle § 18 odst. 1 písm. a), b), g) a h) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění zákona č. 119/2000 Sb., zákona č. 306/2000 Sb., zákona č. 146/2002 Sb., zákona č. 131/2003 Sb., zákona č. 274/2003 Sb., zákona č. 316/2004 Sb., zákona č. 120/2008 Sb., zákona č. 139/2014 Sb. a zákona č. 180/2016 Sb.

- Wang H, Sun H. 2020. Assessment of different antimicrobials to inhibit the growth of *Zygosaccharomyces rouxii* cocktail in concentrated apple juice. *Food Microbiology* **91**:103-549.
- Wang J, Liu Q, Xie B, Sun Z. 2020. Effect of ultrasound combined with ultraviolet treatment on microbial inactivation and quality properties of mango juice. *Ultrasonics Sonochemistry*. **64**.
- Welke JE, Hoeltz M, Dottori HA, Noll IB. 2009. Effect of processing stages of apple juice concentrate on patulin levels. *Food Contr.* **20**:48–52.
- World Health Organization. 1995. Evaluation of certain food additives and contaminants. Pages 36-39 in 44th report of the joint Food and Agriculture Additives/World Health Organization Expert Committee on Food Additives, Technical Report Series 859, Geneva.
- World Health Organization. 2003. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Joint WHO/FAO Expert Consultation. WHO Technical Report Series no. 916. Geneva.
- Xiao R, Grinstaff MW. 2017. Chemical synthesis of polysaccharides and polysaccharide mimetics. *Prog. Polym. Sci.* **74**:78–116.
- Xu J, Zhou L, Miao J, Yu W, Zou L, Zhou W, Liu C, Liu W. 2020. Effect of Cinnamon Essential Oil Nanoemulsion Combined with Ascorbic Acid on Enzymatic Browning of Cloudy Apple Juice. *Food and Bioprocess Technology*. **13**:860–870.
- Yajima H, Takao M, Yasuhira S, Zhao JH, Ishii C, Inoue H, Yasui A. A eukaryotic gene encoding an endonuclease that specifically repairs DNA damaged by ultraviolet light. *EMBO J* 1995. **14**:2393-2399.
- Yen PPL, Kitts DD, Pratap Singh A. 2018. Natural Acidification with Low-pH Fruits and Incorporation of Essential Oil Constituents for Organic Preservation of Unpasteurized Juices. *Journal of Food Science*. **83**:2039–2046. Blackwell Publishing Inc.
- Yikmiş S. 2019. Investigation of the effects of non-thermal, combined and thermal treatments on the physicochemical parameters of pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice. *Food Science and Technology Research*. **25**:341–350.
- Yilmaz L, Kurdal E. 2005. A natural antimicrobial used in cheese protection: natamycin (Turkish with English Abstract). *J. Food*. 385–388.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ANOVA	Analysis of variance, analýza rozptylu
ATP	Adenosintrifosfát
CPM	Celkový počet mikroorganismů
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FDA	Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GC/MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GRAS	Generally recognized as safe, všeobecně považovaný za bezpečný
HHP	Vysoký hydrostatický tlak
HPH	Vysokotlaká homogenizace
HTLT	Působení vyšší teploty po dlouhou dobu
HTST	Působení vyšší teploty po krátkou dobu
KTJ	Kolonie tvořící jednotky
LDL	Low density lipoprotein, nízkodenzitní cholesterol
LTLT	Působení nižší teploty po dlouhou dobu
MBC	Minimální baktericidní koncentrace
MFC	Minimální fungicidní koncentrace
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MO	Mikroorganismy
MTST	Působení nižší teploty po krátkou dobu
MWH	Mikrovlnný ohřev
NMR	Nukleární magnetická rezonance
OH	Ohmický ohřev
PEF	Pulzní elektrické pole
PME	Pektinmethylesterasa
POD	Peroxidasa
PPO	Polyfenoloxidasa
RA	Reziduální aktivita
US	Ultrazvuk
UV	Ultrafialové záření
WHO	World Health Organization, Světová zdravotnická organizace