

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



**Možnost inhibice patogenních bakterií v kachním mase
pomocí oreganové silice enkapsulované do jílových
nanočástic**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Tereza Rychetská

Obor studia: Kvalita a zpracování zemědělských produktů

Vedoucí práce: Ing. Jan Táborský, Ph.D.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Možnost inhibice patogenních bakterií v kachním mase pomocí oreganové silice enkapsulované do jílových nanočástic" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10. 4. 2017

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu diplomové práce Ing. Janu Táborskému, Ph.D. za jeho cenné rady, spolupráci a vstřícný přístup při zpracování této diplomové práce. Rovněž bych chtěla poděkovat doc. Ing. Pavlu Kloučkovi, Ph.D. za jeho pomoc, ochotu, spolupráci a cenné zkušenosti, které mi po dobu experimentu ochotně poskytoval. Poděkovat bych také chtěla Ing. Matěji Božikovi za zkušené a velmi cenné rady poskytnuté v laboratoři na katedře kvality zemědělských produktů. (KKZP). Dále děkuji Mgr. Renatě Kasalové, jednatelce společnosti Kachnička narůžovo za poskytnutí kachního masa a velmi ochotné a vstřícné jednání celé firmy. Dále děkuji KKZP a jejím zaměstnancům za poskytnutí laboratorních prostor, potřebného materiálu a pomůcek k měření.

Za podporu během psaní bych ráda poděkovala svému muži a nejbližší rodině.

Možnost inhibice patogenních bakterií v kachním masě pomocí oreganové silice enkapsulované do jílových nanočástic

Souhrn

Předložená diplomová práce se zaměřuje na využití antimikrobiálního účinku komplexu těkavých látek obsažených v oreganové silici enkapsulované do jílových nanočástic. Cílem práce bylo prodloužit údržnost kachního masa a zároveň inhibovat patogenní mikroorganismy. V posledních letech je značná pozornost věnována právě využití rostlinných silic jako možného moderního způsobu konzervace.

V experimentální části předložené práce byl hodnocen účinek oreganové silice (*Origanum vulgare* L.) enkapsulované do jílových nanočástic. Jednotlivé kousky kachního masa, konkrétně kachních prsou (5 g) byly zaočkovány bakteriemi kmenů *Salmonella enterica* sv. Enteritidis (ATCC 13076) a *Escherichia coli* (ATCC 25922) a poté obaleny v jílových nanočásticích s enkapsulovanou silicí oregana (250 mg nanočástic obsahujících 10 % silice). Po tomto ošetření byly vzorky skladovány při chladničkové teplotě 4 °C a hodnoceny po 1 dni, po 7 dnech a po 14 dnech skladování. Vzorky kachního masa byly podrobeny mikrobiologické analýze, která měla za cíl určit míru inhibice patogenních bakterií. Vzorky byly zároveň podrobeny také chemické analýze, která zahrnovala extrakci vzorků masa hexanem, přečištění vzorků pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) a následnou analýzu reziduí oreganové silice pomocí plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem (GC/FID).

Z dosažených výsledků je zřejmé, že jílové nanočástice s enkapsulovanou oreganovou silicí inhibovaly veškeré patogenní mikroorganismy, a to i po 14 dnech skladování. Rozdíl mezi takto ošetřenými vzorky a kontrolou zaočkování se v jednotlivých časových intervalech pohyboval v rozmezí $5,5 \log \text{KTJ.g}^{-1}$ – $8,4 \log \text{KTJ.g}^{-1}$. V případě chemické analýzy byla ve vzorcích nalezena chemická rezidua majoritní látky obsažené v silici oregana (karvakrolu), přičemž průměrná hodnota reziduí karvakrolu po 14 dnech skladování se pohybovala v rozmezí 46 – 48 % z původního množství.

Předložená diplomová práce tedy potvrdila antimikrobiální aktivitu oreganové silice proti patogenním mikroorganismům.

Klíčová slova: kachní maso; patogenní bakterie; inhibice; enkapsulovaná silice; oregano, jílové nanočástice

Possibility of pathogenic bacteria inhibition in duck meat using oregano essential oil encapsulated into clay nanoparticles

Summary

This master thesis is focused on the using of antimicrobial effect of complex of volatile substances contained in oregano essential oil encapsulated into clay nanoparticles. The aim was to prolong the shelf life of duck meat and also to inhibit pathogenic microorganisms. In recent years, a significant attention is being paid to the use of essential oils as a possible modern method of conservation.

The experimental part of the thesis evaluated the effect of oregano essential oil (*Origanum vulgare* L.) encapsulated in clay nanoparticles. Individual pieces of duck meat, precisely duck breast (5 g) were inoculated with bacterial strains *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) and then these pieces were coated in clay nanoparticles with encapsulated oregano essential oil (250 mg of clay nanoparticles which contain 10 % oregano essential oil). After this treatment the samples were stored in the refrigerator at temperature 4 °C and then evaluated after 24 hours, 7 days and 14 days of storage. The samples of duck meat were microbiologically analyzed. This analysis had to confirm the goal of inhibition of pathogenic bacterial growth. The samples were also chemically analyzed, it included extraction of the meat samples by hexane, purification by gel permeation chromatography (GPC) and subsequently the analysis of residues of oregano essential oils by gas chromatography with flame ionization detector (GC/FID).

As far the results are concerned, it is clear that the clay nanoparticles with encapsulated oregano essential oil inhibited all the pathogenic organisms, even on the 14th day of storage. The difference between this treated samples and control of inoculation ranged between $5,5 \log \text{KTJ.g}^{-1} - 8,4 \log \text{KTJ.g}^{-1}$.

In case of the chemical analysis of the samples chemical residues of main substance contained in oregano essential oil (carvacrol) and the average residue of carvacrol after 14 days of storage ranged from 46 to 48 % of the initial amount.

The master thesis confirmed antibacterial activity of oregano essential oil against pathogenic microorganisms.

Keywords: duck meat; pathogenic bacteria; inhibition; encapsulated essential oil; oregano; clay nanoparticle

Obsah

| | |
|---|-----------|
| 1 Úvod | 10 |
| 2 Vědecká hypotéza a cíl práce | 11 |
| 2.1 Vědecká hypotéza..... | 11 |
| 2.2 Cíl práce..... | 11 |
| 3 Literární rešerše..... | 12 |
| 3.1 Silice | 12 |
| 3.1.1 Silice a jejich historie..... | 12 |
| 3.1.2 Metody izolace těkavých látek z rostlinné matrice..... | 13 |
| 3.1.3 Využití silic v současnosti | 14 |
| 3.1.4 Chemická struktura a vlastnosti silic | 15 |
| 3.1.4.1 Terpeny | 17 |
| 3.1.4.2 Fenylypropanoidy | 17 |
| 3.1.4.3 Alifatické sloučeniny obsahující síru a dusík | 18 |
| 3.1.5 Vybraný druh siličnaté rostliny pro experimentální část práce | 18 |
| 3.1.5.1 Dobromysl obecná (<i>Origanum vulgare</i> L.) | 18 |
| 3.1.6 Mechanismus účinku silic..... | 19 |
| 3.1.6.1 Antimikrobiální účinky karvakrolu | 19 |
| 3.1.6.2 <i>In vivo</i> testy | 20 |
| 3.1.6.3 <i>In vitro</i> testy | 21 |
| 3.1.7 Současné výzkumy v aplikaci silic v masné výrobě..... | 22 |
| 3.1.7.1 Jílové nanočástice | 24 |
| 3.1.8 Budoucnost nanotechnologií v potravinářství | 25 |
| 3.2 Kachní maso a jeho spotřeba..... | 26 |
| 3.2.1 Znaký čerstvosti kachního masa | 27 |
| 3.2.2 Chemické složení masa a jeho vliv na proces kažení | 27 |
| 3.2.2.1 Lipidy a oxidační změny..... | 27 |
| 3.2.2.2 Dusíkaté látky a proteolytické změny..... | 28 |
| 3.2.3 Faktory ovlivňující výskyt mikroorganismů v mase | 28 |
| 3.2.3.1 Vnější faktory | 29 |
| 3.2.3.2 Vnitřní faktory | 30 |
| 3.2.3.3 Implicitní faktory | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.4. Mikrobiální změny masa | 31 |
| 3.2.4.2 <i>Escherichia coli</i> | 32 |
| 4 Materiál a metody | 34 |
| 4.1 Silice | 34 |
| 4.2 Kachní maso | 34 |
| 4.3 Bakteriální kmeny a živná média | 34 |
| 4.4. Příprava vzorků | 35 |
| 4.4.1 Enkapsulace silic do jílových nanočástic..... | 35 |
| 4.4.2 Příprava emulze oreganové silice | 35 |
| 4.4.3 Příprava bakteriálního inokula..... | 35 |
| 4.4.4 Příprava vzorků kachního masa | 36 |
| 4.5 Analýza vzorků a metody analýzy | 38 |
| 4.5.1 Mikrobiologická analýza | 38 |
| 4.5.2 Chemická analýza | 40 |
| 4.5.2.1 Analýza oreganové silice | 40 |
| 4.5.2.2 Výtěžnost analytické metody..... | 40 |
| 4.5.2.3 Čištění extraktů a příprava k analýze..... | 41 |
| 4.5.2.4 Analýza vzorků s využitím plynové chromatografie..... | 42 |
| 4.5.2.5 Analýza vzorků kachního masa s oreganovou silicí enkapsulovanou do jílových nanočástic..... | 42 |
| 4.6 Použité chemikálie | 43 |
| 4.7 Statistické vyhodnocení | 43 |
| 5 Výsledky..... | 44 |
| 5.1 Vyhodnocení mikrobiologické analýzy | 44 |
| 5.1.1 Bakterie <i>Escherichia coli</i> | 44 |
| 5.1.2 Bakterie <i>Salmonella</i> Enteritidis | 45 |
| 5.1.3 Celkové počty mikroorganismů..... | 46 |
| 5.2 Vyhodnocení chemické analýzy | 49 |
| 5.2.1 Složení oreganové silice | 49 |
| 5.2.2 Výtěžnost analytické metody | 51 |
| 5.2.3 Výsledky chemické analýzy vzorků (chemická rezidua silice)..... | 52 |
| 6 Diskuze..... | 53 |
| 7 Závěr | 58 |
| 8 Seznam literatury..... | 59 |

| | |
|--|-----------|
| 9 Seznam použitých zkratk | 68 |
| 10 Přílohy | 70 |
| 11 Seznam tabulek | 73 |
| 12 Seznam grafů | 74 |
| 13 Seznam obrázků | 75 |
| 14 Seznam příloh | 76 |

1 Úvod

Celosvětová konzumace masa v posledních letech neustále roste. Na první příčce ve spotřebě masa sice stále dominuje vepřové maso, ale nárůst spotřeby drůbežího masa je rok od roku vyšší. Drůbeží maso je vyhledávanou potravinou nejen díky jeho obsahu významných bílkovin a minerálních látek, ale také kvůli jeho snadné dostupnosti a poměrně snadné úpravě. Tyto faktory však s sebou nesou i řadu negativ, mezi něž nelze nezařadit především náchylnost k rychlému kažení.

Procesem kažení může docházet k negativnímu ovlivnění nejen organoleptických vlastností masa, ale pozřením takového masa také k případným zdravotním potížím na straně konzumenta. V dnešní době je tedy snaha všechny potraviny a obzvláště ty rychle se kazící obohacovat o nejrůznější chemické konzervanty, jejichž účinky na lidský organismus jsou stále více a více diskutovány. Chemické konzervanty se dnes nahrazují šetrnějšími, ale přinejmenším stejně účinnými rostlinnými konzervanty v podobě rostlinných silic. Výrazný posun je znatelný především v množství vědeckých studií, které se využitím rostlinných silic a jejich začleněním do potravin zabývají. Právě díky tomu, že většina těchto rostlinných látek vykazuje zároveň antimikrobiální aktivitu, jeví se jako vhodná alternativa syntetických konzervantů. Antimikrobiální aktivita silic byla testována na řadě mikroorganismů pomocí různých difúzních testů a ředících metod. Jednou z moderních konzervačních metod se nabízí být právě enkapsulace pomocí vhodného nosiče, do kterého by se silice přímo začlenila. Enkapsulace by dále měla zajistit řízené uvolňování a dlouhodobější účinek silice, ale zároveň neovlivnit antimikrobiální aktivitu dané silice. Přetrvávajícím problémem však zůstává přímé začlenění těchto nanočástic do potravin a případné ovlivnění sensorických vlastností potraviny. Toxicita a kumulace těchto nanočástic v lidském organismu stejně jako v životním prostředí je však stále málo prozkoumanou oblastí vědy.

2 Vědecká hypotéza a cíl práce

2.1 Vědecká hypotéza

Oreganová silice enkapsulovaná do jílových nanočástic (koncentrace silice ve výsledné směsi 10 %) potlačuje růst patogenních bakterií *Escherichia coli* a *Salmonella enterica* sv. Enteritidis v kachním mase.

2.2 Cíl práce

Prostudovat možnosti inhibice vybraných patogenních bakterií v kachním mase s využitím oreganové silice enkapsulované do jílových nanočástic.

3 Literární rešerše

3.1 Silice

Silice (také éterické či esenciální oleje) jsou přírodní komplexní směsi těkavých látek nejčastěji terpenoidní struktury získávané z různých částí rostlin, např. semen, květů, listů, větviček, kůry nebo pupenů. V rostlinách jsou silice uloženy v siličnatých buňkách, přičemž porušením těchto struktur dochází k uvolnění silic do okolního prostředí. Obsah silic v rostlině je jak v průběhu dne, tak i v průběhu celého vývoje rostliny značně rozdílný. Jak již bylo mnohokrát vědecky potvrzeno, silice svým obsahem složitého komplexu více či méně těkavých látek vykazují řadu antioxidačních, antimikrobiálních, protizánětlivých a bioregulačních účinků. V současnosti je známo přibližně 3000 silic, z nichž je přibližně 300 komerčně využívaných a zhruba 150 silic je využíváno farmaceuticky (Burt, 2004; Baser and Buchbauer 2010).

Od poloviny dvacátého století dochází k výraznému rozvoji využití silic jako potenciálně účinných přírodních pesticidů v zemědělství, přírodních léčiv nebo použití v kosmetickém průmyslu. Zájem o využití silic a rostlinných extraktů tak stále roste především proto, že spotřebitelé stále více dávají přednost přírodním látkám a odmítají látky synteticky vyrobené (Antunes and Cavaco, 2010). Velký potenciál lze do budoucna spatřovat v oblasti potravinářství a možnosti využití silic jako konzervačních prostředků nejrůznějších potravin.

3.1.1 Silice a jejich historie

Po tisíce let jsou silice známy a využívány jako koření, léčiva a prostředky k utlumení řady příznaků různých nemocí a též jako konzervační látky. Lidé již ve starověku znali účinky silic a dokazují to nálezy balzamovaných těl zesnulých, které byly balzamovány pomocí různých druhů koření.

První lékařské záznamy z této doby naznačují, že Hippokrates někdy označovaný jako „otec medicíny“ předepisoval pacientům vykuřování za pomoci parfémů (Edris, 2007). Ze 4. století př. Kr. pochází záznamy o biologovi Theoprastovi, který doporučoval použití esenciálních olejů jako protijedů a vdechování výparů silic ke zmírnění bolesti v krku (Laird and Phillips, 2012).

Používání koření v jídle naznačují již starověké védské texty. Historickou zajímavostí je obléhání Říma v roce 408 n. l., kdy vůdce Gótů Alarich požadoval jako výkupné mimo 5000 liber zlata také 3000 liber pepře. Mezi nejstarší dochované zmínky o obchodu s kořením patří bezesporu Čína a také Indie, přes něž vedly hlavní obchodní stezky. Objevitelské výpravy do Ameriky vedené mořeplavcem Kryštofem Kolumbem v roce 1492, následované Vascem de Gammou (1498), Marcem Polem a Fernãem de Magalhãesem byly hlavní příčinou uzavření arabské stezky. Docházelo tak k významnému rozvoji obchodu s kořením a dovozu neznámých koření do Evropy (chilli, vanilka, skořice). Následné bitvy o kontrolu nad tímto obchodem mezi Angličany, Nizozemci a Portugalci nebyly výjimkou a daly vznik koloniálním územím (Billing and Sherman, 1998).

Destilace s vodní parou jako jedna z hlavních metod izolace silic byla známa již od doby starověkého Egypta před více než 2000 lety př. n. l. V 9. století Arabové tuto metodu zdokonalili a napomohli tak k rozšíření obchodu se silicemi a většímu uplatnění a využití silic. Farmakologické účinky silic byly poprvé popsány v lékopisech ze 13. století, avšak až do 16. st. nebyly tyto léčebné účinky v Evropě známy a používány (Burt, 2004). Významný rozvoj byl zaznamenán v 17. století, kdy lékárny nabízely běžně již 15 – 20 druhů různých silic a s objevem některých mikroorganismů byla objasněna i řada léčivých účinků silic. První polovina 19. století znamenala, vzhledem k vývoji účinnějších chemických látek, úpadek ve využití silic jako léčiv a konzervačních látek. S nástupem 20. století tak silice našly využití zejména jako aromata v potravinářství a v kosmetickém průmyslu (Edris, 2007).

3.1.2 Metody izolace těkavých látek z rostlinné matrice

Metody získávání silic zahrnují několik postupů, které jsou dodnes používány. Metody pro izolaci komplexu těkavých látek z rostlinného materiálu zahrnují hydrodestilaci s použitím Clevengerova aparátu, dále destilaci s vodní parou, hydrodestilaci v kombinaci s extrakcí organickým rozpouštědlem a další.

Tradiční způsob izolace těkavých látek je např. lisování, které se nejvíce uplatňuje u citrusů. Důležitým krokem při výběru extrakční metody pro danou silici hraje zejména těkavost silic, lipofilita a také to, zda pochází z květů, listů, kořene či jiné části rostliny. Neméně významnou roli hraje i to, zda se k extrakci používají čerstvé rostliny. Těkavost jejich silic je vysoká, a proto při použití sušených rostlin bude výtěžnost zpravidla nižší, z důvodu nižšího objemu těkavých látek v sušině (Özkan et al., 2004).

Jednou z nejstarších metod získávání silic je metoda zvaná enfleurage založená na rozpouštění v tuku, na kterém je položena vrstva rostlinného materiálu. Tato metoda je dnes již velmi zřídka používána, spíše v domácím prostředí, především pro své časové a prostorové nároky. Čistou silici z tuku je možné získat po extrakci rozpouštědlem např. ethanolem. Zahříváním tuku je možné metodu urychlit (Paibon et al., 2011).

Nejčastější metodou izolace silic je hydrodestilace s použitím Clevengerova aparátu. Při hydrodestilaci je umístěn rostlinný materiál přímo ve varné baňce s vodou, na baňku je nasazen Clevengerův aparát a celé soustava je zahřívána. Silice se usazuje v trubici, kde vytvoří oddělenou vrstvu na povrchu vody vlivem destilace s vodní parou (Davídek, 1977).

Destilace s vodní parou je druhou nejčastější izolační technikou blízké příbuznou hydrodestilaci. Určitou nevýhodou je nutnost následné extrakce vhodným rozpouštědlem a obtížně stanovitelný kvantitativní výnos celé metody. Výhoda však spočívá v šetrnosti vůči tepelně labilním látkám oproti hydrodestilaci. Při destilaci s vodní parou nedochází ke kontaktu vroucí vody a složek silice, páry jsou vyvíjeny mimo rostlinný materiál (Smith, 2002).

Alternativní izolační metody zahrnují extrakci rozpouštědly v různé modifikaci (extrakce za studena, zrychlená extrakce rozpouštědlem, superkritická fluidní extrakce a další metody). Klasická extrakce má tu nevýhodu, že je zpravidla nutné extrakt dále přechistit.

Další velmi účinnou izolační metodou je již výše zmíněná superkritická fluidní extrakce (SFE). Metoda je založena na použití CO₂ v nadkritickém stavu, jehož lze v případě potřeby modifikovat přidávkem nejrůznějších rozpouštědel. Nadkritický CO₂ je ideálním rozpouštědlem, je nepolární a rozpouští tedy nepolární a slabě polární sloučeniny (Klouda, 2003). Dochází k oddělení extraktu od rozpouštědla a odparu CO₂ za normálního tlaku. U tohoto postupu je možné následně přechistit vzorek a oddělit jednotlivé frakce, které jsou vyextrahovány spolu s těkavými látkami. Tato metoda je velmi šetrná a v porovnání s ostatními izolačními technikami i velmi efektivní (Capuzzo et al., 2013).

3.1.3 Využití silic v současnosti

Mezi hlavní odvětví využívající účinky silic v současnosti patří kosmetický, farmaceutický a potravinářský průmysl (Burt, 2004). Významný podíl na celosvětovém trhu se silicemi tvoří i tabákový průmysl a aromatizace cigaret – v současnosti je možné koupit mentolové cigarety, které se těší velké oblibě hlavně v Evropě a Americe. V jihovýchodní Asii zase velkou oblibu sklízí cigarety hřebíčkové. Evropská komise však tvrdě bojuje

o prosazení, že mentolové cigarety by měly nadobro z evropského trhu zmizet do roku 2020 kvůli jejich zdravotní škodlivosti.

V parfémtech jsou hlavními vonnými složkami silice již více než sto let a to i přes významný rozvoj syntetických látek počátkem 19. století. V potravinářském průmyslu nacházejí silice využití jako aroma k ochucování nejrůznějších pochutin (bonbóny, žvýkačky, čokolády) a čajů. V dnešní době jsou získávána buď extrakcí přímo z rostlin, nebo jsou vyráběna synteticky (Edris, 2007). Dnes jsou v potravinářství využívány pouze dva přípravky jako konzervační látky s přídavkem silic, „DMC Base Natural“ jako konzervant vyrobený firmou DOMCA S. A., Alhendín, Granada, Španělsko s obsahem 50 % silic (směs šalvěje, rozmarýnu a citrónu) a 50 % glycerolu a rostlinné extrakty „Protecta One“ a „Protecta Two“ sloužící jako potravinářská aditiva k potlačení růstu mikroorganismů v masných výrobcích (Burt, 2004).

Farmaceutické využití silic si žádá speciální nároky na čistotu a kvalitu vypěstovaných rostlin. Za tímto účelem byly vytvořeny určité normy, které se výrazně liší od norem určujících používání silic v kosmetickém průmyslu a potravinářství (Monteiro et al., 2007). Využití silic v aromaterapii zahrnuje pouze 2 % z celosvětového obchodu se silicemi, avšak jejich účinky jsou prokazatelné (Burt, 2004). Vždy záleží na daném druhu silice a délce její expozice, jelikož některé složky silic mohou vyvolávat kožní alergie nebo mohou být pro člověka ve větším množství toxické (např. eugenol, benzylalkohol aj.). Bylo ovšem potvrzeno, že řada účinných složek silic působí preventivně proti stresu, zmírňuje zánětlivé bolesti kloubů a pomocí masáží působí pozitivně na revmatismus a artritidu (Chiu et al., 2009).

3.1.4 Chemická struktura a vlastnosti silic

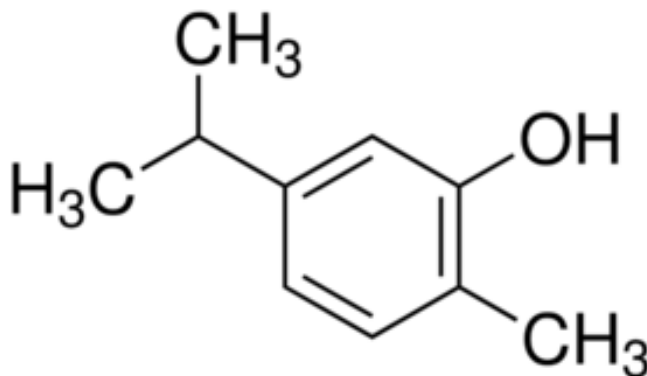
Z rostlinné říše bylo doposud identifikováno více než 200 000 sekundárních metabolitů rostlin. Pro silice je charakteristická jejich olejovitá konzistence, tekutá struktura při běžných pokojových teplotách, silné aroma a značná těkavost. Některé látky v čistém stavu však mají při pokojové teplotě krystalickou strukturu jako například thymol. Na vzduchu běžně oxidují a za běžných teplot se rychle vypařují. Nejsou běžně mísitelné s vodou především pro svůj olejovitý charakter, rozpustnost je možná pouze v organických rozpouštědlech (Tajkarimi et al., 2010; Baser and Buchbauer, 2010).

Silice jsou přírodní směsi těkavých sloučenin, které charakterizuje většinou 20 – 60 různých sloučenin, z nichž zpravidla 2 – 3 látky tvoří majoritní komponenty (až 70 %) a jsou

zodpovědné za biologické vlastnosti dané silice a ostatní látky, které se v silici nacházejí pouze ve stopovém množství. Příkladem může být linalool (až 72 %), který tvoří hlavní složku koriandrové silice. 1-8 cineol (50 %) je hlavní látkou obsaženou v silici rozmarýnu (Bakkali et al., 2008). Pouze výjimečně tvoří hlavní komponentu silice jenom jedna majoritní složka – např. *Betula lenta* (bříza tuhá) zahrnuje pouze jedinou majoritní látku, a to methyl-salicylát (Klouček et al., 2012).

Karvakrol a thymol

Karvakrol je čirá až lehce nažloutlá kapalina, která se některými vlastnostmi přibližuje thymolu. Karvakrol je sloučenina, jejíž hustota při 20 °C je 0,977 g/cm³. Bod varu karvakrolu se pohybuje mezi 236 – 237 °C. Karvakrol patří mezi monoterpenické fenoly (obrázek 1). Strukturně jsou si karvakrol a thymol velmi podobné, ale hydroxylová skupina je navázána na jiném místě fenolického kruhu (Bakkali et al., 2008). Vůně těchto látek je však rozdílná, zatímco karvakrol má kořenitou vůni připomínající kmín, zápach thymolu je tzv. „sanitární“. Obsah karvakrolu v silici oregana se nejčastěji pohybuje mezi 60 – 74 %, následuje thymol s 45 – 55 % (Ultee et al., 1999). Pesavento et al. (2015) mimo tyto dvě hlavní komponenty identifikovali řadu dalších látek např. *p*-cymen, β -pinen, γ -terpinen, linalool, eukalyptol aj. Mimo tyto látky se vyskytují v silici i trísloviny, hořčiny.



Obrázek 1 Vzorec karvakrolu (Sigma-Aldrich)

Tyto látky mají různou chemickou podstatu a lze je rozdělit na tři hlavní skupiny. Hlavní a nejpočetnější skupina zahrnuje terpeny a terpenoidní látky (mono-, di- a seskviterpeny). Druhá skupina je tvořena látkami aromatického charakteru. Třetí nejméně zastoupená skupina je tvořena alifatickými sirnými a dusíkatými sloučeninami (Bakkali et al., 2008).

Všechny tři skupiny látek obsahují složky, které jsou antimikrobiálně účinné, z nichž u některých látek byl vědecky prokázán synergismus a to především u minoritně zastoupených složek v silicích. Jako příklad lze uvést silice karvakrolu a jeho prekursoru *p*-cymenu (Burt, 2004).

Jednotlivé složky silic jsou v různých částech rostliny různě zastoupeny. Jejich koncentrace tak může velmi kolísat. Nejčastěji se objem silice v rostlině pohybuje v rozmezí 0,3 – 2 % silice v sušině. Velké množství silice obsahují velmi aromatické rostliny jako například levandule prostřední (*Lavandula hybrida* – 6,1 %), kardamom (*Elettaria cardamomum* – 8 %). Naopak jednou z nejdražších a nejvzácnějších silic je silice růže damašské, jejíž obsah v okvětních plátcích činí pouze 0,01 % a je známou přísadou éterického oleje Patchouli (Aridogan et al., 2002; Baser and Buchbauer, 2010).

3.1.4.1 Terpeny

Nejvíce zastoupenou složkou silic je skupina terpenů a terpenoidních látek, jejichž základ je tvořen různým počtem izoprenových jednotek (2-methyl-1,3-butadien). Podle počtu těchto jednotek je dělíme na monoterpeny se dvěma izoprenovými jednotkami, jejichž zastoupení je co do počtu největší (až 90 %). Druhou skupinu funkčně blízkou monoterpenům nazýváme seskviterpeny. Ty jsou tvořeny třemi izoprenovými jednotkami. Charakteristické jsou vyšším bodem varu a nižší těkavostí na rozdíl od monoterpenů. Podle funkčních skupin vázaných na uhlíkovou kostru se terpeny dále rozlišují na alkoholy (menthol); fenoly (karvakrol, thymol); aldehydy (geranial); ketony (karvon); estery (linalyl acetát) nebo pouze uhlovodíky (limonen, α -terpinen, *p*-cymen) (Baser and Buchbauer, 2010; Bakkali et al., 2008).

3.1.4.2 Fenylpropanoidy

Za základní strukturní prvek těchto přírodních sloučenin s aromatickým jádrem je považován fenylpropan. Tato skupina derivátů fenylpropanu je tvořena méně zastoupenými složkami silic, avšak i zde se nachází řada významných látek. Tyto látky zahrnují především skupiny aldehydů (cinnamaldehyd); fenolů (eugenol); alkoholů (cinnamický alkohol) a methoxy derivátů (estragol, anethol). Zahrnují především aromatické silice, mezi které řadíme silice skořice (cinnamaldehyd), koprů (anethol), hřebíčku (eugenol), badyánu, anýzu aj. (Bakkali et al., 2008).

3.1.4.3 Alifatické sloučeniny obsahující síru a dusík

Mezi rostliny typické pro sloučeniny obsahující síru a dusík se řadí zejména rostliny z řádu brukvotvarých (Brassicales). Rostliny obsahující pouze sírné sloučeniny patří do čeledi cibulovitých (Alliaceae). V rostlinách čeledi brukvovitých (Brassicaceae) se nejčastěji nacházejí sírné glykosidy neboli glukosinoláty, které jsou sekundárními metabolity rostlin a slouží k ochraně proti škůdcům a jako přírodní pesticidy. Mimo jiné jsou glukosinoláty látky, které zodpovídají za štiplavý a dráždivý zápach výše uvedené čeledi, který vzniká při rozkladu např. hořčičného oleje (Lapčík a kol., 2011).

3.1.5 Vybraný druh siličnaté rostliny pro experimentální část práce

Pro experimentální část práce byla vybrána rostlina z čeledi Lamiaceae (hluchavkovité), kterou lze bez větších problémů pěstovat na celém území ČR: dobromysl obecná neboli oregano (*Origanum vulgare* L.) Výběr byl proveden pro rostlinu s nejvyšším obsahem antimikrobiálních látek, kterými jsou karvakrol a thymol. Důležitým krokem byl výběr siličnaté rostliny s ohledem na kvalitativní vlastnosti silice, tedy na její antimikrobiální aktivitu.

Mnohé rostliny z této čeledi mají svůj původ na Blízkém a Středním východě či ve Středomoří a zahrnují rostliny jak velmi exotické, tak rostliny poměrně běžné. Mnoho autorů se zabývalo ve svých pracích zkoumáním jednotlivých rodů a druhů této čeledi a biologickými účinky některých významných látek zastoupených v této čeledi jako je např. thymochinon (derivát 1,4-benzochinonu), jež je v posledních letech zkoumán pro své možné protinádorové, antimikrobiální a antioxidační účinky. V čeledi Lamiaceae bylo v posledních letech zkoumáno chemické složení silic zejména následujících botanických rodů: *Monarda* (Táborský et al., 2012), *Origanum* (Pedersen, 2000) *Thymus* (Rasooli and Mirmostafa, 2003).

3.1.5.1 Dobromysl obecná (*Origanum vulgare* L.)

Rod *Origanum* čítá více než 40 druhů rostlin, z nichž je řada poddruhů stále neprozkoumána. Taxonomie tohoto rodu je taktéž snadno zaměnitelná s ostatními poddruhy z čeledi hluchavkovitých (Lamiaceae). U nás roste již výše zmíněná rostlina *Origanum vulgare* L. neboli dobromysl obecná, kterou známe pod běžnějším názvem oregano. Oregano řadíme mezi vytrvalé byliny dosahující výšky až 60 cm, nejčastěji však kolem 30 cm. Květy tvoří lichoklas s růžovofialově nebo bíle zbarvenými květy (de Guzman and Jansen, 1999).

Křížením vznikala řada poddruhů, z nichž nejznámější je *Origanum majorana* L. (majoránka zahradní). Chuť oregana je typická svou aromaticností, kořenitostí až nahořklostí.

Běžné využití oregana v kuchyni jako koření je známé po celém světě již od pradávna. Používá se běžně jako koření na pizzu, do příměsí bylinných čajů, také jako složka bylinných koupelí. V tradiční medicíně nachází uplatnění jako spasmolytikum, antimykotikum, antiparazitikum a sedativum, dále se doporučuje ke zmírnění bolestí hlavy, k dezinfekci ústní dutiny a pro zmírnění žaludečních nevolností (Fachini-Queiroz et al., 2012).

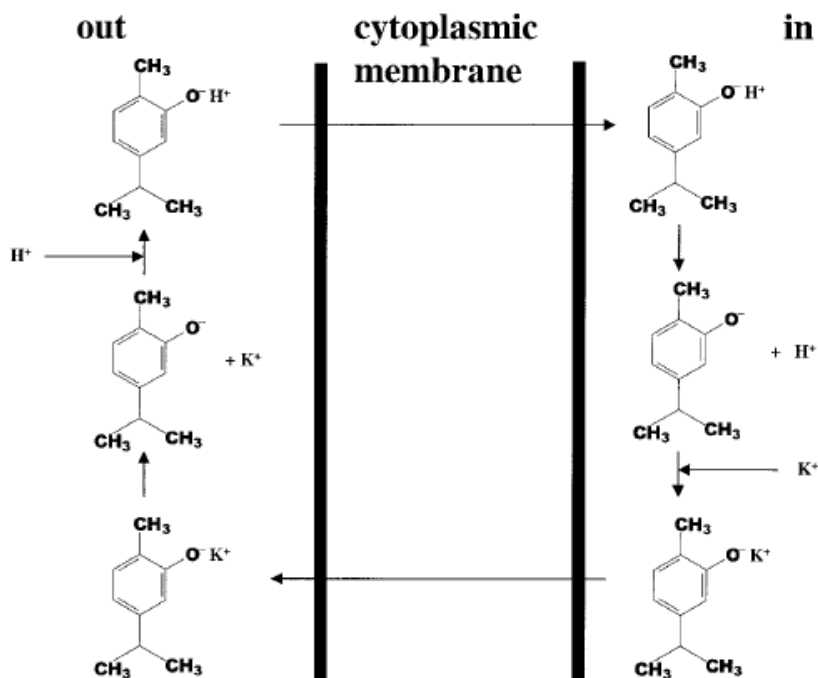
3.1.6 Mechanismus účinku silic

Řada vědeckých studií antibakteriální účinky silic potvrzuje, ale mechanismy účinku na jednotlivé bakterie jsou stále studovány především kvůli možným negativním účinkům na buněčné membrány (Lambert et al., 2001). Mechanismy působení silic v buňkách jsou různé, ale téměř vždy se jedná o kombinaci několika mechanismů zejména proto, že silice jsou složeny vždy z celé řady látek a ne pouze z jedné sloučeniny. S tím souvisí i to, že každá látka působí na specifické části buňky. Hydrofobicita silic zapříčiní interakci s bakteriální membránou složenou z fosfolipidů a dojde tak ke ztrátě vnitřních komponent buňky a v poslední řadě může vést i k apoptóze (Bajpai et al., 2012). Z následujícího přehledu je vybráno pouze několik nejčastějších mechanismů účinku silic a lze konstatovat, že tyto mechanismy jsou velmi různorodé a ne vždy záleží pouze na silici, ale též na přítomnosti určitého mikroorganismu.

3.1.6.1 Antimikrobiální účinky karvakrolu

Silice obsahující látky jako thymol, karvakrol, eugenol a cinnamaldehyd jsou pro svou značnou antimikrobiální aktivitu předmětem mnoha vědeckých studií. U látek jako je karvakrol a thymol byl, vzhledem k jejich fenolové povaze, prokázán jednoznačný antimikrobiální účinek proti patogenním bakteriím způsobujícím některá alimentární onemocnění (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*) (Klouček et al., 2012; Pesavento et al., 2015). Ultee et al. (2002) vysvětlují, že hlavní roli v měření antimikrobiální aktivity karvakrolu a sloučenin jemu podobných (thymol, menthol) hrají zejména hydroxylové skupiny těchto sloučenin a systém delokalizovaných elektronů v aromatickém jádře. Karvakrol je příčinou destabilizace cytoplazmatické membrány. V membráně dochází ke zvýšení fluidity, což má za následek snížení gradientu pH a membránového potenciálu cytoplazmatické membrány a inhibici

syntézy ATP. Výsledkem může být veškeré vyčerpání ATP vedoucí k buněčné smrti (Burt, 2004).



Obrázek 2 Hypotetické schéma struktury a aktivity karvakrolu

Nedisociovaný karvakrol (obrázek 2) difunduje přes cytoplazmatickou membránu k cytoplasmě a disociuje uvolněním protonu do cytoplasmy, čímž dochází k acidifikaci cytoplasmy a znemožnění syntézy ATP. Poté se vrátí nedisociovaný karvakrol tím, že nese K^+ iont z cytoplasmy, který je přepravován přes cytoplazmatickou membránu do vnějšího prostředí. Draselný iont se odštěpí, dojde k protonaci a karvakrol v protonované formě difunduje opět přes cytoplazmatickou membránu (Ultee et al., 2002).

3.1.6.2 *In vivo* testy

Ke zjištění antimikrobiální aktivity silic jsou používány dva základní typy laboratorních testů. Prvním typem je test *in vivo*, u kterého je na konkrétní produkt přímo aplikováno určité množství silice. Druhým typem testu je test *in vitro*, při kterém je možné pozorovat antimikrobiální aktivitu silic proti daným mikroorganismům, které jsou kultivovány na umělých živných médiích.

Antimikrobiální aktivita silic přímo v potravinách je testována za účelem ochrany potravin proti patogenním mikroorganismům, které způsobují kažení potravin, přičemž musí

být vždy zároveň zachována bezpečnost potravin. Velký potenciál pro testování antimikrobiální aktivity mají zejména čerstvé potraviny (ovoce a zelenina), ale používají se i potraviny živočišného původu (maso, masné výrobky, mléčné výrobky) (Tajkarimi et al., 2010). Růst mikroorganismů je ovlivněn řadou vnějších i vnitřních faktorů, které do značné míry ovlivňují výsledné působení silic na mikroorganismy. Mezi tyto faktory lze zařadit pH, obsah vzdušného kyslíku, skladovací teplotu, obsah lipidů a bílkovin (kapitoly 3.2.3.1 a 3.2.3.2). Nízké pH, nízká teplota a též nízký obsah kyslíku vytváří téměř ideální podmínky pro větší vnímavost bakterií k antimikrobiálním účinkům silic.

Většina těchto výše uvedených faktorů působí negativně na antimikrobiální aktivitu silic a je tedy nutné srovnání s testy *in vitro*, kde je však zapotřebí zvýšit koncentrace silic 10krát až 100krát (Burt, 2004). Ve většině případů ale tyto vysoké koncentrace silic způsobují znatelné vady při senzorických zkouškách a výrazně ovlivňují organoleptické vlastnosti potravin, zejména chuť (Tiwari et al., 2009). Tyto nežádoucí organoleptické účinky lze částečně omezit výběrem vhodné silice v závislosti na druhu potravin (Burt, 2004). Např. Oussalah et al. (2006) ve svém výzkumu zjistili, že chuť, vůně a barva mletého hovězího masa s obsahem 1% oleje z oregana se výrazně zlepšila během skladování při 5 °C a za modifikované atmosféry (MAP) a pouze nepatrný rozdíl vykazovalo hovězí maso po uvaření. Tyto pokusy tedy naznačují, že výběr vhodné konzervační metody spolu s vhodnou koncentrací určité silice může vést k výrobě bezpečné a také chutné potraviny.

3.1.6.3 *In vitro* testy

V laboratorních podmínkách je využíváno několik typů *in vitro* testů antimikrobiální aktivity silic. Nejčastěji se hodnotí minimální inhibiční koncentrace (MIC), což je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která inhibuje viditelný růst mikroorganismů za 24 hodin. Dále je hodnocena minimální baktericidní koncentrace (MBC), která vyjadřuje nejnižší koncentraci antimikrobiální látky, která ve vzorku usmrtí 99,9 % mikroorganismů (Tiwari et al., 2009). V laboratořích jsou využívána nejrůznější média pro kultivaci mikroorganismů, ať už tekutá (bujóny), pevná (agary) nebo speciální živná média. Testování silic lze rozdělit na diluční metody (silice rozpuštěna v médiu) a diskové metody (silice se rozšiřuje samovolně do okolního prostředí). V současnosti je velká pozornost věnována eliminaci některých nedostatků vznikajících v kapalně fázi a současnému využití těkavosti silic pro testy v plynné fázi (Nedorostová et al., 2008). Dochází tak k výraznému snížení MIC a tedy i přesnějším a lepším výsledkům (Tiwari et al., 2009; Laird and Phillips, 2012).

3.1.7 Současné výzkumy v aplikaci silic v masné výrobě

Aplikací silic do masné výroby se zabývá mnoho studií, které jednoznačně potvrzují antibakteriální a antifungální aktivitu vybraných druhů silic. Jako nejúčinnější se jeví silice oregana, tymiánu, skořice, rozmarýnu, muškátového oříšku, šalvěje, česneku, fenyklu, koriandru a dalších (Jayasena and Jo, 2013). Zásadní otázkou však je použití vybraných druhů silic a jejich kombinace s dalšími metodami konzervace pro daný typ masa či masného výrobku a jejich koncentrace, která by byla ještě sensoricky přijatelná a zároveň působila antimikrobiálně.

Van Haute et al. (2016) zkoumali působení různých marinád s přídavkem oregana, tymiánu a skořice na vybrané druhy masa a porovnávali je mezi sebou. Bylo použito čerstvé rybí maso (losos), krevety, kuřecí maso (kuřecí kůže, kuřecí prsní řízek), vepřové maso (vepřová panenka, vepřový hřbet s kůží). Vzorky byly ponořeny na 2 minuty do marinády sestávající z vody, 10% roztoku NaCl, 2% mléčnanu sodného a emulgátoru Tween 80 se silicemi. Vzorky byly následně skladovány při teplotě 4 °C v chladničce. Byla pozorována inhibice růstu celkového počtu koliformních bakterií, *Escherichia coli*, bakterií mléčného kvašení (BMK), kvasinek, plísní a aerobních psychrotrofních bakterií. Výsledky ukázaly, že růst kvasinek a plísní byl inhibován na všech matricích ponořených do marinády se skořicí. Prodloužení trvanlivosti bylo zaznamenáno pro vepřovou panenku a lososa při použití silice oregana. Tymián prodloužil trvanlivost taktéž u vepřové panenky a u krevet. Závěrem této studie byla možnost prodloužení vybraných druhů masa a zpomalení růstu některých mikroorganismů. V řadě studií zabývajících se touto problematikou je mimo antimikrobiálních účinků zmiňováno výrazné ovlivnění organoleptických vlastností masa (zejména chuti). Jako zásadní otázka se tedy nabízí použití konkrétní silice s určitou koncentrací na konkrétním druhu masa tak, aby nedošlo k výraznému ovlivnění chuti masa.

Pesavento et al. (2015) zkoumali antimikrobiální účinky silic z rozmarýnu, oregana a tymiánu proti konkrétním bakteriím (*Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes*) u masových kuliček z hovězího masa. Jejich výsledkem bylo, že pouze koncentrace 0,5 % silice a nižší byla přijatelná a neovlivňovala zásadně chuť potraviny a zároveň působila bakteriostaticky i baktericidně. Samozřejmě nelze s jistotou říci, že některé bakteriální kmeny nebudou více či méně citlivé k dané koncentraci silice, ovšem náznak možného alternativního způsobu konzervace při použití silic je více než jasný.

Řada současných výzkumů se proto zabývá otázkou začlenění silic do nejrůznějších potravinových obalů a tím i nalezení dalšího způsobu konzervace potravin. Tyto vědecké

experimenty byly prováděny především na čerstvých potravinách, kterými jsou ovoce a zelenina, maso (zejména rybí) či mléčné výrobky. Nejčastějšími a nejúčinnějšími silicemi aplikovanými do sáčků na potraviny jsou silice oregana, skořice, česneku a citrónové trávy. Han et al. (2014) testovali, zda sáčky obsahující rozmarýn, tymián a směs obou silic prodlouží trvanlivost sýru mozzarella skladovaného při chladírenských teplotách. Všechny sáčky zamezily růstu *Listeria monocytogenes* a sáček se směsí obou silic vykazoval nejvyšší účinnost proti výše uvedené bakterii. Všechny sáčky se silicemi výrazně snížily celkové počty aerobních bakterií nalezených na sýru.

Jako další z možných způsobů konzervace potravin by se mohla jevit aplikace tzv. jedlých povlaků nebo filmů. Jedlé filmy či povlaky tvoří tenké vrstvy jedlých materiálů (bílkovin, polysacharidů nebo tuků) aplikovaných na povrch potraviny za účelem prodloužení její úchovy, ochrany před mechanickým poškozením či mikrobiálním napadením potraviny (Falguera et al., 2011).

Oussalah et al. (2004) zkoumali použití mléčné bílkoviny na bázi jedlého povlaku s obsahem 1 % silice oregana, 1 % silice nového koření a 1 % směsi těchto dvou silic. Tyto silice byly použity na plátky hovězího masa k potlačení růstu *Escherichia coli* O157:H7 a *Pseudomonas spp.* Vzorky byly skladovány při teplotě 4 °C a pravidelně testovány po dobu 7 dní. Lipidová peroxidace byla stanovena analýzou látek reaktivních s kyselinou barbiturovou (TBARS). Vzorky s filmem na bázi oregana vykazovaly stabilní výsledky lipidové oxidace, zatímco vzorky hovězího masa s filmem na bázi nového koření poukazovaly na nejvyšší antioxidační aktivitu. Jedlý povlak se silicí oregana byl nejúčinnější a potlačoval růst obou bakterií. Naopak povlak s novým kořením byl nejméně účinný proti oběma bakteriím.

Tyto způsoby začlenění silice přímo k potravinař však s sebou nesou řadu technologických problémů vyplývajících např. z nerovnoměrného rozptýlení silic v potravinař, z omezené chemické stability účinných složek zapříčiněných interakcemi s dalšími složkami nebo z neřízeného uvolňování senzoričky aktivních látek. Možným řešením by se mohla zdát v tomto případě enkapsulace (česky zapouzdření) silic do vhodných nosičů, jež by umožnily rovnoměrnější rozptýlení silic do potravinové matrice (Onwulata, 2013). Podle Kailasapathy (2009) pojem enkapsulace spočívá v ochraně aktivního jádra před nepříznivými podmínkami životního prostředí a zároveň v umožnění prostupu malých molekul oběma směry přes membránu kapsule. Enkapsulace je aplikována ke stabilizaci určitých složek potraviny, k řízení oxidačních reakcí nebo k řízenému uvolňování bioaktivních složek jako jsou probiotika, mastné kyseliny, antioxidanty, minerální látky, fytochemikálie. Dále též ke snížení

vlivu nepříjemných chutí či pachů vlivem silic nebo k poskytnutí bariér mezi bioaktivními látkami a životním prostředím. Technologie enkapsulace lze rozdělit na řadu chemických nebo mechanicko-fyzikálních procesů. Chemické metody enkapsulace zahrnují emulzifikaci, extruzi, koacervaci, enkapsulaci liposomů a další. Mezi mechanicko-fyzikální patří sprejové sušení, sprejové chlazení, sprejový nástřik a další metody. Jeden z nejstarších procesů enkapsulace je sprejové sušení (spray-drying). Princip metody spočívá v atomizaci suspenze obsahující emulzi olej/voda a polymerní matrice (nejčastěji arabská guma nebo modifikovaný škrob) v proudu horkého plynu (vzduchu nebo dusíku). Plyn je vháněn do sušící komory a dochází k odpaření vodné fáze a vzniku suchého prášku. Takto vyrobené mikrokapsule jsou užitečné především pro řízené uvolňování komplexu těkavých látek. Nicméně u některých aromatických látek s nízkým bodem varu může docházet k degradaci vlivem vysoké teploty, případně oxidaci látek a následným negativním změnám chuti (Kolanowski et al., 2006).

3.1.7.1 Jílové nanočástice

Nanotechnologie se v potravinářském průmyslu mohou uplatňovat dvěma způsoby. Prvním způsobem je jejich začlenění do obalových materiálů vedoucí k prodloužení skladovatelnosti takto balených potravin. Druhým způsobem je přidavek těchto nanočástic během zpracování přímo do potravin.

V současnosti nejvíce studovaný typ nanočástic spojovaný s potravinářstvím je typ hydratovaného hlinito-křemičitanového vrstveného nanojílu tzv. montmorillonit (MMT). Druhý typ je označován jako halloysit a jedná se též o hlinito-křemičitanový dvouvrstevný nanojíl s tubulární strukturou o vnitřním průměru 20 - 50 nm a délkou až 10 μm . Velkou předností těchto nanočástic se jeví to, že jsou schopny pomalého a postupného uvolňování látek tím, že zvyšují rozpustnost v polymerech, čímž se dobře hodí právě pro prodloužení skladovací doby takto balených potravin (Tornuk et al., 2015). Tunç et al. (2016) zkoumali účinky MMT a karvakrolu jako antimikrobiálního činidla. Přítomností těchto dvou složek se snažili zjistit, k jak velkým změnám v mechanických, tepelných, fyzikálně-chemických vlastnostech a změnám barevnosti došlo u nanokompozitních filmů na bázi methyl-celulózy. Bylo zjištěno, že přidavek již malého množství těchto nanočástic zvýšil pevnost a tepelnou stabilitu.

3.1.8 Budoucnost nanotechnologií v potravinářství

Každé zavedení nových nanotechnologií v oblasti potravinářství má své zastánce i odpůrce. Mohou přinášet určitá zdravotní rizika pro konzumenty plynoucí z nevýhod jejich používání. Účinek silice je dán přítomností chemických látek a jejich strukturou v potravine (lipidy, proteiny, soli, sacharidy) a někdy může vést k potlačení antimikrobiálního účinku právě v mase či masných výrobcích. Některé studie naznačují, že právě použití nanoemulzí, enkapsulovaných polymerů či jedlých filmů a povlaků je budoucností v konzervaci potravin (Jayasena and Jo, 2013). Za přednost ve využití silic v potravinářství se považuje nejen jejich potenciál v potlačení růstu nežádoucích mikroorganismů, ale také to, že řada komponentů silic je registrována Evropskou komisí (EC, 2002) a americkou FDA (Food and Drug Administration) jako potravinářská aditiva a jsou tedy chápány jako látky, které nepředstavují žádné nebezpečí pro zdraví konzumentů. Skeptičtější a realističtější pohled však naznačuje, že nanotechnologie jsou ještě stále neprobádanou oblastí. Je nutné zabývat se rizikem toxicity nanočástic a jejich odbouráváním či kumulací ať už v lidském organismu nebo v životním prostředí. Určité studie na laboratorních potkanech ukázaly, že nanočástice mohou poškozovat plíce. To jsou otázky, které ještě nejsou, z hlediska použití daných materiálů, zcela prozkoumány. Nutností je přesná identifikace zdravotních rizik a případných ekologických rizik, která pro zavedení těchto nanotechnologií do potravinářství, budou muset být detailněji zkoumána.

3.2 Kachní maso a jeho spotřeba

V celosvětové spotřebě dominuje maso vepřové, představuje 38 – 40 % globálního trhu s masem, na maso drůbeží připadá 29 – 33 %, na hovězí maso 23 – 26 % a ostatní druhy 6 – 7 % (Eurostat, 2011). Tato spotřeba by výhledově do roku 2018 měla meziročně narůstat o cca 2 %. Obecně se dá konstatovat, že ve všech členských státech EU činí největší spotřebu maso vepřové. Nejvyšší spotřebu drůbežího masa již několik let potvrzuje Portugalsko, kde toto číslo činí 33 kg/osobu/rok. Jen nepatrně za Portugalskem se nachází Irsko, kde je spotřeba drůbežího masa taktéž velmi vysoká (29 kg/osobu/rok) (Bartoň a kol., 2012).

Tradiční čínské kachny (tedy pekingská kachna) a Nanjing marinovaná kachna jsou oblíbené především pro jedinečnou chuť a také výživovou hodnotu a to nejenom v Číně, kde se jich sní nejvíc na světě. Kachny jsou obvykle poráženy ve věku mezi 7. a 8. týdnem. Z hlediska masa je obsah nejvyšší a poměr masa k tuku se jeví jako nejpříznivější v rozsahu tohoto věku (Liu et al., 2013). Maso kachen vyniká tmavší barvou oproti světlému masu hrabavé drůbeže a má výraznou typicky kořeněnou chuť s vyšším podílem tuku (Saláková, 2014).

V České Republice je nejběžnějším druhem kachna pižmová, která je využívána ke křížení s kachnou pekingskou, pro domácí chov je nejčastěji chována kachna domácí vyšlechtěná z kachny divoké.

Tabulka 1 Průměrné chemické složení drůbežího masa s kůží (Saláková, 2014)

| Druh/kategorie | Voda (%) | Bílkoviny (%) | Tuk (%) |
|----------------|----------|---------------|---------|
| Kuřata | 72 | 22 – 23 | 4 – 6 |
| Slepice | 70 | 21 – 22 | 5 – 6 |
| Jatečné krůty | 70,5 | 24 – 25 | 3 – 4 |
| Krůty dospělé | 67 | 24 | 8 |
| Jatečné kachny | 63 | 17 | 19 – 20 |
| Kachny dospělé | 58 | 17,5 | 22 – 25 |
| Jatečné husy | 68 | 20 | 12 |
| Husy dospělé | 60 | 18 | 23 – 26 |

3.2.1 Znaky čerstvosti kachního masa

Pro znaky čerstvosti syrového kachního masa platí, že stejně jako ostatní drůbež by mělo být hodnoceno maximálně jeden den po porážce. Zde se hodnotí povrchový vzhled masa, jakost opracování, vzhled na řezu, textura masa a jeho vůně. Mezi faktory ovlivňující konečnou kvalitu masa řadíme živočišný druh, plemeno, věk zvířete, pohlaví, výživu, zdravotní stav, genetiku, zacházení se zvířaty před porážkou i během porážky, podmínky přepravy, sociální prostředí, způsob porážky aj.

U tepelně opracovaného masa se hodnotí již více faktorů, mezi něž se řadí navíc vzhled, barva, vůně, konzistence, chuť, případně šřavnatost masa (Saláková, 2014; Steinhauser, 1995). Z hlediska sensorických vlastností je tepelně opracované maso ovlivněno zejména použitými surovinami, technologickým postupem a pomocnými aditivy. Vnější a vnitřní faktory významnou měrou zasahují do probíhajících autolytických potažmo i proteolytických procesů a výsledkem může být produkt lišící se svými vlastnostmi od normálního masa. Dochází ke ztrátám kvality masa, které postihují sensorické, technologické a kulinární vlastnosti masa, avšak není ohrožena jeho zdravotní nezávadnost (Stupka a kol., 2009).

3.2.2 Chemické složení masa a jeho vliv na proces kažení

Maso vyjma kostí a viditelného tuku z hlediska složení obsahuje 70 – 80 % vody, 20 % bílkovin, kolem 5 % tuku (libové maso), 1 % vitamínů a minerálních látek, 1 % sacharidů a nepatrné množství nízkomolekulárních dusíkatých sloučenin (kreatin, aminokyseliny aj.) (Kameník, 2011). Tyto látky představují pro řadu mikroorganismů živnou půdu pro jejich růst a řada studií potvrzuje, že skutečná koncentrace těchto látek může zásadně ovlivnit typ, kterým se bude ubírat kažení masa (proteolytické či sacharolytické kažení), stejně jako rychlost kažení.

3.2.2.1 Lipidy a oxidační změny

Tuk v mase tvoří téměř 99 % lipidů s převažujícími triacylglyceroly, z dalších látek jsou, avšak již v menší míře, zastoupeny fosfolipidy, doprovodné látky a cholesterol (sterol doprovázející tuky). Úkolem tuku v mase je z hlediska sensoriky především to, že slouží jako nosič řady aromatických látek (Kadlec a kol., 2009).

Oxidace mastných kyselin je považována za hlavní příčinu nežádoucích sensorických a nutričních změn u potravin s obsahem lipidů. Jedná se o proces, který je urychlován

předcházející hydrolýzou tuků, která souvisí se vznikem volných radikálů. Tyto radikály jsou velmi reaktivní a iniciují peroxidaci lipidů. Drůbeží maso je velmi citlivé na rozvoj oxidativních změn především kvůli vyššímu obsahu polynenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem (PUFA). Jelikož se jedná o radikálovou řetězovou reakci, vznikají tak po útoku radikálů primární produkty, které jsou reaktivní a toxické. Sekundární produkty peroxidace zahrnují těkavé karbonylové sloučeniny (aldehydy, ketony), jež mají velký vliv na sensorickou jakost tuků v potravinách, objevuje se tak rybí, někdy také travnatý zápach. Mnohé z těchto produktů jsou zdravotně závadné – malondialdehyd (Alasnier et al., 2000; Abuja and Albertini, 2001).

3.2.2.2 Dusíkaté látky a proteolytické změny

Nízkomolekulární sacharidy a dusíkaté látky obsažené v mase slouží zpočátku jako živiny pro růst mikroorganismů. Mikroorganismy nejdříve štěpí svými extracelulárními proteolytickými enzymy bílkoviny masa, na rozkladu se nejvíce podílejí silně proteolytické bakterie rodu *Pseudomonas*, dále některé druhy rodu *Proteus*, *Bacillus* a další. Přitom vznikají další produkty bílkovin – aminokyseliny a peptidy. Aminokyseliny mají významný vliv na organoleptické vlastnosti, především na chuť potravin. Rozkladné produkty se pomocí bakterií odbourávají na konečné degradační produkty bílkovin jako amoniak, sirovodík, merkaptany, dimethylsulfid, aminy, aldehydy, indol a skatol, které významně ovlivňují nepříjemný zápach masa. Jako indikátor kažení drůbežního masa lze použít koncentrace volných aminokyselin. Většina aminokyselin je v potravinách vázaná v peptidech a bílkovinách (kolem 99 %), zatímco zbytek tvoří aminokyseliny ve volné formě. Jedná se o glutamin, alanin, arginin, valin, methionin, tryptofan, fenylyalanin, izoleucin, leucin, prolin (Saláková, 2013; Steinhäuser, 1995).

3.2.3 Faktory ovlivňující výskyt mikroorganismů v mase

Čerstvé drůbeží maso z hlediska nutričního složení podléhá mikrobiálnímu kažení velmi rychle oproti některým jiným druhům masa. Hlavní důvod spočívá především v růstu specifických mikroorganismů, které znehodnocují celý produkt. Bruckner et al. (2012) říká, že růst těchto mikroorganismů je ovlivněn několika skupinami faktorů, které dělí z hlediska působení na vnější, vnitřní, implicitní a technologické faktory. V dalších odstavcích jsou tyto faktory více přiblíženy.

3.2.3.1 Vnější faktory

Vnější faktory nevyjadřují vlastnost dané potraviny, ale jsou určitými parametry okolního prostředí, ve kterém je potravina uchovávána. Vyjadřují především skladovací teplotu či ovlivnění masa přítomností plynů – vzdušného kyslíku (Bruckner et al., 2012).

Skladovací teplota je jedním z nejdůležitějších faktorů, který následně může přispívat k růstu nežádoucích patogenních mikroorganismů. Proto v Systému kritických kontrolních bodů (HACCP) každého podniku zpracovávajícího maso je jedním z hlavních faktorů, které se nejčastěji kontrolují a také jedním z kritických bodů (Nychas et al., 2008; Bruckner et al., 2012). Pro maso právě poražené platí, že jeho teplota se pohybuje kolem 38 – 40 °C. Proto je nutné maso co nejrychleji zchladit, aby se zabránilo jeho kažení. Tato teplota však nesmí být šoková (pro mladý skot, jehňata) a neměla by v průběhu 8 – 10 hodin po porážce klesnout pod 10 °C, aby nedošlo k tzv. cold shorteningu neboli zkrácení masa chladem. Drůbež musí být chlazená na teplotu maximálně 4 °C nebo nižší v závislosti na velikosti kostry. Chlazení probíhá vodou, ledem, ledovou drtí, vzduchem nebo inertním plynem (CO₂). Pro chlazení drobů se používá stejná teplota, tedy max. 4 °C. Čerstvé drůbeží maso lze takto označit pouze v případě, pokud teplota masa nikdy neklesla pod hodnotu – 3 °C (FSIS, 1998). Nychas et al. (2008) říká, že jeden z kritických bodů, který má vliv na výslednou kvalitu a zdravotní nezávadnost masa souvisí především s okamžikem přepravy masa od prodávajícího do domácnosti konzumenta. Dochází často k velkému kolísání teplot uvnitř masa a teploty vnějšího prostředí v závislosti na ročním období a může být tak omezena údržnost masa oproti lhůtě uvedené prodávajícím.

Druhým z výše uvedených faktorů je oxidačně-redukční potenciál, který taktéž významnou mírou přispívá k růstu mikroorganismů. Pro snížení oxidačně-redukčního potenciálu v mase slouží běžně přídavek soli a fosfátů. V porovnání s běžnou atmosférou se výrobci snaží volit takovou směs plynů, která prodlouží trvanlivost daného produktu a tím i delší skladovatelnost. Volí se různé směsi plynů, z nichž nejčastější je použití balení MAP. Přítomnost kyslíku ve směsi zabraňuje růstu anaerobních bakterií, přítomnost CO₂ inhibuje růst plísní a dusík brání oxidaci lipidů (Kerth, 2013). McMillin (2008) se ve své studii zabýval právě budoucností ve využití MAP pro masnou výrobu a zjistil, že významný je především použitý poměr plynů ve směsi tak, aby nedocházelo k růstu patogenních bakterií a zároveň byly zachovány pozitivní vlastnosti produktu. Podle řady pokusů se jako nejúčinnější proti patogenním mikroorganismům osvědčily 50% koncentrace kyslíku, 30% koncentrace oxidu uhličitého a 20% koncentrace dusíku.

3.2.3.2 Vnitřní faktory

Tyto faktory vyjadřují přímo určitou fyzikální či chemickou vlastnost samotné potraviny. Řadíme sem vodní aktivitu, pH hodnotu, dostupnost živin aj. (Bruckner et al., 2012).

Vodní aktivita čerstvého syrového masa představuje hodnotu $> 0,98$, pH hodnota po skončení rigor mortis se pohybuje kolem 5,5 – 5,6 a dostupnost zdrojů energie, uhlíku a dalších živin je velmi snadná. Tímto představuje čerstvé maso téměř ideální podmínky pro růst většiny mikroorganismů (McDonald and Sun, 1999). Mikroorganismy tyto živiny právě pro jejich snadnou dostupnost dokážou velmi lehce využít, a proto patří maso mezi potraviny velmi rychle podléhající kažení.

Důležitý zdroj výživy mikroorganismů tvoří glukóza a stavební jednotky bílkovin, tedy aminokyseliny. Koncentrace glukózy v mase s normální hodnotou pH je 100 – 1000 $\mu\text{g/g}$. Pro mikroorganismy je hlavní glukóza nacházející se především v povrchových vrstvách masa, tu rozkládají bakterie nejdříve. Pokud začnou docházet zásoby této glukózy, bakterie napadají a degradují aminokyseliny v hlubších vrstvách, a to má za následek uvolnění dusíkatých rozkladných látek jako je amoniak, aminy či organické sulfidy způsobující nepříjemný zápach masa, případné osliznutí (Robertson, 2010; Kameník 2011). Pokud je počáteční hodnota pH masa vyšší, koncentrace glukózy je naopak nižší, bakterie ji rychle odbourávají a negativní sensorické změny nastupují již při 10^6 KTJ/cm² (Kameník, 2011).

3.2.3.3 Implicitní faktory

Mezi implicitní faktory řadíme antagonistické nebo synergické vlivy mezi bakteriemi (Bruckner et al., 2012). Mezi takový antagonistický účinek lze zařadit například BMK, které jsou za anaerobních podmínek schopné přeměnit glukózu na kyselinu mléčnou. Následnou produkcí baktericidních látek jsou schopné inhibovat růst kontaminujících mikroorganismů (Kameník, 2011). Castro et al. (2011) studovali a izolovali BMK ze vzorků suchých klobás. U několika vzorků potvrdili antimikrobiální aktivitu proti bakteriím *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* nebo *Brochothrix spp.* U jednoho vzorku bakterie, konkrétně *Lactobacillus curvatus/sakei*, byla zjištěna produkce inhibiční látky zvané BLIS (bakteriocinu podobná inhibiční látka) Tyto BLIS látky vykazovaly stabilitu za tepla, při chladničkové teplotě stejně jako po zmrazení/rozmrazení a dokonce působily proti růstu patogenů po přidání 3% koncentrace NaCl.

3.2.4. Mikrobiální změny masa

Vliv faktorů prostředí a faktorů samotné potraviny hraje významnou roli v rozvoji patogenních mikroorganismů, zvláště pak u masa. Maso je potravina, u které, pokud není vhodným způsobem skladována, technologicky zpracována a distribuována, dochází velmi rychle ke kažení (Borch et al., 1996). Nebezpečí v takových případech představují především alimentární infekce, které v nejhorším případě mohou vést až k rozsáhlým epidemiím zasahujících většinu území republiky. V takových případech jsou nositeli infekční dávky kontaminované potraviny nebo kontaminovaná voda, které jsou spojeny především s patogenními mikroorganismy (Bardoň, 2008).

Prodloužení skladovatelnosti a údržnosti masa začíná již ve stádiu před porážkou zvířete a závisí na jeho fyziologickém stavu v době porážky a taktéž na rychlém zchlazení po porážce stejně jako na teplotě během distribuce a skladování masa. K primární kontaminaci může docházet právě během porážky zvířat, například mikroby ze střevního traktu v případě jeho porušení. Nutností je taktéž snaha zabránit sekundární kontaminaci nástroji či rukama pracovníků díky ochranným pomůckám a časté dezinfekci nástrojů a kontaminovaného prostředí (Nychas et al., 2008).

V čerstvém mase se nejčastěji podle Gram et al. (2002) vyskytují bakterie rodu *Pseudomonas*, *Brochotrix*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *BMK* a zástupci rodu čeledě *Enterobacteriaceae*. Bakterie jsou díky vnějším vlivům prostředí pod určitým selekčním tlakem. Růst patogenních mikroorganismů se tak přesouvá na stranu těch, které jsou lépe schopny využít dostupné živiny, lépe adaptovány na dané prostředí a více schopné konkurovat ostatním bakteriím. Tyto podmínky však nejsou závislé pouze na schopnosti daného mikroorganismu, avšak významnou úlohu zde sehrávají vnější a vnitřní faktory jako vliv pH, teploty, koncentrace kyslíku a jiných plynů a také různá skladba masa.

3.2.4.1 Rod *Salmonella*

Jedná se o rod zahrnující krátké, pohyblivé, nesporující tyčinky patřící mezi gramnegativní bakterie čeledě Enterobacteriaceae. Bakterie nejnadhěji rostou při teplotě 38 °C a jsou poměrně citlivé na vyšší teploty (pro jejich zničení stačí 15 – 20 minut při teplotě 60 °C). Bakterie tohoto rodu jsou fakultativně anaerobní, snadno zkvašují glukózu, ale nejsou schopny metabolizovat sacharózu ani laktózu (Kadlec a kol., 2009). Mezi faktory patogenity u salmonel patří bičíky (H-antigen), povrch (K-antigen, nejvýznamnější je mikropouzderný Vi-antigen) a O-antigen. Dále fimbrie adhezivního typu a produkovaný endotoxin (Levin et al., 1975).

Rod *Salmonella* čítá na více než 2500 různých sérovarů, které napadají různé hostitele. Závažnost nemocí se pohybuje od subklinické kolonizace až po závažná systémová onemocnění. Některé převládající sérovary včetně *S. Typhimurium* a *S. Enteritidis* mají široký rozsah hostitelů a jsou schopny infikovat lidi, dobytek a drůbež a kolonizovat jejich střevní trakt. Ostatní sérovary mají hostitele omezené na jeden jediný druh (Blondel et al., 2010). V průběhu uplynulého desetiletí počet případů salmonelózy výrazně vzrostl, Českou republiku nevyjímaje. Sérotypem nejrozšířenějším u nás, ale i ve většině ostatních států je stále *S. enterica* sv. Enteritidis následována *S. enterica* sv. Typhimurium. Vzhledem k nízké infekční dávce je metoda detekce salmonel rutinní kontrolou prováděnou každým potravinářským inspekčním orgánem, který musí prokázat nulovou přítomnost salmonel ve vzorcích potravin (Jeníková et al., 2010).

3.2.4.2 *Escherichia coli*

Tato bakterie patřící mezi gramnegativní bakterie čeledě Enterobacteriaceae zahrnuje krátké, pohyblivé tyčinky, netvořící spory. Rozdíl od salmonel spočívá ve schopnosti zkvašovat laktózu a sacharózu za tvorby bublinek plynu a kyseliny. *E. coli* je odolná bakterie schopná přežít ve vlhkém prostředí (pitná či odpadní voda), teplotní optimum pro její růst je však 37 °C. Pro její zničení postačí zahřátí na 60 °C 30 minut nebo var 1 minutu. S ostatními koliformními bakteriemi je *E. coli* sledována jako indikátor fekálního znečištění vody a potravin. Většina kmenů této bakterie je podmíněně patogenní, což vysvětluje, že se běžně vyskytuje ve střevním traktu lidí i zvířat a v případě oslabení organismu může vyvolat alimentární onemocnění (Kadlec a kol., 2009; Bezpečnost potravin A - Z, 2007).

E. coli je schopna vyvolat celou řadu onemocnění počínaje infekcemi zažívacího traktu až po závažné hemoragicko-uremické syndromy (HUS) vedoucí k rozkladu krve až například

k selhání ledvin a smrti. Podle mechanismů působení a vlastností virulence byly kmeny *E. coli* rozděleny. Bylo stanoveno pět hlavních kmenů patogenních bakterií: enteropatogenní *E. coli* (EPEC), enterohemoragické *E. coli* (EHEC), enteroagregativní *E. coli* (EAEC), enterotoxigenní *E. coli* (ETEC) a enteroinvazivní *E. coli* (EIEC) (Bugarel et al., 2011). EPEC vyvolávají nejčastěji průjmy u dětí a jsou také hlavní příčinou průjmů v rozvojových zemích. EHEC jsou spojovány nejčastěji s ohniskem nákazy u potravin v zemích třetího světa a jsou původci krvavého průjmu, hemoragické kolitidy a HUS v důsledku působení silného verotoxinu – shiga toxinu (podobnost s toxinem produkující bakterie *Shigella* způsobující dysenterie). Především pak kmen shigatoxigenních *E. coli* (STEC) – *E. coli* O157:H7 (Law, 2000). Tento kmen je z hlediska patogenity více virulentní než ostatní kmeny STEC a stojí za příčinou většiny lidských STEC infekcí. Produkci tepelně stabilních nebo tepelně labilních enterotoxinů, které kolonizují střevní sliznici, se vyznačují ETEC, které stojí za příčinou infekčního průjmu zvaného též „cestovní průjem“. Nejčastější příčinou je v tomto případě požití syrového či nedostatečně tepelně upraveného masa, nepasterovaného mléka a mléčných výrobků nebo syrové zeleniny (von Mentzer et al., 2014; Kadlec a kol., 2009). Další skupina EIEC byla popsána prvně v roce 1987 u dítěte v Jižní Americe s akutním průjmem. Proto je tato skupina spojována s přetrvávajícími těžkými průjmy, zvláště u dětí žijících v rozvojových zemích světa. Mezi další příznaky patří horečky a krvavá stolice vedoucí až k zánětům tlustého střeva (Okhuysen and DuPont, 2010). Díky své pevné agregaci na epitelové buňky a tvorbě buněčných agregátů páté skupiny EAEC, byla nalezena souvislost mezi skupinou EAEC a EHEC, které jsou příčinou závažných krvácivých průjmů. Kombinací těchto skupin se značně zvyšuje nebezpečnost nového zárodku: buňky mohou vytvářet ve střevním traktu díky fixaci a agregaci masivní infekční ložisko a produkovat velmi účinný shiga toxin (Nehasilová, 2011).

4 Materiál a metody

4.1 Silice

Pro experimentální část této práce byla použita silice oregana získaná z Výzkumné stanice Uhřetěves (použitá izolační metoda byla destilace s vodní parou). Silice oregana byla následně enkapsulována do předem připravených jílových nanočástic (Nanoclay, hydrophilic bentonit; Sigma-Aldrich, USA). Veškeré práce spojené s mikrobiologickou analýzou a jejím vyhodnocením byly provedeny v laboratoři na katedře kvality zemědělských produktů, stejně jako následná analýza plynovou chromatografií s plamenovým ionizačním detektorem (GC/FID).

4.2 Kachní maso

Pro účely experimentu byla používána chlazená kachní prsa zbavená kůže, která byla zakoupena v kamenném obchodě delikates se sídlem firmy Kachnička narůžovo (Nuselská 4, Praha 4), jejíž jednatelkou je Mgr. Renata Kasalová. Kachny odebírané touto firmou pocházejí z farem středních a jižních Čech a následně jsou zpracovávány v jediném českém podniku v provozovně v Mirovicích (dnes patřící pod Vodňanskou drůbež a.s.), který zpracovává kachny na území ČR. Zakoupená kachní prsa byla do doby experimentu skladována v chladničce při 4 °C.

4.3 Bakteriální kmeny a živná média

V experimentální části bylo využito bakteriálních kmenů *Escherichia coli* ATCC 25922 (Thermo Scientific, USA) a *Salmonella enterica* sv. Enteritidis ATCC 13076 (Thermo Scientific, USA), které byly vždy zaočkovány do čerstvě připraveného Mueller-Hintonova bujónu (Oxoid, CZ). Kultivace bakterií spočívala v přípravě neselektivního média pro stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM) pro oba kmeny bakterií, v tomto případě se jednalo o Plate count agar (Oxoid, CZ). Dále byla využita dvě selektivní média: pro stanovení vzorků zaočkovaných *E. coli* byl zvolen MacConkey agar (Oxoid, CZ) a pro stanovení vzorků zaočkovaných *Salmonellou* Enteritidis byl připraven XLD agar (Sigma-Aldrich, USA). Pro účely experimentu byl také využíván fyziologický roztok Buffered pepton water (Oxoid, CZ). Všechna tato média vyjma XLD agaru byla vždy dokonale rozmíchána, povařena

a sterilována v autoklávu po dobu 20 minut při 121 °C. Před nalitím na Petriho misky byly agary zchlazeny na teplotu 50 °C ve vodní lázni a řádně promíchány krouživým pohybem.

4.4. Příprava vzorků

4.4.1 Enkapsulace silic do jílových nanočástic

Jílové nanočástice (cca 30 g) byly umístěny do kádinky o objemu 250 ml a vysušeny během 24 hodin v sušárně při teplotě 120 °C. Takto vysušený nanojíl byl po celou dobu experimentu skladován v exsikátoru zakrytý propíchaným alobalem.

Samotná enkapsulace zahrnovala navážení 225 mg vysušeného nanojílu do skleněných vialek o objemu 10 ml, do těchto vialek bylo následně automatickou pipetou přidáno 25 µl silice (tak aby celkové množství nanojílu s enkapsulovanou silicí činilo 250 mg a výsledná koncentrace silice ve vzniklé směsi byla 10 %). Toto bylo provedeno ve trojím opakování. Pevně uzavřené vialky byly následně upevněny na třepačku do sušárny vyhřáté na 50 °C a třepány po dobu 24 hodin na rychlostní stupeň 2.

4.4.2 Příprava emulze oreganové silice

Jako kontrola byla připravena vodná emulze čisté silice ze směsi 4 ml sterilní destilované vody, 500 µl Tween 80 a 500 µl silice oregana. Tato emulze byla homogenizována po dobu cca 3 minut za použití homogenizátoru IKA Ultra-Turrax T 18 digital (Merci, CZ), přelita do vialky (10 ml) a zazátkována.

4.4.3 Příprava bakteriálního inokula

Z den starých bakteriálních kultur inkubovaných při 37 °C bylo připraveno bakteriální inokulum o počtu bakterií 10^8 KTJ/ml. K přípravě byly použity sterilní zkumavky naplněné Mueller-Hintonovým bujónem, do nichž byly bakteriální kultury zaočkovány a následně homogenizovány na denzitu odpovídající McFarlandovu standardu 0,5. Měření denzity bakteriální suspenze probíhalo na denzitometru (DEN-1B, Biosan).

4.4.4 Příprava vzorků kachního masa

Veškerá příprava vzorků kachního masa a jejich ošetření probíhala v prostředí laminárního boxu (SCS-III, Merci, CZ). Jednotlivá kachní prsa byla kvůli odstranění veškerých patogenů z povrchu masa namáčena na dobu 30 sekund do 70% ethanolu a následně 30 sekund namáčena ve sterilní destilované vodě. Takto ošetřená kachní prsa byla vložena do sterilních igelitových sáčků a do doby ošetření skladována v mrazáku při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Před ošetřením byla kachní prsa ponechána k povrchovému rozmrazení v laminárním boxu. Následně byly z masa odstraněny veškeré části, které přišly do kontaktu s lihem (cca 1,5 cm vrstva na povrchu). Kachní prsa byla nakrájena a navážena na 5 g kousky na analytických předvážkách (Kern) a umístěna do Petriho misek. Každý kousek masa byl zaočkovan 50 μl bakteriálního inokula, které bylo rozetřeno po celém povrchu masa, každý vzorek se nechal oschnout. Dále byly jednotlivé kousky ošetřeny a označeny dle požadovaných variant (tabulka 2). Vzorky označené písmenem O byly připraveny obalením 5 g kousku masa v 250 mg nanojílů s enkapsulovanou silicí oregana. Současně byly stejným způsobem připraveny vzorky pro chemickou analýzu označené O-CH. Jako KZ byla použita kontrola nárůstu zaočkovaného masa bez dalšího ošetření, jako KV byly označeny kousky zaočkovaného masa omytého v 50 ml sterilní destilované vody a jako KJ byly použity zaočkované kousky masa a čistý neošetřený nanojíl bez silice v množství stejném, jako v případě variant se silicí, tedy v 250 mg nanojílů. Vzorky masa označené KE byly použity jako kontrola emulze čisté silice a byly vytvořeny nanosením 250 μl vodné emulze na vzorek masa. Pro chemickou analýzu byly vytvořeny totožné vzorky emulze vždy pro stejné časové intervaly vyhodnocení (KE-CH). Všechny vzorky byly připraveny ve třech opakováních. Takto ošetřené kousky masa byly skladovány uzavřené v plastových Petriho miskách v chladničce při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně vyhodnocovány vždy po 1 dni, po 7 dnech a po 14 dnech skladování.

Tabulka 2 Jednotlivé varianty ošetření vzorků kachního masa

| Vzorek | Označení | Silice | Způsob ošetření | Inokulum bakterie |
|------------------------|----------|---------|-----------------|--|
| oregano | O | oregano | nanojíl | <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> Enteritidis |
| oregano-chemie | O-CH | oregano | nanojíl | <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> Enteritidis |
| kontrola zaočkování | KZ | – | – | <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> Enteritidis |
| kontrola voda | KV | – | oplach vodou | <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> Enteritidis |
| kontrola jíl | KJ | – | čistý nanojíl | <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> Enteritidis |
| kontrola emulze | KE | oregano | emulze | – |
| kontrola emulze-chemie | KE-CH | oregano | emulze | – |

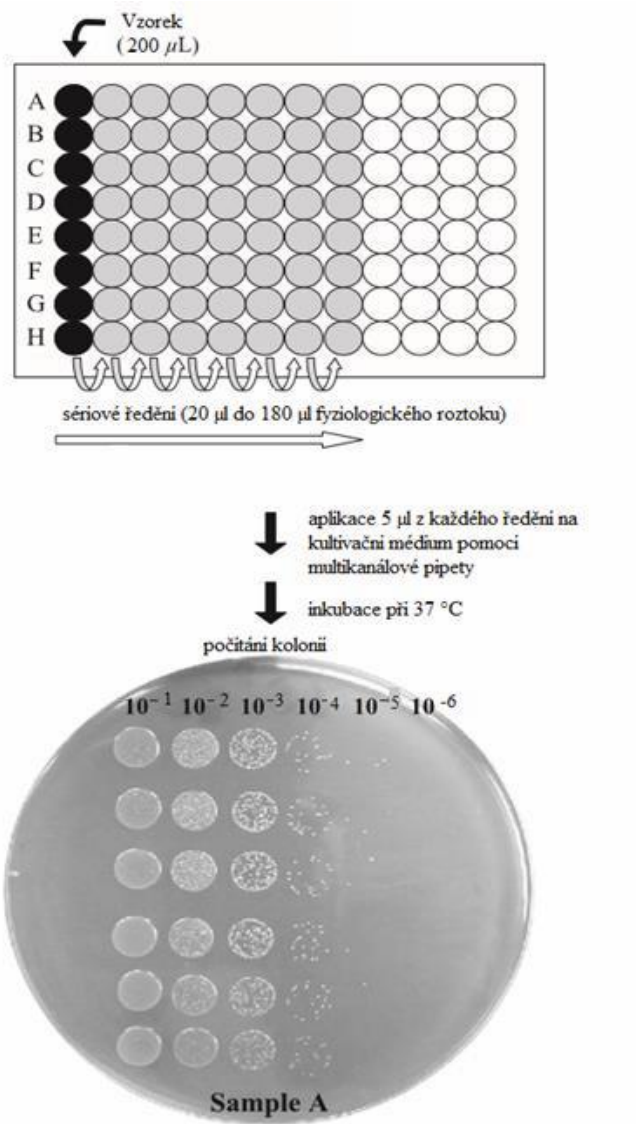
4.5 Analýza vzorků a metody analýzy

4.5.1 Mikrobiologická analýza

V příslušných dnech byly jednotlivé série vzorků vyhodnocovány za použití mikrobiologické analýzy a tzv. kapkové metody dle Chen et al. (2003) (obrázek 3). Mikrobiologická analýza byla provedena ve sterilním prostředí laminárního boxu a s použitím řádně sterilovaného laboratorního nářadí. Každý vzorek masa byl z Petriho misky přemístěn pomocí pinzety do sterilní Erlenmeyerovy baňky o objemu 50 ml a bylo k němu přilito množství fyziologického roztoku rovnajícího se desetinásobku váhy vzorku masa. Tyto baňky byly řádně uzavřeny silnějším alobalem a následně se umístily na třepačku, kde byly po dobu 5 minut třepány na rychlostní stupeň 1.

Ze vzorků masa byly jednotlivě slity tekutiny do skleněných Petriho misek a v množství 200 μ l napipetovány vždy do prvního sloupce na mikrotitrační destičce pomocí multikanálové pipety (obrázek 3). Do ostatních pěti sloupců mikrotitrační destičky bylo postupně napipetováno 180 μ l sterilního fyziologického roztoku. Následně bylo ze vzorkové tekutiny odebráno přesně 20 μ l a toto množství bylo přeneseno do následujícího sloupce s fyziologickým roztokem, kde došlo k důkladnému promíchání. Tímto postupným pipetováním pokračujícím až do šestého sloupce, došlo k vytvoření ředící řady, přičemž důležitou součástí celého procesu přitom byla výměna špiček mezi jednotlivými ředěními.

Pomocí multikanálové pipety bylo na závěr nanášeno přesně 5 μ l roztoku na předem připravené Petriho misky se selektivními a neselektivními médii celkem ve dvou opakováních pro každý vzorek. Takto připravené Petriho misky byly vloženy do termostatu na 24 hodin a inkubovány při 37 °C.



Obrázek 3 Schéma kapkové metody dle Chen et al. (2003)

Vyhodnocení celkového počtu narostlých kolonií bakterií probíhalo po 1 dni a spočívalo ve spočtení narostlých kolonií na jednotlivých Petriho miskách. Počet bakterií byl vyjádřen pomocí vztahu:

$$N = \Sigma c / v [(n_1 + 0,1n_2) d]$$

kde: Σc = celkový počet vyrostlých kolonií na všech Petriho miskách

v = objem jedné kapky

n_1 = počet kapek v prvním ředění

n_2 = počet kapek ve druhém ředění

d = první použité ředění s prvním počtem kapek

4.5.2 Chemická analýza

4.5.2.1 Analýza oreganové silice

Pro analýzu oreganové silice byl připraven roztok oreganové silice o koncentraci 1,2 mg/ml (30 mg silice na 25 ml hexanu – původní používaná koncentrace 30 mg silice/5g kousek masa). Tento roztok byl připraven celkem ve dvojnásobném provedení. Pro identifikaci složek silice byla jako analytická metoda zvolena plynová chromatografie s hmotnostním detektorem (viz dále). Následně probíhala kvantifikace na plynovém chromatografu s plamenovým ionizačním detektorem (GC/FID).

Pro identifikaci jednotlivých složek oreganové silice bylo využito metody plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC/MS). Tato analýza byla provedena na přístroji GC Agilent 7890A (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) vybaveném křemennou kapilární kolonou HP-5MS (30 m x 0,25 mm i. d., tloušťka filmu 0,25 um) s kvadrupólovým hmotnostním detektorem Agilent MSD5975C, ionizační energie 70 eV. Jako nosný plyn bylo použito helium (čistota 5.0), průtok nosného plynu 1 ml/min, vstupní tlak 0,086 MPa (12,537 psi), splitovací poměr 12:1, objem nastříkovaného vzorku 1 µl. Podmínky analýzy: teplota nástřiku 250 °C, teplota spoje GC s hmotnostním spektrometrem (interface) 250 °C, programovaná teplota kolony 60 °C po dobu 2 minut, nárůst 3 °C/min, horní isoterma 231 °C po dobu 10 min, celková doba analýzy 70 min.

Identifikace byla provedena na základě porovnání naměřených spekter analyzovaných látek s autentickými spektry standardních sloučenin (α -terpinen, β -myrcen, limonen, terpinen-4-ol, karvakrol) a také na základě porovnání hmotnostních spekter z přístrojové databáze (NIST) a z literatury. Bylo zjištěno složení oreganové silice a výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

4.5.2.2 Výtěžnost analytické metody

Při stanovení výtěžnosti metody byly do kádinek o objemu 250 ml naváženy vzorky kachního masa (5 g – celkem ve dvojnásobném provedení). Na povrch masa bylo pomocí mikrostříkačky Hamilton o objemu 100 µl aplikováno 30 mg silice oregana, která se nechala cca 15 minut difundovat. Vzorky byly následně kvantitativně převedeny do kuželových zábrusových baněk o objemu 250 ml a pomocí odměrného válce bylo přilito přesně 80 ml hexanu p. a. (malá část z tohoto objemu byla použita na vypláchnutí kádinky, ve které bylo maso uloženo). Baňka byla pečlivě zazátkována a umístěna na třepačku (typ T-40, VD

Lověna, Praha), kde se po dobu 1 hodiny třepala na rychlostní stupeň 2. Po 1 hodině třepání byl extrakt masa zfiltrován do kulaté zábrusové baňky o objemu 250 ml přes papírový filtr KA-1 o průměru 150 mm (rychlost filtrace: vysoká) s přidavkem bezvodého síranu sodného p. a. (filtr se síranem sodným byl předem promyt malým množstvím hexanu). Ke vzorku masa bylo přidáno dalších 40 ml hexanu, baňka byla zazátkována a intenzivně třepána v ruce po dobu 2 – 3 minut. Směs byla opět zfiltrována a na závěr bylo přilito posledních 20 ml hexanu a směs byla naposledy zfiltrována do kulaté zábrusové baňky. Baňky byly uzavřeny zátkami a ponechány v chladničce při teplotě 4 °C.

Řádně uzavřené baňky byly druhý den vyndány z chladničky a ponechány při laboratorní teplotě k vytemperování (cca 30 minut). Každý vzorek byl zahuštěn na vakuové rotační odparce při teplotě 40 °C na objem cca 5 – 10 ml. Následně byl vzorek kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 25 ml (baňka byla vypláchnuta 3 x 4 ml mobilní fáze cyklohexan – ethylacetát 1:1), doplněn touto mobilní fází po rysku a řádně zazátkován. Takto připravené vzorky byly následně ponechány v mrazáku při teplotě –18 °C k přečištění s využitím gelové permeační chromatografie (GPC).

4.5.2.3 Čištění extraktů a příprava k analýze

Pro přečištění vzorků byl použit gelový permeační chromatograf HPP 5001 (Laboratorní přístroje Praha) vybavený kolonou WI 02080 (Watrex Praha s.r.o.), 300 mm x 8 mm, PAH-Prep 10 µm. Jako mobilní fáze byla použita směs rozpouštědel cyklohexan – ethylacetát 1:1 o průtoku 0,8 ml/min, vstupní tlak cca 1,2 MPa.

Každý vzorek extraktu (cca 4 ml) byl nabrán do plastové injekční stříkačky o objemu 10 ml (stříkačka byla vždy předem propláchnuta malým množstvím vzorku) a nastříknut do dávkovací smyčky chromatografu o objemu 2 ml. Následně probíhala separace látek a jednotlivé frakce byly zachycovány do kalibrovaných zkumavek s využitím frakčního kolektoru FCC 60 (Laboratorní přístroje Praha). Na základě výsledků předchozí kalibrace chromatografické kolony byla pro další analýzu odebírána frakce v rozmezí 9,6 – 14,6 ml, ve které jsou obsaženy složky silice oregana. Tato frakce byla poté kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 10 ml a doplněna po rysku MF. Baňky byly pečlivě uzavřeny zátkou a promíchány. Do vialek se šroubovacím uzávěrem o objemu 2 ml bylo napipetováno cca 1,5 ml frakce, která byla určena k následné analýze pomocí plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem (GC/FID).

4.5.2.4 Analýza vzorků s využitím plynové chromatografie

Pro analýzu vzorků byl použit plynový chromatograf GC Agilent 7890A vybavený křemennou kapilární kolonou Agilent HP-5MS (30 m x 0,25 mm i. d., tloušťka filmu 0,25 μm) s plamenovým ionizačním detektorem. Jako nosný plyn byl použit dusík (čistota 5.0) o průtoku 1 ml/min, vstupní tlak 0,086 MPa (12,537 psi), splitovací poměr 50:1, objem nastříkovaného vzorku 1 μl . Podmínky analýzy: teplota injektoru 250 $^{\circ}\text{C}$, teplota detektoru 300 $^{\circ}\text{C}$, počáteční teplota kolony 60 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 minut, nárůst teploty 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, horní isoterma 231 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut (celková doba analýzy 70 min).

Pro vyhodnocení chromatogramů byl použit chromatografický software Agilent ChemStation. Sloučeniny byly identifikovány na základě porovnání retenčních časů analyzovaných sloučenin s retenčními časy standardů (s následným ověřením metodou GC/MS) a kvantifikovány metodou vnějšího standardu na základě porovnání naměřených ploch příslušných píků. Jako vnější standard pro kalibraci na GC/FID byl použit roztok silice o koncentraci 1,2 mg/ml (viz kapitola 4.5.2.1).

4.5.2.5 Analýza vzorků kachního masa s oreganovou silicí enkapsulovanou do jílových nanočástic

Pro chemickou analýzu vzorků kachního masa s oreganovou silicí enkapsulovanou do jílových nanočástic byly připraveny vždy 3 vzorky (celkem ve třech opakováních): vzorek kachního masa s bakterií *Escherichia coli* s oreganovou silicí enkapsulovanou do jílových nanočástic (označený O-CH 1), vzorek kachního masa s bakterií *Salmonella* Enteritidis s oreganovou silicí enkapsulovanou do jílových nanočástic (označený O-CH 2) a kontrolní vzorek vodné emulze (označený KE-CH). Vzorky kachního masa s oreganovou silicí enkapsulovanou do jílových nanočástic byly připraveny nanesením 50 μl bakteriálního inokula na 5 g kousek masa a následným obalením v 250 mg nanojílů (s obsahem 25 μl enkapsulované silice). Vzorek vodné emulze byl připraven nanesením 250 μl emulze na 5 g kousek masa. Tyto vzorky byly poté extrahovány a přečišťovány stejným způsobem jako vzorky připravené pro ověření analytické výtěžnosti. Rozdíl spočíval v tom, že tyto vzorky byly připraveny do Petriho misek a následně kvantitativně převedeny do kuželových zábrusových baněk o objemu 250 ml, kam bylo přilito přesně 80 ml hexanu (malá část z tohoto objemu byla použita na vypláchnutí Petriho misky, ve které bylo maso uloženo). Další postup byl již shodný s postupem uvedeným v kapitolách 4.5.2.2 – 4.5.2.4. Pro kalibraci GC/FID byl jako vnější standard v tomto případě použit roztok silice o koncentraci 0,2 $\mu\text{l}/\text{ml}$.

4.6 Použité chemikálie

- Cyklohexan p. a., Lach-Ner s.r.o., Neratovice
- Dichlormethan p. a., Lach-Ner s.r.o., Neratovice
- Ethylacetát p. a., Lach-Ner s.r.o., Neratovice
- Hexan GC (pro analýzu reziduí), J. T. Baker, USA
- Hexan p. a. (pro extrakce), Lach-Ner s.r.o., Neratovice
- Síran sodný p. a., Lach-Ner s.r.o., Neratovice

4.7 Statistické vyhodnocení

Statistické zpracování výsledků bylo provedeno v programu Statistica 12 (StatSoft CR s.r.o.). Výsledky mikrobiologické analýzy byly hodnoceny pomocí analýzy rozptylu s použitím jednofaktorové ANOVY a pomocí Tukeyho HSD testu. Rozdíly mezi jednotlivými typy ošetření byly hodnoceny a za použití neparametrického chí – kvadrát testu (testu dobré shody). Testování bylo provedeno na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

5 Výsledky

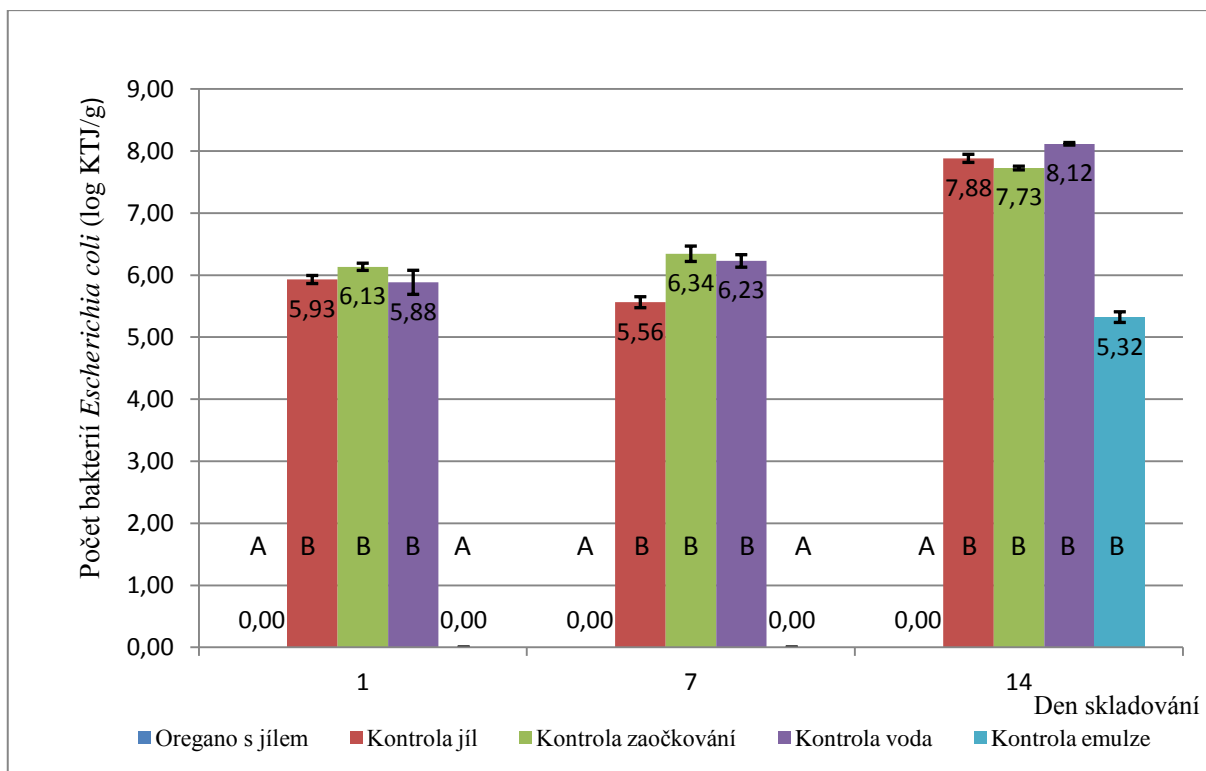
5.1 Vyhodnocení mikrobiologické analýzy

Provedení mikrobiologické analýzy bylo uskutečněno za účelem prokázání antimikrobiálního účinku enkapsulovaných silic proti patogenním mikroorganismům přítomným na kachním masa. Vzorky kachního masa byly hodnoceny na selektivních médiích pro stanovení počtu narostlých kolonií *Salmonella Enteritidis* a *Escherichia coli*. Stanovován byl také celkový počet mikroorganismů (CPM) na neselektivních médiích. Mikrobiologická analýza byla provedena v průběhu skladování zaočkovaných vzorků kachního masa, a to 1., 7. a 14. den skladování.

5.1.1 Bakterie *Escherichia coli*

Oreganová silice enkapsulovaná do jílových nanočástic zcela inhibovala růst patogenní bakterie *Escherichia coli*, a to ve všech třech opakováních a ve všech dnech skladování (Graf 1). U kontrol byl patrný nárůst bakterií až do 14. dne skladování. Kontrola emulze vyšla negativní po 1 dni a 7 dnech skladování, ovšem po 14 dnech skladování došlo k nárůstu bakterií.

Po 1 dni a 7 dnech skladování byly rozdíly v počtu bakterií *Escherichia coli* narostlých na kontrolních vzorcích pouze nepatrně rozdílné, u kontroly jílu došlo po 7 dnech k eliminaci bakterií o téměř $0,4 \log \text{KTJ.g}^{-1}$ oproti 1. dni. V průběhu skladování, tedy po 14 dnech, byl však u kontroly jílu patrný nárůst počtu bakterií o více než $2 \log \text{KTJ.g}^{-1}$. Pro kontrolu zaočkování stejně jako pro kontrolu vody byl jasně viditelný nárůst bakterií, který je nejvýraznější mezi 7. a 14. dnem skladování a pohyboval se v rozmezí $1,5 - 2 \log \text{KTJ.g}^{-1}$. Účinek kontroly emulze vykazoval po 14 dnech skladování ve srovnání s ošetřenými vzorky oreganovou silicí enkapsulovanou do jílových nanočástic rozdíl o více než $5 \log \text{KTJ.g}^{-1}$. Stejně tak mezi kontrolou zaočkování a ošetřenými vzorky byl patrný rozdíl o více než $6 \log \text{KTJ.g}^{-1}$ a po 14 dnech skladování činil tento rozdíl téměř $8 \log \text{KTJ.g}^{-1}$. Statisticky významné rozdíly mezi ošetřenými vzorky a kontrolními vzorky jsou tak patrné již z grafu.



Graf 1 Počty bakterií *Escherichia coli* na selektivním médiu

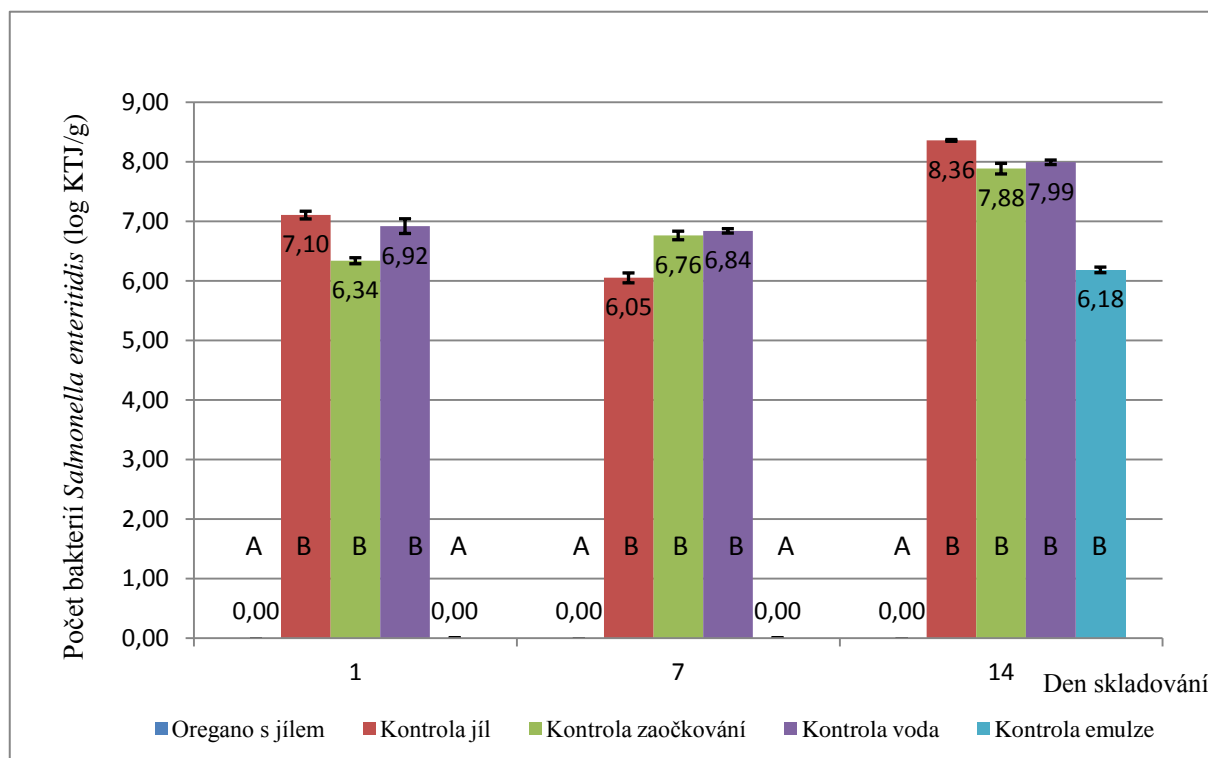
Pozn.: Stejná písmena ve sloupcích znamenají statisticky nevýznamné rozdíly mezi hodnotami v jednom dni ($p > 0,05$).

5.1.2 Bakterie *Salmonella Enteritidis*

Stejně jako v prvním případě došlo i zde u ošetřených vzorků s oreganovou silicí enkapsulovanou do jílových nanočástic k totální inhibici růstu patogenních bakterií *Salmonella Enteritidis* ve všech dnech skladování a ve všech opakováních (Graf 2). Naproti tomu kontrolní vzorky, s výjimkou kontroly emulze, se od sebe v jednotlivých dnech příliš nelišily. Ve srovnání s účinkem proti bakterii *Escherichia coli* (Graf 1) však byly zaznamenány větší rozdíly v počtu $\log \text{KTJ.g}^{-1}$ mezi ošetřenými vzorky a kontrolními vzorky.

Účinek oreganové silice enkapsulované do jílových nanočástic byl patrný po 1 dni skladování, kdy počet bakterií na kontrole zaočkování činil přes $6 \log \text{KTJ.g}^{-1}$. Po 7 dnech došlo k ještě výraznějšímu prohloubení rozdílů mezi ošetřeným vzorkem a kontrolou zaočkování a tato hodnota byla již téměř $7 \log \text{KTJ.g}^{-1}$. Největší nárůst počtu bakterií pro kontrolu zaočkování oproti ošetřeným vzorkům vykazovala hodnota téměř $8 \log \text{KTJ.g}^{-1}$, a to po 14 dnech skladování.

Po 1 dni a 7 dnech došlo jak u kontroly jílu, tak u kontroly vody k poklesu růstu bakterií, po 14 dnech se však opět počet bakterií zvýšil a rozdíl pro kontrolu jílu tak činil více než 2 log KTJ.g⁻¹ oproti 7. dni. Ošetřené vzorky oreganovou silicí enkapsulovanou do jílových nanočástic v tomto případě vykazovaly větší rozdíl než u bakterie *Escherichia coli* a tento rozdíl byl po 14 dnech skladování proti kontrole emulze více než 6 log KTJ.g⁻¹. Statistická významnost mezi ošetřenými vzorky a kontrolními vzorky je stále patrná.



Graf 2 Počty bakterií *Salmonella Enteritidis* na selektivním médiu

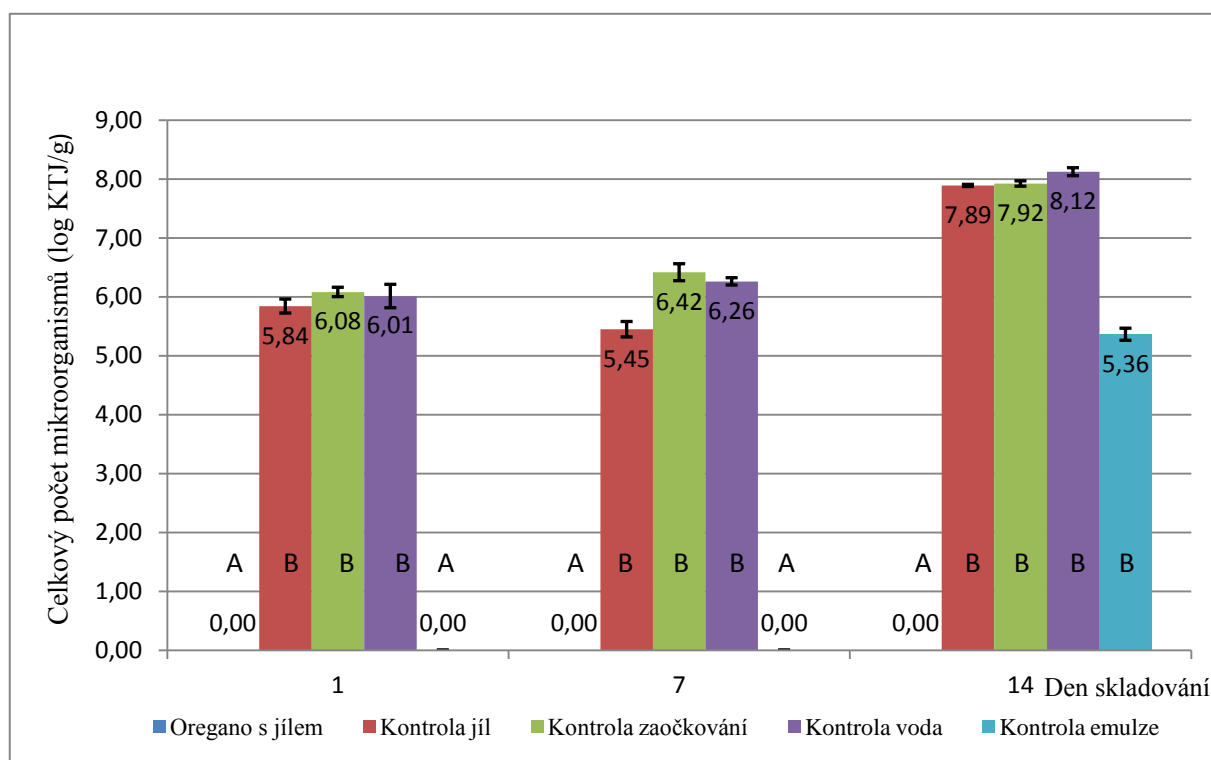
Pozn.: Stejná písmena ve sloupcích znamenají statisticky nevýznamné rozdíly mezi hodnotami v jednom dni ($p > 0,05$).

5.1.3 Celkové počty mikroorganismů

Oreganová silice enkapsulovaná do jílových nanočástic dokázala také zcela inhibovat celkový počet mikroorganismů (CPM), a to znovu ve všech dnech skladování i ve všech opakováních (Graf 3). V případě kontrolních vzorků, které byly vyhodnocovány paralelně se vzorky zaočkovanými bakterií *Salmonella Enteritidis* (Graf 4) bylo patrné, že rozdíl v počtu bakterií pro *Escherichia coli* byl menší.

Kontrolní vzorky se opět po 1 dni skladování příliš nelišily od předchozích výsledků

pro selektivní médium a opět vykazovaly rozdíl proti ošetřeným vzorkům s oreganovou silicí enkapsulovanou do jílových nanočástic více než o 5 log KTJ.g⁻¹. Rozdíl pro kontrolu zaočkování proti ošetřeným vzorkům po 1 dni skladování činil 6 log KTJ.g⁻¹, v průběhu 7. dne skladování došlo k nárůstu počtu bakterií na hodnotu téměř 7 log KTJ.g⁻¹ a po 14 dnech tento rozdíl byl bezmála 8 log KTJ.g⁻¹ oproti ošetřeným vzorkům s oreganovou silicí enkapsulovanou do jílových nanočástic. Kontrola vody a kontrola jílu zaznamenala mezi 1. a 7. dnem skladování mírný pokles počtu bakterií, avšak po 14 dnech se tento rozdíl opět prohloubil a byl zaznamenán výrazný nárůst počtu bakterií na hodnoty kolem 8 log KTJ.g⁻¹. Kontrola emulze v průběhu skladování (po 1 dni a 7 dnech) nevykazovala žádné reakce, ale po 14 dnech skladování byl zaznamenán nárůst bakterií a tento rozdíl byl téměř 5,5 log KTJ.g⁻¹ oproti ošetřeným vzorkům.

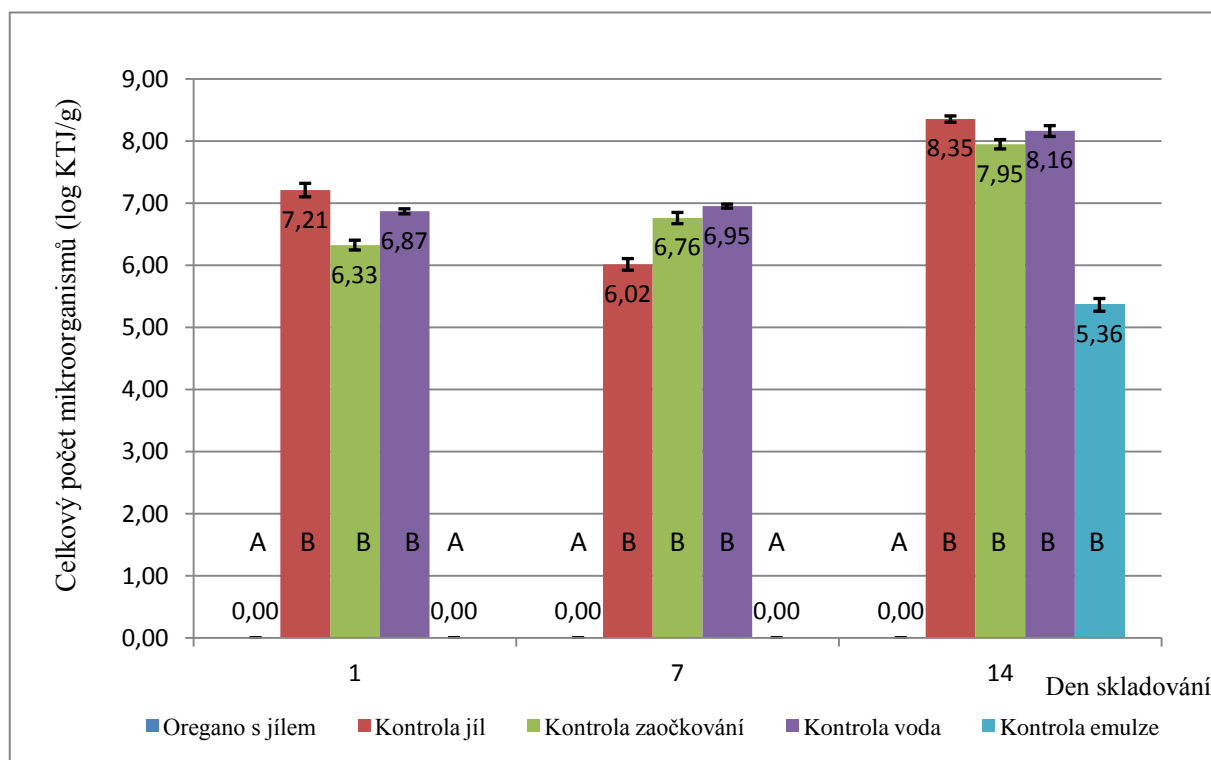


Graf 3 Celkový počet mikroorganismů u vzorků zaočkových bakterií *Escherichia coli*

Pozn.: Stejná písmena ve sloupcích znamenají statisticky nevýznamné rozdíly mezi hodnotami v jednom dni ($p > 0,05$).

Jak již bylo zmíněno v předchozím odstavci, u vzorků, které byly zaočkovány bakterií *Escherichia coli*, byly rozdíly v počtu log KTJ.g⁻¹ pro kontrolní vzorky podstatně menší ve srovnání s kontrolními vzorky zaočkoványými *Salmonellou Enteritidis* (Graf 3 a 4).

Kontrola jílu vykazovala po 7 dnech skladování pokles v počtu bakterií a tento rozdíl oproti kontrole jílu po 1 dni skladování byl 1,2 log KTJ.g⁻¹. Na konci skladování však opět došlo k výraznému nárůstu počtu bakterií a rozdíl oproti 7 dnech skladování činil téměř 2,5 log KTJ.g⁻¹. Vzorky ošetřené oreganovou silicí enkapsulovanou do jílových nanočástic opět eliminovaly počty bakterií po 1, 7 a 14 dnech skladování na nulu. Kontrola zaočkování proti ošetřeným vzorkům činila rozdíl po 1 dni skladování téměř 6,5 log KTJ.g⁻¹, po 7 dnech skladování byl tento rozdíl ještě větší a činil téměř 7 log KTJ.g⁻¹ a po 14 dnech skladování došlo k prohloubení rozdílu v počtu bakterií až na 8 log KTJ.g⁻¹ oproti ošetřeným vzorkům. Kontrola vody v průběhu skladování nevykazovala výrazné rozdíly v počtu narostlých kolonií proti ostatním kontrolním vzorkům.



Graf 4 Celkový počet mikroorganismů u vzorků zaočkovaných bakterií *Salmonella* Enteritidis

Pozn.: Stejná písmena ve sloupcích znamenají statisticky nevýznamné rozdíly mezi hodnotami v jednom dni ($p > 0,05$).

5.2 Vyhodnocení chemické analýzy

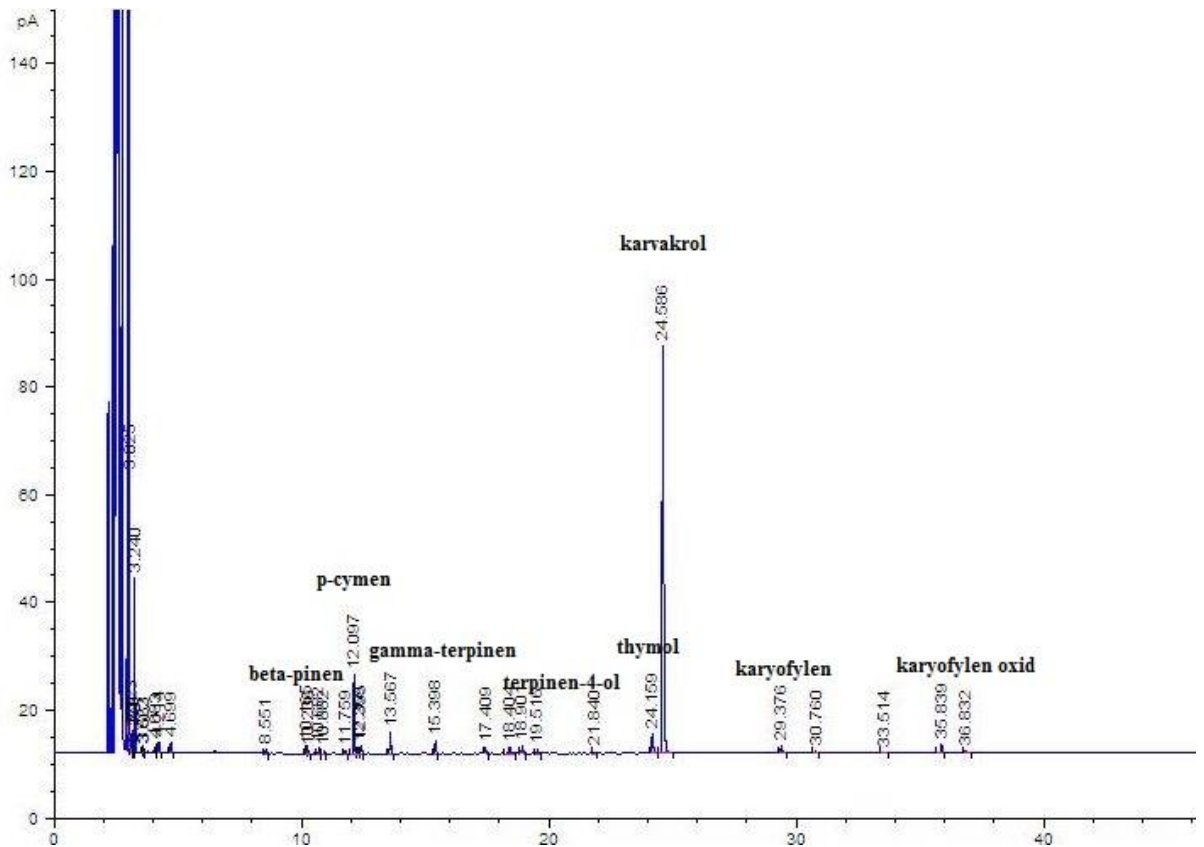
5.2.1 Složení oreganové silice

Pro identifikaci složek oreganové silice byla jako analytická metoda zvolena GC/MS (identifikace látek) a GC/FID (kvantifikace). Identita vybraných sloučenin byla potvrzena porovnáním naměřených retenčních časů s retenčními časy standardů (ve všech případech, kde byly tyto analytické standardy dostupné). Výsledky analýzy na GC/FID oreganové silice (roztok silice o koncentraci 1,2 mg/ml) jsou uvedeny v tabulce 3, příslušný chromatogram je uveden na obrázku 4.

Tabulka 3 Složení oreganové silice (*Origanum vulgare* L.)

| Číslo píku | Ret. čas (min) | Obsah složky v silici (%) | Sloučenina | Metoda identifikace |
|------------|----------------|---------------------------|--------------------|---------------------|
| 1 | 10,05 | 1,25 | β -pinen | MS |
| 2 | 11,97 | 9,75 | <i>p</i> -cymen | MS |
| 3 | 12,27 | 1,01 | eukalyptol | MS |
| 4 | 13,44 | 2,43 | γ -terpinen | MS |
| 5 | 15,25 | 1,80 | linalool | MS |
| 6 | 18,24 | 1,03 | borneol | MS |
| 7 | 18,75 | 1,00 | terpinen-4-ol | MS, STD |
| 8 | 23,93 | 3,04 | thymol | MS |
| 9 | 24,34 | 71,62 | karvakrol | MS, STD |
| 10 | 29,24 | 1,16 | karyofylen | MS |
| 11 | 35,69 | 1,32 | karyofylen oxid | MS |

Vysvětlivky: MS = hmotnostní spektrometrie, STD = standard (porovnání retenčních časů)



Obrázek 4 Chromatogram oreganové silice

Ve vzorku oreganové silice bylo metodou GC/FID detekováno celkem 55 složek (sloučeniny se zastoupením složky v silici menším než 1 % nejsou v tabulce uvedeny); z toho bylo s využitím MS a porovnáním standardů identifikováno celkem 11 složek (tabulka 3). Jako výrazně majoritní složka v analyzované silici byl identifikován karvakrol (71,62 %); jako další významné složky silice (≥ 1 %) byly identifikovány *p*-cymen (9,75 %), thymol (3,04%), γ -terpinen (2,43 %), linalool (1,8 %), karyofylen oxid (1,32 %), β -pinen (1,25 %), karyofylen (1,16 %), borneol (1,03 %), eukalyptol (1,01 %) a terpinen-4-ol (1 %). Celková plocha píků identifikovaných látek činila > 95 %.

5.2.2 Výtěžnost analytické metody

Analýza vzorků kachního masa se silicí oregana probíhala na GC/FID (kapitola 4.5.2.2 – 4.5.2.4). Celkem bylo detekováno 28 složek, z nichž bylo vybráno a identifikováno 7 složek porovnáním retenčních časů s retenčními časy standardů a s následným použitím MS. Sloučeniny byly kvantifikovány metodou vnějšího standardu (kalibrační roztok o koncentraci 1,2 mg/ml) na základě porovnání naměřených ploch příslušných píků. Výtěžnost analytické metody vyjadřuje kvantitativní zastoupení pro jednotlivé složky silice z přidaného množství silice (30 mg silice/5 g kousek masa).

Tabulka 4 Kvantitativní zastoupení jednotlivých složek oreganové silice v kachním mase

| Číslo píku | Sloučenina | Ret. čas (min) | Výtěžnost (%) | ± SD |
|------------|--------------------|----------------|---------------|------|
| 1 | <i>p</i> -cymen | 12,1 | 75,7 | 0,0 |
| 2 | γ -terpinen | 13,6 | 74,8 | 0,0 |
| 3 | linalool | 15,4 | 79,6 | 0,0 |
| 4 | thymol | 24,2 | 81,8 | 0,4 |
| 5 | karvakrol | 24,6 | 82,6 | 0,2 |
| 6 | karyofylen | 29,4 | 82,0 | 0,0 |
| 7 | karyofylen oxid | 35,8 | 78,6 | 0,0 |

SD = směrodatná odchylka

5.2.3 Výsledky chemické analýzy vzorků (chemická rezidua silice)

Analýza vzorků kachního masa probíhala dle použité metody (kapitola 4.5.2.4) na GC/FID a pro kvantifikaci byl použit jako vnější standard roztok silice o koncentraci 0,2 µl/ml. Každý vzorek byl analyzován celkem ve trojím provedení, jak naznačuje tabulka 5. I přesto, že ve vzorcích analyzovaných dříve bylo detekováno celkem 7 složek oreganové silice (tabulka 4), ve vzorcích kachního masa s oreganovou silicí enkapsulovanou do jílových nanočástic byla detekována pouze jediná majoritní složka (karvakrol). Hodnoty 1., 2. a 3. měření vyjadřují jednotlivá procentuální zastoupení reziduí karvakrolu a průměrná hodnota je vyjádřena jako průměr těchto tří měření.

Tabulka 5 Hodnoty reziduí karvakrolu v reálných vzorcích kachního masa ošetřených oreganovou silicí (výsledky jsou uvedeny v % z přidaného množství silice)

| Způsob ošetření | Doba ošetření | 1. měření | 2. měření | 3. měření | průměr | ± SD |
|--|---------------|-----------|-----------|-----------|--------|------|
| Emulze | 1 den | 12,4 | 10 | 32 | 18,1 | 12,1 |
| Emulze | 7 dní | 15,5 | 4,7 | 4,1 | 8,1 | 6,4 |
| Emulze | 14 dní | 5,2 | 8,1 | 8,1 | 7,1 | 1,7 |
| Nanojíl + silice + <i>E. coli</i> | 1 den | 120,6 | 129,8 | 168,0 | 139,5 | 25,1 |
| Nanojíl + silice + <i>E. coli</i> | 7 dní | 51,5 | 81,4 | 55,7 | 62,9 | 16,2 |
| Nanojíl + silice + <i>E. coli</i> | 14 dní | 74,2 | 47,4 | 17,5 | 46,4 | 28,4 |
| Nanojíl + silice + <i>S. Enteritidis</i> | 1 den | 141,2 | 106,2 | 104,1 | 117,2 | 20,8 |
| Nanojíl + silice + <i>S. Enteritidis</i> | 7 dní | 82,5 | 37,1 | 42,3 | 54,0 | 24,8 |
| Nanojíl + silice + <i>S. Enteritidis</i> | 14 dní | 29,9 | 41,2 | 72,2 | 47,8 | 21,9 |

SD = směrodatná odchylka

6 Diskuze

Předložená diplomová práce měla za úkol ověřit antimikrobiální aktivitu silice oregana enkapsulované do nanojílových kompozitů proti vybraným bakteriím (*Escherichia coli* a *Salmonella enterica* sv. Enteritidis) v kachním masu a následně chemickou analýzou identifikovat rezidua oreganové silice obsažené ve vzorcích. Maso je potravinou, která velmi rychle podléhá mikrobiálnímu napadení, proto se dnes mnoho vědeckých studií zabývá konzervací masa za pomoci rostlinných silic. Lidé dnes také stále častěji dávají přednost všemu přírodnímu a nejinak je tomu i u konzervace silicemi, která se oproti chemické konzervaci těší stále větší oblibě (Kerth, 2013; Bakkali et al., 2008).

Z uvedených výsledků vyplývá, že celkový počet mikroorganismů (CPM) i patogenních bakterií, byl oreganovou silicí enkapsulovanou do jílových nanočástic totálně inhibován, a to ve všech opakováních. V tomto případě se tedy zdá, že koncentrace, která by ještě inhibovala růst mikroorganismů a zároveň byla pro konzumenta stále sensoricky přijatelná předpokládá použití ještě nižší koncentrace silice, než jaká byla použita v této práci. Řada autorů se ve svých studiích již problematikou antimikrobiálního účinku oreganové silice ve vztahu k různým druhům masa zabývala. Výběr oreganové silice byl tedy proveden na základě těchto studií.

Silnější antimikrobiální účinek ze dvou zkoumaných silic (oregano a tymián) proti bakteriím *Salmonella* Enteritidis a *Escherichia coli* potvrdila studie, kterou provedli Boskovic et al. (2015). V porovnání silic vykazovala silice tymiánu nižší antimikrobiální účinek. Další studie Penalver et al. (2005) dokázala taktéž potvrdit antimikrobiální aktivitu oreganové silice proti bakteriím *Salmonella* Enteritidis a *Escherichia coli* v kuřecím masu.

Další autoři jako Tassou et al. (1996) uvedli, že použití směsi citronové šťávy (10 %), oregana (0,4 %), olivového oleje a balené v modifikované atmosféře (MAP) na čerstvé rybí filety snížilo počet původních $7 \log \text{KTJ/g}^{-1}$ bakterie *Salmonella* Enteritidis na téměř $1 \log \text{KTJ/g}^{-1}$ po 15 dnech skladování při teplotě $1 \text{ }^\circ\text{C}$ a po 30 dnech skladování se již tento počet neměnil. Účinek silice oregana v kombinaci s nisinem na mletém skopovém masu proti bakterii *S. Enteritidis* testovali Govaris et al. (2010) a také potvrdili výrazný antimikrobiální účinek oreganové silice (0,6 %). Zaznamenali pokles výskytu bakterie o $2,4 \log \text{KTJ.g}^{-1}$ již druhý den skladování. Oral et al. (2009) ve své studii zjišťovali, jak byla prodloužena údržnost čerstvých kuřecích paliček, které byly skladovány na absorpční podložce s emulzí vody a oreganové silice zabalené ve strečové fólii. Silice prodloužila trvanlivost výrobku o přibližně 2 dny při skladovací teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$, přičemž bez použití silice byla trvanlivost kuřecích paliček 3 dny.

Kombinovaný účinek silice oregana 0,1 % a 1 % (w/w) a balení MAP pro prodloužení trvanlivosti čerstvého kuřecího masa skladovaného při teplotě 4 °C využili ve své studii také Chouliara et al. (2007). Počet bakterií z čeledi Enterobacteriaceae byl z původního počtu 2,8 log KTJ.g⁻¹ snížen pod 1 log KTJ.g⁻¹ po dobu 9 dní. Dále však došlo k nárůstu počtu bakterií a v 25. dni skladování byl počet bakterií roven 5,8 log KTJ/g⁻¹. Kombinace masových kuliček z hovězího masa a antimikrobiálních účinků oregana, tymiánu a rozmarýnu proti patogenním bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes* studovali Pesavento et al. (2015). Zjistili, že pouze koncentrace silice 0,5 % by byla přijatelná z hlediska senzoryckého a zároveň účinkovala baktericidně na výše zmíněné patogenní bakterie. Tyto studie ukazují antimikrobiální působení oreganové silice na různé druhy masa. Žádná z publikovaných studií se však prozatím nevěnovala účinku jakékoli silice na kachním mase. V porovnání s výše uvedenými autory byl v našem experimentu počet bakterií ve vzorcích kachního masa s oreganovou silicí enkapsulovanou do jílových nanočástic nejnižší, resp. nulový. Rozdíl v počtu bakterií *Escherichia coli* byl po 1 dni skladování 6,1 log KTJ.g⁻¹, po 7 dnech skladování stoupl na hodnotu 6,3 log KTJ.g⁻¹ po uplynutí doby 14 dnů se rovnal 7,7 log KTJ.g⁻¹. Bakterie *S. Enteritidis* reagovala na enkapsulovanou oreganovou silici podobně, jen počet bakterií byl o něco vyšší. Po 1 dni skladování činil rozdíl v počtu bakterií 6,3 log KTJ.g⁻¹, po 7 dnech skladování byl 6,8 log KTJ.g⁻¹ a po 14 dnech skladování se rovnal 7,9 log KTJ.g⁻¹. Výsledky všech kontrolních vzorků neprokázaly žádné statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými dny. Proto by mohlo být do budoucna jistým doporučením, v případě, že by se dále tato studie rozvíjela, snížit počet testovaných kontrolních vzorků.

Jistou podobnost s naším výzkumem můžeme spatřovat ve studii Moraes-Lovison et al. (2017), kteří se zabývali enkapsulovanou nanoemulzí oregana do kuřecí paštiky. Zkoumali antimikrobiální aktivitu dané emulze proti patogenním bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Nanoemulze ve vzorcích kuřecí paštiky 8. den skladování vykazovala vyšší antibakteriální účinek proti bakterii *Escherichia coli* než proti bakterii *Staphylococcus aureus*. Kontrola emulze v našem experimentu vykazovala zajímavé výsledky mikrobiologické analýzy. Do 7. dne skladování dosahovala negativních výsledků, přičemž po 14 dnech skladování došlo k nárůstu CPM i patogenních bakterií. Tuto skutečnost můžeme porovnat se studií Skandamis and Nychas (2011), kteří se věnovali účinku oreganové silice a zjistili, že tato silice může představovat jistý překážkový efekt pro bakterie. Tento efekt vykazoval vyšší účinek u chemických změn než u antimikrobiálních změn. Vysvětlení bychom mohli spatřovat v tom, že těkavé látky obsažené v silici oregana se z emulze postupně vypařují a při dosažení určité koncentrace dojde k tomu, že bakterie vznikající

v mase mohou dosáhnout inhibiční fáze, kdy přežívají, ale nemnoží se. Po dosažení určité koncentrace vhodné pro jejich množení poté dojde k jejich znovuoživení a začnou se dále množit.

Těchto výsledků však nebylo dosaženo u oreganové silice enkapsulované do jílových nanočástic. Enkapsulace do jílových nanočástic byla zvolena hned z několika důvodů. Jedním z nich je to, že tyto jílové nanokompozity jsou oproti např. křemičitým nanočásticím výrazně levnější a taktéž jejich příprava je časově méně náročná. Další důvod spočívá v jejich snadné aplikaci, přičemž jednotlivé kousky masa je možné v tomto prášku velmi snadno obalit. V neposlední řadě je tím hlavním důvodem to, že komplex těkavých látek silice se z těchto nanočástic uvolňuje postupně, a právě tímto způsobem tak inhibuje či výrazně eliminuje růst patogenních mikroorganismů. Právě z tohoto důvodu v našem experimentu takto ošetřené vzorky masa ani po 14 dnech skladování nevykazovaly žádnou mikrobiální aktivitu. Vojtíšková (2016) ve své diplomové práci uvedla, že silice tymiánu enkapsulovaná do jílových nanočástic, jejíž hlavní složky jsou thymol a karvakrol, byla antimikrobiálně mnohem účinnější než silice saturejky, a to jak v boji proti patogenním bakteriím *Salmonella Enteritidis* a *Escherichia coli*, tak i v boji proti CPM. Výsledky ukázaly, že mezi jednotlivými kontrolami se nevyskytovaly statisticky významné rozdíly, což značí, že samotná enkapsulace do jílových nanočástic téměř neovlivnila inhibici bakterií. Antimikrobiálnímu účinku jílových nanočástic se věnoval také Tornuk et al. (2015), kteří tento účinek potvrdili při použití tymiánové silice enkapsulované do jílových nanočástic jako součást tzv. aktivního balení, kde byly jílové nanočástice aplikovány do fólie, kterou bylo obaleno hovězí maso. Z doposud publikovaných studií se však žádná prozatím nevěnovala přímému začlenění jílových nanočástic do potravin tak, jak je to popsáno v této práci.

Kromě výše zmíněných důvodů jsou podle EFSA (2015) a FDA minerální nanojíly považovány za bezpečné přídatné látky, které pro konzumenty nepředstavují žádné riziko (Meira et al., 2015). V souvislosti s vytvořením jílových nanočástic se však jedná o určitou modifikaci nanojílu, jehož účinky, včetně způsobu kumulace a toxicity v biologických systémech nejsou studii zatím potvrzeny a mohly by mít negativní vliv na zdraví konzumentů (Dlouhý a kol., 2011).

Další částí experimentu této práce bylo stanovení chemických reziduí ve vzorcích kachního masa s oreganovou silicí enkapsulovanou do jílových nanočástic. Řada autorů ve svých studiích uvádí složení oreganové silice použité při výzkumu. Tak například již výše zmíněná studie Pesavento et al. (2015), ve které provedli identifikaci složek oreganové silice pomocí GC/MS a následnou kvantifikaci na GC/FID. Na prvním místě uvedli karvakrol

(72 %), dále *p*-cymen (12 %), α -pinen a γ -terpinen (2 %), thymol (2 %). V další studii (Burt, 2004) bylo zmíněno, že hlavní antimikrobiální účinky oreganové silice jsou přisuzovány právě karvakrolu a thymolu, které jsou nejčastěji přítomny v koncentraci 15 – 20 % (v/v). V závislosti na chemotypu rostliny však může docházet k výrazným rozdílům mezi procentuálním zastoupením jednotlivých složek silice oregana. V další studii podrobili Milovanović et al. (2009) oreganovou silici stejné analýze na GC/MS a GC/FID a jejich výsledky byly následující: karvakrol (70 %), *p*-cymen (14 %), následovaný thymolem (8 %). Identifikace a následná kvantifikace složek oreganové silice použitá v našem experimentu byla zastoupena nejvýrazněji karvakrolem (72 %), *p*-cymenem (10 %) a thymolem (3 %). Ve výše zmíněných studiích byla vždy chemické analýze podrobena samotná oreganová silice, avšak z nalezených publikací se žádná doposud nevěnovala analýze vzorků kachního masa v kombinaci s oreganovou silicí enkapsulovanou do jílových nanočástic.

Výsledky našeho experimentu ukázaly, že výtěžnost analytické metody vzorků kachního masa se silicí oregana se pohybovala pro jednotlivé identifikované složky silice v rozmezí 75 – 83 %. Tyto hodnoty byly jen nepatrně rozdílné a pro jednotlivé látky vycházely následující výsledky: karvakrol (83 %), thymol (82 %), karyofylen (82 %), linalool (80 %), karyofylen oxid (79 %), *p*-cymen (76 %), γ -terpinen (75 %). Výsledky výtěžnosti metody ukázaly velmi uspokojivé hodnoty.

Následovala analýza vzorků kachního masa s oreganovou silicí enkapsulovanou do jílových nanočástic. Výsledky chemické analýzy pro rezidua oreganové silice byly zaznamenány pouze pro jedinou složku, kterou byl karvakrol. Po 1 dni byly hodnoty karvakrolu nejvyšší pro vzorek kachního masa s oreganovou silicí enkapsulovanou do jílových nanočástic a bakterií *Escherichia coli* (140 %), po 7 dnech byla hodnota 63 % a po 14 dnech 46 %. Pro vzorky kachního masa s oreganovou silicí enkapsulovanou do jílových nanočástic a bakterií *S. Enteritidis* vyšly pro karvakrol hodnoty o něco nižší; po 1 dni se rovnala hodnotě 117 %, po 7 dnech byla hodnota 54 % a po 14 dnech činila 48 % karvakrolu z přidaného množství silice. Všechny výsledky měly klesající tendenci v závislosti na čase, nejvýrazněji se projevily u kontroly emulze (po 1 dni – 18 %, po 7 dnech – 8 % a po 14 dnech – 7 %). Hodnoty reziduí karvakrolu nad 100 % jasně vypovídají o jisté chybě, která mohla být způsobena několika faktory. První chyba mohla být zapříčiněna nepřesností při odměřování přesného množství silice automatickou pipetou z toho důvodu, že silice je velmi viskózní kapalina a mohlo tak docházet k určitým odchylkám při dávkování. Dalším faktorem by mohla být interference z matrice masa, případně jílových nanočástic. Interference v chromatografu by mohla být také jedním z faktorů ovlivnění výsledků. Jako případný faktor

ovlivnění by se mohly jevit chemické změny silice, jelikož s největší pravděpodobností dochází k oxidačním změnám složek silice a není tedy jisté, jaký vliv zde mohou hrát samotné nanočástice, stejně jako vliv mikroorganismů. Důvodem velké rozptylu mezi rezidui karvakrolu pro vzorky s emulzí a enkapsulovanými vzorky (viz tabulka 5) by mohlo být například to, že z emulze se těkavé látky oreganové silice vypařují rychleji, a proto nemohou být extrahovány a následně detekovány v takovém množství jako ve vzorcích s enkapsulovanou silicí. Určitou roli by zde mohlo sehrát i to, že vzorky masa byly emulzí pouze potřeny, tudíž je pravděpodobné, že se dovnitř masa složky silice nedostaly tak výrazně jako u enkapsulovaných vzorků. Dalším neméně důležitým faktorem je vliv matrice. Jelikož maso je velmi heterogenní materiál, obsahuje různě velké póry, mohly by být výsledky zkresleny právě proto, že do různých kousků masa se silice s jílovými nanočásticemi dostane různě hluboko a následně se uvolňuje do masa postupně.

Na základě výsledků dosažených v této diplomové práci je tak možné konstatovat, že jílové nanočástice s enkapsulovanou silicí oregana se ukázaly jako účinný prostředek pro inhibici patogenních bakterií v kachním mase a ukázaly se jako vhodný přenašeč antimikrobiálních látek. Vzhledem k nepříliš vědecky podloženým studiím ohledně jílových nanočástic a jejich začlenění do potravin, bude však zapotřebí věnovat ještě zvýšenou pozornost nepotvrzené toxicitě těchto a dalších nanočástic a jejich způsobu vylučování z lidského organismu. Výzkumu jílových nanočástic by proto měla být věnována další pozornost v souvislosti s přímou aplikací do potravin. V souvislosti s chemickou analýzou reziduí oreganové silice by měla být provedena další měření, která by vyvrátila tvrzení ohledně možných zdrojů chyb a eliminovaly se tak faktory ovlivňující zcela nepochybně výsledky chemických reziduí.

7 Závěr

V předložené diplomové práci byl zkoumán vliv oreganové silice enkapsulované do jílových nanočástic na růst patogenních bakterií *Escherichia coli* a *Salmonella enterica* sv. Enteritidis v kachním mase. Hypotéza zněla, zda oreganová silice enkapsulovaná do jílových nanočástic při aplikovaném množství 225 mg nanojílu s 25 μ l enkapsulované silice bude inhibovat patogenní bakterie ve vzorcích kachního masa. Tato hypotéza byla tímto experimentem potvrzena. Rozdíl mezi ošetřenými vzorky s enkapsulovanou silicí oregana a kontrolami zaočkování se pohyboval v rozmezí 5,5 log KTJ.g⁻¹ – 8,4 log KTJ.g⁻¹ v jednotlivých časových intervalech.

Doporučením do budoucna by bylo testování nižších koncentrací silic, u kterých by byl předpoklad, že by působily antimikrobiálně proti patogenním mikroorganismům a zároveň by byly z hlediska sensorického hodnocení přijatelné. V případě přímého začleňování jílových nanočástic do potravin by bylo zapotřebí provést ještě řadu studií k objasnění jejich případné toxicity.

Z hlediska chemické analýzy reziduí silice by bylo zapotřebí odstranit možné zdroje chyb při experimentu. Případné objasnění by mohla přinést chemická analýza vzorků kachního masa se samotnými jílovými nanočásticemi s enkapsulovanou oreganovou silicí a vyvrátit či potvrdit tak určitá tvrzení ohledně možných zdrojů chyb diskutovaných v této práci.

8 Seznam literatury

- Abuja, P. M., Albertini, R. 2001. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*. 306 (1). 1 – 17.
- Alasnier, C., Meynier, A., Viau, M., Gandemer, G. 2000. Hydrolytic and oxidative changes in the lipids of chicken breast and thigh muscles during refrigerated storage. *Journal of Food Science*. 65 (1). 9 – 14.
- Antunes, M. D. C., Cavaco, A. M. 2010. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour and Fragrance Journal*. 25 (5). 351 – 366.
- Aridogan, I. A., Bayazit, Y., Soyupak, B., Zeren, H., Uguz, A. 2002. A rare retroperitoneal benign tumor. *Urologia Internationalis*. 69 (1). 69 – 71.
- Bajpai, V. K., Baek, K-H., Kang, S-Ch. 2012. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*. 45 (2). 722 – 734.
- Bakkali, F, Averbeck, S, Averbeck, D, Waomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46 (2). 446 – 475.
- Bardoň, J. 2008. Bakteriální alimentární infekce. *Potravinářská revue*. (2). 11 – 14.
- Bartoň, L., Bureš, D., David, L., Ivánek, J., Pulkrábek, J., Trčka, P. 2012. Ročenka 2011 – Výsledky klasifikace jatečně upravených těl prasat a skotu. Výzkumný ústav živočišné výroby. v.v.i.. Praha Uhřetěves. 74 s.
- Baser, K. H. C., Buchbauer, G. 2010. Handbook of essential oils – science, technology, and applications. CRC Press. p. 975. ISBN: 9781420063158.
- Bezpečnost potravin A – Z. 2007. *Escherichia coli*. Informační centrum bezpečnosti potravin. Ministerstvo zemědělství (online). [cit. 2017-02-03]. Dostupné z <<https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76555.aspx>>.
- Billing, J., Sherman, P. W. 1998. Antimicrobial functions of spices: why some like it hot. *The Quarterly Review of Biology*. 73 (1). 3 – 49.

- Blondel, C. J., Yang, H. J., Castro, B., Chiang, S., Toro, C. S., Zaldívar, M., Santiviago, C. A. 2010. Contribution of the type VI secretion system encoded in SPI-19 to chicken colonization by *Salmonella enterica* serotypes *Gallinarum* and *Enteritidis*. PLoS One. 5 (7). e11724.
- Borch, E., Kant-Muermans, M. L., Blixt, Y. 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. International Journal of Food Microbiology. 33 (1). 103 – 120.
- Boskovic, M., Zdravkovic, N., Ivanovic, J., Janjic, J., Djordjevic, J., Starcevic, M., Baltic, M. Z. 2015. Antimicrobial activity of Thyme (*Thymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum vulgare*) essential oils against some food-borne microorganisms. Procedia Food Science. 5. 18 – 21.
- Bruckner, S., Albrecht, A., Petersen, B., Kreyenschmidt, J. 2012. Characterization and comparison of spoilage processes in fresh pork and poultry. Journal of Food Quality. 35 (5). 372 – 382.
- Bugarel, M., Martin, A., Fach, P., Beutin, L. 2011. Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. BMC Microbiology. 11 (1). 142.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiology. 94 (3). 223 – 253.
- Capuzzo, A., Maffei, M. E., Occhipinti, A. 2013. Supercritical fluid extraction of plant flavors and fragrances. Molecules. 18 (6). 7194 – 7238.
- Castro, M. P., Palavecino, N. Z., Herman, C., Garro, O. A., Campos, C. A. 2011. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. Meat Science. 87 (4). 321 – 329.
- Davídek, J. 1977. Laboratorní příručka analýzy potravin. SNTL. Praha. 720 s.
- de Guzman, C. C., Jansen, P. C. M. *Origanum* L. 1999. Proseabase (online). [cit. 2013-08-19]. Dostupné z <http://books.google.cz/books?id=nvGBAAQBAJ&pg=PA66&lpg=PA66&dq=de+guzman+and+jansen+origanum&source=false>.

- Dlouhý, J., Duchek, P., Špírková, M. 2011. Interkalace polárních materiálů do struktury montmorillonitu. Česká společnost pro výzkum a využití jílu. 45. 1 – 5.
- EC. 2002. Commission Decision of 23 January 2002 amending Commission Decision 1999/217/EC as regards the register of flavouring substances used in or on foodstuffs. 2002/113/EC. Official Journal. L49 20/02/2002 (Issue). 1 – 160.
- Edris, A. E. 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytotherapy Research*. 21 (4). 308 – 323.
- EFSA. 2015. Safety assessment of the substance montmorillonite clay modified by dimethyldialkyl (C16-C18) ammonium chloride for use in food contact materials. *The EFSA Journal*. 13 (11). 4285.
- Eurostat. 2011. Statistický úřad Evropských společenství. Chov prasat a produkce vepřového masa v členských zemích EU. Databáze (online). [cit. 2017-02-18]. Dostupné z <<http://www.ec.europa.eu/eurostat/web/agriculture/data/main-tables>>.
- Fachini-Queiroz, F. C., Kummer, R., Estevao-Silva, C. F., Carvalho, M. D. D. B., Cunha, J. M., Grespan, R., Cuman, R. K. N. 2012. Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012.
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., Ibarz, A. 2011. Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science and Technology*. 22 (6). 292 – 303.
- FSIS (Food Safety and Inspection Service). 1998. Safe storage of meat and poultry. United States Department of Agriculture Washington D. C. (online). [cit. 2017-01-30]. Dostupné z <<https://www.rvs.umn.edu/Uploads/EducationalMaterials/6e870938-2072-47f1-a589-e4a3f346d31b.pdf>>.
- Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A., Chatzopoulou, P. S. 2010. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*. 137 (2). 175 – 180.

- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., Givskov, M. 2002. Food spoilage – interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 78 (1). 79 – 97.
- Han, J. H., Patel, D., Kim, J. E., Min, S. C. 2014. Retardation of *Listeria monocytogenes* growth in mozzarella cheese using antimicrobial sachets containing rosemary oil and thyme oil. *Journal of Food Science*. 79 (11). E2272 – E2278.
- Chen, C.-Y., Nace, G. W., Irwin, P. L. 2003. A 6 x 6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*. 55 (2). 475 – 479.
- Chiu, H. H., Chiang, H. M., Lo, C. C., Cheri, C. Y., Chiang, H. L. 2009. Constituents of volatile organic compounds of evaporating essential oil. *Atmospheric Environment*. 43 (36). 5743 – 5749.
- Chouliara, E., Karatapanis, A., Savvaidis, I. N., Kontominas, M. G. 2007. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 °C. *Food Microbiology*. 24 (6). 607 – 617.
- Jayasena, D. D., Jo, Ch. 2013. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science and Technology*. 34 (2). 96 – 108.
- Jeníková, G., Pazlarová, J., Demnerová, K. 2010. Detection of *Salmonella* in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay. *International Microbiology*. 3 (4). 225 – 229.
- Kadlec, P., Melzoch, K., Voldřich, M. (eds.). 2009. Co byste měli vědět o výrobě potravin? *Technologie potravin*. Key Publishing s. r. o. Ostrava – Přívoz. 536 s. ISBN: 9788074180514.
- Kailasapathy, K. 2009. Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*. 4 (033). 1 – 19.
- Kameník, J. 2011. Mikrobiologie kažení masa: příčiny a souvislosti. *Veterinářství*. 61 (8). 453 – 457.

- Kerth, Ch. R. 2013. The science of meat quality. Wiley-Blackwell. p. 283. ISBN: 9780813815435/2013.
- Klouček, P., Šmíd, J., Fraňková, A., Kokoška, L., Valterová, I., Pavela, R. 2012. Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. *Food Research International*. 47 (2). 161 – 165.
- Klouda, P. 2003. Moderní analytické metody. Pavel Klouda. Ostrava. 132 s. ISBN 8086369072.
- Kolanowski, W., Ziolkowski, M., Weißbrodt, J., Kunz, B., Laufenberg, G. 2006. Microencapsulation of fish oil by spray drying-impact on oxidative stability. Part 1. *European Food Research and Technology*. 222 (3-4). 336 – 342.
- Laird, K., Phillips, C. 2012. Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials? *Letters in Applied Microbiology*. 54 (3). 169 – 174.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote P. J., Nychas, G.-J. E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 91 (3). 453 – 462.
- Lapčík, O., Opletal, L., Moravcová, J., Čopíková, J., Drašar, P. 2011. Přírodní látky a jejich deriváty chuti pálivé. *Chemické Listy*. 105. 452 – 457.
- Law, D. 2000. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *Journal of Applied Microbiology*. 88 (5). 729 – 745.
- Levin, D. M., Wong, K. H., Reynolds, H. Y., Sutton, A., Northrup, R. S. 1975. V_i antigen from *Salmonella typhosa* and immunity against typhoid fever. 11. Safety and antigenicity in humans. *Infection and Immunity*. 12 (6). 1290 – 1294.
- Liu, C., Pan, D., Ye, Y., Cao, J. 2013. H NMR and multivariate data analysis of the relationship between the age and quality of duck meat. *Food Chemistry*. 141 (2). 1281 – 1286.
- McDonald, K., Sun, D. W. 1999. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 52 (1). 1 – 27.

- McMillin, K. W. 2008. Where is MAP going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Science*. 80 (1). 43 – 65.
- Meira, S. M. M., Jardim, A. I., Brandelli, A. 2015. Adsorption of nisin and pediocin on nanoclays. *Food Chemistry*. 188. 161 – 169.
- Milovanović, I. L., Mišan, A. Č., Sakač, M. B., Čabarkapa, I. S., Šarić, B. M., Matic, J. J., Jovanov, P. T. 2009. Evaluation of a GC-MS method for the analysis of oregano essential oil composition. *Food Processing Quality and Safety*. 36 (3). 75 – 79.
- Monteiro, M. V. B., Leite, A., Bertini, L. M., de Moraes, S. M., Nunes-Pinheiro, D. C. S. 2007. Tropical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 111 (2). 378 – 382.
- Moraes-Lovison, M., Marostegan, L. F., Peres, M. S., Menezes, I. F., Ghiraldi, M., Rodrigues, R. A., Pinho, S. C. 2017. Nanoemulsions encapsulating oregano essential oil: Production, stability, antibacterial activity and incorporation in chicken paté. *LWT – Food Science and Technology*. 77. 233 – 240.
- Nedorostová, L., Klouček, P., Kokoška, L., Štolcová, M. 2008. Comparison of antimicrobial properties of essential oils in vapour and liquid phase against foodborne pathogens. *Planta Medica*. 74 (9). 1190 – 1190.
- Nehasilová, D. 2011. Enteroagregativní hemoragická *E.coli*. Informační centrum bezpečnosti potravin, Ministerstvo zemědělství (online). [cit. 2017-02-04]. Dostupné z <<http://www.bezpecnostpotravin.cz/enteroagregativni-hemoragicka-e-coli.aspx>>.
- Nychas, E. G. L., Skandamis, P. N., Tassou, C. Ch., Koutsoumanis, P. K. 2008. Meat spoilage during distribution. *Meat Science*. 78 (1). 77 – 89.
- Okhuysen, P. C., DuPont, H. L. 2010. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. *Journal of Infectious Diseases*. 202 (4). 503 – 505.
- Onwulata, C. I. 2013. Microencapsulation and functional bioactive foods. *Journal of Food Processing and Preservation*. 37 (5). 510 – 532.

- Oral, N., Vatanserver, L., Sezer, Ç., Aydın, B., Güven, A., Gülmez, M., Kürkçüoğlu, M. 2009. Effect of absorbent pads containing oregano essential oil on the shelf life extensit of overwrap packed chicken drumsticks stored at four degrees Celsius. *Poultry Science*. 88 (7). 1459 – 1465.
- Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L., Lacroix, M. 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (18). 5598 – 5605.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M. 2006. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*. 73 (2). 236 – 244.
- Özkan, G., Sagdic, O., Baydar, N. G., Baydar, H. 2004. Note: Antioxidant and antibacterial activities of *Rosa damascena* flower extracts. *Revista de Agaroquimica y Tecnologia de Alimentos*. 10 (4). 277 – 281.
- Paibon, W., Yimnoi, C. A., Tembap, N., Boonlue, W., Jampachaisri, K., Nuengchamnon, N., Waranuch, N., Ingkaninan, K. 2011. Comparison and evaluation of volatile oils from three different extraction methods for some Thai fragrant flowers. *International Journal of Cosmetic Science*. 33 (2). 150 – 156.
- Pedersen, J. A. 2000. Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy. *Biochemical Systematics and Ecology*. 28 (3). 229 – 253.
- Penalver, P., Huerta, B., Borge, C., Astorga, R., Romero, R., Perea, A. 2005. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. *Apmis*. 113 (1). 1 – 6.
- Pesavento, G., Calonico, C., Bilia, A. R., Barnabei, M., Calesini, F., Addona, R., Mencarelli, L., Carmagnini, L., Di Martino, M. C., Lo Nostro, A. 2015. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control*. 54. 188 – 199.

Rasooli, I., Mirmostafa, S. A. 2003. Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (8). 2200 – 2205.

Saláková, A. 2013. Vybrané chemické projevy kažení masa. *Maso*. 24 (5). 28 – 31.

Saláková, A., 2014. Hygiena a technologie drůbeže, vajec a zvěřiny. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. Brno. 82 s. ISBN: 9788073057213.

Sigma-Aldrich – bezpečnostní list. (online). [citováno dne 24. 8. 2016] Dostupné z <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/carvacrol1502249975211?lang=en®ion=CZ>>.

Skandamis, P. N., Nychas, G. J. 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*. 91 (6). 1011 – 22.

Smith, R. M. 2002. Extractions with superheated water. *Journal of Chromatography A*. 975 (1). 31 – 46.

Steinhauser, L. 1995. Hygiena a technologie masa. 1. vyd. LAST. Brno. 643 s. ISBN: 8090026044.

Stupka, R., Šprysl, M., Čítek, J. 2009. Základy chovu prasat. Power Print. Praha. 182 s. ISBN: 9788090401129.

Táborský, J., Kunt, M., Klouček, P., Lachman, J., Zelený, V., Kokoška, L. 2012. Identification of potential sources of thymoquinone and related compounds in Asteraceae, Cupressaceae, Lamiaceae, and Ranunculaceae families. *Open Chemistry*. 10 (6). 1899 – 1906.

Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., Cliver, D. O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 21 (9). 1199 – 1218.

Tassou, C. C., Drosinos, E. H., Nychas, G. J. E. 1996. Inhibition of resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fish fillets in olive oil, oregano, and lemon juice under modified atmosphere or air. *Journal of Food Protection*. 59 (1). 31 – 34.

- Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., Cullen, P. J. 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 (14). 5987 – 6000.
- Tornuk, F., Hancer, M., Sagdic, O., Yetim, H. 2015. LLDPE based food packaging incorporated with nanoclays grafted with bioactive compounds to extend shelf life of some meat products. *LWT – Food Science and Technology*. 64 (2). 540 – 546.
- Tunç, S., Duman, O., Polat, T. G. 2016. Effects of montmorillonite on properties of methyl cellulose/carvacrol based active antimicrobial nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*. 150. 259 – 268.
- Ultee, A., Kets, E. P. W., Smid, E. J. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (10). 4606 – 4610.
- Ultee, A., Bennik, M., Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (4). 1561 – 1568.
- Van Haute, S., Raes, K., Van Der Meeren, P., Sampers, I. 2016. The effect of cinnamon, oregano and thyme essential oils in marinade on the microbial shelf life of fish and meat products. *Food Control*. 68. 30 – 39.
- Vojtíšková, Z. 2016. Možnost prodloužení úchovy čerstvého kuřecího masa pomocí silic enkapsulovaných do jílových nanočástic. Diplomová práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 79 s.
- von Mentzer, A., Connor, T. R., Wieler, L. H., Semmler, T., Iguchi, A., Thomson, N. R., Wiklund, G. 2014. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. *Nature Genetics*. 46 (12). 1321 – 1326.

9 Seznam použitých zkratek

ATP - adenosintrifosfát

BLIS - bakteriocinu podobná inhibiční látka

BMK - bakterie mléčného kvašení

CPM - celkový počet mikroorganismů

EAEC - enteroagregativní *E. coli*

EC - Evropská komise

EFSA - Evropský úřad pro bezpečnost potravin

EHEC - enterohemoragické *E. coli*

EIEC - enteroinvazivní *E. coli*

EPEC - enteropatogenní *E. coli*

ETEC - enterotoxigenní *E. coli*

EU - Evropská unie

FDA - Úřad pro kontrolu potravin a léčiv

GC - plynová chromatografie

GC/FID - plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem

GC/MS - plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem

GPC - gelová permeační chromatografie

HACCP - Systém analýzy rizik a stanovení kritických kontrolních bodů

HUS - hemolyticko-uremický syndrom

KTJ - kolonii tvořící jednotka

MAP - balení v modifikované atmosféře

MBC - minimální baktericidní koncentrace

MIC - minimální inhibiční koncentrace

MMT - montmorillonit

PUFA - polynenasycené mastné kyseliny

SFE - superkritická fluidní extrakce

STEC - shigatoxigenní *E. coli*

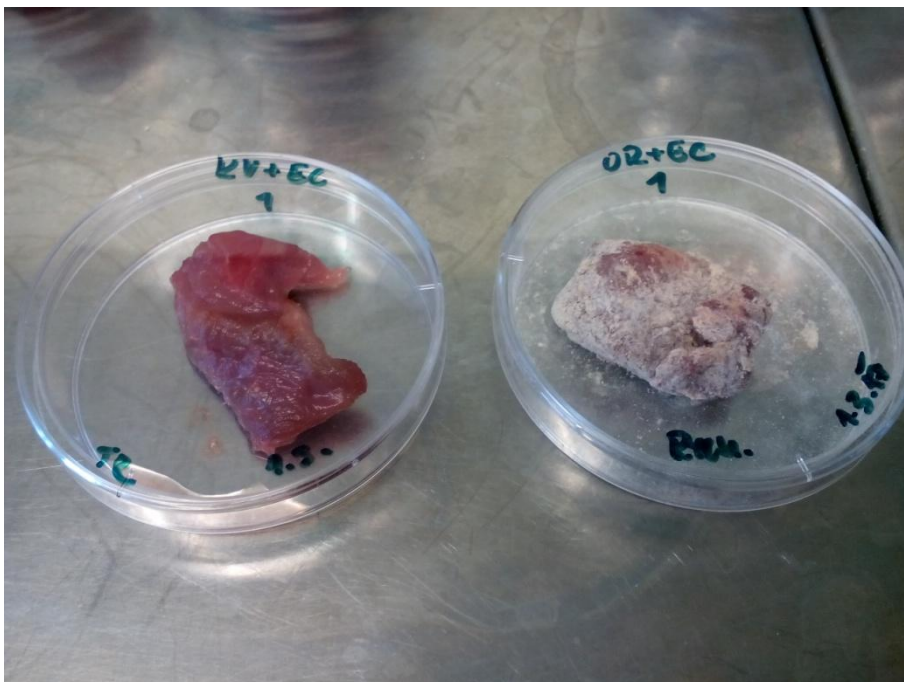
TBARS - stanovení látek reaktivních s kyselinou thiobarbiturovou (lipoperoxidace)

10 Přílohy

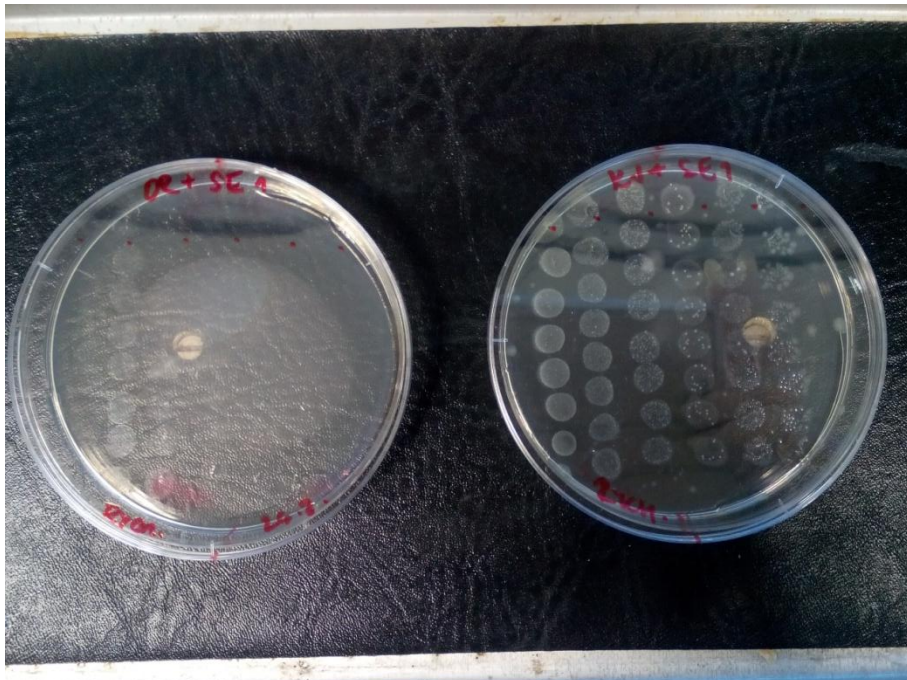
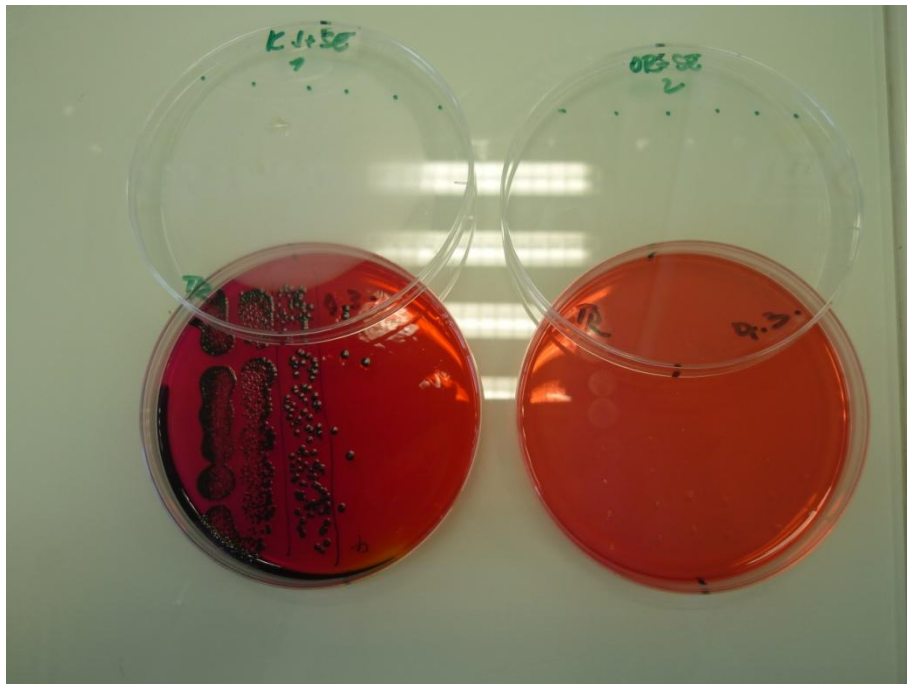
Příloha 1 Jílové nanočástice s enkapsulovanou oreganovou silicí



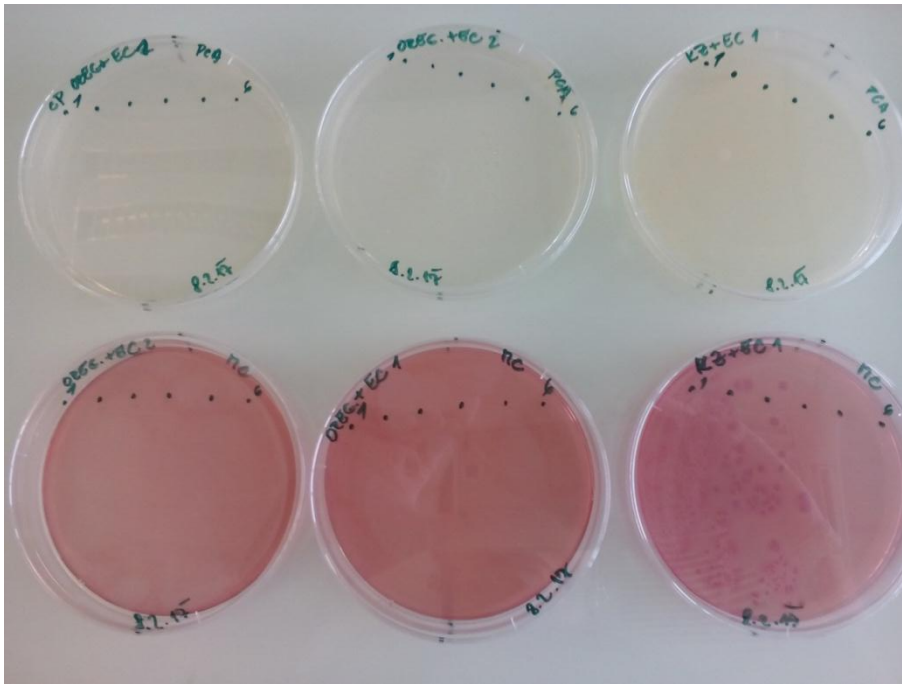
Příloha 2 Aplikace jílových nanočástic na kousky kachního masa, srovnání kontroly vody (KV) a oreganové silice enkapsulované do jílových nanočástic s bakterií *Escherichia coli* (OR + EC)



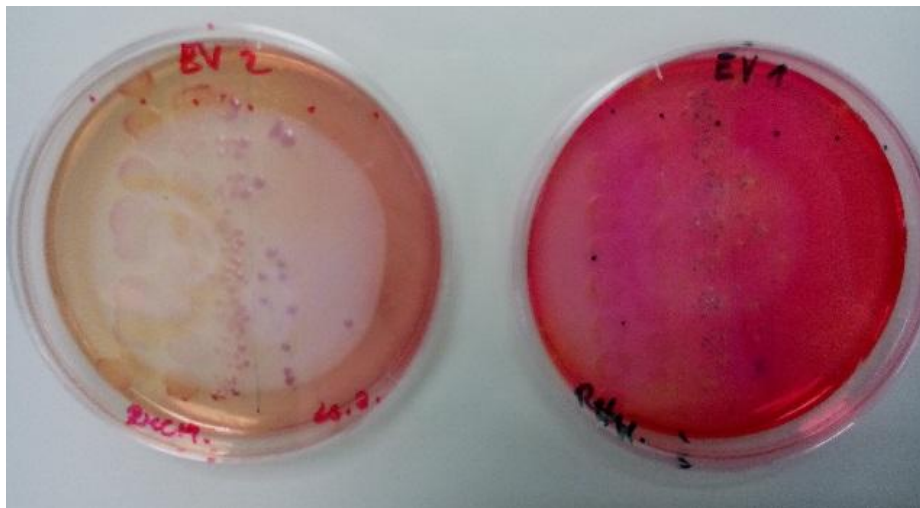
Příloha 3 Antimikrobiální aktivita oreganové silice (OR) proti bakterii *Salmonella* Enteritidis, srovnání s kontrolou jílů (KJ)



Příloha 4 Antimikrobiální aktivita oreganové silice (OR) proti bakterii *Escherichia coli*, srovnání s kontrolou zaočkování (KZ)



Příloha 5 Antimikrobiální aktivita oreganové silice ve vodné emulzi (EV) po 14 dnech skladování



11 Seznam tabulek

| | |
|---|----|
| Tabulka 1 Průměrné chemické složení drůbežního masa s kůží..... | 26 |
| Tabulka 2 Jednotlivé varianty ošetření vzorků kachního masa..... | 37 |
| Tabulka 3 Složení oreganové silice (<i>Origanum vulgare</i> L.)..... | 49 |
| Tabulka 4 Kvantitativní zastoupení jednotlivých složek oreganové silice v kachním mase..... | 51 |
| Tabulka 5 Hodnoty reziduí karvakrolu v reálných vzorcích kachního masa ošetřených oreganovou silicí (výsledky jsou uvedeny v % z přidaného množství silice)..... | 52 |

12 Seznam grafů

| | |
|---|----|
| Graf 1 Počty bakterií <i>Escherichia coli</i> na McConkeyho agaru..... | 45 |
| Graf 2 Počty bakterií <i>Salmonella enteritidis</i> na selektivním médiu..... | 46 |
| Graf 3 Celkový počet mikroorganismů u vzorků zaočkovaných bakterií <i>Escherichia coli</i> | 47 |
| Graf 4 Celkový počet mikroorganismů u vzorků zaočkovaných bakterií <i>Salmonella Enteritidis</i> | 48 |

13 Seznam obrázků

| | |
|--|----|
| Obrázek 1 Vzorec karvakrolu (Sigma-Aldrich)..... | 16 |
| Obrázek 2 Hypotetické schéma struktury a aktivity karvakrolu..... | 20 |
| Obrázek 3 Schéma kapkové metody dle Chen et al. (2003)..... | 39 |
| Obrázek 4 Chromatogram oreganové silice..... | 50 |

14 Seznam příloh

| | |
|--|----|
| Příloha 1 Jílové nanočástice s enkapsulovanou oreganovou silicí..... | 70 |
| Příloha 2 Aplikace jílových nanočástic na kousky kachního masa, srovnání kontroly vody (KV) a oreganové silice enkapsulované do jílových nanočástic s bakterií <i>Escherichia coli</i> (OR + EC)..... | 70 |
| Příloha 3 Antimikrobiální aktivita oreganové silice (OR) proti bakterii <i>Salmonella</i> Enteritidis, srovnání s kontrolou jílu (KJ)..... | 71 |
| Příloha 4 Antimikrobiální aktivita oreganové silice (OR) proti bakterii <i>Escherichia coli</i> , srovnání s kontrolou zaočkování (KZ)..... | 72 |
| Příloha 5 Antimikrobiální aktivita oreganové silice ve vodné emulzi (EV) po 14 dnech skladování..... | 72 |