



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VLIV ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK NA TRVANLIVOST
RAW POTRAVIN**

EFFECT OF ANTIMICROBIAL SUBSTANCES ON "RAW FOOD" DURABILITY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Daniela Horká

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1236/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Daniela Horká**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název diplomové práce:

Vliv antimikrobiálních látek na trvanlivost raw potravin

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Literární rešerše zabývající se charakterizací „raw“ potravin, možnostmi nejčastější mikrobiální kontaminace v daných typech potravin a přehledem antimikrobiálních účinků aktivních látek získaných z různých přírodních materiálů
- 2) Testování vybraných přírodních materiálů na antimikrobiální účinek
- 3) Izolace DNA z komplexní „raw“ potravinové matrice s následnou identifikací obsažených mikroorganismů
- 4) Návrh a testování prodloužené trvanlivosti nového „raw“ produktu s přidavkem aktivních látek s antimikrobiálním účinkem

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2018

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Daniela Horká
student(ka)

Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zabývá vlivem přírodních antimikrobiálních látek na trvanlivost raw potravin. Raw strava se v poslední době stala velmi žádaným výživovým směrem, který začíná praktikovat stále více lidí. Jedná se o stravování výhradně rostlinnou syrovou stravou, která neprochází tepelnou úpravou nad 42–45 °C.

Cílem této diplomové práce bylo studium antioxidačních a antibakteriálních vlastností extraktů z bylin a koření a jejich následná aplikace do raw dezertů pro prodloužení doby jejich trvanlivosti. V teoretické části je popsána problematika raw stravy a popis mikroorganismů, které se nejčastěji vyskytují na rostlinných materiálech. Dále jsou zde charakterizovány vybrané byliny a koření, mechanismy jejich antimikrobiálních účinků a metody použité při testování produktů.

V experimentální části byla provedena charakterizace etanolových extraktů z vybraných 13 druhů koření a bylin. Bylo provedeno stanovení biologicky aktivních látek, konkrétně polyfenolů, flavonoidů, anthokyanů a jejich antioxidační aktivity. Dále byly tyto extrakty podrobeny testování antimikrobiálních účinků vůči grampozitivnímu kmenu bakterií *Micrococcus luteus*, gramnegativní bakterii *Escherichia coli* a kvasince *Candida glabrata*. Molekulární část práce se zabývala izolací DNA z testovaného raw materiálu obohaceného o testované kombinace koření a bylin. Byla sledována změna doby trvanlivosti daných vzorků dezertů. Přítomnost sledovaných mikroorganismů byla potvrzena metodou PCR.

KLÍČOVÁ SLOVA

RAW strava, přírodní antimikrobiální látky, izolace DNA, PCR

ABSTRACT

Submitted diploma thesis deals with an effect of antimicrobial substances on raw food durability. Nowadays, the raw food has become very required style of nutrition, which is being practised by more and more people. The issue is that this kind of alimentation, especially vegetable raw food is not prepared in heat treatment which is higher than 42–45 °C.

The main aim of the thesis is to study antioxidant and antibacterial properties of the herbal and spice extracts and their following implementation into raw desserts to prolong their durability. At the beginning of the theoretical part, there is an analysis of the issue of raw food and the description of micro-organisms, which are mostly occurred on plant materials. Afterwards, selected herbs and spices, and mechanisms of their antimicrobial effects, and also the methods used to test the products are characterised.

The experimental part focuses on characterization of ethanol extracts from 13 selected kinds of spices and herbs. The determination of biologically active substance was accomplished, specifically, polyphenols, flavonoids, anthocyanins and their antioxidant properties. Moreover, these extracts were tested to antimicrobial effect towards gram-positive species of germs *Micrococcus luteus*, gram-negative species of germs *Escherichia coli* and yeast *Candida glabrata*. The molecular part of the thesis contains the DNA isolation from the tested raw material, which was enriched of combination of the selected herbs and spices. Change of expiry date of selected samples of raw desserts was monitored. The presence of chosen micro-organisms was confirmed by the PCR method.

KEYWORDS

RAW food, nature antimicrobial agents, DNA isolation, PCR

HORKÁ, D. *Vliv antimikrobiálních látek na trvanlivost raw potravin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 85 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Tato diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucí mé diplomové práce Ing. Andree Háronikové, Ph.D. za odborné vedení a čas, který mi věnovala. Děkuji také Ing. Denise Romanovské a Ing. Janě Konečné za poskytnuté rady a konzultace při tvorbě této práce.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Teoretická část.....	10
2.1	RAW strava – vitariánství	10
2.2	Historie RAW stravy	10
2.3	Pozitivní aspekty RAW stravy	11
2.4	Rizika konzumace RAW stravy	12
2.4.1	Nutriční a zdravotní rizika.....	12
2.5	Mikrobiální kontaminace potravin	13
2.5.1	Bakterie	13
2.5.2	Kvasinky.....	14
2.5.3	Plísně	15
2.6	Mikrobiální riziko u vybraných potravin.....	16
2.6.1	Ořechy	16
2.6.2	Cereálie.....	16
2.6.3	Ovoce a zelenina	17
2.6.4	Koření.....	17
2.7	Charakteristika vybraných skupin přírodních látek.....	17
2.7.1	Antioxidanty	17
2.7.2	Polyfenoly	17
2.7.3	Flavonoidy.....	18
2.8	Charakterizace vybraných bylin a koření	18
2.8.1	Aloe kapská	18
2.8.2	Andělíka lékařská	19
2.8.3	Badyán.....	19
2.8.4	Citronová kůra.....	20
2.8.5	Hřebíček vonný	20
2.8.6	Kardamom	21
2.8.7	Lékořice.....	21
2.8.8	Lichořeřišnice.....	21
2.8.9	Skořice.....	21
2.8.10	Smetanka lékařská.....	22
2.8.11	Šafrán	22
2.8.12	Třapatka nachová	23
2.8.13	Zázvor.....	23
2.9	Mechanismy antimikrobiálního účinku aktivních látek na mikroorganismy	24
2.9.1	Inhibice syntézy buněčné stěny	24

2.9.2	Poškození syntézy cytoplasmatické membrány	24
2.9.3	Inhibice proteosyntézy	24
2.9.4	Porucha syntézy nukleových kyselin	24
2.1	Metody pro stanovení antimikrobiální aktivity	24
2.1.1	Kvalitativní metody	24
2.1.2	Kvantitativní metody	25
2.2	Metody identifikace mikrobiálních vlastností potravin	26
2.2.1	Přímé kvantitativní stanovení mikroorganismů	26
2.2.2	Nepřímé kvantitativní stanovení mikroorganismů	26
2.3	Molekulárně – biologické metody	27
2.3.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	27
3	Cíle práce	29
5	Experimentální část	30
5.1	Použité přístroje a pomůcky	30
5.1.1	Chemikálie použité na spektrofotometrická stanovení	31
5.1.2	Chemikálie použité na kultivaci mikroorganismů	31
5.1.3	Komponenty pro PCR a elektroforézu	31
5.1.4	Roztoky	32
5.1.5	Použité mikroorganismy pro kultivace	32
5.1.6	DNA použitá pro pozitivní kontroly	32
5.1.7	Použité byliny a koření	32
5.1.8	Analyzované potraviny	33
5.2	Metody a postupy	34
5.2.1	Příprava kultivačních médií	34
5.2.2	Příprava etanolových extraktů	34
5.2.3	Příprava vzorků z RAW potravin	35
5.2.4	Charakterizace extraktů	35
5.2.5	Antimikrobiální testy	36
5.2.6	Kultivace mikroorganismů pro stanovení mikrobiální kontaminace potravin ...	37
5.2.7	Kultivace mikroorganismů pro izolaci DNA	37
5.2.8	Kultivace mikroorganismů pro antimikrobiální testy	37
5.2.9	Izolace bakteriální a kvasinkové DNA	38
5.2.10	Lyze plísňových buněk získaných kultivací v tekutém médiu	38
5.2.11	Izolace DNA fenolovou extrakcí	38
5.2.12	Srážení DNA ethanolem	38
5.2.13	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	39
5.2.14	PCR	39

5.2.15	Elektroforetická detekce PCR produktů.....	41
6	Výsledky a diskuze.....	42
6.1	Stanovení aktivních látek v extraktech z bylin a koření	42
6.1.1	Spektrofotometrické stanovení polyfenolů	42
6.1.2	Spektrofotometrické stanovení flavonoidů	43
6.1.3	Spektrofotometrické stanovení anthokyanů	44
6.1.4	Stanovení antioxidační aktivity	45
6.2	Antimikrobiální testy	46
6.2.1	Antimikrobiální účinek extraktů na <i>Escherichia coli</i>	46
6.2.2	Antimikrobiální účinek extraktů na <i>Micrococcus luteus</i>	47
6.2.3	Antimikrobiální účinek extraktů na kvasinku <i>Candida glabrata</i>	49
6.3	Stanovení mikrobiální kontaminace potravin.....	50
6.3.1	Testování doby mikrobiální nezávadnosti výrobku	51
6.4	Izolace DNA	55
6.4.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované bakteriální DNA	55
6.4.2	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované kvasinkové DNA	60
6.5	Prokázání přítomnosti DNA domény <i>Bacteria</i> metodou PCR.....	64
6.6	Prokázání přítomnosti DNA rodu <i>Bacillus</i> metodou PCR	66
6.7	Prokázání přítomnosti DNA rodu <i>Escherichia</i> metodou PCR	68
6.8	Prokázání přítomnosti DNA domény kvasinky metodou PCR	70
6.9	Prokázání přítomnosti DNA rodu <i>Aspergillus</i> metodou PCR.....	72
6.10	Prokázání přítomnosti DNA rodu <i>Fusarium</i> metodou PCR	73
7	Závěr.....	74
8	Seznam použité literatury	76
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	83
10	Přílohy	84

1 Úvod

Raw potraviny se v posledních letech staly velmi žádanou součástí trhu s potravinami. Díky velkému zájmu o tento typ stravování se dnes setkáváme se spoustou nových raw restaurací a cukráren. Tento výživový směr nachází čím dál více příznivců především z řad mladých lidí. Jedná se o stravování velmi podobné veganské stravě, která vynechává všechny živočišné produkty. Zastánci tohoto stylu stravování ho nenazývají výživovým směrem, či dietou, ale návratem k přirozenému stravování našich předků, kteří se z velké části stravovali pouze syrovou stravou.

Raw strava vychází z myšlenky, že tepelnou úpravou nad hranicí 42–45 °C dochází ke zničení veškerých živin a enzymů a z potravy se stává tzv. mrtvá strava. Tato hranice však zcela nespĺňuje požadavky na tepelné opracování, tím pádem při konzumaci hrozí větší zdravotní a mikrobiální rizika, především výskyt patogenních mikroorganismů způsobujících alimentární onemocnění. Tyto typy výrobků zatím nejsou legislativně ošetřené, a proto je téměř nemožné určit adekvátní dobu trvanlivosti a tím také bezpečnost potravin.

Konzumenti raw stravy se zaměřují na využitelnost vitaminů, minerálů a bioaktivních látek v co největší míře, avšak některé potraviny mohou být v syrovém stavu špatně stravitelné. Surová strava obsahuje velké množství aktivních látek a důležitých prvků, které posilují imunitní systém, má nižší obsah tuků, sodíku a cholesterolu, což může podpořit redukci hmotnosti. Problémem u konzumentů jak veganské, tak raw stravy, je nedostatek vitaminu B12, který se nachází v živočišných produktech nebo nedostatečný příjem omega 3 mastných kyselin, minerálních látek nebo vitaminů rozpustných v tucích (A, D, E, K).

2 Teoretická část

2.1 RAW strava – vitariánství

Pojem RAW food, v českém jazyce RAW strava, byl převzat z anglických výrazů raw – syrový a food – jídlo, strava. Mezi raw potraviny patří všechny, které vyrostly v přírodě a byly konzumovány bez tepelných úprav. Jedná se většinou o veganskou výživu, ale existují i další upravené směry tohoto stravování např. fruktariánství, kdy se lidé stravují pouze ovocem, ořechy a semínky nebo laktoovovegetariánství, kde jsou povoleny i mléčné výrobky a vejce. Základní teorií raw stravy je myšlenka, že při tepelném zpracování potravin nad 42–45 °C dochází ke zničení živin a enzymů a z potraviny se stává „mrtvá strava“. Jak můžeme vidět na obrázku 1 hlavními složkami syrové stravy jsou ovoce, zelenina, byliny, ořechy, semínka, luštěniny, obiloviny, mořské řasy, čerstvé kokosové mléko a voda. K úpravě potravin se zde používá nakličování semínek, obilovin a luštěnin, čímž se zvyšuje jejich enzymatická aktivita, a tak se potraviny stávají biologicky hodnotnějšími. Dále se využívá odšťavňování ovoce a zeleniny, namáčení ořechů a semínek, mixování a sušení ve speciálních sušárnách do 42–45 °C, kde se z potravin šetrně odstraňuje voda [1,2].



Obrázek 1: Nejčastější skupiny potravin v raw stravě (upraveno dle [3])

2.2 Historie RAW stravy

Syrová strava má své počátky již v pravěku, kdy lidé konzumovali pouze teplem neopracované potraviny, avšak pouze do té doby, než objevili oheň. Raw strava je podle svých příznivců jakýsi návrat ke kořenům lidstva a také k přírodě. Vitariáni se snaží nalézt ztracenou rovnováhu mezi člověkem a přírodou.

Syrovou stravou se začal zabývat vegetariánský propagátor Sylvestr Graham již na počátku 19. století, kdy ji v USA propagoval kvůli epidemii cholery, která propukla v Evropě. Přednášel převážně o konzumaci čisté vody, čerstvého ovoce, zeleniny a ořechů, jako prevenci proti onemocnění. Po propuknutí cholery v USA prý lidé, kteří se řídili jeho radami nemoci nepodlehli a jejich zdravotní stav se zlepšil.

Dalším průkopníkem tohoto stylu stravování byl švýcarský lékař a vynálezce müsli Maximilian O. Bircher-Benner, který experimentoval s léčbou pomocí živé stravy. Pro tyto účely založil sanatorium, kde upozorňoval na soužití člověka s přírodou a také na myšlenku, že strava nemá pouze zasytit, ale hlavně udržovat tělo zdravé [1,2].

2.3 Pozitivní aspekty RAW stravy

Raw stravu tvoří především ovoce, zelenina, ořechy, semínka nebo sušené plody. Tyto nutričně bohaté potraviny obsahují velké množství antioxidantních látek – fytochemikálií (fenoly, flavonoidy, anthokyaniny, karotenoidy), nenasycených mastných kyselin, minerálů a vitamínů, které chrání buněčné systémy před oxidačním poškozením a mají pozitivní dopad na lidské zdraví.

Ovoce a zelenina jsou známé skupiny potravin, které zauímají místo ve všech výživových nebo dietních směrech. Ovoce a zelenina obsahuje velké množství vitamínů, minerálů, fytochemikálií a vlákniny, která pomáhá řídit koncentraci glukosy v krvi, snižuje hladinu cholesterolu a zlepšuje průchodnost střev. Zelenina je považována za základní složku vyvážené a pestré stravy. Její konzumace zajišťuje dostatečný příjem důležitých živin, které přispívají k řešení mnoha výživových či zdravotních problémů, které vznikají v důsledku nezdravého životního stylu. Zelenina se rozděluje do 6 základních skupin (plodová, kořenová, listová, košťálová, cibulová, lusková), z nichž každá obsahuje jinou kombinaci a množství fytonutrientů. Některé druhy těchto látek patří do skupiny silných antioxidantů, které chrání tělo před volnými radikály, neboť lidské buňky jsou neustále vystavovány oxidačnímu stresu, a proto je důležité, aby byla v organismu stanovena rovnováha mezi oxidanty a antioxidanty. Oxidační stres způsobuje chronická onemocnění, ale také degradaci makromolekul, což vede ke vzniku rakoviny nebo kardiovaskulárních onemocnění. Pravidelná konzumace ovoce a zeleniny může snížit riziko těchto onemocnění a lze tak předcházet i procesům způsobující stárnutí. Tyto potraviny obsahují vysoká množství bioaktivních složek, které poskytují zdravotní přínos nad rámec základní výživy a prevenci proti chronickým onemocněním. Ovoce a zelenina by měly být obsaženy v každodenní stravě, kvůli prevenci onemocnění gastrointestinálního traktu, kardiovaskulárních onemocnění, obezity nebo diabetu [4,5,6].

Ořechy jsou potraviny bohaté na důležité bioaktivní makro a mikroživiny, obsahují velké množství nenasycených mastných kyselin, kvalitní rostlinné bílkoviny, vlákninu a minerály. Podle studie provedené ve Španělsku je konzumace ořechů prevencí proti kardiovaskulárním chorobám např. ischemické chorobě srdeční, hypertenzi nebo kornatění tepen. Dalšími benefity ořechů jsou snižování tvorby žlučových kamenů, diabetu nebo LDL cholesterolu. Ačkoliv ořechy obsahují velké množství tuků, jejich pravidelná konzumace v přiměřených dávkách, má pozitivní vliv na hubnutí a prevenci proti obezitě. Ve veganské a vegetariánské stravě jsou ořechy důležitou složkou potravy a hojně se využívají jako náhražka masa [7].

Příznivci tohoto stylu stravování uvádí, že při přechodu na RAW stravu dochází ke zlepšení psychického i fyzického stavu jedince a ke zvýšení příjmu energie. Výhodou je především vysoký příjem živin z potravin, převážně draslíku, kyseliny listové a vlákniny. Naopak příjem tuků, cukrů, cholesterolu a sodíku se výrazně snižuje. Další výhodou je, že syrová strava neobsahuje žádná nežádoucí aditiva, konzervanty, trans-mastné kyseliny nebo množství přidávaných cukrů a sladidel. Z hlediska životního prostředí je tento typ stravování, stejně jako i jiné rostlinné výživové směry, ekologicky šetrný [8].

2.4 Rizika konzumace RAW stravy

Názory na konzumaci výhradně syrové stravy se z pohledu moderní medicíny mohou značně rozcházet. Na jedné straně má RAW strava nepochybné výhody, ale na druhé straně může docházet ke značným zdravotním komplikacím.

2.4.1 Nutriční a zdravotní rizika

RAW strava jako většina striktně orientovaných stylů stravování má i své nevýhody. Tím, že není dostatečně tepelně upravená může docházet k ochlazování organismu a metabolismus člověka není energeticky vyrovnán.

Podle studie německých vědců bylo zjištěno, že konzumace převážně syrového ovoce a zeleniny má vliv na lipidický profil krve, a tak může vést k mírnému zvýšení LDL cholesterolu, a naopak ke snížení HDL cholesterolu. U konzumentů striktní RAW stravy byl dále zjištěn nedostatek kobalamínu (vitamin B12), což má za následek zvýšení tzv. MCV objemu (mean cell volume), střední objem erythrocytů v krvi. Tento parametr se získává z krevního obrazu a je indikátorem ke zjištění vzniku anémie nedostatkem vitamínu B12. Dalším ukazatelem deficitu vitamínu B12 byl zjištěn zvýšený obsah homocysteinu, který může způsobit psychické poruchy, vznik kardiovaskulárních onemocnění, komplikace v těhotenství nebo defekty při narození [9].

Dalším negativním aspektem raw stravování se zabývala německá studie, která pracovala na výzkumu frekvencí a závažnosti zubních erozí u konzumentů syrové stravy. Bylo zjištěno, že 60 % konzumentů mělo minimálně jeden zub napadený závažnou dentální erozí. Dentální eroze je postupný úbytek tvrdých zubních tkání vznikající působením kyselin vnějšího nebo vnitřního původu na povrch zubů zbařených zubního plaku bez účasti bakteriální mikroflóry. Za kyseliny vnějšího původu jsou považovány kyseliny v potravinách a nápojích (čerstvé ovoce, zelenina, ovocné džusy, sycené nápoje obsahující CO₂). Výsledky prokázaly, že nadměrná konzumace ovoce a zeleniny, oproti konvenční výživě, zvyšuje riziko zubních erozí [10,11].

V další studii německých vědců bylo zjištěno, že dlouhodobá konzumace pouze syrové stravy způsobuje vysokou ztrátu tělesné hmotnosti, index tělesné hmotnosti u některých konzumentů byl vyhodnocen pod normálním hmotnostním rozsahem (<18.5 kg/m²). U žen do 45 let doprovázela podvýživu i amenorea [12].

2.5 Mikrobiální kontaminace potravin

Mikrobiální kontaminace potravin lze rozdělit na primární a sekundární.

Primární kontaminace potravin je způsobena choroboplodnými nebo saprofytickými mikroorganismy, které se nacházejí v surovinách ještě před zpracováním. U rostlin dochází k této kontaminaci před sklizní úrody nebo během sklizně, díky půdním mikroorganismům, mezi které patří např. rody bakterií *Bacillus* a *Clostridium* a plísně produkující mykotoxiny. Dalším zdrojem primární kontaminace může být zalévání plodin kontaminovanou vodou.

Sekundární kontaminace potravin vyvolávají především saprofytické mikroorganismy při jejich zpracování a finalizaci produktů. Jde především o kontakt se znečištěným nebo nedostatečně dezinfikovaným zařízením a nářadím. Dalším způsobem kontaminace jsou nemocní lidé pracující ve výrobním závodě, nakažený člověk může produkt kontaminovat přímo nebo nepřímo bakteriemi, které se nachází ve fekáliích, vlasech nebo hnisavých ranách. Sekundární kontaminace se nevyskytuje pouze ve fázi výroby, ale také i během skladování, při kterém mohou nastat nevhodné podmínky a v polotovarech nebo hotových pokrmech se začnou množit kontaminující mikroorganismy [13].

2.5.1 Bakterie

Bakterie jsou prokaryotické mikroorganismy, od eukaryotických buněk se liší tím, že nemají jádro oddělené od cytoplasmy jadernou membránou. Mají málo diferencovanou morfologii, rozdělují se na 2 základní skupiny: tyčinky a koky. Bakteriální buňky mají malé rozměry, ale velký specifický povrch, který přispívá k intenzivní kvantitativní a kvalitativní přeměně látek a díky tomu se bakterie rychle rozmnožují. Mezi nejčastější původce onemocnění z potravin patří patogenní bakterie, ale také bakterie způsobující kažení potravin. Tyto mikroorganismy rostou při optimálním nebo slabě alkalickém pH [14].

2.5.1.1 Rod *Bacillus*

Bacillus je rod grampozitivních bakterií tyčinkovitého tvaru. Významným zástupcem tohoto rodu je *Bacillus cereus*, který se přirozeně vyskytuje v půdě a vodě. Patří mezi významné kontaminanty potravin rostlinného i živočišného původu. Optimální teplota růstu je 10–48 °C. Ve formě odolných spor se dostává do surovin (zelenina, cukr, koření, rýže, syrové maso, ryby) a je schopen přežít v suchém prostředí, ale i během běžných tepelných úprav (pasterace). *Bacillus cereus* produkuje 2 druhy toxinů enterotoxin a emetický toxin.

Enterotoxin je produkován v tenkém střevě po konzumaci kontaminované potravin. Tento typ toxinu vyvolává průjemová onemocnění a nevolnosti. Inkubační doba toxinu je 8–16 hodin a doba onemocnění trvá 12–24 hodin. Toxin je velmi termolabilní a lze ho inaktivovat již při teplotě 60 °C. Častým problémem je, že spory tuto teplotu překonají a po opětovném zchlazení potravin mohou znovu vyklíčit a rozmnožit se. Zdrojem onemocnění jsou většinou masné produkty, polévky, zelenina a mléčné výrobky.

Emetický toxin je produkován již v kontaminované potravine. Tento toxin způsobuje nevolnost, zvracení a malátnost. Inkubační doba toxinu je 1–5 hodin, chorobné příznaky onemocnění většinou odeznívají 6–24 hodin po jejich vzniku. Na rozdíl od enterotoxinu je emetický toxin velmi termostabilní a dokáže přežít sterilizační teplotu 120 °C. Častým zdrojem onemocnění jsou výrobky z rýže, sladkosti a těstoviny [13].

2.5.1.2 Rod *Escherichia*

Bakterie z rodu *Escherichia* jsou gramnegativní, fakultativně anaerobní a mají tyčinkovitý tvar. Nejvýznamnějším zástupcem je *Escherichia coli*, která fermentuje ve střevech teplokrevných živočichů laktózu za tvorby organických kyselin (kyselina mléčná, octová) a plynů (CO₂, H₂). Tyto bakterie se rozdělují na patogenní a nepatogenní. Nepatogenní patří mezi indikátory fekálního znečištění ve vodě nebo potravinách, tyto běžné kmeny jsou pro zdravého člověka neškodné.

Podmíněně patogenní kmeny *Escherichia coli* se rozdělují do čtyř skupin:

- Enteroinvazivní *E. coli* (EIEC) – způsobuje potravinové nákazy, u člověka může vyvolat infekce močových cest, zánět žlučníku, zápal plic atd.
- Enteropatogenní *E. coli* (EPEC) – u lidí s oslabenou imunitou může způsobit gastroenteritidu a těžká průjemová onemocnění až epidemii.
- Enterotoxinogenní *E. coli* (ETEC) – u lidí i zvířat způsobuje toxikoinfekce. Tento typ produkuje termostabilní nebo termolabilní enterotoxiny.
- Enterohemoragická *E. coli* (EHEC) – je nejnebezpečnějším kmenem *E. coli*, tento kmen produkuje verotoxin a může kromě krvácivých průjmů způsobit vážná onemocnění ledvin vedoucí až k smrti. Inkubační doba bývá 3–8 dní, což je ze všech patogenních kmenů nejdéle.

Nejčastějšími zdroji nákazy patogenními kmeny *E. coli* jsou kontaminovaná voda, syrové nebo nedostatečně tepelně opracované maso a mléko, ale také zelenina, ovoce a naklíčená semena. Konzumace naklíčených semen se stává v poslední době velmi oblíbenou nejen u zastánců raw stravy, problémem však může být kontaminace ještě před sklizní nebo během skladování bakteriemi EHEC, salmonelami nebo lysteriemi. Během klíčení se poté vytvoří ideální podmínky (vlhkost, teplota, dostatek živin) pro růst těchto bakterií a dochází k jejich pomnožení. Z toho důvodu je nutné dodržovat vysokou úroveň hygieny při produkci, manipulaci a skladování semen při sklizni i během prodeje [13,15,16].

2.5.1.3 Rod *Micrococcus*

Rod *Micrococcus* patří do čeledi *Micrococcaceae*, tyto bakterie jsou aerobní, grampozitivní a mají kulovitý tvar. Vyskytují se ve shlucích nebo párech a netvoří spóry. Významným zástupcem tohoto rodu je *Micrococcus luteus*, který se vyskytuje ve vodě, půdě nebo na lidské kůži, sliznicích dutiny ústní a dýchacích cestách. Všeobecně je tento druh považován za neškodný, avšak u jedinců s oslabenou imunitou může vyvolat různá infekční onemocnění [15].

2.5.2 Kvasinky

Kvasinky jsou eukaryotní mikroorganismy patřící mezi houby (*Fungi*). Tvar buněk je elipsovité až kulovité a souvisí s vegetativním rozmnožováním pučením nebo dělením. Kvasinky pro svůj růst vyžadují, stejně jako plísně, vzdušný kyslík. Při anaerobních podmínkách jsou schopné přeměnit svůj metabolismus na fermentační a díky omezení růstu buňkové hmoty produkovat z monosacharidů a některých di a trisacharidů etanol a oxid uhličitý [14,17].

2.5.2.1 Rod *Candida*

Kvasinky rodu *Candida* se přirozeně nachází na lidské kůži, ve střevní mikroflóře, v dutině ústní nebo v ženském pohlavním systému. V případě, že dojde k narušení rovnováhy přirozené mikroflóry (např. použití antibiotik), mohou se tyto kvasinky stát nebezpečnými patogeny. Významným zástupcem tohoto rodu je kvasinka *Candida glabrata*, která byla původně nazývána jako *Torulopsis glabrata*. Výskyt této kvasinky je způsoben užíváním širokospektrálních antibiotik, k přenosu může docházet také z rukou nebo pláštěů zaměstnanců na oddělení JIP v nemocnicích. Pro svůj růst využívá jako všechny kvasinky zdroj glukózy, který zkvašuje za tvorby CO₂ a díky tomu se lehce přizpůsobuje nižšímu pH. Tato kvasinka byla považována za méně virulentní než *Candida albicans*, avšak poté byla zjištěna její vysoká rezistence vůči některým antibiotikům a také vyšší úmrtnost v porovnání s jinými zástupci *Candida*. Nachází se v prostředí ženského pohlavního systému, kde vytváří biofilm, ale může způsobovat také plicní infekce a dentální problémy [18,19].

2.5.3 Plísně

Plísně jsou mikroskopické, eukaryotní mikroorganismy patřící do říše hub (*Fungi*). Jsou to aerobní organismy, které napadají porušené nebo kazící se potraviny. Závislost na kyslíku při růstu se odvíjí od složení cytoplazmatické membrány, která obsahuje steroidy, k jejichž syntéze je kyslík potřeba. Plísně se od bakterií a kvasinek liší svojí přizpůsobivostí na různé změny růstových podmínek (snížení hodnoty pH, snížení teploty nebo aktivity vody). Z potravinářského hlediska se mezi tyto organismy řadí ty, které vytváří na povrchu potravin viditelné mycelium složené z jednotlivých vláken (hyf). Systematicky se plísně rozdělují do šesti skupin: *Myxomycota*, *Chytridiomycota*, *Oomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* a *Basidiomycota* [14].

2.5.3.1 Rod *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* je plíseň, která vytváří na potravinách plst'ovitě – vatové mycelium černé, hnědé, žluté až bílé barvy. Je to častý původce kažení potravin – ovoce, zeleniny a produktů z nich vyrobených, jedlých olejů a potravin bohatých na tuky. Je to plíseň, která nemá vysoké nároky pro růst, vyskytuje se také na obilí, pekárenských a mlýnských výrobcích. Některé druhy těchto plísni se díky svým specifickým fyziologickým vlastnostem využívají pro průmyslové zpracování. Mezi tyto druhy patří *A. niger* pro výrobu kyseliny citronové, amyláz, lipáz a pektináz nebo *A. terreus* pro výrobu kyseliny itakonové. Avšak ne všechny druhy těchto plísni jsou užitečné, většina produkuje nebezpečné aflatoxiny např. *A. flavus*, *A. parasiticus* nebo *A. nomenus*. Plísně rodu *Aspergillus* rostou při optimálních teplotách 25 až 40 °C, ale toxiny produkují již v rozmezí teplot 20 až 28 °C. Aflatoxiny jsou velmi termorezistentní, lze je částečně inaktivovat dlouhodobým působením teplot nad 100 °C. Nebezpečí aflatoxinů spočívá především při vdechování prachu ze zplsnivnělých potravin, ty se poté akumulují v játrech nebo svalovině, což zvyšuje jejich toxicitu. Akutní otravy aflatoxiny však nejsou příliš známé, významnější je jejich teratogenita (poškození nebo odumření plodu) a kancerogenita [13,14].

2.5.3.2 Rod *Fusarium*

Rod *Fusarium* je plíseň vytvářející řídké, vzdušné mycelium nepravidelné barvy (žluté, hnědé, černé, fialové). Většina druhů parazituje na rostlinných materiálech a způsobuje na nich velké škody při růstu (vadnutí polních plodin), ale také při skladování (plesnivění kukuřice, kažení ovoce a ovocných šťáv). Dále se zúčastňují kažení potravin bohatých na tuky (ořechy, tučné pečivo, oleje, tuky) a hnilobě brambor (*F. solani*). Tento rod plísni se vyznačuje tvorbou mykotoxinů především T-2-toxin, nivalenol, trichotheceny, zearalenon napadající kukuřici a diacetoxyscirpenol (*F. graminearum*), který způsobuje nemoc alimentární toxickou aleukii (ATA – vyznačuje se oslabením krevního systému). Plísňe rodu *Fusarium* rostou při optimálních teplotách 25 až 30 °C, ale toxiny produkují již v rozmezí teplot 8 až 12 °C [13,14].

2.5.3.3 Rod *Mucor*

Rod *Mucor* vytváří na potravinách vzdušné, vatovité mycelium, které má bílou až šedou barvu a velmi rychle se rozrůstá. Některé druhy jsou choroboplodné a způsobují hloubkové mykózy. Tato plíseň je velmi rozšířená na rostlinných materiálech, ovoci nebo obilninách, je známo asi 50 druhů. Nejčastěji se jedná o *M. plumbeus*, který se vyskytuje na pekárenských kvasnicích a mlýnských výrobcích. Dalším zástupcem způsobující kažení potravin je *M. racemosus*, tento druh se nachází v mléku, sýrech a na zralých sladkých plodech. Za nepřítomnosti kyslíku způsobuje kažení ovocných šťáv a mokrou hnilobu rajčat. Pro průmyslové využití se používají druhy *M. mucedo* na výrobu proteolytických enzymů nebo *M. rouxianus* na hydrolýzu škrobu [13,14].

2.5.3.4 Rod *Rhizopus*

Rod *Rhizopus* vytváří kolonie podobné rodu *Mucor*. Jedná se o parazitární, saprofytickou plíseň, je známo asi 10 druhů. Nejčastěji se vyskytuje na rostlinných materiálech – ovoce, zelenina, obilí, mlýnské výrobky nebo slad. Nejčastějšími zástupci jsou *R. oryzae*, který způsobuje hloubkové mykózy u teplokrevných živočichů a *R. stolonifer*, který způsobuje na ovoci a zelenině mokrou hnilobu. Tito zástupci se využívají také v průmyslové výrobě kyseliny fumarové (*R. stolonifer*) a výrobě alkoholického nápoje arak (*R. oryzae*) [13,14].

2.6 Mikrobiální riziko u vybraných potravin

2.6.1 Ořechy

Ořechy jsou náchylné ke kontaminacím plísněmi, především *Aspergillus flavus*, která dominuje na slupkách podzemnice olejně. Pokud je slupka porušená, ve vyloupaných jádrech, ale také v produktech z podzemnice vyrobené (arašídové máslo), se obvykle vyskytují aflatoxiny. Další ořechy náchylné k plísni *Aspergillus flavus* jsou pistácie a para ořechy [13].

2.6.2 Cereálie

V obilí se mohou tvořit aflatoxiny plísni *Aspergillus flavus*, která je produkuje v teplejších klimatických podmínkách nebo mykotoxiny (zearalenon, trichoteceny nebo ochratoxin A). Množství tvorby toxinů v obilných zrnech je závislé na agronomických podmínkách a na vlivu počasí. Množení plísni (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*) podporuje také hnojení syntetickými dusíkatými hnojivy. Plíseň *Fusarium* napadá obilná zrna již před sklizní, ke svému růstu potřebuje vysoký obsah vody, proto se po sklizni a následném schnutí obilí růst výrazně zpomaluje [13].

2.6.3 Ovoce a zelenina

Nejčastějšími mykotoxiny, které se vyskytují na ovoci, zelenině nebo v ovocných produktech je patulin nebo kyselina byssochlamová produkovaná rodem *Byssochlamys*. Patulin je produkován plísněmi rostoucími na ovoci (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssochlamys*), zpomalení růstu plísní a redukce tvorby patulinu je možná skladováním ovoce v chladárnách s kontrolovanou atmosférou (snížený obsah kyslíku a mírně zvýšený obsah oxidu uhličitého) [13].

2.6.4 Koření

Koření může obsahovat až 10^6 KTJ.g⁻¹ spór plísní, avšak velmi záleží na způsobu opracování a také druhu koření. Pokud je koření správně skladováno v suchém prostředí, nedochází k růstu plísní a tvorbě mykotoxinů. V případě, že je koření přidáno do tepelně neupravené potraviny nebo je ve vlhkém prostředí, může být významným zdrojem kontaminace mykotoxickými plísněmi [13].

2.7 Charakteristika vybraných skupin přírodních látek

Sekundární metabolity rostlin jsou předmětem mnoha výzkumných studií, protože tyto sloučeniny vykazují mnoho biologických aktivit. Patří sem např. antimikrobiální, antimykotické, antikarcinogenní a protizánětlivé účinky.

2.7.1 Antioxidanty

Antioxidanty jsou molekuly, které omezují aktivitu volných radikálů a zabraňují jejich oxidační destrukci v organismu. Volné radikály vznikají v organismu vlivem oxidačního stresu, mají řadu fyziologických funkcí např. účast v protizánětlivých reakcích, avšak z větší části negativně působí na funkci organismu. Jedná se především o reaktivní kyslíkové a dusíkové radikály, které působí na biologicky významné sloučeniny (lipidy, bílkoviny, nukleové kyseliny) a jejich působením dochází k modifikaci a změně struktury těchto látek [20].

2.7.2 Polyfenoly

Polyfenoly představují jednu z nejpočetnějších a nejrozšířenějších skupin látek v rostlinné říši. Je známo více než 8000 látek s fenolickými strukturami, které lze rozdělit do 10 různých tříd v závislosti na jejich základní chemické struktuře, ta také ovlivňuje mechanismy účinku těchto látek. Tyto látky vznikají jako produkty sekundárního metabolismu rostlin, vycházejí ze dvou hlavních syntetických cest, a to buď cestou šikimátu nebo acetátovou cestou. Rostliny si je vytváří pro svoji ochranu před volnými radikály, různými patogeny a ultrafialovým zářením. Polyfenoly jsou lehce dostupným zdrojem antioxidantů, nachází se v pestré stravě bohaté na ovoce a zeleninu, dále se vyskytují v nápojích rostlinného původu (čaj, káva, víno). Tyto látky jsou z potravy přijímány ve vysokých koncentracích, avšak nedochází u nich k úplnému vstřebávání střevní mikroflórou do organismu. Polyfenoly mají vliv na metabolismus lipidů, glukózy, a proto snižují riziko kardiovaskulárních onemocnění nebo cukrovky. Jejich nevýhodou je vysoká nestabilita a následná degradace v nepříznivých podmínkách – vyšší teplota, přístup kyslíku, světla, enzymů [21].

2.7.3 Flavonoidy

Flavonoidy jsou fenolické struktury, které se nacházejí hojně ve fotosyntetizujících buňkách. Flavonoidní sloučeniny mají strukturální znak 2-fenylbenzopyranu nebo flavinového jádra, který se skládá ze dvou benzenových kruhů spojených přes heterocyklický pyranový kruh. Je známo 14 tříd flavonoidů, které se od sebe liší chemickou strukturou a polohou substituentů na různých kruzích. Obvykle se vyskytují v mnoha běžně konzumovaných potravinách, jako jsou: ovoce, zelenina, ořechy a semena. Mnoho flavonoidů má antioxidační, protizánětlivou a antikarcinogenní aktivitu, proto jsou tyto sloučeniny používány ve farmaceutickém nebo kosmetickém průmyslu [21,22].

2.7.3.1 Anthokyany

Anthokyany jsou fenolové sloučeniny patřící do skupiny flavonoidů. Tyto biologicky aktivní látky jsou známy především jako přírodní barviva v rostlinách, ovoci nebo zelenině. Anthokyany jsou ve vodě rozpustné pigmenty, které mají červenou, modrou až fialovou barvu. Díky svým antioxidačním a biologickým vlastnostem mají prospěšné účinky na lidské zdraví. Použití těchto pigmentů v potravinářství je omezeno nestabilní strukturou těchto látek vůči pH, teplotě, obsahu kyslíku nebo enzymů [21].

2.8 Charakterizace vybraných bylin a koření

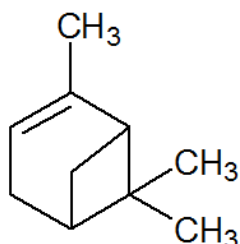
Byliny a koření jsou v potravinářském a farmaceutickém průmyslu využívány pro své antibakteriální, antioxidační a antimykotické účinky již po staletí. Tyto rostliny a jejich složky byly široce používány jako látky určené k úpravě organoleptických vlastností potravin a je dobře známo, že mnoho z nich má široké spektrum antimikrobiálních účinků. Tyto sloučeniny mohou být smrtelné pro mikrobiální buňky nebo mohou inhibovat tvorbu sekundárních metabolitů (např. mykotoxinů). Vlastnosti bylin a koření a jejich intenzita mohou být ovlivněny původem rostlin, podnebím nebo dobou sklizně.

2.8.1 Aloe kapská

Aloe kapská (*Aloe capensis*) je vytrvalá sukulentní rostlina, která pochází z Jižní Afriky. Tato rostlina má díky svému dřevnatému kořenu tvar keře nebo stromu. Štáva, která vytváří v listech gel obsahuje velké množství polysacharidů jako je např. acemannan (látky mající vliv na imunitní systém). Tyto polysacharidy obsažené v gelu mají antibiotické účinky a inhibují růst bakteriálních kmenů např. *Bacillus subtilis*, *Citrobacter species*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus*. Aloe obsahuje také vysoké množství aminokyselin, vitaminů A, B, C, E, enzymů (amylázy, lipázy), esenciálních mastných kyselin, vápníku, zinku, manganu, hořčíku a železa. Tento druh aloe je užíván ve farmacii, kosmetice, kde se využívá především k regeneraci poškozených tkání, k hojení ran, zklidnění pokožky, proti ekzémům, lupénce nebo proti kožním zánětům. V potravinářském průmyslu se využívá např. při výrobě nápojů [23].

2.8.2 Andělka lékařská

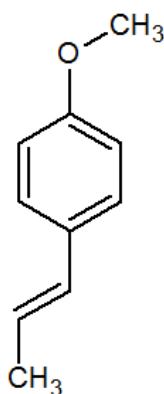
Andělka lékařská (*Angelica archangelica*) je bylina z čeledi miříkovitých. Pochází ze severo – východní Evropy (Skandinávie, Grónsko, Island). Již od středověku se používá k léčebným účelům, a to především při problémech s trávením, bolestmi hlavy, zahleněním nebo při kožních vyrážkách. Hlavními složkami oleje z oddenků a kořene jsou α – pinen, jehož struktura je uvedena na obrázku 2, δ – 3 – katein, limonen a α -phellandren. Olej vykazuje dobrou antimikrobiální účinnost proti *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *Eubacterium limosum*, *Peptostreptococcus anaerobius* a *Candida albicans* [25,26].



Obrázek 2: α – pinen

2.8.3 Badyán

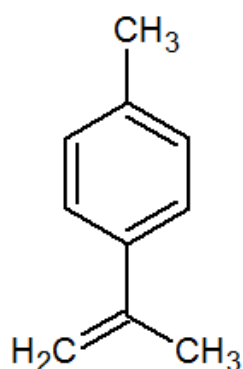
Badyán je sušený plod z badyáníku pravého (*Illicium verum*), který roste především ve Vietnamu a jižní Číně, kde se používá v tradiční medicíně. Je to jehličnatý strom s červenými květy a plody hvězdicového tvaru, které se běžně používají jako koření. Studie ukázaly, že badyán lze považovat za dobrý zdroj přírodních látek s významnými antioxidačními a antimikrobiálními účinky. Především se jedná o antimykotické účinky, což lze připsat vysokému procentu hlavních složek (trans-anethol, jehož struktura je znázorněna na obrázku 3, karyofylen a limonen). Synergický účinek mezi různými složkami oleje vyvolává biocidní účinky proti patogenním houbám a produkci mykotoxinu. Díky těmto účinkům by badyánový esenciální olej mohl být používán v různých průmyslových odvětvích jako je kosmetický, farmaceutický nebo potravinářský průmysl, kde by mohl být vhodnou náhradou pro syntetický antioxidant používaný v současné době [27].



Obrázek 3: trans-anethol

2.8.4 Citronová kůra

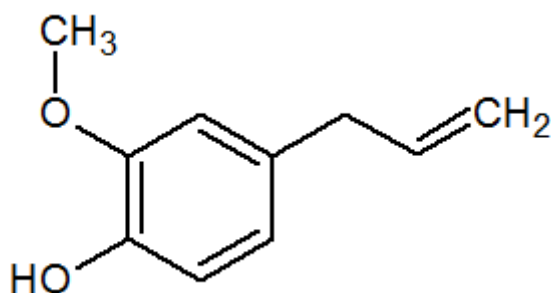
Citrony jsou plody citronovníku (*Citrus lemon*), který pochází z jihovýchodní Asie. Citrony obsahují velké množství kyseliny askorbové (vitamin C) a kyseliny citronové. Kůra citrusových plodů je bohatým zdrojem flavanonů a mnoha polymethoxylovaných flavonů, které jsou v jiných rostlinách velmi vzácné. Tyto sloučeniny hrají důležitou fyziologickou a ekologickou roli, a proto jsou také komerčně zajímavé pro potravinářský a farmaceutický průmysl. Výtažky z citrusové kůry obsahují různé esenciální oleje, protopin, limonen, jehož struktura je znázorněna na obrázku 4, korydalinové alkaloidy, laktony a další látky, které vykazují silnou antimikrobiální aktivitu proti mikroorganismům, jako je *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* nebo *Micrococcus aureus*. Citrusové flavonoidy mají také antifungální, antidiabetické, protinádorové účinky a také snižují hladinu LDL cholesterolu [28].



Obrázek 4: Limonen

2.8.5 Hřebíček vonný

Hřebíček pochází ze stálezeleného stromu hřebíčkovce vonného (*Syzygium aromaticum*), který pochází z Moluckých ostrovů v Indonésii. Známé koření tvoří nerozvinutá, sušená poupata, která obsahují velký podíl aromatických látek. Hřebíček se vyznačuje antiseptickými, antimikrobiálními, antimykotickými, antioxidačními a analgetickými vlastnostmi. Využívá se především v gastronomii, ale také ve stomatologii pro preventivní opatření nebo jako přídatek do zubních past a ústních vod. Antimikrobiální účinky jsou dány díky látkám obsaženým v éterickém oleji hřebíčku jako jsou fenylypropanoidy eugenol, jehož struktura je znázorněna na obrázku 5, β -karyofylen, ahumulen, a eugenyl acetát. Působí proti patogenům včetně *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium*, *Salmonella*, *Bacteroides* a *Candida albicans* [29].



Obrázek 5: Eugenol

2.8.6 Kardamom

Kardamom je koření získávané ze semen rostliny kardamovník obecný (*Ellettaria cardamomum*) a (*Amomum subulatum*). Tato bylina se pěstuje komerčně v Indii, na Srí Lance, v Guatemale a Tanzanii. Semena kardamomu mají mírně palčivou chuť a jsou velmi aromatická. Používají se proto jako koření v pikantních nebo sladkých jídlech, převážně v indické kuchyni. Kardamomový olej se používá v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, při výrobě parfémů nebo likérů. Má silné aromatické, antiseptické, stimulační a antibakteriální vlastnosti, které působí proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím např. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter spp.*, *Acinetobacter*, *Escherichia coli*, *Serratia spp.*, a *Salmonella typhi* [30].

2.8.7 Lékořice

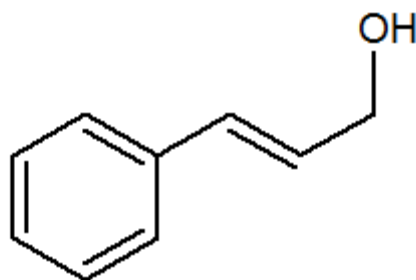
Lékořice (*Glycyrrhiza glabra*) z řeckého *glykos* (sladký) *rhiza* (kořen). Je vytrvalá bylina z čeledi bobovitých rozšířená především v Evropě a Asii. Tato rostlina je používána v tradiční medicíně po celém světě, kvůli obsahu biologicky aktivních látek jako např. glycyrrhizin (působí proti volným radikálům, zabraňuje oxidaci lipidů, má chemopreventivní účinky), kyselina glycyrrhizinová, glabrin A, B a isoflavony. Lékořice má protizánětlivé, antidiabetické, antivirové, antifungální a antimikrobiální účinky, inhibují růst *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*. Využívá se k léčbě žaludečních vředů, kašle, dně a při kožních onemocněních. Díky nadměrné sladivosti glycyrrhizinu (50x sladší než sacharóza) se využívá také v potravinářském průmyslu k výrobě cukrovinek, avšak nadměrná konzumace může vést ke zvýšení krevního tlaku [26,31,32].

2.8.8 Lichořeřišnice

Lichořeřišnice větší (*Tropaeolum majus*) je vytrvalá bylina pocházející z Jižní Ameriky. Jedlé části lichořeřišnice (listy, květy, semena) obsahují vysoký obsah vitamínu C, olej z lichořeřišnice mastné kyseliny, steroly, flavonoidy a karotenoidy. Tyto látky mají za následek antimikrobiální, antifungální a protizánětlivý účinek byliny. Působí proti gramnegativním a grampozitivním bakteriím *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Escherichia coli* a proti kvasinkám *Candida*, proto se hojně využívá v léčitelství, jak při respiračních, tak i při urologických onemocněních [26,33].

2.8.9 Skořice

Skořice je koření získávané z kůry skořicovníků (*Cinnamomum*), stálezelených tropických stromů rostoucích v tropickém a subtropickém pásmu jihovýchodní Asie. Obsahuje velké množství polyfenolů a těkavých fenolů, v esenciálním oleji z kůry je nejvíce zastoupen cinnamaldehyd, jehož struktura je znázorněna na obrázku 6 a eugenol, tyto sloučeniny jsou příčinou typického aroma skořice. Cinnamaldehyd má svůj hlavní účinek na bakteriální buněčnou membránu a je vhodný jako přírodní konzervační látka k potlačení růstu patogenních bakterií, čímž prodlužuje trvanlivost potravin. Skořice je koření, které se využívá především v potravinářském průmyslu, a to při výrobě cukrářských výrobků, likérů nebo nápojů. Esenciální skořicové oleje se využívají v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Skořice byla využívána již v tradiční čínské medicíně, díky svým dezinfekčním a antimikrobiálním vlastnostem, kdy se používala k léčbě neuroprotektivních onemocnění, léčbě diabetu a gastrointestinálních poruch [34].



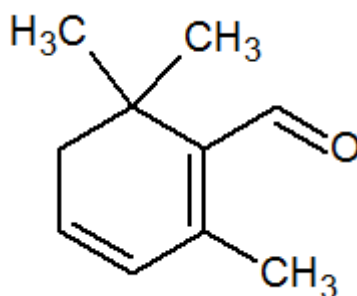
Obrázek 6: Cinnamaldehyd

2.8.10 Smetanka lékařská

Smetanka lékařská (*Taraxacum officinale*) je rostlina rostoucí převážně v mírném pásmu severní polokoule (Evropa, Amerika, Asie), běžně se dnes vyskytuje na loukách a polích jako plevel. Rostlina obsahuje velké množství flavonoidů, kumarinů a také kyselinu skořicovou, tyto látky mají léčebný a terapeutický význam. Extrakty ze smetanky vykazují dobrý antimikrobiální účinek proti bakteriím *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Kořen je primárně užíván jako gastrointestinální lék podporující trávení a funkci jater, zatímco list je používán jako diuretikum k léčbě zánětů močových cest a ledvin [26,35].

2.8.11 Šafrán

Šafrán setý (*Crocus sativus*) je velmi stará kulturní rostlina, která pochází ze západní Asie. V květech rostliny se nachází tzv. čnělky, které se sbírají ručně odštípnutím a poté se používají jako koření. Díky malému množství čnělek a náročnosti sběru je šafrán nejdražším kořením na světě. Šafrán obsahuje více než 150 těkavých aromatických sloučenin např. crocin, picrocrocin a safranal, jehož struktura je znázorněna na obrázku 7. Tyto látky jsou hlavní chemické sloučeniny šafránu, které jsou odpovědné za typickou barvu, chuť a vůni šafránu. Tato rostlina vykazuje antimikrobiální, antidepressivní, mírné afrodiziakální, antioxidantní, protinádorové, diuretické a protizánětlivé vlastnosti. V tradiční čínské medicíně byl šafrán používán ve formě infuze a odvaru k léčbě patologických stavů jako je astma, artritida, kašel, akné, kožní onemocnění, a dokonce i neplodnost. Kromě medicíny se využívá i v orientální či latinskoamerické kuchyni [36].



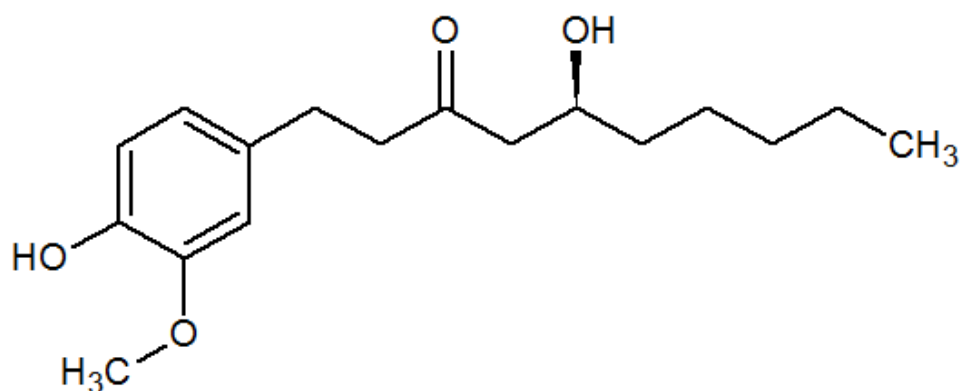
Obrázek 7: Safranal

2.8.12 Třapatka nachová

Třapatka nachová (*Echinacea purpurea*) je vytrvalá bylina se vzpřímenými větvenými stonky pocházející ze Severní Ameriky, kde byla používána v tradiční medicíně původních obyvatel. Pěstuje se především jako okrasná rostlina, avšak výtažky z ní mají léčivé účinky. Používanými částmi rostliny jsou kořeny nebo nať, které obsahují velké množství specifických polysacharidů, terpenů, deriváty kyseliny kávové, kyselinu cichorovou řadu alkylamidů a flavonoidů. Třapatka bývá užívána vnitřně při nachlazeních a infekcích dýchacích cest nebo povrchově na špatně se hojící poranění [32].

2.8.13 Zázvor

Zázvor (*Zingiber officinale*) je vytrvalá rostlina s hustými kořeny, která pochází z Asie. Po celém světě se žluté oddenky této rostliny používají jako koření pro svou typickou vůni, kterou způsobují aromatické látky zingiberen a bisabolen a také výraznou, ostrou chuť, kterou způsobuje obsah gingerolu, jehož struktura je znázorněna na obrázku 8. Další využití zázvor našel také v léčitelství pro své antibakteriální, antimykotické a protizánětlivé účinky. Zázvor stimuluje krevní oběh, snižuje horečku, tlumí průjem a žaludeční křeče. Antimikrobiální aktivita byla zkoumána u gramnegativních a grampozitivních bakterií. Nejvyšší inhibiční účinky zázvoru na bakterie byly zjištěny u rodů *Bacillus* sp., *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*, naopak nejnižší inhibiční zónu měl zázvor na rody *Klebsiella* a *Enterobacter*. V další studii bylo zjištěno, že zázvor vykazuje redukční účinky na krevní lipidy, proto může být do budoucna považován za cennou přísadu do léčiv např. u diabetických pacientů [32,37,38].



Obrázek 8: Gingerol

2.9 Mechanismy antimikrobiálního účinku aktivních látek na mikroorganismy

Antimikrobiální látky jsou takové, které mají schopnost inhibovat nebo potlačovat růst mikroorganismů v dávkách, které nepoškozují makroorganismus. Antimikrobiální látky mohou působit různým způsobem a v různých místech bakteriální buňky [14].

2.9.1 Inhibice syntézy buněčné stěny

Antimikrobiální látky působící tímto mechanismem se vážou na specifická vazebná místa a tím inhibují enzymy (transpeptidázy), jejichž přítomnost je nutná ke tvorbě peptidoglykanů v bakteriální buněčné stěně. Látky působí pouze v době růstu mikroorganismů, ale mají baktericidní účinek. Během růstu vznikají buňky, které mají defektní buněčnou stěnou, a proto nejsou schopné odolávat vysokému osmotickému tlaku. Oslabené buňky podléhají lýzi nebo jsou zničeny buňkami hostitele. Buněčná stěna gramnegativních bakterií je vůči antimikrobiálním látkám odolnější než u grampozitivních bakterií, protože kromě tenké vrstvy peptidoglykanů obsahuje také fosfolipidovou dvouvrstvu a beta-laktamázy v periplazmatickém prostoru. Beta-laktamázy jsou schopné rozkládat některé antimikrobiální látky, a proto jsou gramnegativní bakterie vůči jejich účinku odolnější [39,40,41].

2.9.2 Poškození syntézy cytoplasmatické membrány

Antimikrobiální látky obsahují lipofilní i lipofobní skupiny, tím se umožňuje jejich průnik do plazmatických membrán mikroorganismů. Přítomností těchto látek v buňce se naruší její struktura, dochází k poruchám permeability cytoplasmatické membrány to způsobí narušení iontové rovnováhy a k úniku důležitých složek buňky (aminokyseliny, puriny, pyrimidiny), které vede k zániku buňky [39,40,41].

2.9.3 Inhibice proteosyntézy

Antimikrobiální látky, které blokují syntézu buněčných proteinů tím, že se specificky vážou na ribozomální podjednotky bakterií [39,40,41].

2.9.4 Porucha syntézy nukleových kyselin

Do této skupiny patří antimikrobiální látky, které narušují správné prostorové uspořádání DNA nebo brání zahájení tvorby řetězce. Replikace DNA vyžaduje aktivitu třídy enzymů nazývaných topoizomerázy. Topoizomeráza II (DNA gyráza) uvolňuje molekuly DNA, iniciuje přechodné zlomky a opětovně propojuje fosfodiesterové vazby v superheliálních závitech uzavřené kruhové DNA bakterií. To umožňuje DNA řetězci replikovat DNA nebo RNA polymerázy. Inhibicí topoizomerázy dochází k poruše zřetězování DNA nebo rozvolnění DNA a replikace nemůže probíhat [39,40,41].

2.1 Metody pro stanovení antimikrobiální aktivity

K testování antimikrobiálních nebo antifungálních účinků vybraných extraktů se využívají konvenční metody kvalitativní (difúzní) a kvantitativní (diluční).

2.1.1 Kvalitativní metody

Mezi kvalitativní metody stanovení antimikrobiální aktivity látek patří převážně difúzní metody, které určují citlivost mikroorganismů k antimikrobiálním látkám.

2.1.1.1 Disková difúzní metoda

Disková difúzní metoda stanovuje citlivost vybraného mikrobiálního kmene k použité antibakteriální látce. Pevné živné médium je zaočkováno testovaným mikroorganismem o vhodném ředění. Na povrch média jsou přiloženy papírové disky napuštěné antimikrobiální látkou. Poté dochází ke kultivaci mikroorganismů, které se postupně v přítomnosti antimikrobiální látky inhibují, protože antimikrobiální látka se pomalu rozpouští a difunduje do média. Vytváří se tzv. inhibiční zóna, její velikost je závislá na druhu mikroorganismu, jeho citlivosti k dané antimikrobiální látce a na vlastnostech živného média. Podle velikosti vzniklé inhibiční zóny se mikroorganismy rozdělují na citlivé, intermediálně rezistentní a rezistentní [42].

2.1.1.2 Agarová difúzní metoda

Obdobný princip jako u diskové difúzní metody, avšak místo papírových disků, jakožto nosičů antimikrobiální látky se do pevného média vyhloubí jamky, do kterých se aplikuje antimikrobiální látka [42].

2.1.2 Kvantitativní metody

Mezi kvantitativní metody stanovení antimikrobiální aktivity látek patří diluční metody, které stanovují tzv. minimální inhibiční koncentrace (MIC), což znamená nejnižší koncentrace antimikrobiální látky účinné pro inhibici růstu mikroorganismu. Dále určují množství látky potřebné pro usmrcení mikroorganismu tzv. minimální baktericidní koncentrace (MBC).

2.1.2.1 Agarová diluční metoda

Agarová diluční metodou je nejpoužívanější kvantitativní metodou pro stanovení antimikrobiální aktivity látek. Do Petriho misek s pevným živným médiem jsou přidávána různá ředění antimikrobiální látky o přesných koncentracích. Obvykle se připravuje 12–15 koncentrací jedné antimikrobiální látky ve dvou až třech opakováních. Inokulum vybraných bakterií se aplikuje na povrch agaru a po příslušné době inkubace se odečte pro každý testovaný bakteriální kmen hodnota MIC [42].

2.1.2.2 Mikrodiluční metoda

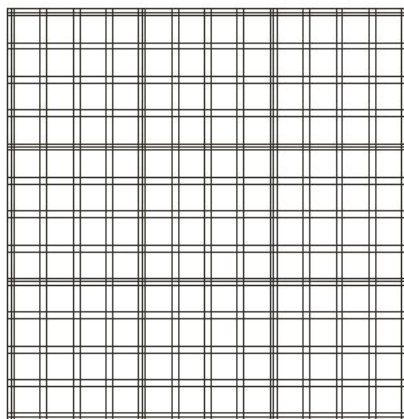
Antimikrobiální látka je stejně jako u agarové diluční metody ředěna dvojnásobnou řadou, ale v tekuté živné půdě. Tekutá půda s obsahem antimikrobiální látky se dává do jamek mikrotitrační destičky s 96 jamkami, které mají kulaté nebo kónické dno. Jedna jamka většinou slouží jako kontrola růstu testovaného mikroorganismu, kdy se do zaočkovaného média nepřidá antimikrobiální látka. K jednotlivým řaděným koncentracím média se poté přidává standardní inokulum testovaného kmene. Po inkubaci se odečítají hodnoty MIC. Vyhodnocení probíhá, buď vizuálně nebo za použití tzv. readeru, který změří hodnoty absorbcí v jamkách [42].

2.2 Metody identifikace mikrobiálních vlastností potravin

Stanovení počtu mikroorganismů ve vzorku patří k nejzákladnějším metodám v mikrobiologické laboratoři. Stanovení probíhá během růstu a rozmnožování mikroorganismů v určitém objemu, který je poté přepočítán na 1 ml testovaného vzorku. Nejčastěji využívanými metodami jsou přímé metody – mikroskopické a nepřímé metody – kultivační.

2.2.1 Přímé kvantitativní stanovení mikroorganismů

Přímé metody jsou založené na principu počítání buněk v mikroskopickém preparátu, jejichž výhodou je rychlost získání výsledků, které zahrnují mrtvé i živé buňky v preparátu. Mezi přímé metody stanovení patří počítání v Bürkerově komůrce znázorněné na obrázku 9, na fixovaných, barvených preparátech nebo na membránových filtrech [43].



Obrázek 9: Bürkerova počítací komůrka (upraveno dle [43])

2.2.2 Nepřímé kvantitativní stanovení mikroorganismů

Nejčastěji využívanou kultivační metodou je počítání kolonií na agarových plotnách. Principem metody je předpoklad, že z jedné životaschopné buňky vyroste jedna kolonie, která je na agarové plotně viditelná. Očkování mikroorganismů na agarové plotny lze provést dvěma způsoby, a to buď přímým zaočkováním inokula (max. 0,5 ml) na agarovou plotnu, které se poté rozetře sterilní hokejkou, nebo zalitím inokula (max. 1 ml) agarem. Při kultivaci mikroorganismů je nutné zajistit dostatečné pomnožení v podmínkách laboratoře, proto se musí zajistit vhodné podmínky pro růst mikroorganismů (dostatek vody, živin, pH, složení atmosféry, optimální teplota, osmotický tlak). Každý mikroorganismus má jiné nároky k rozmnožování, proto se ke kultivacím využívají vhodná živná média, která splňují podmínky jednotlivých mikroorganismů [43].

Podle původu dělíme kultivační půdy na:

- **přirozené** – jsou chemicky nedefinované, jejich základ tvoří živný bujon
- **syntetické** – jejich základ tvoří chemicky definované sloučenin

Podle konzistence dělíme kultivační půdy na:

- **půdy tekuté** – tzv. bujony, neobsahují přísávek agaru
- **půdy pevné** – obsahují asi 1–2 % agaru
- **půdy polotuhé** – semisolidní, obsahují asi 0,5 % agaru

Podle složení dělíme půdy na:

- **základní, obohacené** – např. krevní agar (mohou se na něm projevit hemolytické vlastnosti bakterií)
- **elektivní** – používají se pro kultivace úzké taxonomické skupiny mikroorganismů
- **selektivní** – používají se pro kultivace určité skupiny mikroorganismů, obsahují inhibitor růstu nežádoucích mikroorganismů
- **diagnostické** – obsahují indikátor biochemické aktivity, který mění barvu na základě změny vnějších podmínek okolí
- **selektivně diagnostické** – tato půda je kombinací selektivních a diagnostických půd
- **chromogenní** – půda obsahuje chromogen, tyto půdy dokážou odlišit jednotlivé mikroorganismy na základě specifické barvy jejich kolonií
- **fluorogenní půdy** – na substrát je navázáno fluorescenční barvivo k detekci mikroorganismů

2.3 Molekulárně – biologické metody

Molekulárně – biologické metody se zabývají studiem buněčných a biologických procesů na molekulární úrovni. Studují strukturu biomakromolekul (DNA, RNA), jejich interakce a regulace funkcí v závislosti na vlastnostech buňky. K hlavním metodám molekulární biologie patří zejména purifikace a separace nukleových kyselin, sekvenování DNA nebo genové exprese. Tyto metody se široce využívají v genetickém výzkumu a genovém inženýrství, ale také v zoologii, botanice, klinické medicíně nebo v soudním lékařství.

2.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction) je metoda využívaná v molekulární biologii, která již částečně nahrazuje klasické biochemické a mikrobiologické metody. V roce 1984 ji vynalezl americký biochemik Kary Mullis a v roce 1993 za tento objev dostal Nobelovu cenu [44].

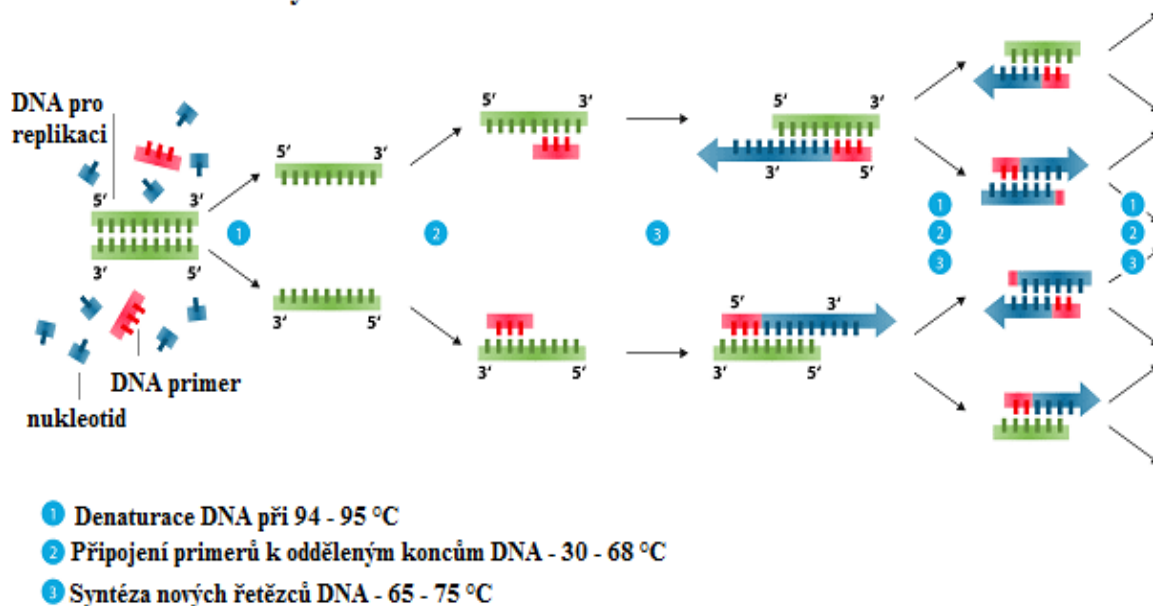
Principem metody je replikace nukleových kyselin, kdy z jedné molekuly DNA lze amplifikovat mnoho milionů exaktních kopií. Díky termostabilnímu enzymu DNA polymeráze dochází k syntéze nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5'→3'. Jednotlivé úseky nukleotidové sekvence jsou vymezeny připojením tzv. primerů (syntetických oligonuklidů), které se navážou na komplementární úseky řetězce DNA. Tyto primery slouží k ohraničení místa o specifické velikosti na DNA matrici, které má být amplifikováno. Pro vytváření nových řetězců. Syntéza nových vláken probíhá po přidání DNA – polymerázy a nukleotidů adeninu (A), thyminu (T), cytosinu (C) a guaninu (G) na obou matricových řetězcích protisměrně.

V molekulární metodě PCR se pravidelně střídají tři kroky, u kterých má každý odlišné podmínky a teploty a to:

- I. denaturace dvouřetězcových molekul DNA (90–97 °C)
- II. připojení primerů k odděleným koncům řetězců DNA (30–65 °C)
- III. syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA – polymerázy (65–75 °C)

Průběh polymerázové řetězové reakce je znázorněn na obrázku 10.

Polymerázová řetězová reakce - PCR



Obrázek 10: Schéma průběhu polymerázové řetězové reakce (upraveno dle [45])

Tento postup se opakuje 25–45x, podle koncentrace nebo kvality původní templátové DNA. Reakce probíhají v tzv. termocyklieru znázorněném na obrázku 11 ve kterém se teploty mění automaticky v jednotlivých časových intervalech. Výsledkem jsou tzv. amplikony (úseky DNA analogické restriční fragmentům) a jejich velikost v reakční směsi se stanovuje elektroforézou v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Pro vizualizaci amplikonů se používá barvivo interkalující do DNA.



Obrázek 11: Termocykler

Výhodou této metody je rychlost provedení, jednoduchost, finanční dostupnost, a především umožnění získat specifickou sekvenci genomové DNA bez předchozího klonování ve vektorech, a to i z velmi malého množství materiálu. Tato metoda se využívá v chemických, lékařských, forenzních laboratořích např. k detekci mikroorganismů, lidských genů, ke kontrole potravin, zjišťování GMO nebo k identifikaci genů způsobujících rakovinu [44,46].

3 Cíle práce

Cílem práce je studium mikrobiální jakosti „raw“ potravin a následně potravin s přídavkem antimikrobiálních látek, které by mohly prodloužit bezpečnou trvanlivost dané potraviny.

V rámci práce byly řešeny následující dílčí úkoly:

1. Literární rešerše zabývající se charakterizací „raw“ potravin, možnostmi nejčastější mikrobiální kontaminace v daných typech potravin a přehledem antimikrobiálních účinků aktivních látek získaných z různých přírodních materiálů
2. Testování vybraných přírodních materiálů na antimikrobiální účinek
3. Izolace DNA z komplexní „raw“ potravinové matrice s následnou identifikací obsažených mikroorganismů
4. Návrh a testování prodloužené trvanlivosti nového „raw“ produktu s přídavkem aktivních látek s antimikrobiálním účinkem

5 Experimentální část

Všechna měření a postupy byly provedeny dle upravených postupů ze skript doktorky Veselé [43], docentky Španové a docenta Ritticha [47], a profesorky Márové a docenta Obruči [48].

5.1 Použité přístroje a pomůcky

- Analytické váhy (A&D, Instruments LTD, Japonsko)
- Bakteriologické kličky a hokejky
- Buničitá vata
- Bunsenův kahan
- Centrifuga Eppendorf 5430 R (Eppendorf AG, Německo)
- Elektroforetická vana Owl separation systeme, model B1, B2, D3 (Biotech s.r.o., ČR)
- ELISA ReaderBio Tek ELx808
- Eppendorfovy zkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Laboratorní sklo
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New jersey, USA)
- Laminární box Aura mini, Bioair
- Lednice a mrazák k uchování vzorků DNA
- Mikropipety Biohit (Biotech s.r.o., ČR)
- Mikropipety pipet4u (AHN Biotechnologie GmbH, Německo)
- Mikrovlnná trouba ETA 1195 (ČR)
- Mikrozukavky Eppendorf
- Minicentrifuga National LABNET C-1200 (Biotech s.r.o., ČR)
- NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA)
- Parafilm (American Nacional CanTM, USA)
- PCR box AURA MINI (Bioair instruments, Itálie)
- Plastové Petriho misky
- Předvážky EK-600 H (A&D, Instruments LTD, Japonsko)
- Sušárna (Binder, Německo)
- Spektrofotometr Helios Delta (Spectronic Unicam, UK)
- Sterilní box pro mikrobiologickou práci
- Špičky z umělé hmoty
- Temperovaná třepačka Heidolph Unimax 1010, Labicom (ČR)
- Thermal cycler DNA Engine (BIO—RAD Lab., USA)
- Transilluminátor TVR-3121 (Spectroline, Albany, USA)
- Vortex, TK3S, Kartel spa (USA)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Další laboratorní pomůcky (špachtle, lžička, buničina...)

5.1.1 Chemikálie použité na spektrofotometrická stanovení

- ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfuric acid)diammonium salt) (Sigma-Aldrich (SRN))
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- Dusičnan sodný (LachNer, ČR)
- Etanol (p.a., LachNer, ČR)
- Folin-Ciocalteu činidlo (p.a., LachNer, ČR)
- Hydroxid sodný (LachNer, ČR)
- Chlorid hlinitý (LachNer, ČR)
- Katechin (Sigma-Aldrich, SRN)
- Kyselina gallová (Sigma-Aldrich, SRN)
- Peroxodisíran draselný (Sigma-Aldrich, SRN)
- Uhličitan sodný (LachNer, ČR)
- Trolox (Sigma-Aldrich, SRN)

5.1.2 Chemikálie použité na kultivaci mikroorganismů

- Agar (HiMedia Laboratories Limited Mumbai Indie)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- Glukóza (LachNer, ČR)
- Kvasničný autokatalyzát (HiMedia Laboratories Limited Mumbai Indie)
- LB médium (Luria – Bertani Broth) (HiMedia Laboratories Limited Mumbai Indie)
- NB médium (Nutrient Broth) (HiMedia Laboratories Limited Mumbai Indie)
- Pepton (HiMedia Laboratories Limited Mumbai Indie)
- TSA médium (Trypton soya agar) (HiMedia Laboratories Limited Mumbai Indie)

5.1.3 Komponenty pro PCR a elektroforézu

- Agaróza pro elektroforézu DNA EliPhore (Elizabeth Pharmacon s.r.o., ČR)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- DNA-polymerasa (Taq DNA pol. 1.1, 500 U, 1 U· μl^{-1}) (Top-Bio, Praha, ČR)
- DNA standard (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Etanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethidium bromid (5 mg· ml^{-1}) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Fenol:chloroform:isoamylalkohol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Fluorescenční barvivo GoldView (Ecoli, Bratislava, SR)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Lyzační pufr – CellLytic Y Cell Lysis Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Nanášecí pufr Yeallow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- PCR voda (PCR Ultra H₂O) (Top-Bio, Praha, ČR)
- PCR pufr s Mg⁺ ionty (10x PCR blue buffer complete (750 mM Tris-HCl; pH 8,8; 200 mM (NH₄)₂SO₄, 1 % Tween 20; 25 mM MgCl₂)) (Top-Bio, Praha, ČR)
- směs dNTP (PCR dNTP mix, 10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery specifické pro doménu *Bacteria* (Feub, Reub) [49]

- Primery specifické pro doménu kvasinky (OliF, OliR) [50]
- Primery specifické pro rod *Escherichia* (coneaeAF, conenaeAR) [51]
- Primery specifické pro rod *Bacillus* (BK1F, BK1R) [52]
- Primery specifické pro rod *Aspergillus* (ASAP1, ASAP2) [53]
- Primery specifické pro rod *Fusarium* (TEF-Fu3f, TEF-Fu3r) [54]

5.1.4 Roztoky

- 0,5 mM EDTA, pH 8,0
- Tris-HCl (1M, Tris-báze (121 g·l⁻¹), destilovaná voda, koncentrovaná HCl pro úpravu pH)
- TE pufr (0,01M Tris-HCl (pH 7,8), 0,001M EDTA (pH 8))
- CIZ (směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1)
- 5 × TBE pufr (Tris-base (54 g·l⁻¹), kyselina boritá (27,5 g·l⁻¹), 0,5 M EDTA (20 ml) a destilovaná voda do 1 l)

5.1.5 Použité mikroorganismy pro kultivace

V experimentální části této diplomové práce byly použity na testování antimikrobiální aktivity kultury *Micrococcus luteus* CCM 1569, *Escherichia coli* CCM 2024 a *Candida glabrata* CCM 8270. Tyto kultury byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

5.1.6 DNA použitá pro pozitivní kontroly

Použitá bakteriální, kvasinková a DNA z plísní pro pozitivní kontroly byly poskytnuté paní Ing. Andreou Háronikovou, Ph.D. DNA ze všech kultur kromě *Escherichia coli* byla vyizolována ze sbírkových kmenů z České sbírky mikroorganismů (CCM). DNA *Escherichia coli* byla komerčně zakoupena z firmy Sigma-Aldrich. Bakteriální a kvasinková DNA byla izolována komerčním Ultra Clean kitem, DNA z plísní byla izolována fenolovou extrakcí.

- *Aspergillus niger* CCM 8155
- *Bacillus subtilis* CCM 1999
- *Escherichia coli* strain B (ultra pure, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- *Fusarium avenaceum* CCM 8015
- *Lactobacillus pentosus* CCM 4619
- *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8191

5.1.7 Použité byliny a koření

- Aloe kapská — Valdemar Grešík
- Andělíka kořen — Léčivé rostliny
- Badyán — Valdemar Grešík
- Citronová kůra — Avokádo
- Hřebíček — Avokádo
- Kardamom — Valdemar Grešík
- Lékořice kořen — Léčivé rostliny
- Lichořeřišnice semeno — Léčivé rostliny
- Skořice — Kotanyi
- Smetanka kořen — Léčivé rostliny
- Šafrán — Valdemar Grešík

- Třapatka nat' — Léčivé rostliny
- Zázvor — Valdemar Grešík

5.1.8 Analyzované potraviny

K analýze byly použity dva typy RAW dezertů zakoupené v obchodě My Kitchen.

5.1.8.1 RAW perník

Složení: jablka, mandle bio, slunečnice bio, kokosový olej bio, datle, chia semínka, kokos strouhaný bio, kakaový prášek, kokosový cukr bio, perníkové koření (3%), skořice

Hmotnost: 60 g

Trvanlivost: 5 dní



Obrázek 12: RAW perník

5.1.8.2 RAW hraběčiny řezy

Složení: jablka, kokos strouhaný bio, mandle bio, datle, kokosový olej bio, voda, citronová šťáva, skořice, kokosový cukr

Hmotnost: 145 g

Trvanlivost: 5 dní



Obrázek 13: RAW hraběčiny řezy

5.2 Metody a postupy

5.2.1 Příprava kultivačních médií

Na přípravu kapalných médií pro kultivaci bakteriálních kmenů bylo použito TS médium (Trypton soya broth), jehož složení je uvedeno v tabulce 1. Pro přípravu pevného média byl použito médium TSA (Trypton soya agar), během přípravy bylo postupováno podle pokynů výrobce. Na 100 ml kapalného média bylo naváženo 4,15 g TSA média.

Tabulka 1: Složení živného média pro bakteriální kmeny

Složka	Množství
destilovaná voda	100 ml
bakteriologický pepton	1,7 g
sójový pepton	0,3 g
chlorid sodný	0,5 g
hydrogenfosforečnan draselný	0,25 g
kvasniční extrakt	0,6 g
glukosa	0,25 g

Pro kultivaci kvasinky *Candida glabrata* a ostatních kvasinkových kmenů a plísní bylo použito Yeast pepton dextrose médium (YPD), jehož složení je uvedeno v tabulce 2. Na přípravu tuhého média bylo k navážce YPD média přidáno 2 g agaru.

Tabulka 2: Složení živného média pro kvasinku *Candida glabrata*

Složka	Množství
destilovaná voda	100 ml
bakteriologický pepton	2 g
kvasniční extrakt	1 g
glukóza	2 g

Na přípravu kapalných médií pro kultivaci *Escherichia coli* bylo použito médium Luria-Bertani Broth (LB), během přípravy bylo postupováno podle pokynů výrobce. Na 100 ml kapalného média bylo naváženo 2,5 g LB média. Na přípravu tuhého média bylo k navážce LB média přidáno 2 g agaru.

Na přípravu kapalných médií pro kmen *Micrococcus luteus* bylo použito médium Nutrient Broth (NB), během přípravy bylo postupováno podle pokynů výrobce. Na 100 ml kapalného média bylo naváženo 2,5 g NB média. Na přípravu tuhého média bylo k navážce LB média přidáno 2 g agaru.

Všechna média byla před kultivacemi mikroorganismů vysterilována v tlakovém hrnci při 120 °C po dobu 60 minut. Pevná média byla poté ještě za horka rozlita do Petriho misek a uchována v lednici po dobu max. 1 týdne.

5.2.2 Příprava etanolových extraktů

Alkoholové extrakty byly připraveny ze 2 g rostlinné látky, navážka byla louhována týden v 40 ml 40 % etanolu u vzorku šafránu 0,1 g/20 ml. Extrakty byly následně zfiltrány přes textilní gázu.

5.2.3 Příprava vzorků z RAW potravin

Na základě výsledků antimikrobiálních testů a ostatních stanovení pro charakterizaci bylin a koření, byly do testovaných RAW výrobků pro prodloužení trvanlivosti zvoleny kombinace bylin a koření, které vykazovaly nejlepší výsledky.

Podle receptu na RAW perník, kde se uvádí obsah perníkového koření (skořice bio, hřebíček bio, anýz bio, kardamon bio, koriandr bio) 30 g/1000 g výsledného produktu, byly zvoleny kombinace a množství přidávaných bylin a koření. Testované produkty byly rozděleny na 7 dílů, 1 díl byl testován bez přídavku antimikrobiálních látek a k šesti z nich byla přidána navážka koření a bylin o celkové hmotnosti 1 g/20 g produktu. Množství bylin a koření bylo voleno tak, aby příliš neovlivňovalo organoleptické vlastnosti produktů.

5.2.4 Charakterizace extraktů

5.2.4.1 Stanovení celkového množství polyfenolů

Tato metoda je založena na reakci, kdy dochází k redukci Folin-Ciocalteuova činidla za vzniku modrého zbarvení, proto je možné ji sledovat pomocí spektrofotometru při $\lambda=750$ nm. Intenzita zbarvení roztoku závisí na koncentraci polyfenolů nacházejících se ve vzorku. Jako standard byla používána kyselina gallová [55].

Do zkumavky byl napipetován 1 ml zředěného Folin-Ciocalteuova činidla (1:9) a 1 ml destilované vody. Následně bylo přidáno 50 μ l připraveného vzorku, směs byla promíchána a ponechána 5 minut stát. Poté byl přidán 1 ml nasyceného roztoku Na_2CO_3 (29,5 g Na_2CO_3 v 95 ml destilované vody), zkumavka byla promíchána a ponechána 15 minut stát. Obsah přítomných polyfenolů byl změřen spektrofotometricky, kdy byla zaznamenávána absorbance při $\lambda=750$ nm. Slepý vzorek byl připraven stejným způsobem, ale místo vzorku byla použita destilovaná voda. Pro kalibraci byla jako standard použita kyselina gallová v koncentračním rozmezí 0–0,6 mg/ml.

5.2.4.2 Stanovení celkového množství flavonoidů

Tato kalorimetrická metoda je založena na reakci hlinité soli a flavonoidů přítomných v roztoku, při které vznikají oranžovo–žluté komplexy, které se spektrofotometricky detekují při vlnové délce $\lambda=510$ nm [56].

Do zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml připraveného vzorku, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5 % NaNO_2 (5 g NaNO_2 do 100 ml odměrné baňky doplněné po rysku destilovanou vodou). Směs byla promíchána a ponechána 5 minut stát. Poté bylo přidáno 0,2 ml 10 % AlCl_3 (10 g AlCl_3 do 100 ml odměrné baňky doplněné po rysku destilovanou vodou), promícháno a ponecháno 5 minut stát. Nakonec bylo přidáno 1,5 ml 1M NaOH (4 g NaOH do 100 ml odměrné baňky doplněné po rysku destilovanou vodou) a 1 ml destilované vody. Tato směs byla ještě jednou promíchána a ponechána 15 minut stát. Následně byla změřena absorbance při $\lambda=510$ nm. Slepý vzorek byl připraven stejným způsobem, ale místo vzorku byla použita destilovaná voda. Jako standard byl použit katechin v koncentračním rozmezí 0–0,3 mg/ml.

5.2.4.3 Stanovení celkového množství anthokyanů

Tato spektrofotometrická metoda využívá přirozeného zbarvení anthokyanů po dosáhnutí kyselého pH. Množství celkových anthokyanů se měří při vlnové délce $\lambda = 528$ nm, jako standard je využíván kyanidinchlorid [48].

Připravené roztoky vzorků byly desetkrát zředěné (1 ml extrahovaného roztoku vzorku + 9 ml etanolu). Takto připravený roztok byl okyselen 35 % kyselinou chlorovodíkovou do získání hodnoty pH = 3. Absorbance vzorků byla změřena pomocí spektrofotometru při vlnové délce $\lambda = 528$ nm, jako slepý vzorek byla použita okyselená destilovaná voda. Jako standard byl použit roztok kyanidinchloridu v koncentračním rozmezí 1–20 $\mu\text{g/ml}$.

5.2.4.4 Stanovení antioxidační aktivity

Tato metoda patří mezi základní a nejpoužívanější metody stanovení antioxidační aktivity. Principem metody je schopnost vzorku nebo látek zhášet kationt-radikál ABTS^{•+} (2,2-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát). Zhášení radikálu antioxidanty se měří spektrofotometricky, a to na základě změn absorpčního spektra ABTS^{•+} při $\lambda=734$ nm. Výsledné množství antioxidačních látek je srovnáváno s antioxidační aktivitou syntetické látky Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2- karboxylová kyselina), proto se tato metoda někdy označuje jako TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity).

Do 10 ml odměrné baňky byl připraven kationt-radikál ABTS^{•+} (2,2 - azinobis(3 – ethyl -2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát) tak, že ABTS bylo rozpuštěno v destilované vodě na koncentraci $c=7$ mM. Poté byl přidán peroxodisíran draselný o koncentraci $c = 2,45$ mM, který generuje v reakční směsi oxidaci ABTS na kationt-radikál ABTS^{•+} a baňka byla po rysku doplněna destilovanou vodou. Takto připravená odměrná baňka byla obalena alobalem a ponechána stát ve tmě při pokojové teplotě minimálně 12 hodin.

Před analýzou vzorků byl roztok ABTS^{•+} zředěn ethanolem pro UV – VIS na absorbanci $A = 0,700$ při vlnové délce $\lambda=734$ nm. Jako slepý vzorek byl použit etanol.

Pro výpočet výsledné absorbance byl připraven vzorek (A_0) smísením 1 ml upraveného ABTS^{•+} a 10 μl etanolu a ihned po promíchání byla zaznamenána absorbance. Pro zjištění antioxidační aktivity vzorku (A_1) byl do zúžené kyvety napipetován 1 ml upraveného ABTS^{•+} a 10 μl připraveného vzorku, tato směs byla dostatečně promíchána a ponechána 10 minut stát ve tmě. Po deseti minutách byl změřen pokles absorbance. Výsledná absorbance byla vypočítána pomocí vztahu: $A = A_0 - A_1$. Pro kalibraci byl jako standard použit zásobní roztok Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2- karboxylová kyselina) v koncentračním rozmezí 0–400 $\mu\text{g/ml}$ [57].

5.2.5 Antimikrobiální testy

Připravené etanolové extrakty byly testovány dvěma typy testů: agarovým difúzním testem a bujónovým dilučním testem proti dvěma kmenům bakteriálních kmenů a jednomu kvasinkovému kmenu.

5.2.5.1 Agarový difúzní test

Na připravené Petriho misky s tuhým agarem byla naočkována 24 hodinová kultura bakteriálních nebo kvasinkových buněk připravených podle kapitoly 5.2.8, tak že bylo napipetováno 100 μl média s narostlou kulturou, které bylo pečlivě rozetřeno sterilní hokejkou. Misky se poté nechaly cca 5 minut stát. Poté byly pomocí plastové špičky od pipety vyhloubeny jamky, do kterých bylo napipetováno po 50 μl extraktu. Jako blank byl použit 40 % etanol. Experiment byl proveden dvakrát a po 24 hodinách kultivace byla stanovena průměrná hodnota inhibiční zóny.

5.2.5.2 Bujónový diluční test

Do jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 150 μ l média s narostlou kulturou, které bylo naředěno sterilním médiem tak, aby absorbance při 630 nm byla 0,1. K médiu s kulturou bylo dále přidáno 50 μ l extraktu, jako blank byla použita kultura s přidavkem 50 μ l 40 % etanolu. Absorbance byla měřena v čase 0 a po 24 hodinách kultivace.

5.2.6 Kultivace mikroorganismů pro stanovení mikrobiální kontaminace potravin

Pro stanovení mikrobiální kontaminace potravin byla zvolena kultivace na pevných selektivních médiích (na agarových plotnách), jejichž příprava je uvedena v kapitole 5.2.

Výrobce udává dobu trvanlivosti potravin 5 dní od zakoupení produktu, v tomto časovém rozsahu by měla být konzumace produktu bezpečná. Pro potvrzení nebo vyloučení přítomnosti mikroorganismů v produktech, které neprošly tepelnou úpravou nad 42 °C byla zvolena metoda očkování vzorků na pevná selektivní média, a to po dobu trvanlivosti (5 dní). Kontrola Petriho misek se prováděla u bakteriálních kmenů po 1 dni, u kvasinek a plísní po 2 dnech po zaočkování. Veškerá práce se vzorky (příprava médií, ředění a očkování vzorek, uchovávání vzorků) byla prováděla ve sterilním boxu, aby se zamezilo kontaminaci mikroorganismy z vnějšího prostředí.

5.2.6.1 Ředění a očkování vzorků na pevná média

Do sterilní zkumavky byl naváženo 0,1 g vzorku a k tomuto množství bylo napipetováno 0,9 ml sterilní destilované vody. Poté bylo provedeno desítkové ředění až po hodnotu 10^{-5} . Pro stanovení mikrobiální kontaminace bylo zvoleno ředění 10^{-3} a 10^{-5} . Na agarové plotny s TSA a YPD médiem bylo rozetřeno 100 μ l vzorku sterilní hokejkou ve třech paralelních stanovení. Poté byly misky uzavřeny parafilmem a ponechány kultivovat 24 hodin při teplotě 37 °C (TSA médium) a 48 hodin při 25 °C (YPD médium). Po ukončení kultivace byl zaznamenán počet narostlých kolonií.

5.2.7 Kultivace mikroorganismů pro izolaci DNA

Pro kultivaci mikroorganismů na izolaci DNA byla připravena 2 tekutá média (TS a YPD médium), postup přípravy je uveden v kapitole 5.2. Pro zabránění možného růstu bakterií v YPD médiu do něj bylo přidáno 1 μ g/ml ampicilinu. Na každý vzorek bylo do Erlenmeyerových baněk připraveno 20 ml TS a YPD média. Do takto připravených baněk bylo sterilně odváženo 1 g vzorku, 1. a 5. den trvanlivosti produktu. Poté se baňky s TS médiem nechaly kultivovat po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C a baňky s YPD médiem 48 hodin při teplotě 25 °C. Baňky s TS médiem s již narostlou bakteriální kulturou byly přeočkovány po 24 hodinách do nově připraveného média. Baňky s YPD médiem byly přeočkovány po 48 hodinách. Tento postup se opakoval min. 2x, dokud nebylo dosaženo dostatečné čistoty média.

5.2.8 Kultivace mikroorganismů pro antimikrobiální testy

Ke kultivacím byl použit kmen gramnegativní bakterie *Escherichia coli*, kmen grampozitivní bakterie *Micrococcus luteus* a kvasinka *Candida glabrata*. Práce s těmito mikroorganismy byla prováděna ve sterilním boxu. Inokula kultur byla zaočkována sterilní kličkou z Petriho misek. Tyto kultury byly kultivovány v tekutých médiích v Erlenmeyerových baňkách za stálého třepání na třepačce, která byla vytemperována na teplotu 37 °C. Takto připravená inokula se nechala kultivovat 24 hodin.

5.2.9 Izolace bakteriální a kvasinkové DNA

Tato metoda byla provedena pomocí komerčního setu UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit. V prvním kroku bylo do mikrozkušavky napipetováno 1,8 ml média s kulturou, takto připravená mikrozkušavka byla centrifugována při 14 000 otáčkách 30 sekund. Po centrifugaci byl opatrně slit supernatant a mikrozkušavka byla znovu centrifugována. Vzniklý supernatant byl odpipetován sterilní špičkou. Bylo přidáno 300 µl rozbíjecího pufru a sediment v něm byla rozsuspendována a mírně zvortexována. Takto připravený roztok byl přenesen do rozbíjecí zkumavky, bylo přidáno 50 µl roztoku MD1 a následně byla rozbíjecí zkumavka 10 minut vortexována při maximální rychlosti na horizontálním vortexu. Poté byly rozbíjecí zkumavky umístěny do centrifugy na 30 sekund při maximální rychlosti 14 000 otáček. Supernatant z rozbíjecí zkumavky (asi 350 µl) byl přenesen do čisté mikrozkušavky, a bylo k němu přidáno 100 µl MD2. Tato směs byla jemně zvortexována a inkubována 5 minut při teplotě 4 °C. Po inkubaci byla mikrozkušavka opět centrifugována a supernatant (asi 450 µl) byl opět přenesen do čisté mikrozkušavky. Do takto připravené mikrozkušavky bylo přidáno 900 µl roztoku MD3 a směs byla zvortexována. Poté bylo přeneseno do kolonky 700 µl takto vzniklého roztoku a kolonka byla centrifugována. Přefiltrovaný roztok byl odstraněn a zbytek z původní směsi byl přenesen do kolonky, která byla znovu centrifugována. Přefiltrovaný roztok byl opět odstraněn, do kolonky bylo přidáno 300 µl roztoku MD4 a kolonka byla opět centrifugována 30 s při 14 000 otáčkách. Přefiltrovaný roztok byl odstraněn a kolonka byla znovu centrifugována po dobu 1 minuty při 14 000 otáčkách. Po centrifugaci byla kolonka opatrně přenesena do čisté mikrozkušavky, do středu bílé membrány uvnitř kolonky bylo napipetováno 50 µl roztoku MD5 a následně znovu centrifugováno 30 s při 14 000 otáčkách. Posledním krokem bylo odstranění kolonky a DNA v mikrozkušavce byla připravena pro další aplikace. Vzorky DNA byly uchovány při teplotě - 20 °C.

5.2.10 Lyze plísňových buněk získaných kultivací v tekutém médiu

Kolonie plísní narostlé na tekutém YPD médiu byly sterilně odebrány do Eppendorfovy zkumavky a následně k nim bylo přidáno 500 µl lyzačního pufru. Takto připravené zkumavky byly vortexovány na horizontálním vortexu po dobu 20 minut a poté byly zcentrifugovány při 14 000 otáčkách po dobu 10 minut. Poté byl supernatant odebrán do čisté Eppendorfovy zkumavky. Takto připravené lyzáty byly připraveny pro následnou izolaci DNA.

5.2.11 Izolace DNA fenolovou extrakcí

K 500 µl lyzátu buněk bylo přidáno 500 µl směsi fenol:isoamylalkohol:chloroform. Směs byla kývavým pohybem míchána 4 minuty. Poté byla směs centrifugována 5 minut při 14 000 otáčkách. Po centrifugaci byla do čisté Eppendorfovy zkumavky odebrána vodná fáze obsahující DNA a postup byl opakován. Po centrifugaci byla opět odebrána vodná fáze a byla doplněna TE pufrům na objem 500 µl.

5.2.12 Srážení DNA ethanolem

Do zkumavky s vodnou fází a TE pufrům z fenolové extrakce bylo přidáno 20 µl 3 M octanu sodného a roztok byl lehce promíchán. Ke vzorku byl přidán 1 ml 96 % ethanolu, který byl vychlazen na - 20 °C. Směs byla promíchána a ponechána 20 minut při - 20 °C. Poté byly zkumavky zcentrifugovány při 14 000 ot·min⁻¹ po dobu 15 minut. Po centrifugaci byl odlit supernatant a vzniklý sediment DNA byl ponechán na vysušení v exsikátoru 15 minut. Po vysušení byl rozpuštěn ve 100 µl TE pufru. DNA byla uchována pro další použití při 4 °C.

5.2.13 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Stanovení bylo provedeno přístrojem NanoDrop 2000, kde byla proměřena absorbance izolované DNA v TE pufru oproti čistému pufru. Použitý objem byl 2 μl a optická délka byla 1 nm. Absorbance byla proměřena pro vlnové délky 230 nm – minimum absorbance pro DNA, 260 nm – maximum absorbance pro DNA. Z hodnot absorbancí pro vlnovou délku 260 nm byla určena koncentrace DNA ve vzorku.

5.2.14 PCR

Komponenty pro PCR, jejichž postup přípravy je uveden v kapitole 5.1.3 byly rozmrazeny, zvortexovány a mírně zcentrifugovány. Poté byla připravena směs o objemu 25 μl podle postupu uvedeném v tabulce 3.

Tabulka 3: Postup přípravy směsi pro PCR

Krok	Komponenty	Objem [μl]
1.	PCR voda	18,0
2.	10x reakční pufr kompletní	2,5
3.	Směs dNTP (10 mM)	0,5
4.	Primer č. 1 (10 μM)	1,0
5.	Primer č. 2 (10 μM)	1,0
6.	Taq – DNA polymeráza (1 U· μl^{-1})	1,0
7.	Matrice DNA	1,0
Celkem		25,0

Jako matrice DNA byla použita purifikovaná DNA z jednotlivých vzorků, která byla zředěna na jednotnou koncentraci 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Poté se připravila také negativní kontrola (kontrola kontaminace komponent), u které se místo DNA přidala PCR voda. Stejným způsobem byla připravena pozitivní kontrola (kontrola pečlivosti práce), kde bylo místo matrice DNA přidáno stejné množství DNA izolované z čistých kultur. Pro doménu *Bacteria* byla použita DNA z *Lactobacillus pentosus* CCM 4619, pro kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8191 a pro plísně *Aspergillus niger* CCM 8155 a *Fusarium avenaceum* CCM 8015.

5.2.14.1 Primery

Pro přípravu směsi pro PCR byly použity primery specifické pro doménu *Bacteria* (F_eub, R_eub), primery specifické pro kvasinky (Oli-F, Oli-R), specifické primery pro bakterie rodu *Escherichia* (coneaeAF, coneaeAR), *Bacillus* (B-K1F, B-K1R) a plísně *Aspergillus* (ASAP1, ASAP2) a *Fusarium* (TEF-fu3F, TEF-fu3R). Primery s uvedenými sekvencemi a velikostmi produktů jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Primery specifické pro doménu *Bacteria*, kvasinky, plísně a rodově specifické PCR

Primery	Sekvence primeru (5' - 3')	Velikost produktů PCR [bp]
Doména <i>Bacteria</i> [49]		
F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466
R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	
Doména kvasinky [50]		
Oli-F	CGT CAT AGA GGG TGA GAA TCC	152
Oli-R	ACT TGT TCG CTA TCG GTC TC	
Rod <i>Escherichia</i> [51]		
coneaeAF	GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC	384
coneaeAR	CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG	
Rod <i>Bacillus</i> [52]		
BK1F	TCACCAAGGCRACGATGCG	1100
BK1R	CGTATTCACCGCGGCATG	
Rod <i>Aspergillus</i> [53]		
ASAP1	CAGCGAGTACATCACCTTGG	521
ASAP2	CCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATT	
Rod <i>Fusarium</i> [54]		
TEF-Fu3f	GGTATCGACAAGCGAACCAT	420
TEF-Fu3r	TAGTAGCGGGGAGTCTCGAA	

5.2.14.2 Programy pro amplifikaci DNA

Byla provedena amplifikace izolované DNA. Programy pro amplifikaci DNA uvedené v tabulce 5 byly zvoleny podle vybraných primerů, které jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 5: Teplotní programy pro jednotlivé primery

Inciace	Denaturace DNA	Hybridizace primerů	Syntéza DNA	Terminace
Doména Bacteria				
95 °C/300 s	95 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/60 s	72 °C/300 s
	30 cyklů			
Doména kvasinky				
94 °C/300 s	94 °C/60 s	51 °C/30 s	72 °C/60 s	72 °C/300 s
	35 cyklů			
Rod Escherichia				
94 °C/300 s	94 °C/60 s	51 °C/30 s	72 °C/60 s	72 °C/300 s
	35 cyklů			
Rod Bacillus				
95 °C/300 s	95 °C/60 s	63 °C/60 s	72 °C/60 s	72 °C/300 s
	30 cyklů			
Rod Aspergillus				
94 °C/240 s	94 °C/60 s	55 °C/60 s	72 °C/90 s	72 °C/600 s
	30 cyklů			
Rod Fusarium				
94 °C/300 s	94 °C/60 s	58 °C/60 s	72 °C/60 s	72 °C/300 s
	40 cyklů			

5.2.15 Elektroforetická detekce PCR produktů

Byl připraven 1,6 % agarosový gel pro detekci amplikonů navážením 1,6 g agarosy a jejím rozpuštěním ve 100 ml 0,5 × TBE pufru. Suspenze byla rozvařena v mikrovlnné troubě. Po vychladnutí na teplotu cca 60 °C byla připravená suspenze promíchána a bylo do ní přidáno fluorescenční barvivo GoldView (1 µl barviva/100 ml), poté byla nalita do připravené formy. Gel se nechal tuhnout po dobu 1 hodiny. Do komůrek vzniklých po vyjmutí hřebínku byly napipetovány produkty z PCR smíchané s nanášecím pufrem Yeallow load (6x koncentrovaným) v poměru 5:1. Do jedné komůrky byl napipetován DNA standard (100 bp) o objemu 5 µl. Takto připravený gel byl přenesen do elektroforetické vany a přelit 0,5 x TBE pufrem do výšky cca 0,5 cm nad gel. Elektroforéza probíhala po dobu 1,5 hodiny při konstantním napětí 65 V. Po skončení elektroforézy byl gel vyhodnocen v transluminátoru pod UV světlem při vlnové délce 305 nm.

6 Výsledky a diskuze

6.1 Stanovení aktivních látek v extraktech z bylin a koření

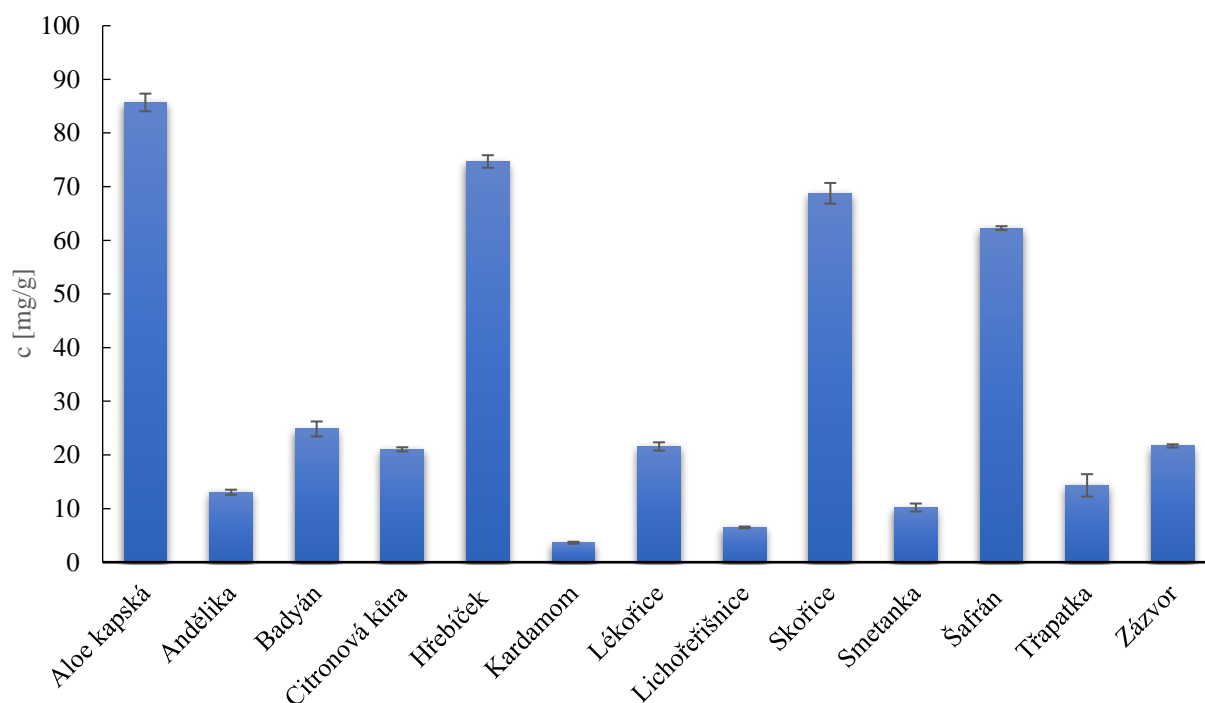
Byla provedena stanovení k charakterizaci aktivních látek v extraktech z bylin a koření konkrétně stanovení polyfenolů, flavonoidů, anthokyanů a jejich antioxidační aktivity.

6.1.1 Spektrofotometrické stanovení polyfenolů

Podle postupu 5.2.4.1 bylo provedeno celkové stanovení polyfenolů ve 13 ethanolových vzorcích připravených podle postupu 5.2.2. Každý vzorek byl proměřen třikrát. Z průměru výsledných absorbancí byla pomocí kalibrační křivky na obrázku 38 vypočítána celková koncentrace polyfenolů na 1 g vzorku. Výsledky stanovení s vypočtenými směrodatnými odchylkami jsou shrnuty v tabulce 6.

Tabulka 6: Obsah polyfenolů v testovaných extraktech

Vzorek	[mg/g]	Vzorek	[mg/g]
Aloe kapská	85,70±1,64	Lichořeřišnice	6,50±0,16
Andělíka	13,05±0,47	Skořice	68,76±1,93
Badyán	24,85±1,39	Smetanka	10,20±0,74
Citronová kůra	21,04±0,39	Šafrán	62,27±0,36
Hřebíček	74,70±1,17	Třesavka	14,32±2,09
Kardamom	3,63±0,19	Zázvor	21,68±0,30
Lékořice	21,58±0,77		



Obrázek 14: Množství polyfenolů v ethanolových extraktech

Z výsledných hodnot znázorněných na obrázku 14 je viditelné, že nejmenší obsah polyfenolů byl ve vzorku kardamomu a lichořeřišnice, kde byl obsah polyfenolů nižší než 10 mg/g. Naopak nejvyšší obsah polyfenolů vykazovaly extrakty z aloe, hřebíčku, skořice a šafránu, kde byl obsah polyfenolů vyšší než 60 mg/g.

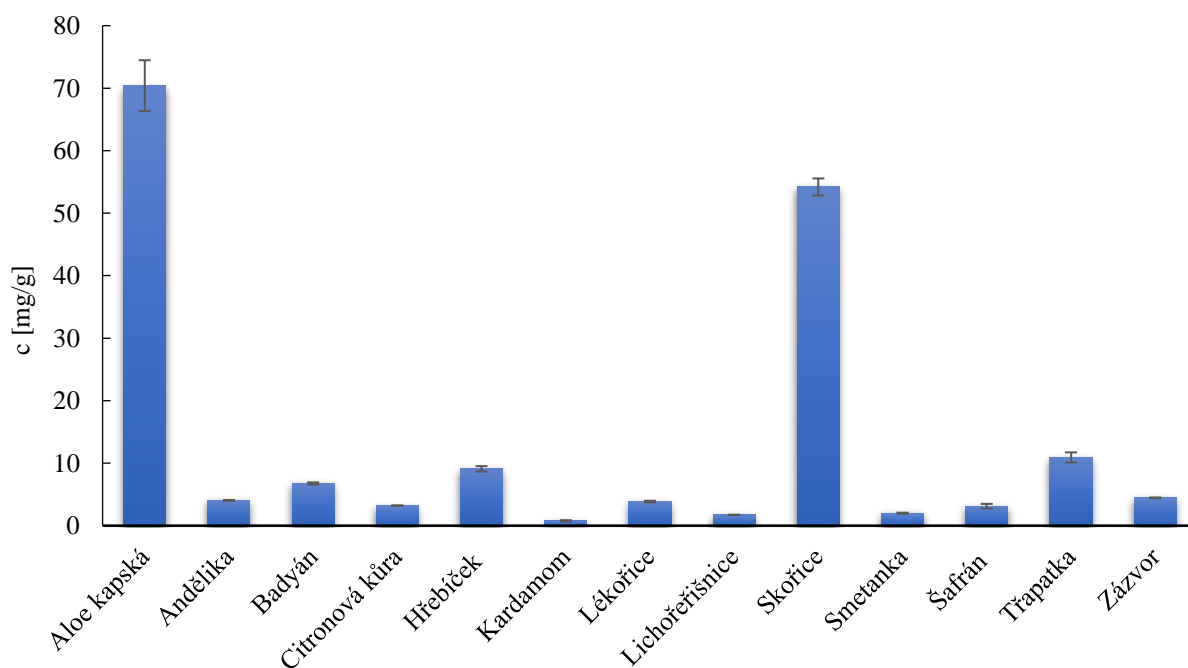
Obsahem polyfenolů v koření se zabývala studie vědců z Hong Kongu, kteří zjistili, že hřebíček vykazuje silnou antioxidační aktivitu a obsahuje velké množství polyfenolů. Analýzou na HPLC zjistili, že hřebíček obsahuje především fenolové kyseliny, flavonolové glykosidy, taniny a fenolové těkavé oleje (eugenol) a označili ho jako významný zdroj polyfenolů pro další aplikace [58].

6.1.2 Spektrofotometrické stanovení flavonoidů

Podle postupu 5.2.4.2 bylo provedeno celkové stanovení flavonoidů ve vzorcích. Každý vzorek byl proměřen třikrát. Z průměru výsledných absorbancí byla pomocí kalibrační křivky na obrázku 39 vypočítána celková koncentrace polyfenolů na 1 g vzorku. Výsledky stanovení s vypočtenými směrodatnými odchylkami jsou shrnuty v tabulce 7.

Tabulka 7: Obsah flavonoidů v testovaných extraktech

Vzorek	[mg/g]	Vzorek	[mg/g]
Aloe kapská	70,41±4,06	Lichořeřišnice	1,73±0,02
Andělíka	4,04±0,03	Skořice	54,19±1,37
Badyán	6,75±0,17	Smetanka	2,00±0,08
Citronová kůra	3,20±0,01	Šafrán	3,10±0,38
Hřebíček	9,10±0,43	Třesavka	10,92±0,81
Kardamom	0,76±0,11	Zázvor	4,45±0,06
Lékořice	3,86±0,12		



Obrázek 15: Množství flavonoidů v ethanolových extraktech

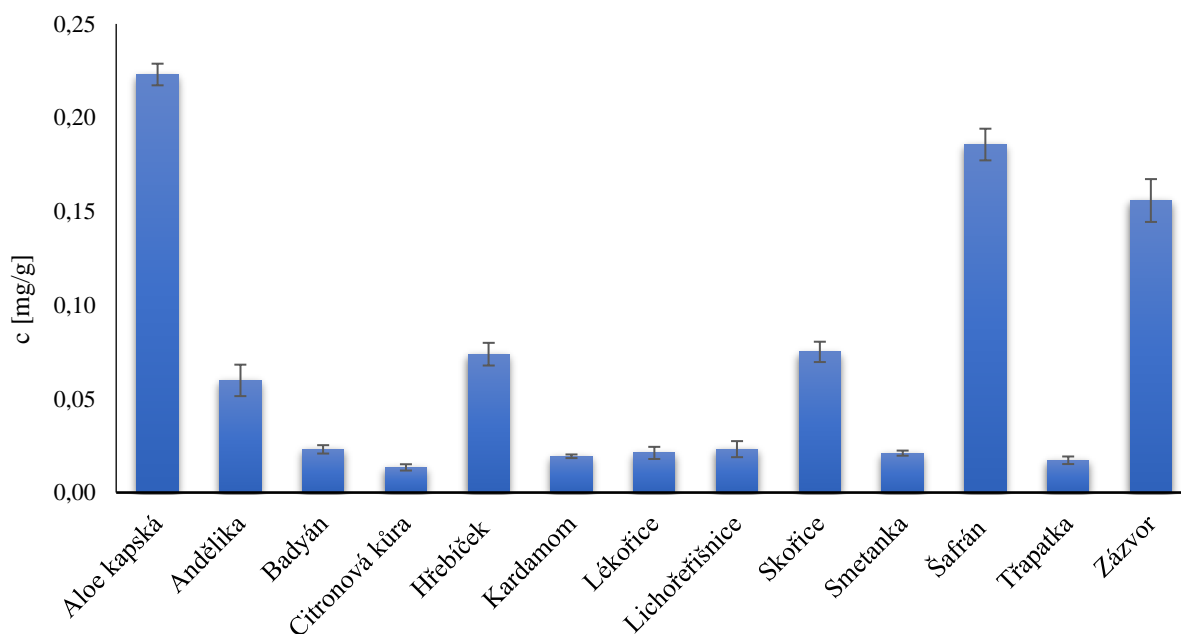
Z výsledných hodnot znázorněných na obrázku 15 je patrné, že nejnižší obsah flavonoidů byl stanoven v extraktech z kardamomu, lichořeřišnice a smetanky, kde byla koncentrace nižší než 2 mg/g. Naopak nejvyšší obsah flavonoidů vykazovaly extrakty z aloe a skořice, kde koncentrace přesáhla hodnotu 50 mg/g.

6.1.3 Spektrofotometrické stanovení anthokyanů

Podle postupu 5.2.4.3 bylo provedeno celkové stanovení anthokyanů ve vzorcích. Každý vzorek byl proměřen třikrát. Z průměru výsledných absorbancí byla pomocí rovnice lineární regrese kalibrační křivky ($A = 60,3368 \times [\mu\text{g/ml}]$), vypočítána celková koncentrace anthokyanů na 1 g vzorku. Kalibrační křivka byla převzata z pracovního sešitu ze skript Praktikum z biochemie. Výsledky stanovení s vypočtenými směrodatnými odchylkami jsou shrnuty v tabulce 8.

Tabulka 8: Obsah anthokyanů v testovaných extraktech

Vzorek	[mg/g]	Vzorek	[mg/g]
Aloe kapská	0,22±0,01	Lichořeřišnice	0,02±0,00
Andělíka	0,06±0,01	Skořice	0,08±0,00
Badyán	0,02±0,02	Smetanka	0,02±0,00
Citronová kůra	0,02±0,00	Šafrán	0,19±0,01
Hřebíček	0,07±0,01	Třesavka	0,02±0,00
Kardamom	0,02±0,00	Zázvor	0,16±0,01
Lékořice	0,02±0,00		



Obrázek 16: Množství anthokyanů v ethanolových extraktech

Anthokyaniny jsou rostlinná barviva, která se nacházejí především v čerstvém, barevném ovoci a zelenině, avšak v nižších koncentracích se mohou nacházet i v sušených plodech nebo kořeni. Jejich zbarvení se pohybuje od žluté, oranžové po modrou až fialovou barvu.

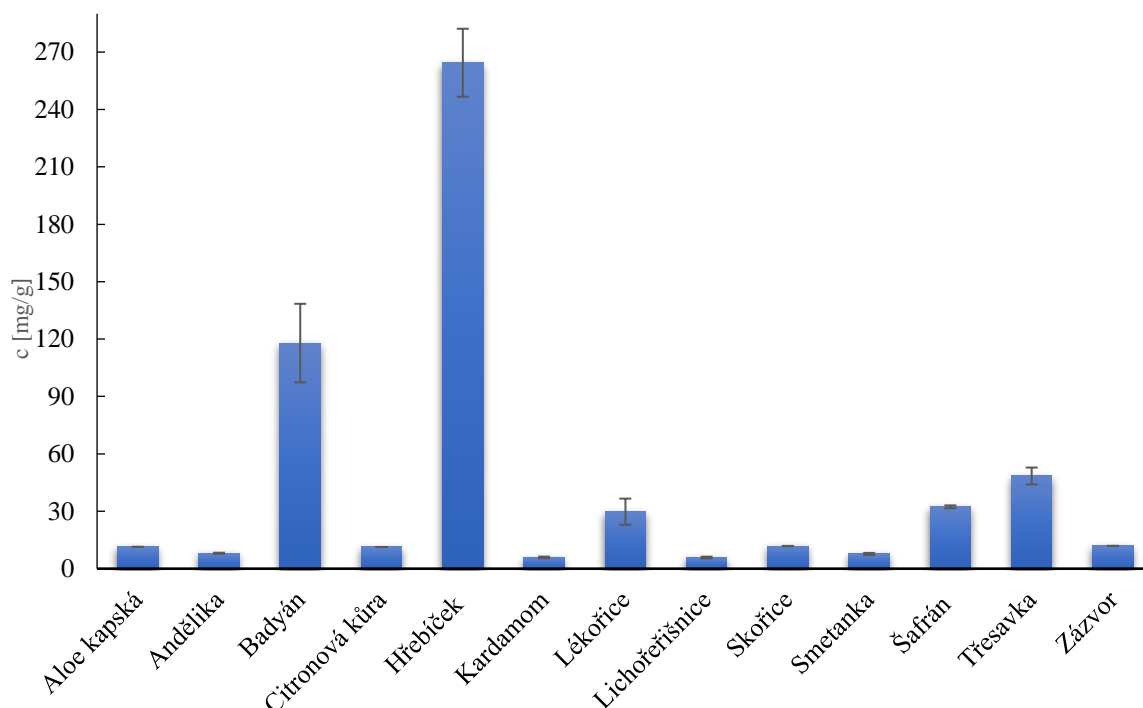
Z výsledných hodnot na obrázku 16 je patrné, že nejnižší obsah anthokyanů byl stanoven v extraktech z citronové kůry, kde byla koncentrace anthokyanů nižší než 0,02 mg/g. Naopak nejvyšší obsah anthokyanů vykazovaly extrakty z aloe, jehož extrakt byl velmi silně zabarvený, šafránu a zázvoru, jejichž extrakty vykazovaly jasně žlutou až oranžovou barvu. Koncentrace u těchto vzorků se pohybovaly v koncentračním rozmezí 0,1 – 0,3 mg/g.

6.1.4 Stanovení antioxidační aktivity

Podle postupu 5.2.4.4 bylo provedeno celkové stanovení antioxidační aktivity ve vzorcích. Každý vzorek byl proměřen třikrát. Z průměru výsledných absorbancí byla pomocí kalibrační křivky na obrázku 40 vypočítána celková antioxidační aktivita na 1 g vzorku. Výsledná antioxidační aktivita je vyjádřena v ekvivalentech Troloxu, který byl použit jako standard. Výsledky stanovení s vypočtenými směrodatnými odchylkami jsou shrnuty v tabulce 9.

Tabulka 9: Antioxidační aktivita testovaných extraktů

Vzorek	[mg/g]	Vzorek	[mg/g]
Aloe kapská	11,38±0,07	Lichořeřišnice	5,82±0,44
Andělíka	8,06±0,28	Skořice	11,82±0,07
Badyán	117,91±20,52	Smetanka	7,68±0,55
Citronová kůra	11,35±0,02	Šafrán	32,34±0,73
Hřebíček	264,43±17,77	Třesavka	48,45±4,41
Kardamom	5,87±0,44	Zázvor	11,90±0,04
Lékořice	29,77±6,84		



Obrázek 17: Antioxidační aktivita ethanolových extraktů

Z výsledných hodnot, které znázorňuje obrázek 17 je patrné, že nejnižší antioxidační aktivitu vykazovaly extrakty z kardamomu a lichořeřišnice, kde byla stanovena hodnota antioxidační aktivity nižší než 0,6 mg/g. Naopak nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval extrakt z hřebíčku, kde byla stanovena koncentrace 264 mg/g vzorku.

Antioxidační aktivitou hřebíčku a kardamomu se zabývala studie vědců ze Saudské Arábie, kteří porovnávali jejich účinky. Kardamom a hřebíček byly extrahovány v diethyletheru, destilované vodě a ethanolu. Bylo zjištěno, že ethanolový extrakt z hřebíčku má významně vyšší antioxidační aktivitu než ethanolový extrakt z kardamomu. Ethanolový extrakt hřebíčku také vykazoval vyšší úbytek volných radikálů než ostatní testované extrakty [59].

6.2 Antimikrobiální testy

Pro stanovení antimikrobiální účinnosti ethanolových extraktů z koření a bylin byly použity dva druhy antimikrobiálních testů – difúzní a diluční metoda, jejichž postupy jsou popsány v kapitolách 5.2.5.1 a 5.2.5.2. Antimikrobiální vlastnosti extraktů byly testovány na gramnegativní kmen bakterií *Escherichia coli*, grampozitivní kmen bakterií *Micrococcus luteus* a na kvasinku *Candida glabrata*. Výsledky byly pro přehlednost zpracovány pro každý mikroorganismus zvlášť.

6.2.1 Antimikrobiální účinek extraktů na *Escherichia coli*

Gramnegativní bakterie *Escherichia coli* byla podrobena testování ethanolových extraktů z bylin a koření na antimikrobiální účinky. Jako blank byl použit 40 % etanol. Výsledky jamkového testu jsou shrnuty v tabulce 10. V případě, že došlo k vytvoření inhibiční zóny, zóna byla změřena a fotograficky zdokumentována. Na obrázku 18 je znázorněn příklad inhibiční zóny hřebíčku.

Tabulka 10: Velikosti inhibičních zón extraktů – *Escherichia coli*

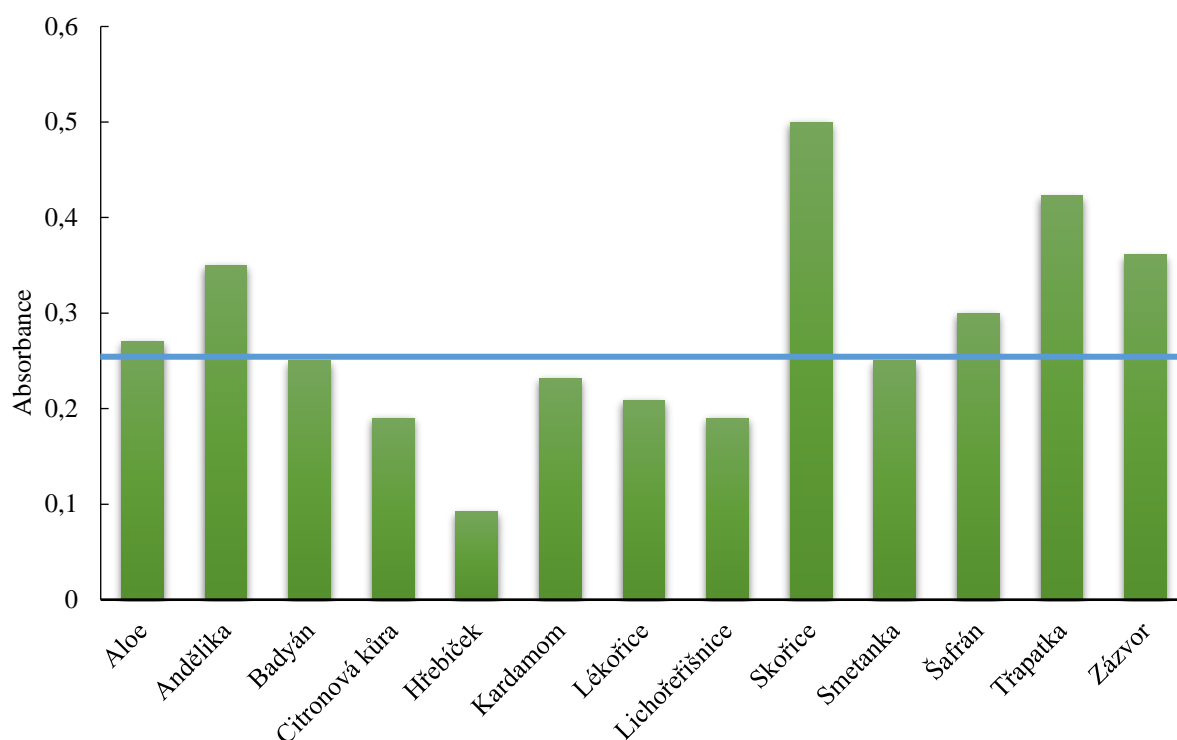
Extrakt	Inhibiční zóna [mm]	Extrakt	Inhibiční zóna [mm]
Aloe kapská	0	Lichořeřišnice	0
Andělíka	0	Skořice	0
Badyán	0	Smetanka	0
Citronová kůra	0	Šafrán	0
Hřebíček	2	Třapatka	0
Kardamom	0	Zázvor	0
Lékořice	0	Blank	0



Obrázek 18: Inhibiční zóna hřebíčku

Ze získaných výsledků v tabulce 10 bylo zjištěno, že inhibiční zóna se vytvořila pouze u extraktu z hřebíčku. Studium antimikrobiálních vlastností hřebíčku a kardamomu proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím se zabývala studie vědců ze Saudské Arábie. Bylo zjištěno, že ethanolový extrakt hřebíčku vykazuje vysokou antimikrobiální aktivitu proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím [59].

Dále byla antimikrobiální účinnost testována diluční metodou měřením zákalu při 630 nm podle postupu v kapitole 5.2.5.2. Na obrázku 19 jsou zobrazeny výsledky testování extraktů na gramnegativní kmen *Escherichia coli*. Modrá vodorovná čára na obrázku znázorňuje počáteční koncentraci bakterií (100 %), z toho vyplývá, že hodnoty absorbancí, které dosahují nejnižší pod tuto hranici mají nejvyšší antimikrobiální účinnost a naopak. Bylo zjištěno, že nejvyšší antimikrobiální účinnost proti *Escherichia coli* má extrakt z hřebíčku (účinnost 65%), dále extrakt z citronové kůry, lékořice a lichořeřišnice (účinnost 20–30%) a také kardamomu (12%).



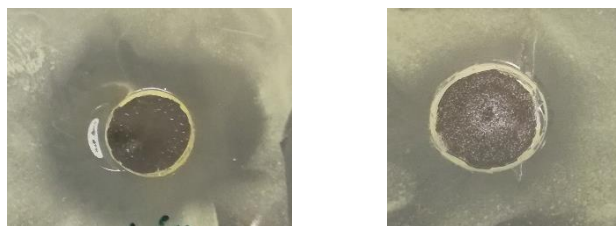
Obrázek 19: Antimikrobiální diluční test – *Escherichia coli*

6.2.2 Antimikrobiální účinek extraktů na *Micrococcus luteus*

Grampozitivní bakterie *Micrococcus luteus* byla podrobena testování ethanolových extraktů z bylin a koření na antimikrobiální účinky. Jako blank byl použit 40 % etanol. Výsledky jamkového testu jsou shrnuty v tabulce 11. V případě, že došlo k vytvoření inhibiční zóny, zóna byla změřena a fotograficky zdokumentována. Na obrázku 20 je znázorněn příklad inhibičních zón lékořice a andělíky.

Tabulka 11: Velikosti inhibičních zón extraktů – *Micrococcus luteus*

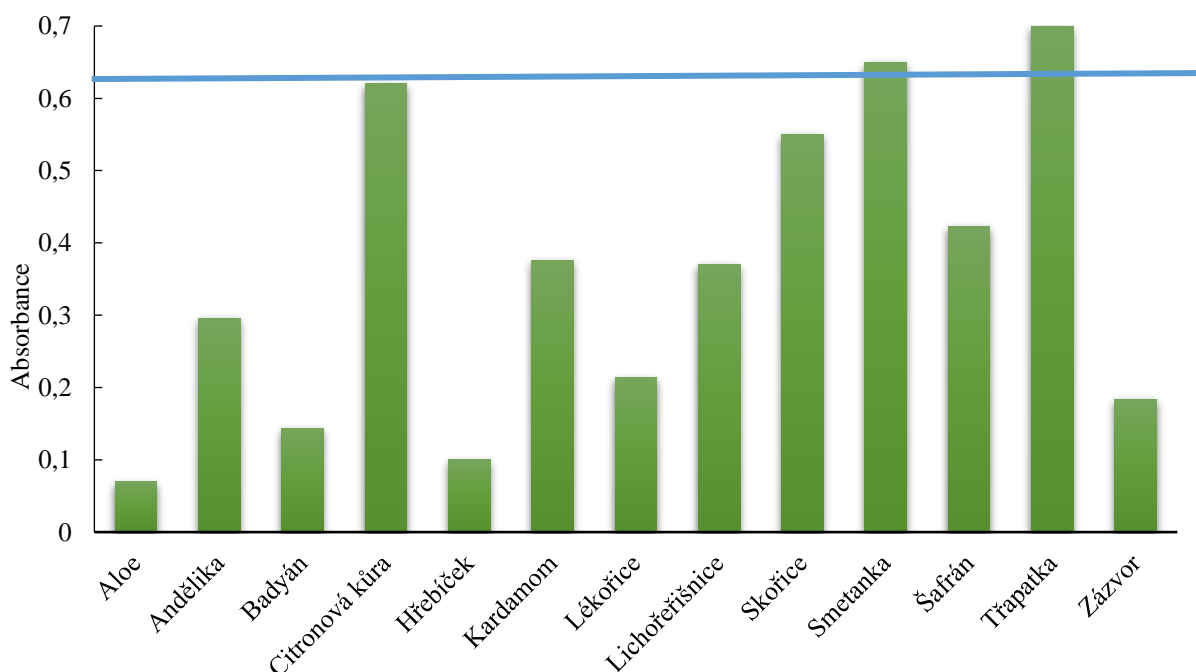
Extrakt	Inhibiční zóna [mm]	Extrakt	Inhibiční zóna [mm]
Aloe kapská	7	Lichořeřišnice	4
Andělíka	2,5	Skořice	3
Badyán	3	Smetanka	0
Citronová kůra	0	Šafrán	3
Hřebíček	5	Třapatka	1
Kardamom	1	Zázvor	0,5
Lékořice	7	Blank	0



Obrázek 20: Inhibiční zóny lékořice a andělíky

Ze získaných výsledků v tabulce 11 bylo zjištěno, že největší inhibiční zóny se vytvořily u extraktů z aloe, lékořice, hřebíčku, lichořeřišnice, skořice, šafránu, třapatky, kardamomu, badyánu a zázvoru. U extraktů z citronové kůry a smetanky nebyla inhibiční zóna detekována. Studium antimikrobiálních účinků gelových extraktů z aloe proti gramnegativním a grampozitivním bakteriím se zabývala studie vědců z Malajsie a Bangladéše. Bylo zjištěno, že aloe má velmi dobré antimikrobiální účinky proti grampozitivním patogenním bakteriím rodu *Staphylococcus* [60].

Dále byla antimikrobiální účinnost testována diluční metodou měřením zákalu při 630 nm podle postupu v kapitole 5.2.5.2. Na obrázku 21 jsou zobrazeny výsledky testování extraktů na grampozitivní kmen *Micrococcus luteus*. Modrá vodorovná čára na obrázku opět znázorňuje počáteční koncentraci bakterií (100%), z toho vyplývá, že hodnoty absorbancí, které dosahují nejnižší pod tuto hranici mají nejvyšší antimikrobiální účinnost a naopak. Bylo zjištěno, že všechny extrakty vykazovaly antimikrobiální účinky. Nejvyšší antimikrobiální účinnost proti *Micrococcus luteus* byla zjištěna u extraktu z aloe, hřebíčku a lékořice a zázvoru (účinnost 70–90%).



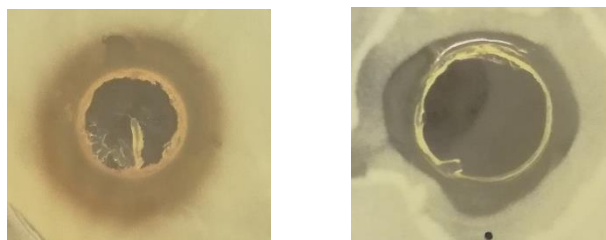
Obrázek 21: Antimikrobiální diluční test – *Micrococcus luteus*

6.2.3 Antimikrobiální účinek extraktů na kvasinku *Candida glabrata*

Kvasinka *Candida glabrata* byla podrobena testování ethanolových extraktů z bylin a koření na antimikrobiální účinky. Jako blank byl použit 40 % etanol. Výsledky jamkového testu jsou shrnuty v tabulce 12. V případě, že došlo k vytvoření inhibiční zóny, zóna byla změřena a fotograficky zdokumentována. Na obrázku 22 je znázorněn příklad inhibičních zón lékořice a hřebíčku.

Tabulka 12: Velikosti inhibičních zón extraktů – *Candida glabrata*

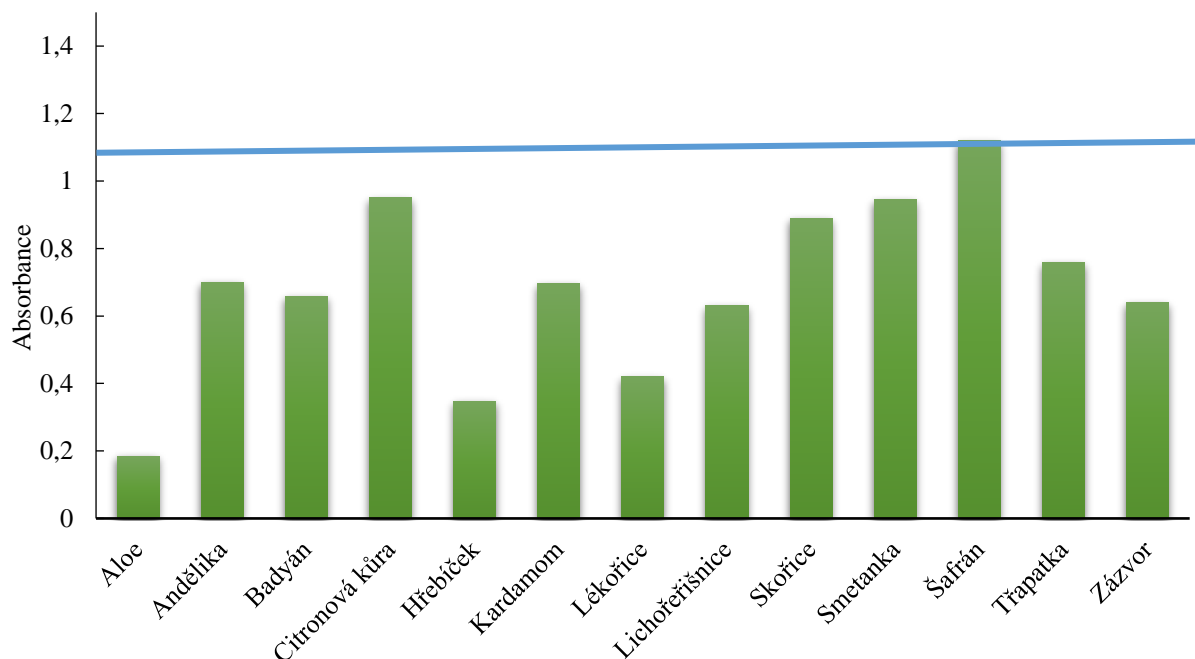
Extrakt	Inhibiční zóna [mm]	Extrakt	Inhibiční zóna [mm]
Aloe kapská	4	Lichořeřišnice	2
Andělíka	0	Skořice	0
Badyán	1	Smetanka	2
Citronová kůra	0	Šafrán	0
Hřebíček	4	Třapatka	0
Kardamom	1	Zázvor	1,5
Lékořice	2	Blank	0



Obrázek 22: Inhibiční zóny hřebíčku a lékořice

Ze získaných výsledků v tabulce 12 bylo zjištěno, že největší inhibiční zóny se vytvořily opět u extraktu z hřebíčku, dále u aloe, lékořice, lichořeřišnice, smetanky, kardamomu, badyánu a zázvoru. U extraktů z citronové kůry, andělíky, skořice, šafránu a třapatky nebyla inhibiční zóna detekována.

Dále byla antimikrobiální účinnost testována diluční metodou měřením zákalu při 630 nm podle postupu v kapitole 5.2.5.2. Na obrázku 23 jsou zobrazeny výsledky testování extraktů na kvasinku *Candida glabrata*. Modrá vodorovná čára na obrázku opět znázorňuje počáteční koncentraci bakterií (100%), z toho vyplývá, že hodnoty absorbancí, které dosahují nejnižší pod tuto hranici mají nejvyšší antimikrobiální účinnost a naopak. Bylo zjištěno, že všechny extrakty kromě šafránu vykazovaly antimikrobiální účinky. Nejvyšší antimikrobiální účinnost byla zjištěna u extraktu z aloe, hřebíčku (účinnost 70–90%), dále u lékořice, lichořeřišnice a zázvoru (40%).



Obrázek 23: Antimikrobiální diluční test – *Candida glabrata*

6.3 Stanovení mikrobiální kontaminace potravin

Na základě výsledků z předchozích stanovení byly podle postupu v kapitole 5.2.3 připraveny vzorky RAW produktů s přidavkem bylin a koření. Použité kombinace a množství znázorňuje tabulka 13.

Tabulka 13: Návrh kombinací bylin a koření přidanych do RAW výrobků

Vzorek	1.	Množství vzorku [g]	Vzorek	2.	Množství vzorku [g]
P1	RAW perník	20	H1	RAW hraběčiny řezy	20
P2	+ lékořice/lichořeřišnice	0,2:0,8	H2	+ badyán/lichořeřišnice	0,2:0,8
P3	+ lékořice/lichořeřišnice	0,8:0,2	H3	+ badyán/lichořeřišnice	0,8:0,2
P4	+ lékořice/aloe	0,2:0,8	H4	+ hřebíček/aloe	0,2:0,8
P5	+ lékořice/aloe	0,8:0,2	H5	+ hřebíček/aloe	0,8:0,2
P6	+ zázvor/andělíka	0,2:0,8	H6	+ lékořice/zázvor	0,2:0,8
P7	+ zázvor/andělíka	0,8:0,2	H7	+ lékořice/zázvor	0,8:0,2

6.3.1 Testování doby mikrobiální nezávadnosti výrobku

Podle postupu v kapitole 5.2.6.1 byla provedena kultivace z naředěných vzorků po dobu pěti dnů na dva druhy pevných médií. Očkování byla provedena ve dvou ředěních 10^{-3} a 10^{-5} , každé po třech opakováních. Vyhodnocené misky byly zprůměrovány a výsledky jsou uvedeny v tabulkách 16 a 17.

Při sledování mikrobiální kontaminace vzorků bylo zjištěno, že tyto typy výrobků mohou být potencionálně rizikové, z toho důvodu, že již druhý den po zakoupení výrobku byl zaznamenán mírný růst mikroorganismů na TSA i YPD médiu. Rychlejší růst mikroorganismů může být způsoben vyšším obsahem sacharidů obsažených ve výrobcích, které jsou vhodným substrátem pro růst bakterií, kvasinek i plísní. Dalším potenciálním faktorem, který mohl zapříčinit zrychlený nárůst mikroorganismů, byl, že zakoupené dezerty byly skladovány ve větraných chlazených vitrínách a nebyly baleny v žádném ochranném obalu, který by zamezil kontaminaci z okolí. Raw výrobky v dnešní době zatím nejsou ošetřeny legislativními předpisy, proto je složité určit limit počtu mikroorganismů, které se ve výrobcích mohou nacházet a tím stanovit dobu trvanlivosti. Limitní hodnoty pro obsah mikroorganismů v potravinách určuje Vyhláška č. 132/2004 Sb. o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení. Pro naše účely testování tato vyhláška uvádí pouze limitní hodnoty celkového počtu mikroorganismů pro tepelně neošetřené ovocné a zeleninové šťávy a cukrářské výrobky, které jsou uvedeny v tabulkách 14 a 15 Pro semena a skořápkové plody uvádí legislativa pouze limity na obsah plísní (10^5) a bakterií *Escherichia coli* ($5 \cdot 10^2$). Pro sušené a proslazené ovoce jsou limitní hodnoty pro koliformní bakterie (10^3) a pro plísně (10^4).

Tabulka 14: Limitní hodnoty počtu mikroorganismů v tepelně neošetřených ovocných a zeleninových šťávách [61]

	Limitní hodnota
Celkový počet mikroorganismů	10^6
<i>Escherichia coli</i>	10^2
Kvasinky	$5 \cdot 10^4$

Tabulka 15: Limitní hodnoty pro počet mikroorganismů v cukrářských výrobcích [61]

	Limitní hodnota
Celkový počet mikroorganismů	10^6
Koliformní bakterie	10^3
Koagulázopozitivní stafylokoky	10^2
Kvasinky	$5 \cdot 10^4$

Vzhledem k tomu, že v testovaných dezertech jsou obsažena syrová jablka, skořápkové plody a semena, lze se orientačně řídit limitními hodnotami, jež udává legislativa, avšak pouze hodnotou celkového počtu mikroorganismů. Kvantitativní stanovení výskytu koliformních bakterií, *Escherichia coli* nebo koagulázopozitivních stafylokoků by mohlo být předmětem dalšího testování na specifických agarových půdách.

Bylo zjištěno, že u obou testovaných raw dezertů bez příměsí kombinací antimikrobiálních látek došlo k mírnému nárůstu mikroorganismů již druhý den po zakoupení. Dezerty byly mikrobiálně sledovány po dobu pěti dnů, pokud bychom vztáhli výsledné hodnoty na limity

uvedené v legislativě, již čtvrtý den vykazovaly oba dezerty limitní hodnoty pro obsah mikroorganismů. Zrychlený růst mikroorganismů u těchto produktů mohl být také způsoben přítomností syrových jablek, která se řadí mezi neúdržné potraviny a snadno podléhají kažení. Důležitou roli hraje také absence tepelného ošetření, které by značně zpomalilo růst mikroorganismů v těchto potravinách.

Potenciální antimikrobiální účinky ve vzorcích raw perníku byly zjištěny u vzorků P2, P5 a P7, kde se růst mikroorganismů prokazatelně zpomalil na TSA i YPD médiu, což je uvedeno v tabulce 16. Slabší účinky byly zjištěny u vzorků P3, P4 a P6. U vzorků P2 a P3 bylo zjištěno, že kombinace s vyšším obsahem lichořeřišnice byla účinnější pro potlačení růstu bakterií, kvasinek a plísní než kombinace s vyšším obsahem lékořice. Naopak u vzorků P4 a P5 byla výhodnější kombinace s vyšším obsahem lékořice a nižším obsahem aloe. Domnívám se, že lékořice v kombinaci s aloe, mohla mít, v tomto případě, lepší synergistický účinek, než tatáž kombinace s lichořeřišnicí. U vzorků P6 a P7 bylo zjištěno, že kombinace s vyšším obsahem zázvoru má lepší antimikrobiální vlastnosti na bakterie, kvasinky i plísně než kombinace s vyšším obsahem anděliky.

V případě vzorků z raw hraběčniných řezů bylo zaznamenáno, že potenciální antimikrobiální účinky vykazovaly vzorky H3, H4, H5, H6 a H7, a to především proti bakteriím. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 17. U těchto vzorků došlo na druhý den po zakoupení k mírnému nárůstu bakterií, avšak další dny kultivací došlo k potlačení růstu nebo úplné inhibici vlivem obsažených antibakteriálních látek. Většina přírodních antimikrobiálních látek působí mechanismem, který poškozují buněčnou stěnu viz. kapitola 2.9.1. a antimikrobiální účinek není okamžitý jako např. u syntetických antibiotik. Domnívám se, že zpomalený nebo zcela inhibovaný růst mikroorganismů u těchto vzorků v dalších dnech kultivace, mohl být způsoben opožděným antimikrobiálním účinkem látek. Jediným vzorkem, který nevykazoval prokazatelný antimikrobiální účinek byl vzorek H2, který obsahoval kombinaci badyánu a lichořeřišnice viz. Tabulka 13.

Tabulka 16: Shrnutí růstu buněk naředěných vzorků z RAW perniku na selektivních pevných médiích TSA a YPD

Den					Den					Den				
1.	Vzorek	Ředění	TSA	YPD	2.	Vzorek	Ředění	TSA	YPD	3.	Vzorek	Ředění	TSA	YPD
	P1	10 ⁻³	—	—		P1	10 ⁻³	++	++		P1	10 ⁻³	+++	+++
		10 ⁻⁵	—	—			10 ⁻⁵	—	—			10 ⁻⁵	+	—
	P2	10 ⁻³	—	—		P2	10 ⁻³	++	++		P2	10 ⁻³	++	+
		10 ⁻⁵	—	—			10 ⁻⁵	—	—			10 ⁻⁵	+	—
	P3	10 ⁻³	—	—		P3	10 ⁻³	++	—		P3	10 ⁻³	+++	+
		10 ⁻⁵	—	—			10 ⁻⁵	—	—			10 ⁻⁵	—	—
	P4	10 ⁻³	—	—		P4	10 ⁻³	++	++		P4	10 ⁻³	++	+
		10 ⁻⁵	—	—			10 ⁻⁵	—	—			10 ⁻⁵	+	—
	P5	10 ⁻³	—	—		P5	10 ⁻³	—	—		P5	10 ⁻³	++	+
		10 ⁻⁵	—	—			10 ⁻⁵	—	—			10 ⁻⁵	—	—
	P6	10 ⁻³	—	—		P6	10 ⁻³	++	+		P6	10 ⁻³	+++	+
		10 ⁻⁵	—	—			10 ⁻⁵	+	—			10 ⁻⁵	+	—
	P7	10 ⁻³	—	—		P7	10 ⁻³	—	+		P7	10 ⁻³	++	+
		10 ⁻⁵	—	—			10 ⁻⁵	—	—			10 ⁻⁵	+	—
4.										5.				
	Vzorek	Ředění	TSA	YPD	<p>(Pozn. Symbol – odpovídá <math><100\text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}</math> (bez růstu mikroorganismů), + odpovídá <math>10^2\text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}</math> (nepatrný růst mikroorganismů), ++ odpovídá <math>10^4\text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}</math> (mírný růst mikroorganismů), +++ odpovídá <math>10^5\text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}</math> (silný růst mikroorganismů), +++++ odpovídá <math>10^6\text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}</math> (masivní růst mikroorganismů), symbol C odpovídá <math>10^8\text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}</math> (povrch pokrytý mikroorganismy))</p>	Vzorek	Ředění	TSA	YPD					
		P1	10 ⁻³	++++			+++	P1	10 ⁻³	C	C			
	10 ⁻⁵		+++	++		10 ⁻⁵	++++		+++					
	P2	10 ⁻³	++	++		P2	10 ⁻³	C	+++					
		10 ⁻⁵	++	+			10 ⁻⁵	++++	+					
	P3	10 ⁻³	+++	++		P3	10 ⁻³	C	C					
		10 ⁻⁵	++	—			10 ⁻⁵	+++	+					
	P4	10 ⁻³	++	+		P4	10 ⁻³	++++	++					
		10 ⁻⁵	++	—			10 ⁻⁵	++	+					
	P5	10 ⁻³	++	++		P5	10 ⁻³	+++	+++					
		10 ⁻⁵	+	—			10 ⁻⁵	++	+					
	P6	10 ⁻³	+++	+++		P6	10 ⁻³	C	C					
		10 ⁻⁵	++	+			10 ⁻⁵	++++	+++					
	P7	10 ⁻³	++	+++		P7	10 ⁻³	C	+++					
10 ⁻⁵		+	+	10 ⁻⁵	++++		++							

Tabulka 17: Shrnutí růstu buněk naředěných vzorků z RAW hraběčnických řezů na selektivních pevných médiích TSA a YPD

Den					Den					Den				
1.	Vzorek	Ředění	TSA	YPD	2.	Vzorek	Ředění	TSA	YPD	3.	Vzorek	Ředění	TSA	YPD
	H1	10^{-3}	—	—		H1	10^{-3}	++	++		H1	10^{-3}	+++	+++
		10^{-5}	—	—			10^{-5}	—	—			10^{-5}	—	+
	H2	10^{-3}	—	—		H2	10^{-3}	++	—		H2	10^{-3}	++	+
		10^{-5}	—	—			10^{-5}	—	—			10^{-5}	—	—
	H3	10^{-3}	—	—		H3	10^{-3}	++	—		H3	10^{-3}	+	+
		10^{-5}	—	—			10^{-5}	—	—			10^{-5}	—	—
	H4	10^{-3}	—	—		H4	10^{-3}	++	+		H4	10^{-3}	++	—
		10^{-5}	—	—			10^{-5}	+	—			10^{-5}	—	—
	H5	10^{-3}	—	—		H5	10^{-3}	—	+		H5	10^{-3}	+	+
		10^{-5}	—	—			10^{-5}	—	—			10^{-5}	—	—
	H6	10^{-3}	—	—		H6	10^{-3}	++	—		H6	10^{-3}	+	+
		10^{-5}	—	—			10^{-5}	+	—			10^{-5}	—	—
	H7	10^{-3}	—	—		H7	10^{-3}	++	+		H7	10^{-3}	+	++
		10^{-5}	—	—			10^{-5}	—	—			10^{-5}	—	—
4.										5.				
	Vzorek	Ředění	TSA	YPD							Vzorek	Ředění	TSA	YPD
		H1	10^{-3}	++++								++++	H1	10^{-3}
	10^{-5}		++	++							10^{-5}	++++		++++
	H2	10^{-3}	++++	+++							H2	10^{-3}	C	C
		10^{-5}	++	+								10^{-5}	++++	+++
	H3	10^{-3}	—	++							H3	10^{-3}	—	+++
		10^{-5}	—	—								10^{-5}	—	—
	H4	10^{-3}	—	++							H4	10^{-3}	+	++
		10^{-5}	—	—								10^{-5}	—	—
	H5	10^{-3}	—	++							H5	10^{-3}	—	++
		10^{-5}	—	—								10^{-5}	—	—
	H6	10^{-3}	+	+++							H6	10^{-3}	+	C
		10^{-5}	—	—								10^{-5}	—	+++
	H7	10^{-3}	—	+++							H7	10^{-3}	—	C
10^{-5}		—	+	10^{-5}	—	++++								

(Pozn. Symbol – odpovídá $<100 \text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ (bez růstu mikroorganismů), + odpovídá $10^2 \text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ (nepatrný růst mikroorganismů), ++ odpovídá $10^4 \text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ (mírný růst mikroorganismů), +++ odpovídá $10^5 \text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ (silný růst mikroorganismů), ++++ odpovídá $10^6 \text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ (masivní růst mikroorganismů), symbol C odpovídá $10^8 \text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ (povrch pokrytý mikroorganismy))

6.4 Izolace DNA

Podle postupu v kapitole 5.2.9 byla komerčním kitem izolována bakteriální a kvasinková DNA. Dále byly připraveny hrubé lyzáty ze vzorků plísní podle postupu v kapitole 5.2.10, DNA z nich byla izolována fenolovou extrakcí dle postupu 5.2.11 a následně přesrážena ethanolem podle 5.2.12. Koncentrace a čistota DNA byla stanovena spektrofotometricky.

6.4.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované bakteriální DNA

K měření koncentrace a čistoty DNA byl použit přístroj NanoDrop 2000, na kterém byla proměřena absorbance všech vzorků DNA v rozsahu 220–320 nm. Poměr absorbancí $A_{260/280 \text{ nm}}$ znázorňuje možná znečištění proteiny případně jinými látkami a měl by ideálně splňovat optimální rozmezí 1,8 – 2,0. U vzorků jejichž hodnoty absorbancí se nacházejí pod touto hranicí je velká pravděpodobnost, že byly znečištěny proteiny. Naopak hodnoty vyšší, než je optimální rozmezí naznačují, že byl vzorek znečištěn RNA.

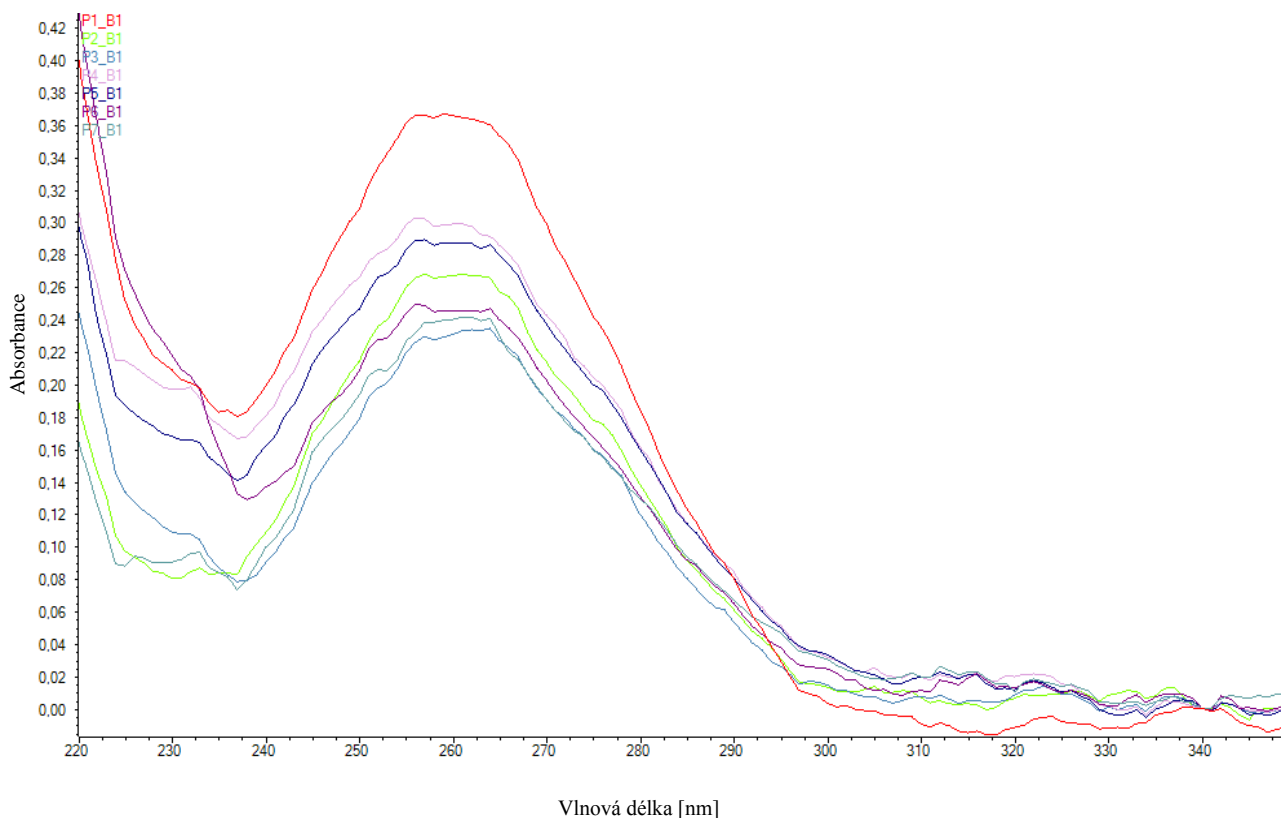
Naměřené hodnoty absorbancí a koncentrace DNA ze vzorků odebraných z 1. dne jsou uvedeny v tabulce 18. Spektrofotometrické křivky absorbancí během měření jsou uvedeny na obrázcích 24 a 25. Hodnoty absorbancí a koncentrace DNA ze vzorků odebraných z 5. dne znázorňuje tabulka 19. Spektrofotometrické křivky absorbancí v průběhu měření jsou uvedeny na obrázcích 26 a 27. Poměr absorbancí $A_{260/280 \text{ nm}}$ se u většiny vzorků pohyboval mezi optimálními hodnotami (1,8–2,0), to naznačuje, že izolace komerčním kitem poskytla velmi čisté vzorky DNA.

Tabulka 18: Spektrofotometrické stanovení bakteriální DNA izolované komerčním kitem ze vzorků odebraných z 1. dne

Vzorek	$A_{260 \text{ nm}}$	$A_{280 \text{ nm}}$	$A_{260/280 \text{ nm}}$	CDNA [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]
P1/B1	0,366	0,184	1,98	18,3
P2/B1	0,267	0,139	1,93	13,4
P3/B1	0,231	0,120	1,93	11,5
P4/B1	0,299	0,161	1,85	14,9
P5/B1	0,287	0,160	1,79	14,4
P6/B1	0,246	0,131	1,88	12,3
P7/B1	0,240	0,129	1,86	12,0
H1/B1	0,366	0,194	1,88	18,3
H2/B1	0,257	0,138	1,87	12,9
H3/B1	0,337	0,182	1,85	16,9
H4/B1	0,227	0,125	1,82	11,3
H5/B1	0,183	0,090	2,02	9,1
H6/B1	0,272	0,142	1,92	13,6
H7/B1	0,226	0,110	2,05	11,3

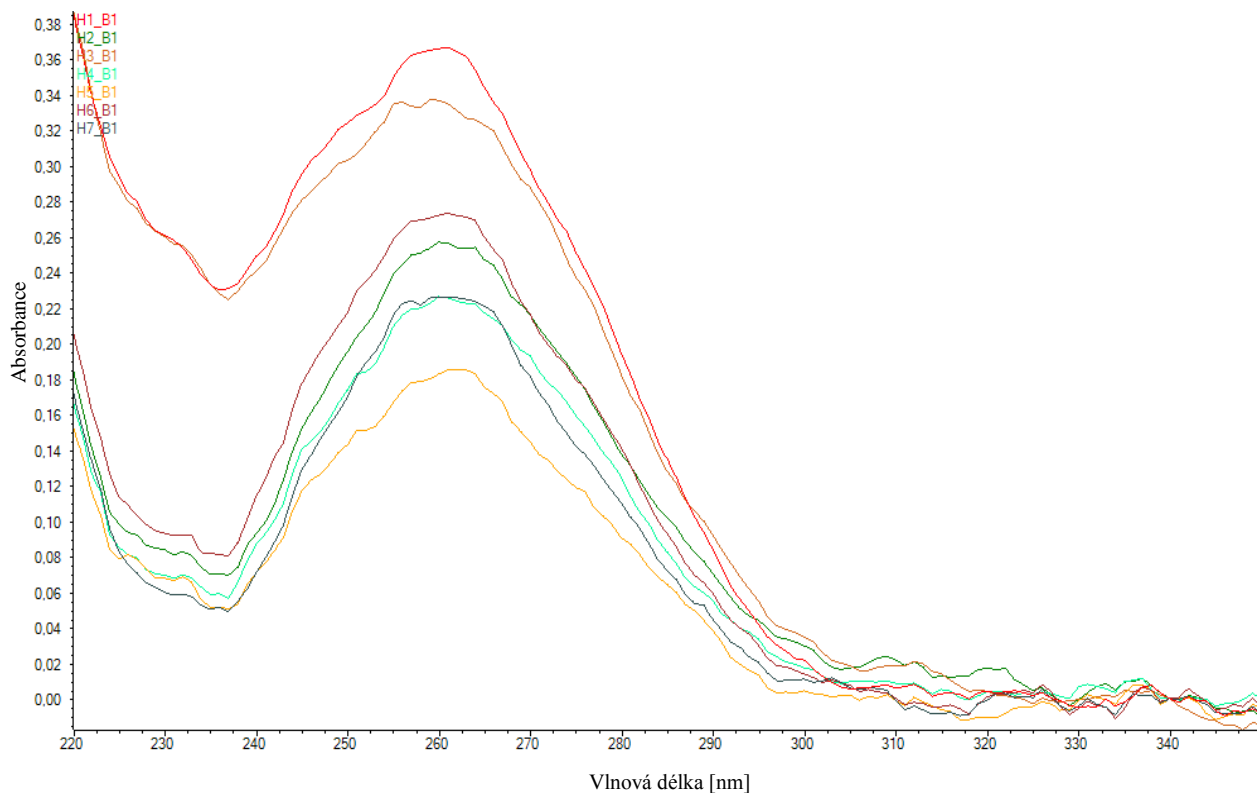
Pozn. P1 – raw perník bez příměsi, P2 – lékořice/lichořeřišnice (0,2:0,8 g), P3 – lékořice/lichořeřišnice (0,8:0,2 g), P4 – lékořice/aloë (0,2:0,8 g), P5 – lékořice/aloë (0,8:0,2 g), P6 – zázvor/andělíka (0,2:0,8 g), P7 – zázvor/andělíka (0,8:0,2 g), H1 – raw hraběňčiny řezy bez příměsi, H2 – badyán/lichořeřišnice (0,2:0,8 g), H3 – badyán/lichořeřišnice (0,8:0,2 g), H4 – hřebíček/aloë (0,2:0,8 g), H5 – hřebíček/aloë (0,8:0,2 g), H6 – lékořice/zázvor (0,2:0,8 g), H7 – lékořice/zázvor (0,8:0,2 g)

Obrázek 24: Absorpční spektrum bakteriální DNA vzorků raw perníku odebraných z 1. dne



Bakteriální DNA ze vzorků raw perníku odebraných z 1. dne byla izolovaná v různých koncentracích. Nejvyšší koncentrace DNA byla změřena u raw perníku bez příměsi (vzorek P1), stanovená koncentrace byla $18,3 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Hodnoty koncentrací ostatních vzorků s přidanými kombinacemi bylin se pohybovali v rozmezí $12,0\text{--}14,9 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

Obrázek 25: Absorpční spektrum bakteriální DNA vzorků raw hraběčinyých řezů odebraných z 1. dne



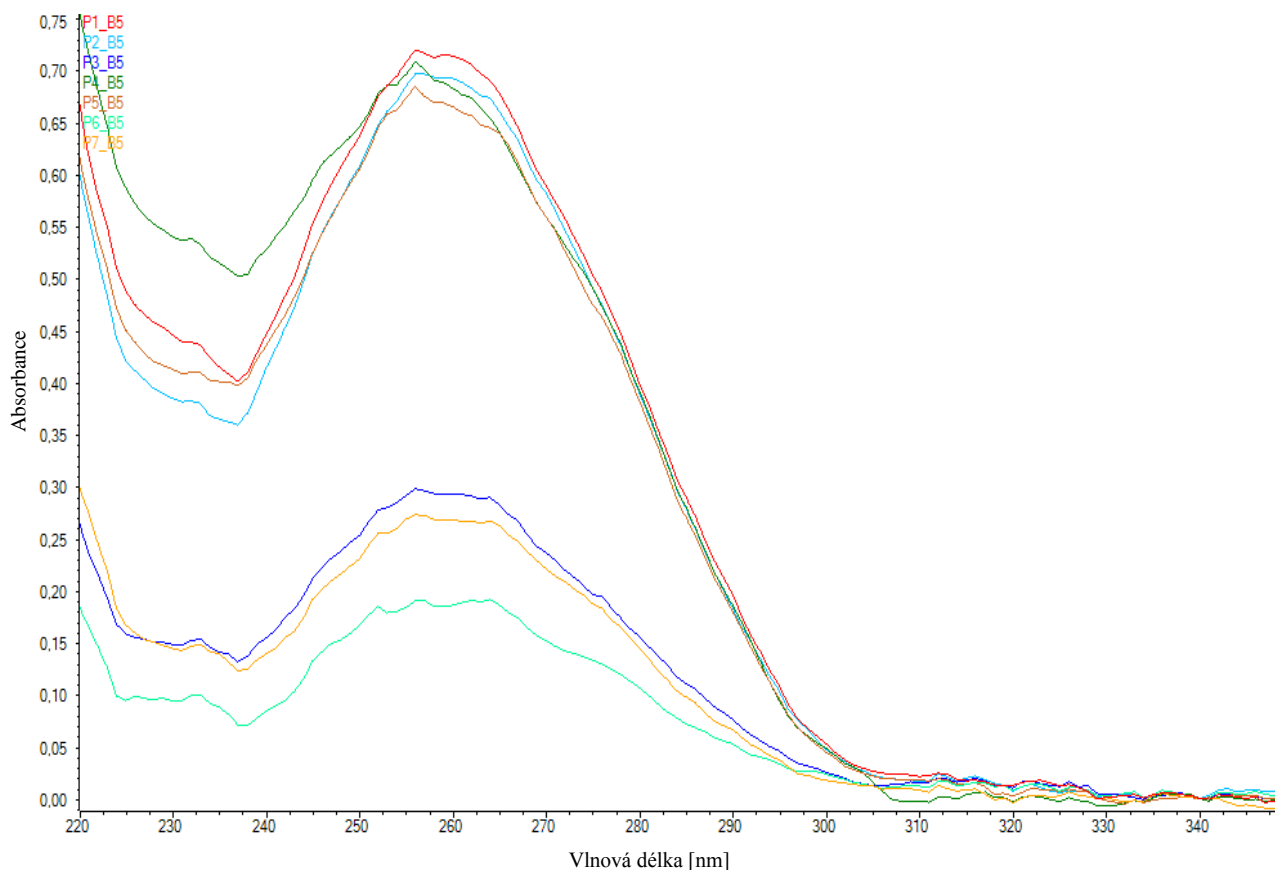
Bakteriální DNA ze vzorků raw hraběčinyých řezů odebraných z 1. dne byla izolovaná v různých koncentracích. Nejvyšší koncentrace DNA byla změřena u raw hraběčinyých řezů bez příměsi (vzorek H1), stanovená koncentrace byla $18,3 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Hodnoty koncentrací ostatních vzorků s přidávanými kombinacemi bylin se pohybovali v rozmezí $9,1\text{--}16,9 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

Tabulka 19: Spektrofotometrické stanovení bakteriální DNA izolované komerčním kitem ze vzorků odebraných z 5. dne

Vzorek	$A_{260 \text{ nm}}$	$A_{280 \text{ nm}}$	$A_{260/280 \text{ nm}}$	CDNA [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]
P1/B5	0,715	0,400	1,79	35,7
P2/B5	0,693	0,391	1,77	34,7
P3/B5	0,293	0,156	1,88	14,6
P4/B5	0,684	0,393	1,74	34,2
P5/B5	0,666	0,384	1,74	33,3
P6/B5	0,186	0,107	1,74	9,3
P7/B5	0,268	0,145	1,85	13,4
H1/B5	0,282	0,157	1,79	14,1
H2/B5	0,309	0,175	1,77	15,5
H3/B5	0,853	0,473	1,80	42,6
H4/B5	0,259	0,141	1,84	13,0
H5/B5	0,310	0,176	1,76	15,5
H6/B5	0,291	0,151	1,93	14,5
H7/B5	0,224	0,122	1,83	11,2

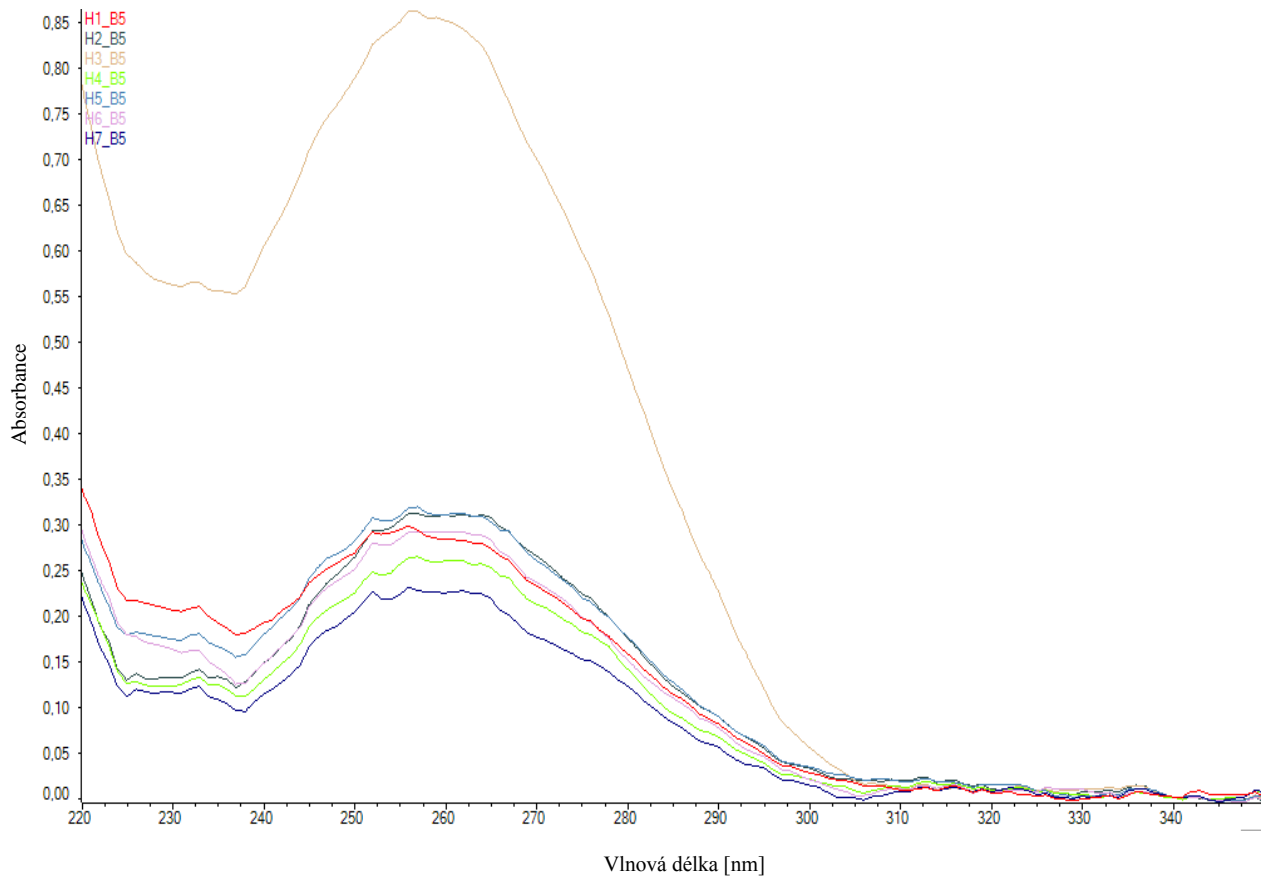
Pozn. P1 – raw perník bez příměsí, P2 – lékořice/lichořeřišnice (0,2:0,8 g), P3 – lékořice/lichořeřišnice (0,8:0,2 g), P4 – lékořice/aloë (0,2:0,8 g), P5 – lékořice/aloë (0,8:0,2 g), P6 – zázvor/andělíka (0,2:0,8 g), P7 – zázvor/andělíka (0,8:0,2 g), H1 – raw hraběňčiny řezy bez příměsí, H2 – badyán/lichořeřišnice (0,2:0,8 g), H3 – badyán/lichořeřišnice (0,8:0,2 g), H4 – hřebíček/aloë (0,2:0,8 g), H5 – hřebíček/aloë (0,8:0,2 g), H6 – lékořice/zázvor (0,2:0,8 g), H7 – lékořice/zázvor (0,8:0,2 g)

Obrázek 26: Absorpční spektrum bakteriální DNA vzorků raw perníku odebraných z 5. dne



Bakteriální DNA ze vzorků raw perníku odebraných z 5. dne byla izolovaná v různých koncentracích. Nejvyšší koncentrace DNA byla změřena u raw perníku bez příměsí (vzorek P1), stanovená koncentrace byla $35,7 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Hodnoty koncentrací ostatních vzorků s přidávanými kombinacemi bylin se pohybovali v rozmezí $9,3\text{--}34,7 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

Obrázek 27: Absorpční spektrum bakteriální DNA vzorků raw hraběčniných řezů odebraných z 5. dne



Bakteriální DNA ze vzorků raw hraběčniných řezů odebraných z 5. dne byla izolovaná v různých koncentracích. Nejvyšší koncentrace DNA byla změřena u raw hraběčniných řezů s kombinací bylin a koření badyán/lichořeřišnice (0,8:0,2 g), (vzorek H3), stanovená koncentrace byla $42,6 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Hodnoty koncentrací ostatních vzorků s přidáním kombinací bylin a vzorku bez příměsí se pohybovali v rozmezí $11,2\text{--}15,5 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

6.4.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované kvasinkové DNA

K měření koncentrace a čistoty DNA byl použit přístroj NanoDrop 2000, na kterém byla proměřena absorbance DNA v rozsahu 220–320 nm. Poměr vlnových délek $A_{260/280}$ nm znázorňuje možná znečištění proteiny případně jinými látkami.

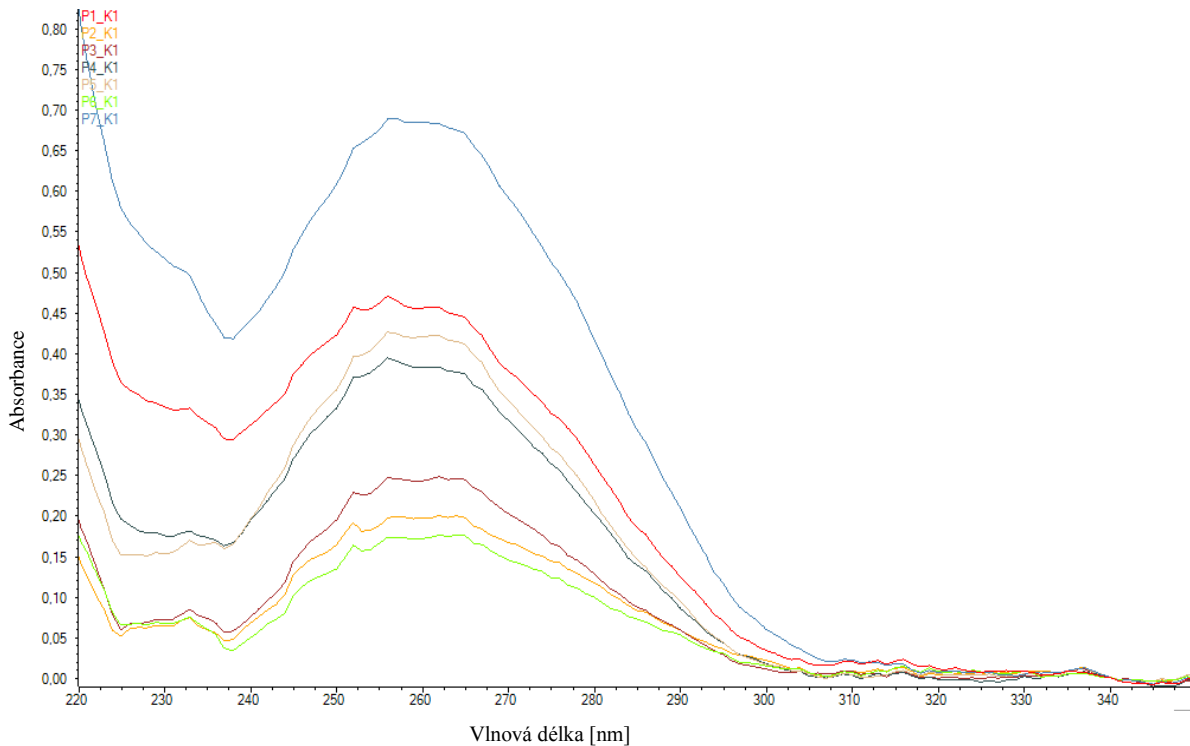
Naměřené hodnoty absorbancí a koncentrace DNA ze vzorků odebraných z 1. dne jsou uvedeny v tabulce 20. Spektrofotometrické křivky absorbancí během měření jsou uvedeny na obrázcích 28 a 29. Hodnoty absorbancí a koncentrace DNA ze vzorků odebraných z 5. dne znázorňuje tabulka 21. Spektrofotometrické křivky absorbancí v průběhu měření jsou uvedeny na obrázcích 30 a 31. Poměr absorbancí $A_{260/280}$ nm se u většiny vzorků odebraných z 1. dne pohyboval mezi optimálními hodnotami (1,8–2,0), to naznačuje, že izolace komerčním kitem poskytla velmi čisté vzorky DNA. Poměr absorbancí vzorků odebraných z 5. dne se pohyboval mírně pod optimálními hodnotami.

Tabulka 20: Spektrofotometrické stanovení kvasinkové DNA izolované komerčním kitem ze vzorků odebraných z 1. dne

Vzorek	A_{260} nm	A_{280} nm	$A_{260/280}$ nm	CDNA [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]
P1/K1	0,456	0,264	1,73	22,8
P2/K1	0,196	0,117	1,68	9,8
P3/K1	0,242	0,128	1,89	12,1
P4/K1	0,382	0,202	1,89	19,1
P5/K1	0,421	0,219	1,92	21,0
P6/K1	0,171	0,099	1,72	8,5
P7/K1	0,685	0,418	1,64	34,2
H1/K1	0,445	0,237	1,88	22,3
H2/K1	0,349	0,191	1,83	17,5
H3/K1	0,448	0,242	1,85	22,4
H4/K1	0,348	0,186	1,88	17,4
H5/K1	0,975	0,543	1,80	48,8
H6/K1	0,13	0,125	1,54	9,6
H7/K1	0,216	0,122	1,77	10,8

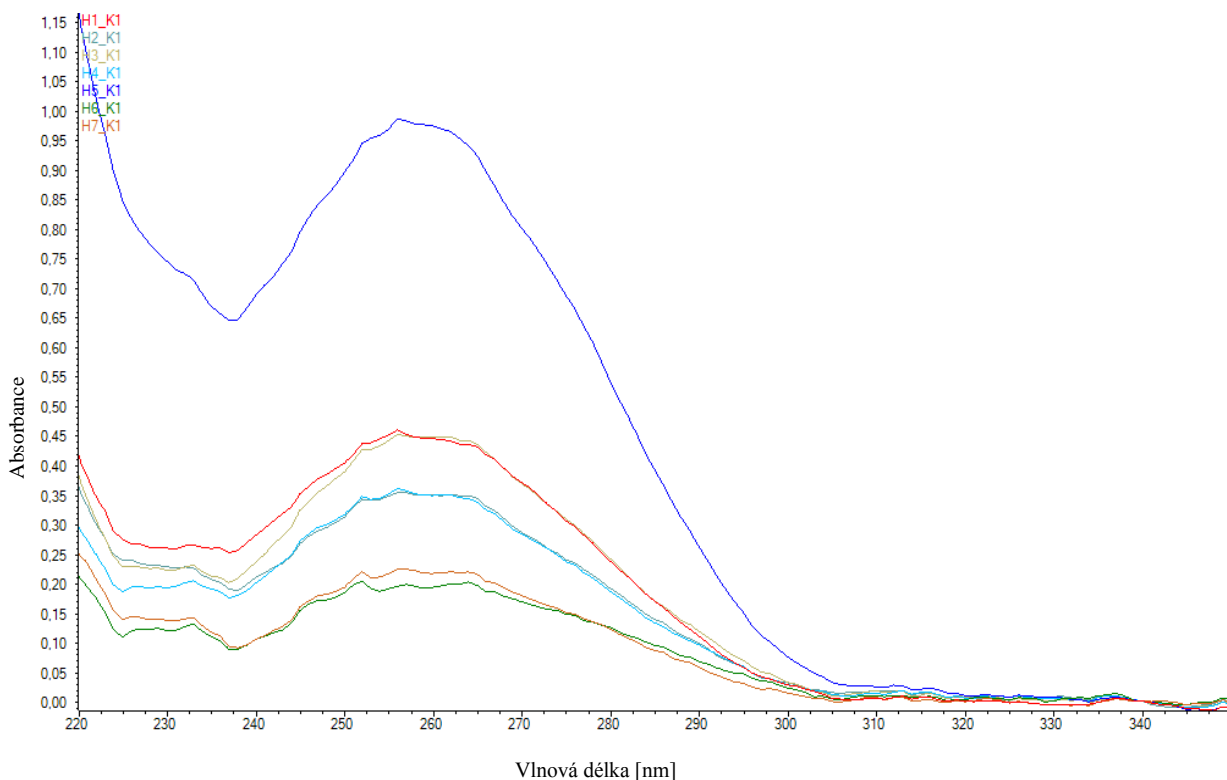
Pozn. P1 – raw perník bez příměsí, P2 – lékořice/lichořeřišnice (0,2:0,8 g), P3 – lékořice/lichořeřišnice (0,8:0,2 g), P4 – lékořice/aloë (0,2:0,8 g), P5 – lékořice/aloë (0,8:0,2 g), P6 – zázvor/andělíka (0,2:0,8 g), P7 – zázvor/andělíka (0,8:0,2 g), H1 – raw hraběčiny řezy bez příměsí, H2 – badyán/lichořeřišnice (0,2:0,8 g), H3 – badyán/lichořeřišnice (0,8:0,2 g), H4 – hřebíček/aloë (0,2:0,8 g), H5 – hřebíček/aloë (0,8:0,2 g), H6 – lékořice/zázvor (0,2:0,8 g), H7 – lékořice/zázvor (0,8:0,2 g)

Obrázek 28: Absorpční spektrum kvasinkové DNA ze vzorků raw perníku odebraných z 1. dne



Kvasinková DNA ze vzorků raw perníku odebraných z 1. dne byla izolovaná v různých koncentracích. Nejvyšší koncentrace DNA byla změřena u raw perníku s příměsí zázvor/andělíka (0,8:0,2 g), (vzorek P7), stanovená koncentrace byla $34,2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Hodnoty koncentrací ostatních vzorků s přidávanými kombinacemi bylin i bez příměsí se pohybovali v rozmezí $8,5\text{--}22,8 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

Obrázek 29: Absorpční spektrum kvasinkové DNA ze vzorků raw hraběčniných řezů odebraných z 1. dne



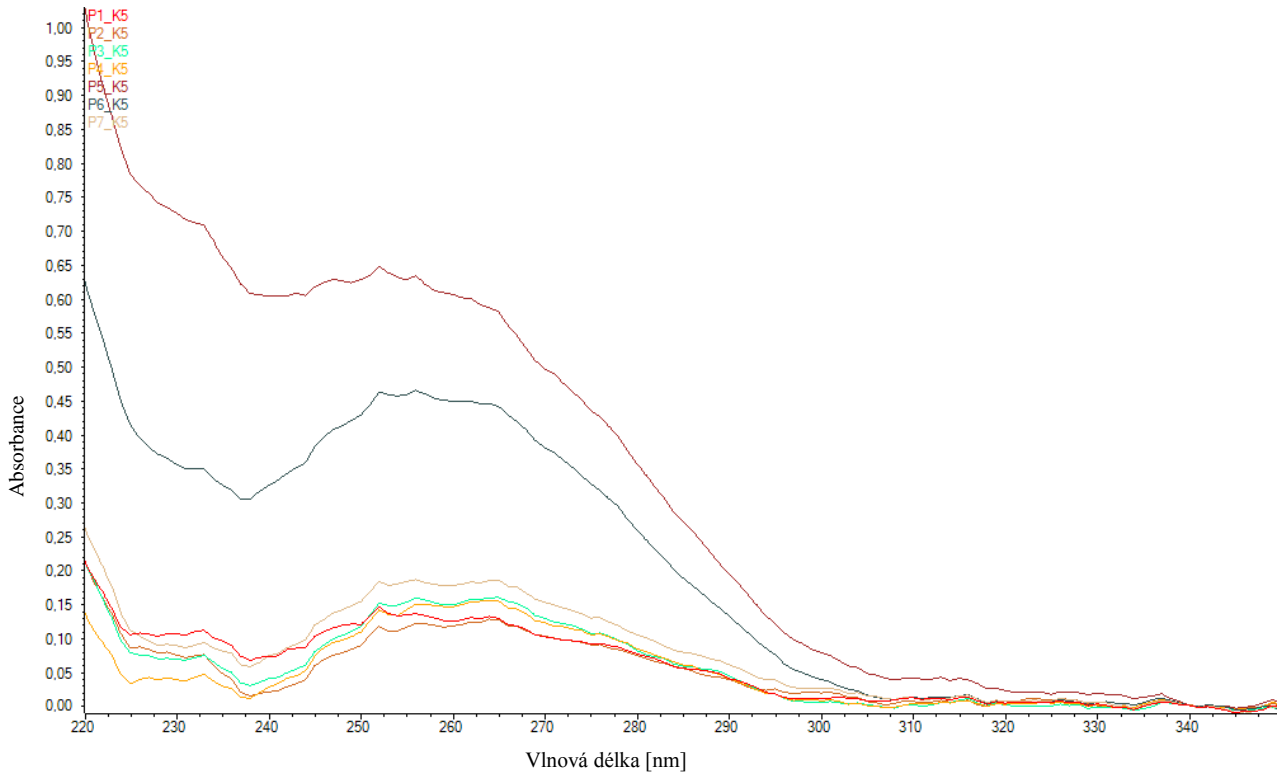
Kvasinková DNA ze vzorků raw hraběčniných řezů odebraných z 1. dne byla izolovaná v různých koncentracích. Nejvyšší koncentrace DNA byla změřena u raw hraběčniných řezů s příměsí hřebíček/aloé (0,8:0,2 g), (vzorek H5), stanovená koncentrace byla 48,8 ng·μl⁻¹. Hodnoty koncentrací ostatních vzorků s přidávanými kombinacemi bylin se pohybovali v rozmezí 9,6–22,4 ng·μl⁻¹.

Tabulka 21: Spektrofotometrické stanovení kvasinkové DNA izolované komerčním kitem ze vzorků odebraných z 5. dne

Vzorek	A _{260 nm}	A _{280 nm}	A _{260/280 nm}	CDNA [ng·μl ⁻¹]
P1/K5	0,124	0,076	1,63	6,2
P2/K5	0,117	0,074	1,59	5,9
P3/K5	0,148	0,081	1,83	7,4
P4/K5	0,145	0,083	1,74	7,3
P5/K5	0,606	0,357	1,70	30,3
P6/K5	0,449	0,259	1,73	22,4
P7/K5	0,177	0,104	1,70	8,8
H1/K5	0,561	0,327	1,72	28,0
H2/K5	0,151	0,087	1,73	7,6
H3/K5	0,257	0,148	1,73	12,9
H4/K5	0,466	0,286	1,63	23,3
H5/K5	0,176	0,109	1,62	8,8
H6/K5	0,140	0,089	1,58	7,0
H7/K5	0,404	0,242	1,67	20,2

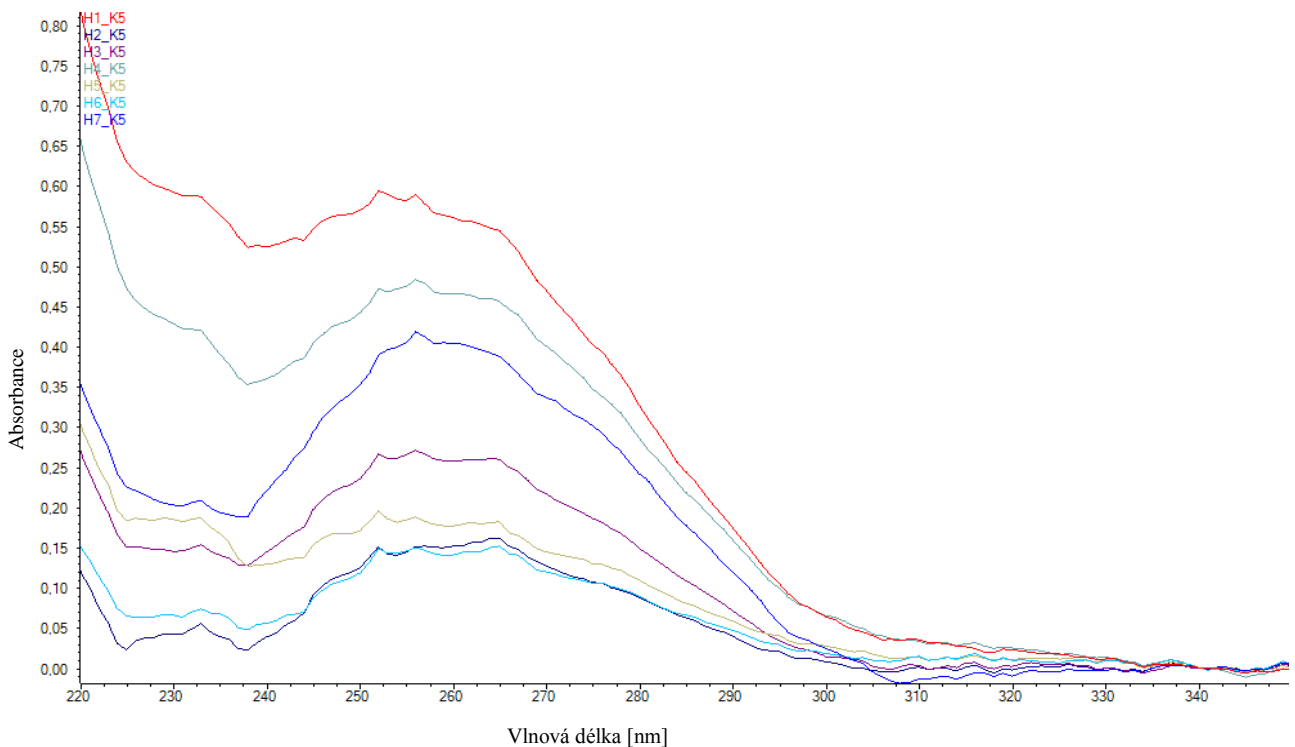
Pozn. P1 – raw perník bez příměsí, P2 – lékořice/lichořeřišnice (0,2:0,8 g), P3 – lékořice/lichořeřišnice (0,8:0,2 g), P4 – lékořice/aloé (0,2:0,8 g), P5 – lékořice/aloé (0,8:0,2 g), P6 – zázvor/andělka (0,2:0,8 g), P7 – zázvor/andělka (0,8:0,2 g), H1 – raw hraběčniny řezy bez příměsí, H2 – badyán/lichořeřišnice (0,2:0,8 g), H3 – badyán/lichořeřišnice (0,8:0,2 g), H4 – hřebíček/aloé (0,2:0,8 g), H5 – hřebíček/aloé (0,8:0,2 g), H6 – lékořice/zázvor (0,2:0,8 g), H7 – lékořice/zázvor (0,8:0,2 g)

Obrázek 30: Absorpční spektrum kvasinkové DNA ze vzorků raw perníku odebraných z 5. dne



Kvasinková DNA ze vzorků raw perníku odebraných z 5. dne byla izolovaná v různých koncentracích. Nejvyšší koncentrace DNA byla změřena u raw perníku s příměsí lékořice/aloë (0,8:0,2 g), (vzorek P5), stanovená koncentrace byla $30,3 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Hodnoty koncentrací ostatních vzorků s přidávanými kombinacemi i bez příměsí bylin a koření se pohybovali v rozmezí $5,9\text{--}22,4 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

Obrázek 31: Absorpční spektrum kvasinkové DNA ze vzorků raw hraběčniných řezů odebraných z 5. dne

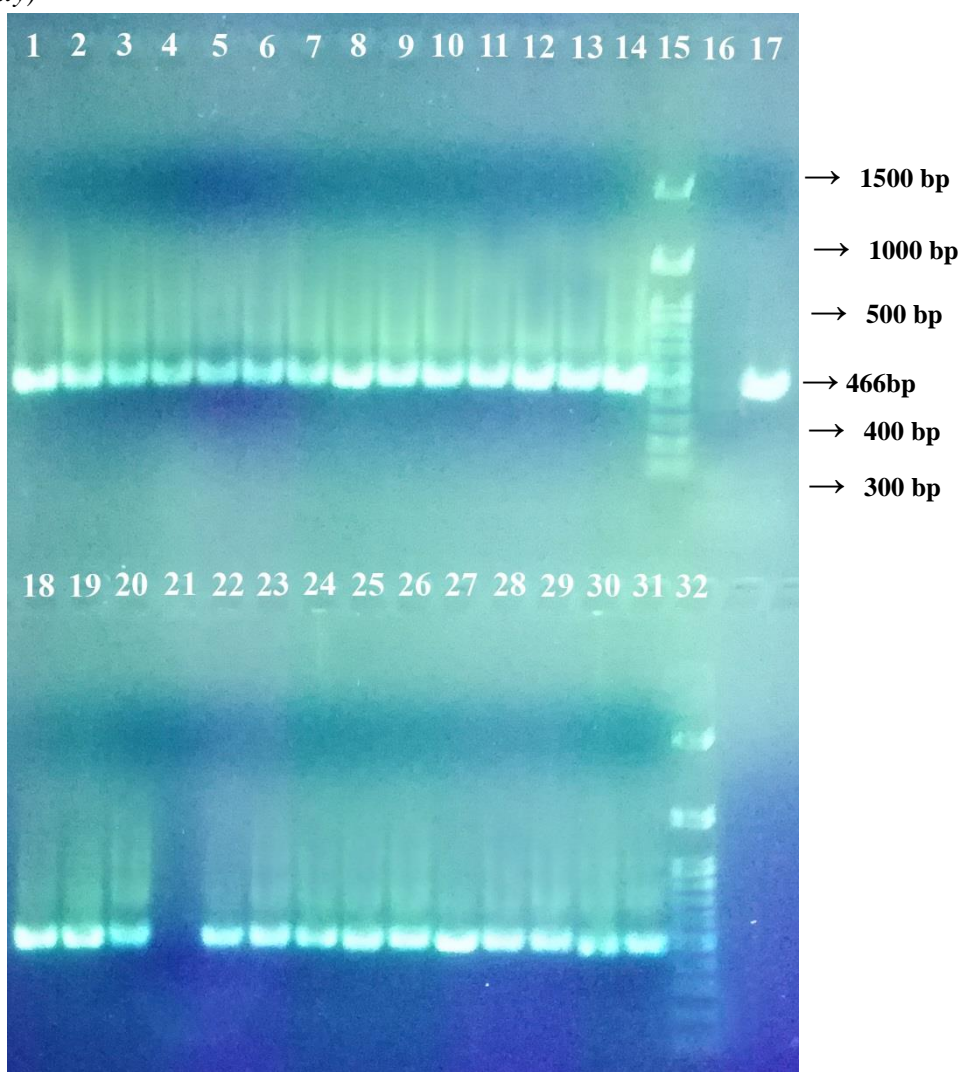


Kvasinková DNA ze vzorků raw hraběčniných řezů odebraných z 5. dne byla izolovaná v různých koncentracích. Nejvyšší koncentrace DNA byla změřena u raw hraběčniných řezů bez příměsi (vzorek H1), stanovená koncentrace byla $28,0 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Hodnoty koncentrací ostatních vzorků s přidávanými kombinacemi bylin se pohybovali v rozmezí $7,0\text{--}23,3 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

6.5 Prokázání přítomnosti DNA domény *Bacteria* metodou PCR

Podle postupu v kapitole 5.2.14 byly připraveny směsi pro PCR a byla provedena konvenční PCR. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná ze sbírkového kmene *Lactobacillus pentosus* CCM 4619. Pro prokázání přítomnosti bakteriální DNA, byly použité primery specifické pro doménu *Bacteria* (Feub, Reub), jejichž sekvence jsou uvedeny v tabulce 4 a teplotní program je uveden v tabulce 5. PCR byla provedena se vzorky DNA naředěnými na koncentraci $10 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Velikost specifických produktů byla 466 bp. Výsledná detekce PCR produktů je uvedena na obrázku 32, kde byly ve všech vzorcích kromě vzorku P4/B5 detekovány specifické PCR produkty silné intenzity, tudíž byla potvrzena přítomnost bakteriální DNA. U vzorku P4/B5 mohlo dojít k chybě při pipetování DNA, je velmi nepravděpodobné, že by se v tomto vzorku nenacházela ani nízká koncentrace bakteriální DNA.

Obrázek 32: Agarosová gelová elektroforéza produktů specifické PCR pro doménu *Bacteria* (466 bp), DNA byla izolována komerčním kitem ((- nedetekováno, PCR produkt: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity))

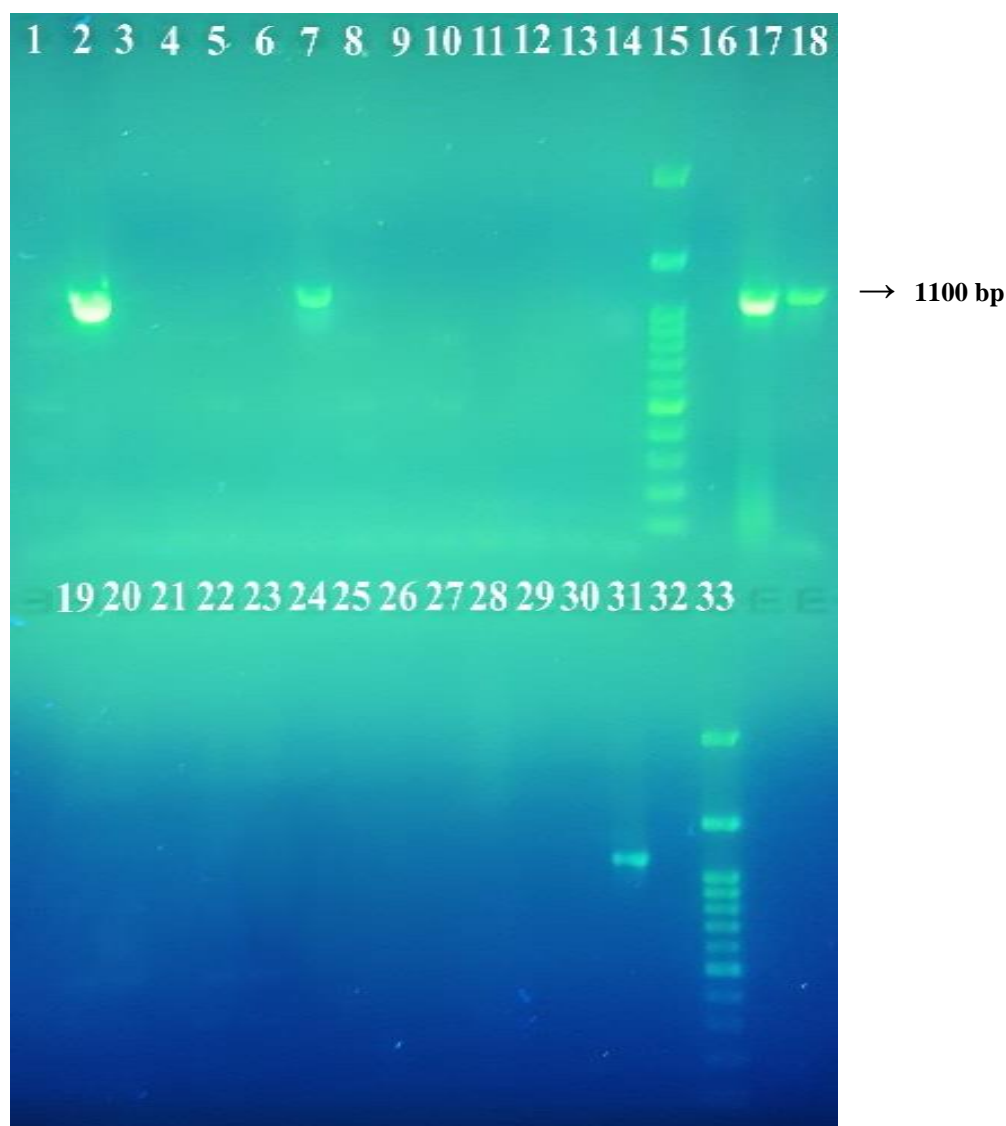


Běh č.	Vzorek	Produkt PCR	Běh č.	Vzorek	Produkt PCR
1.	P1/B1	+++	18.	P1/B5	+++
2.	P2/B1	+++	19.	P2/B5	+++
3.	P3/B1	+++	20.	P3/B5	+++
4.	P4/B1	+++	21.	P4/B5	-
5.	P5/B1	+++	22.	P5/B5	+++
6.	P6/B1	+++	23.	P6/B5	+++
7.	P7/B1	+++	24.	P7/B5	+++
8.	H1/B1	+++	25.	H1/B5	+++
9.	H2/B1	+++	26.	H2/B5	+++
10.	H3/B1	+++	27.	H3/B5	+++
11.	H4/B1	+++	28.	H4/B5	+++
12.	H5/B1	+++	29.	H5/B5	+++
13.	H6/B1	+++	30.	H6/B5	+++
14.	H7/B1	+++	31.	H7/B5	+++
15.	DNA standard (100 bp)	-	32.	DNA standard (100 bp)	-
16.	NK	-			
17.	PK [10 ng·μl ⁻¹]	+++			

6.6 Prokázání přítomnosti DNA rodu *Bacillus* metodou PCR

Podle postupu v kapitole 5.2.14 byly připraveny směsi pro PCR a byla provedena konvenční PCR. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná ze sbírkového kmene *Bacillus subtilis* CCM 1999. Pro prokázání přítomnosti bakteriální DNA, byly použité primery specifické pro rod *Bacillus* (BK1F, BK1R), jejichž sekvence jsou uvedeny v tabulce 4 a teplotní program je uveden v tabulce 5. PCR byla provedena se vzorky DNA naředěnými na koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Velikost specifických produktů byla 1100 bp. Výsledná detekce PCR produktů je uvedena na obrázku 33, kde byly ve vzorcích P2/B1, P7/B1 a H6/B5 detekovány specifické PCR produkty silné intenzity, tudíž byla potvrzena přítomnost bakteriální DNA rodu *Bacillus*. Nepřítomnost DNA u vzorků P2/B5 a P7/B5, které byly izolované z 5. dne, mohla být způsobena pomnožením jiných konkurenčních bakterií, které mohly inhibovat nebo potlačovat růst bakterií rodu *Bacillus*.

Obrázek 33: Agarosová gelová elektroforéza produktů specifické PCR pro rod *Bacillus* (1100 bp), DNA byla izolována komerčním kitem ((- nedetekováno, PCR produkt: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

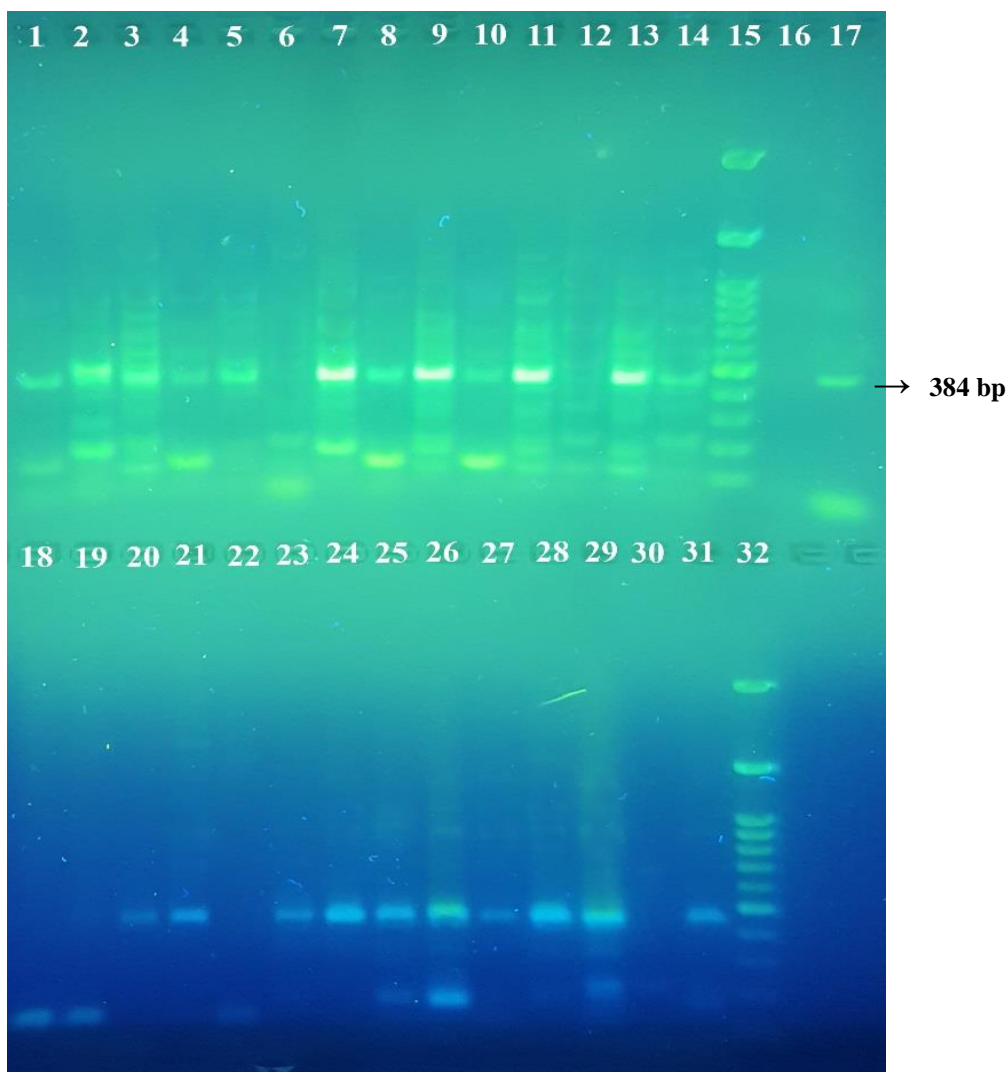


Běh č.	Vzorek	Produkt PCR	Běh č.	Vzorek	Produkt PCR
1.	P1/B1	-	19.	P1/B5	-
2.	P2/B1	+++	20.	P2/B5	-
3.	P3/B1	-	21.	P3/B5	-
4.	P4/B1	-	22.	P4/B5	-
5.	P5/B1	-	23.	P5/B5	-
6.	P6/B1	-	24.	P6/B5	-
7.	P7/B1	++	25.	P7/B5	-
8.	H1/B1	-	26.	H1/B5	-
9.	H2/B1	-	27.	H2/B5	-
10.	H3/B1	-	28.	H3/B5	-
11.	H4/B1	-	29.	H4/B5	-
12.	H5/B1	-	30.	H5/B5	-
13.	H6/B1	-	31.	H6/B5	+
14.	H7/B1	-	32.	H7/B5	-
15.	DNA standard (100 bp)	-	33.	DNA standard (100 bp)	-
16.	NK	-			
17.	PK1 [10 ng·μl ⁻¹]	+++			
18.	PK1 [10 ng·μl ⁻¹]	+++			

6.7 Prokázání přítomnosti DNA rodu *Escherichia* metodou PCR

Podle postupu v kapitole 5.2.14 byly připraveny směsi pro PCR a byla provedena konvenční PCR. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná z kmene *Escherichia coli* strain B (ultra pure, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Pro prokázání přítomnosti bakteriální DNA, byly použity primery specifické pro rod *Escherichia coli* (coneaeAF, coneaeAR), jejichž sekvence jsou uvedeny v tabulce 4 a teplotní program je uveden v tabulce 5. PCR byla provedena se vzorky DNA naředěnými na koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Velikost specifických produktů byla 384 bp. Výsledná detekce PCR produktů je znázorněna na obrázku 34, kde byly ve všech vzorcích kromě vzorků P6/B1, H5/B1, P1/B5, P2/B5, P5/B5, H6/B5 detekovány specifické PCR produkty, ve všech vzorcích byly detekovány také nespecifické PCR produkty. Z toho důvodu by bylo třeba PCR optimalizovat buď změnou teplotního programu, nebo změnou množství Mg^{2+} iontů v PCR směsi, které ovlivňují činnost DNA polymerázy.

Obrázek 34: Agarosová gelová elektroforéza produktů specifické PCR pro rod *Escherichia* (384 bp), DNA byla izolována komerčním kitem ((- nedetekováno, PCR produkt: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

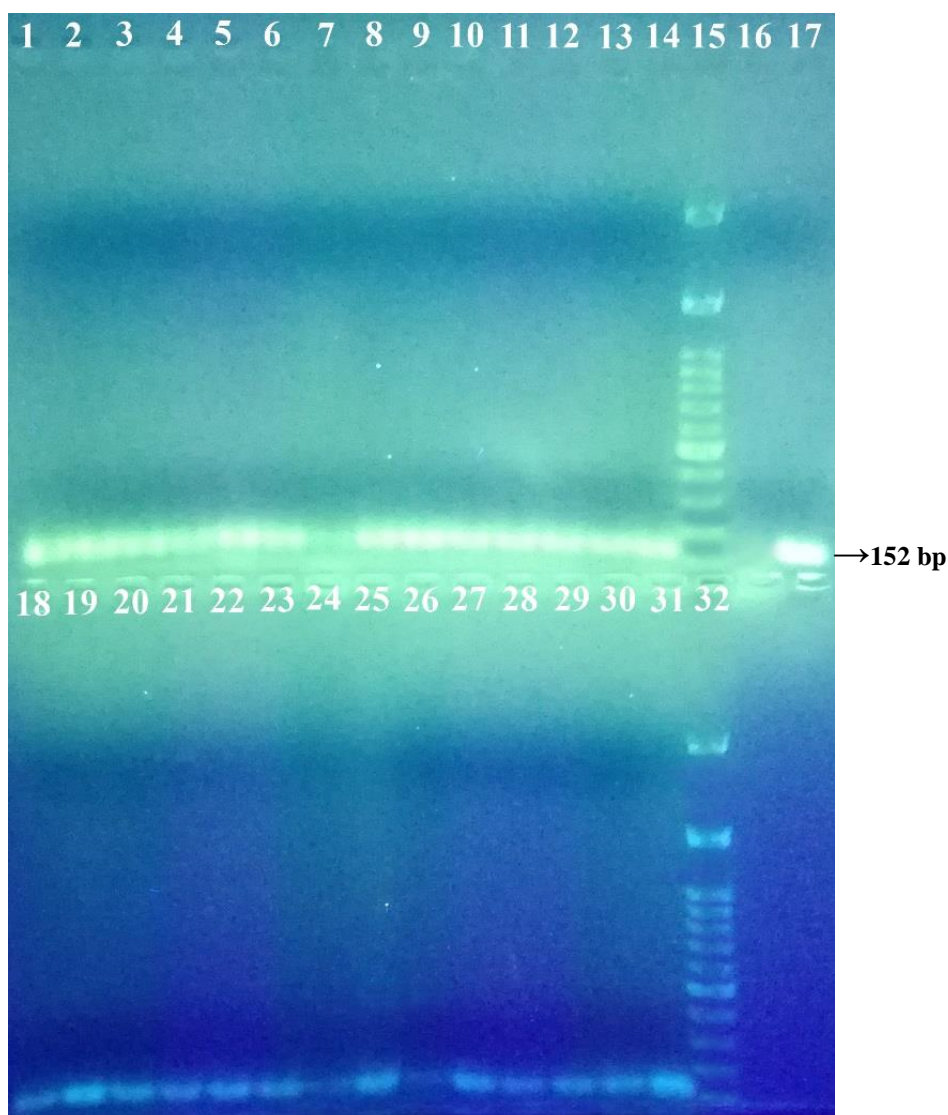


Běh č.	Vzorek	Produkt PCR	Běh č.	Vzorek	Produkt PCR
1.	P1/B1	+	18.	P1/B5	-
2.	P2/B1	+++	19.	P2/B5	-
3.	P3/B1	+++	20.	P3/B5	+
4.	P4/B1	+	21.	P4/B5	++
5.	P5/B1	+	22.	P5/B5	-
6.	P6/B1	-	23.	P6/B5	+
7.	P7/B1	+++	24.	P7/B5	+++
8.	H1/B1	++	25.	H1/B5	+++
9.	H2/B1	+++	26.	H2/B5	+++
10.	H3/B1	+	27.	H3/B5	+
11.	H4/B1	+++	28.	H4/B5	+++
12.	H5/B1	-	29.	H5/B5	+++
13.	H6/B1	++	30.	H6/B5	-
14.	H7/B1	+	31.	H7/B5	+
15.	DNA standard (100 bp)	-	32.	DNA standard (100 bp)	-
16.	NK	-			
17.	PK [10 ng·μl ⁻¹]	+++			

6.8 Prokázání přítomnosti DNA domény kvasinky metodou PCR

Podle postupu v kapitole 5.2.14 byly připraveny směsi pro PCR a byla provedena konvenční PCR. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná ze sbírkového kmene *Saccharomyces cerevisiae* CCM 8191. Pro prokázání přítomnosti kvasinkové DNA, byly použity primery specifické pro doménu kvasinky (OliF, OliR), jejichž sekvence jsou uvedeny v tabulce 4 a teplotní program je uveden v tabulce 5.. PCR byla provedena se vzorky DNA naředěnými na koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Velikost specifických produktů byla 152 bp. Výsledná detekce PCR produktů je uvedena na obrázku 35, kde byly ve všech vzorcích detekovány specifické PCR produkty silné intenzity, tudíž byla potvrzena přítomnost kvasinkové DNA.

Obrázek 35: Agarosová gelová elektroforéza produktů specifické PCR pro doménu kvasinky (152 bp), DNA byla izolována komerčním kitem ((- nedetekováno, PCR produkt: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)



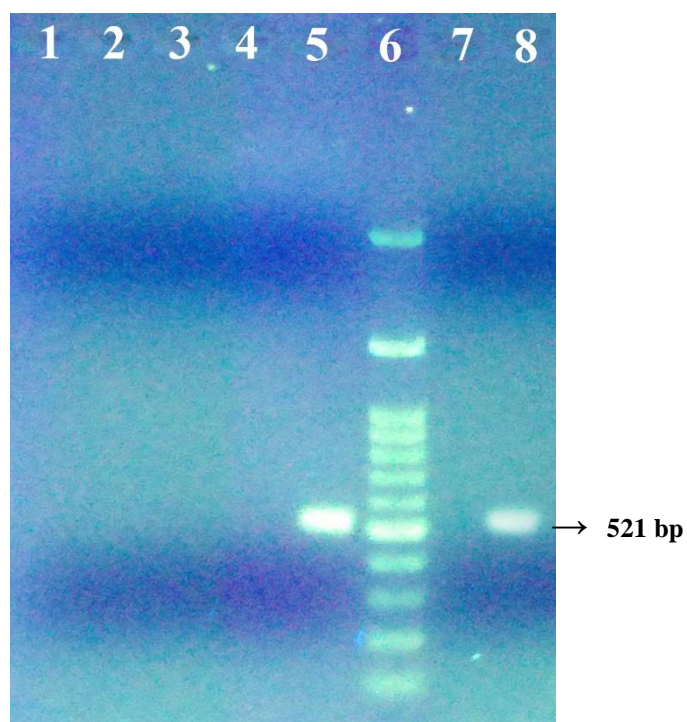
Běh č.	Vzorek	Produkt PCR	Běh č.	Vzorek	Produkt PCR
1.	P1/B1	+++	18.	P1/B5	+++
2.	P2/B1	+++	19.	P2/B5	+++
3.	P3/B1	+++	20.	P3/B5	+++
4.	P4/B1	+++	21.	P4/B5	+++
5.	P5/B1	+++	22.	P5/B5	+++
6.	P6/B1	+++	23.	P6/B5	+++
7.	P7/B1	+++	24.	P7/B5	+
8.	H1/B1	+++	25.	H1/B5	+++
9.	H2/B1	+++	26.	H2/B5	+
10.	H3/B1	+++	27.	H3/B5	+++
11.	H4/B1	+++	28.	H4/B5	+++
12.	H5/B1	+++	29.	H5/B5	+++
13.	H6/B1	+++	30.	H6/B5	+++
14.	H7/B1	+++	31.	H7/B5	+++
15.	DNA standard (100 bp)	-	32.	DNA standard (100 bp)	-
16.	NK	-			
17.	PK [10 ng·μl ⁻¹]	+++			

6.9 Prokázání přítomnosti DNA rodu *Aspergillus* metodou PCR

Podle postupu v kapitole 5.2.14 byly připraveny směsi pro PCR a byla provedena konvenční PCR. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná ze sbírkového kmene *Aspergillus niger* CCM 8155. Pro prokázání přítomnosti plísňové DNA, byly použité primery specifické pro rod *Aspergillus* (ASAP1, ASAP2), jejichž sekvence jsou uvedeny v tabulce 4 a teplotní program je uveden v tabulce 5. PCR byla provedena se vzorky DNA naředěnými na koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Velikost specifických produktů byla 521 bp. Výsledná detekce PCR produktů je uvedena na obrázku 36, kde byl detekován specifický PCR produkt silné intenzity u vzorku H7/K5, tudíž zde byla potvrzena přítomnost plísňové DNA rodu *Aspergillus*.

Obrázek 36: Agarosová gelová elektroforéza produktů specifické PCR pro rod *Aspergillus* (521 bp), DNA byla izolována fenolovou extrakcí ((- nedetekováno, PCR produkt: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

Běh č.	Vzorek	Produkt PCR
1.	P3/K5	-
2.	P5/K5	-
3.	H3/K5	-
4.	H6/K5	-
5.	H7/K5	+++
6.	DNA standard (100 bp)	-
7.	NK	-
8.	PK [$10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$]	+++

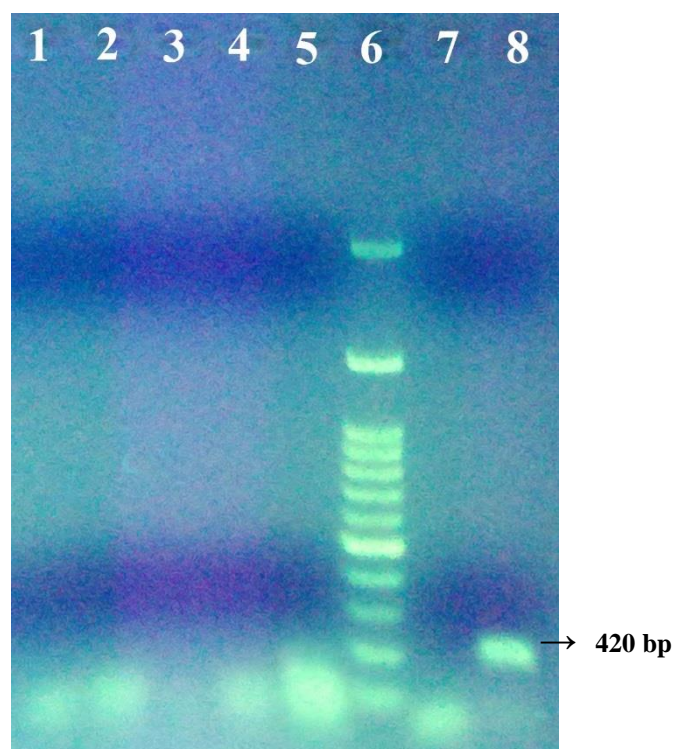


6.10 Prokázání přítomnosti DNA rodu *Fusarium* metodou PCR

Podle postupu v kapitole 5.2.14 byly připraveny směsi pro PCR a byla provedena konvenční PCR. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná ze sbírkového kmene *Fusarium* CCM 8015. Pro prokázání přítomnosti plísňové DNA, byly použity primery specifické pro rod *Fusarium* (TEF-Fu3f, TEF-Fu3r), jejichž sekvence jsou uvedeny v tabulce 4 a teplotní program je uveden v tabulce 5. PCR byla provedena se vzorky DNA naředěnými na koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Velikost specifických produktů byla 420 bp. Výsledná detekce PCR produktů je uvedena na obrázku 37, kde byly ve všech vzorcích detekovány nespecifické PCR produkty. Specifické produkty nebyly prokázány, proto nebyla potvrzena přítomnost plísňové DNA rodu *Fusarium*.

Obrázek 37: Agarosová gelová elektroforéza produktů specifické PCR pro rod *Fusarium* (420 bp), DNA byla izolována fenolovou extrakcí ((- nedetekováno, PCR produkt: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

Běh č.	Vzorek	Produkt PCR
1.	P3/K5	-
2.	P5/K5	-
3.	H3/K5	-
4.	H6/K5	-
5.	H7/K5	-
6.	DNA standard (100 bp)	-
7.	NK	-
8.	PK [$10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$]	+++



7 Závěr

Experimentální část diplomové práce byla zaměřena na charakterizaci extraktů z různých koření a bylin a jejich následnou aplikaci do raw dezertů pro prodloužení jejich trvanlivosti. K charakterizaci bylo vybráno 13 druhů bylin a koření, ze kterých byly připraveny ethanolové extrakty. U extraktů byly sledovány antioxidační a antimikrobiální účinky. Bylo provedeno stanovení celkových polyfenolů, flavonoidů, anthokyanů a celkové antioxidační aktivity. Nejvyšší množství polyfenolů obsahovaly extrakty z aloe, hřebíčku, skořice a šafránu, kde byl obsah polyfenolů vyšší než 60 mg/g. Nejvyšší množství flavonoidů vykazovaly extrakty z aloe a skořice, kde koncentrace přesáhla hodnotu 50 mg/g. Nejvyšší množství anthokyanů vykazovaly extrakty z aloe, šafránu a zázvoru, kde se koncentrace pohybovaly v koncentračním rozmezí 0,1 – 0,3 mg/g. Jako poslední bylo provedeno stanovení antioxidační aktivity, kde nejvyšší hodnoty vykazoval extrakt z hřebíčku 264 mg/g a badyánu 118 mg/g.

V další části této práce byly provedeny antimikrobiální testy (difúzní a diluční) extraktů proti gramnegativní bakterii *Escherichia coli*, grampozitivní bakterii *Micrococcus luteus* a kvasince *Candida glabrata*. Bylo zjištěno, že silný antimikrobiální účinek proti *Escherichia coli* vykazuje pouze extrakt z hřebíčku (účinnost 65%). Slabší antimikrobiální efekt vykazovaly extrakty z citronové kůry, lékořice a lichořeřišnice. Nejvyšší antimikrobiální účinnost proti *Micrococcus luteus* byla zjištěna u extraktu z aloe, hřebíčku a lékořice a zázvoru (účinnost 70–90 %). Nejvyšší antimikrobiální účinnost proti kvasince *Candida glabrata* byla zjištěna u extraktů z aloe a hřebíčku (účinnost 70–90 %), dále pak u lékořice, lichořeřišnice a zázvoru (40 %).

Na základě výsledků charakterizace bylin a koření byly vybrány vhodné kombinace, které byly aplikovány do raw dezertů za účelem prodloužení trvanlivosti a byla sledována jejich mikrobiální kontaminace po dobu pěti dnů.

Bylo zjištěno, že u raw perníku bez příměsí kombinací antimikrobiálních látek došlo k mírnému nárůstu mikroorganismů již druhý den od zakoupení produktu. Pokud bychom výsledné hodnoty testování porovnávali s limity uvedenými v legislativě pro cukrářské výrobky nebo tepelně neupravené ovocné a zeleninové šťávy, již čtvrtý den by tento dezert vykazoval limitní hodnoty. Z toho vyplývá, že bezpečná konzumace tohoto dezertu by zde měla být zajištěna pouze do třetího, nikoliv pátého dne od zakoupení.

Možné antimikrobiální účinky byly zjištěny u vzorku raw perníku P2, který obsahoval kombinaci bylin lékořice a lichořeřišnice v poměru 0,8:0,2 g. Tato kombinace byla účinnější než tatáž kombinace s vyšším obsahem lékořice u vzorku P3. Dalším vzorkem, který vykazoval určité antimikrobiální účinky byl vzorek P5, který obsahoval kombinaci bylin lékořice a aloe v poměru 0,8:0,2 g. V tomto případě mohla mít lékořice lepší synergistický účinek než kombinace s lichořeřišnicí. Třetím vzorkem, byl vzorek P7, který obsahoval kombinaci zázvoru a anděliky v poměru 0,8:0,2 g. V tomto případě byla kombinace s vyšším obsahem zázvoru účinnější než kombinace u vzorku P6 s vyšším obsahem anděliky.

U vzorku raw hraběčniných řezů bez příměsí kombinací antimikrobiálních látek byly zjištěny téměř identické výsledky jako u raw perníku bez příměsí. Mírný nárůst mikroorganismů byl zjištěn již ve druhý den od zakoupení a čtvrtý a pátý den už dezert vykazoval limitní hodnoty počtu mikroorganismů.

Potenciální antimikrobiální účinky u vzorků z raw hraběčniných řezů vykazovaly vzorky H3, který obsahoval kombinaci badyánu a lichořeřišnice v poměru 0,8:0,2 g. Tato kombinace byla

vyhodnocena jako účinnější než kombinace s nižším obsahem badyánu u vzorku H2. Během druhého dne testování došlo k mírnému nárůstu mikroorganismů na TSA i YPD médiu, ale během dalších dnů byl růst mikroorganismů výrazně potlačen. Pozitivní výsledky vykazovaly také vzorky H4 a H5, které oba obsahovaly kombinaci hřebíčku a aloe ve dvou různých poměrech. U vzorku s vyšším obsahem aloe došlo druhý den k mírnému nárůstu mikroorganismů na TSA médiu, během dalších dnů byl růst potlačen až zcela eliminován. Další kladné výsledky poskytly vzorky H6, H7, které obsahovaly lékořici a zázvor také ve dvou různých poměrech. U těchto vzorků došlo druhý den k mírnému nárůstu bakterií, ale během dalších dnů byl růst potlačen až zcela eliminován, avšak růst kvasinek a plísní potlačen nebyl.

V dalším kroku této práce byla provedena izolace DNA ze vzorků raw potravin a jejich následná identifikace. Izolace bakteriální a kvasinkové DNA byla provedena komerčním kitem, DNA ze vzorků plísní byla provedena fenolovou extrakcí.

Bylo zjištěno, že všechny testované vzorky obsahovaly bakteriální a kvasinkovou DNA. U vzorku P2, který obsahoval příměs lékořice a lichořeřišnice v poměru 0,2:0,8 g odebraného z 1. dne testování byla rodově specifickou PCR zjištěna přítomnost bakteriální DNA rodu *Bacillus*. Dalším vzorkem, kde byla tato DNA prokázána byl vzorek P7, který obsahoval kombinaci zázvoru a anděliky v poměru 0,8:0,2 g. Avšak u těchto vzorků odebraných z 5. dne tato přítomnost DNA potvrzena nebyla. Domnívám se, že toto zjištění mohlo být způsobeno přítomností konkurenčního mikroorganismu, který potlačil nebo zamezil růstu bakterii rodu *Bacillus* nebo růst ovlivnily přidané antimikrobiální látky. Dále byla provedena rodově specifická PCR prokazující přítomnost bakterie rodu *Escherichia coli*. Bylo zjištěno, že kromě vzorků izolovaných z 1. dne P6, který obsahoval kombinaci zázvoru a anděliky v poměru 0,2:0,8 g a vzorku H5, který obsahoval kombinaci hřebíčku a aloe v poměru 0,8:0,2 g, dále u vzorků izolovaných z 5. dne P2 obsahující kombinaci lékořice a lichořeřišnice v poměru 0,2:0,8 g, P5 obsahující kombinaci lékořice a aloe v poměru 0,8:0,2 g a vzorku H6 obsahující kombinaci lékořice a zázvor v poměru 0,2:0,8 g byly detekovány specifické PCR produkty. Avšak ve všech vzorcích byly detekovány také nespecifické PCR produkty. Proto by bylo třeba PCR optimalizovat změnou teplotního programu nebo změnou složení PCR směsi. Dále byla provedena rodově specifická PCR pro dokázání přítomnosti DNA plísně *Aspergillus*. Bylo zjištěno, že se tato DNA nacházela ve vzorku H7/K5, který obsahoval kombinaci lékořice a zázvoru v poměru 0,8:0,2 g a byl odebrán 5. den kultivace. Přítomnost DNA plísně *Fusarium* nebyla prokázána v žádném vzorku. U všech testovaných vzorků byly detekovány pouze nespecifické PCR produkty. Z toho důvodu by bylo třeba optimalizovat izolaci DNA z plísní nebo změnit teplotní program průběhu PCR.

Ze získaných výsledků práce je patrné, že většina testovaných bylin a koření obsahuje velké množství aktivních látek, které mohou působit antimikrobiálně. Bylo zjištěno, že byliny a koření aloe, andělíka, badyán, hřebíček, lékořice, lichořeřišnice, zázvor, mají v různých kombinacích určité antimikrobiální účinky a mohou ovlivnit mikrobiální údržnost raw potravin, proto by měly být do budoucna předmětem dalšího testování.

8 Seznam použité literatury

- [1] RUSSO, Ruthann. *The Raw Food Lifestyle: The Philosophy and Nutrition Behind Raw and Live Foods*. 1. California: North Atlantic Books, 2008. ISBN 9781556438370.
- [2] MELINA, Vesanto a Brenda DAVIS. *Becoming Raw: The essential guide to raw vegan diets*. 1. Summertown: Book Publishing Company, 2010. ISBN 1570672385.
- [3] Pyramida živé stravy. In: *Yammy* [online]. Opava, 2016 [cit. 2018-05-12]. Dostupné z: <http://www.yammy.cz/vitarianstvi-syrova-strava-a-jejich-pyramida/>
- [4] DIAS, João. Nutritional Quality and Health Benefits of Vegetables: A Review. *Food and Nutrition Sciences* [online]. 2012, **3**(1), 1354-1374 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.4236/fns.2012.310179.
- [5] SLAVIN, Joanne a Beate LLOYD. Health Benefits of Fruits and Vegetables. *Advances in nutrition* [online]. 2012, **3**(4), 506-516 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.3945/an.112.002154. Dostupné z: <https://academic.oup.com/advances/article/3/4/506/4591497>
- [6] LIU, Rui. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2003, **78**(3), 517-520 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1093/ajcn/78.3.517S. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/78/3/517S/4689990>
- [7] ROS, Emilio. Health Benefits of Nut Consumption. *Nutrients* [online]. 2010, **2**(1), 652-682 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.3390/nu2070652. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6643/2/7/652>
- [8] PERŠINOVÁ, Eva. *Raw food jako zážitek*. 1. Praha: Grada Publishing a.s., 2016. ISBN 978-80-247-5799-5.
- [9] KOEBNICK, Corinna, Ada GARCIA a Pieter DAGNELIE. Long-Term Consumption of a Raw Food Diet Is Associated with Favorable Serum LDL Cholesterol and Triglycerides but Also with Elevated Plasma Homocysteine and Low Serum HDL Cholesterol in Humans¹. *The journal of nutrition* [online]. 2005, **135**(10), 2372–2378 [cit. 2018-01-10]. Dostupné z: <http://jn.nutrition.org/content/135/10/2372.full.pdf+html>
- [10] GANSS, C., M. SCHLECHTRIEMEN a J. KLIMEK. Dental Erosions in Subjects Living on a Raw Food Diet. *Journal Abbreviation: Caries Research* [online]. 1999, **33**(1), 74-80 [cit. 2018-01-10]. DOI: 10.1159/000016498. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/16498>

- [11] MOROZOVA, Julia, Zdeňka ZAPLETALOVÁ a Eva MÍŠOVÁ. Stomatologické symptomy u pacientů s dysfunkcí gastrointestinálního traktu. *Interní medicína* [online]. 2014, **16**(6), 244-246 [cit. 2018-01-10]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2014/06/07.pdf>
- [12] KOEBNICK, C., C. STRASSNER, I. HOFFMANN a C. LEITZMANN. Consequences of a Long-Term Raw Food Diet on Body Weight and Menstruation: Results of a Questionnaire Survey. *Annals of Nutrition and Metabolism Journal* [online]. 1999, **43**(2), 69-79 [cit. 2018-01-10]. DOI: 10.1159/000012770. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/12770>
- [13] GÖRNER, Fridrich a Ľubomír VALÍK. Aplikovaná mikrobiológia požívatín : princípy mikrobiológie požívatín, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodky sú prenášané požívat. 1. Bratislava: Malé centrum, 2004. ISBN 8096706497.
- [14] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 361 s. ISBN 80-856-0571-6.
- [15] KLABAN, Vladimír. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. Praha: Galén, 2005. ISBN 8072623419.
- [16] CEMPÍRKOVÁ, R., J. LUKÁŠOVÁ a Š. HEJLOVÁ. *Mikrobiologie potravin*. 1. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 1997. ISBN 80-7040-254-7.
- [17] JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDOVIÁ. *Úvod do biologie kvasinek*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-990-1.
- [18] BETHEA, E., B. CARVER, A. MONTEDONICO a T. REYNOLDS. The inositol regulon controls viability in *Candida glabrata*. *Microbiology* [online]. 2010, **156**(2), 452-462 [cit. 2018-05-09]. DOI: 10.1099/mic.0.030072-0. Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.030072-0>
- [19] SAVASTANO, Catarina, Elisa DE OLIVEIRA SILVA, Lindyanne GONÇALVES, Jéssica NERY, Naiara SILVA a Amanda DIAS. *Candida glabrata* among *Candida* spp. from environmental health practitioners of a Brazilian Hospital. *Brazilian journal of microbiology* [online]. 2016, **47**(2), 367-372 [cit. 2018-05-09]. DOI: 10.1016/j.bjm.2015.05.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1517838216000484>
- [20] ĎURAČKOVÁ, Zdena. *Volné radikály a antioxidanty v medicíne (I)*. 1. Bratislava: Slovak Academic Press, 1998. ISBN 80-88908-11-6.

- [21] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-866-5903-8.
- [22] SANTOS, Balbino, Mona OLIVEIRA, Paulo COELHO et al. Flavonoids suppress human glioblastoma cell growth by inhibiting cell metabolism, migration, and by regulating extracellular matrix proteins and metalloproteinases expression. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2015, **242**(2), 123-138 [cit. 2018-05-09]. DOI: 10.1016/j.cbi.2015.07.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279715300284>
- [23] RAKSHA, Bawankar. Bioactive Compounds and Medicinal Properties of Aloe Vera L: An Update. *Journal of plant sciences* [online]. 2014, **2**(3), 102-107 [cit. 2018-01-06]. DOI: 10.11648/j.jps.20140203.11. Dostupné z: <http://article.sciencepublishinggroup.com/pdf/10.11648.j.jps.20140203.11.pdf>
- [24] KUMAR, Dinesh, MY SHAH a ZA BHAT. Angelica archangelica Linn. is an angel on earth for the treatment of diseases. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases* [online]. 2011, **1**(1), 36-50 [cit. 2018-01-05]. DOI: 10.4103/2231-0738.77531. Dostupné z: <http://www.ijnpnd.com/text.asp?2011/1/1/36/77531>
- [25] FRATERNALE, Daniele, Guido FLAMINI a Donata RICCI. Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of Angelica archangelica L. (Apiaceae) Roots. *Journal of Medicinal Food* [online]. 2014, **17**(9), 1043-1047 [cit. 2018-01-05]. DOI: 10.1089/jmf.2013.0012. Dostupné z: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/jmf.2013.0012>
- [26] KORBELÁŘ, Jaroslav a Zdeněk ENDRIS. *Naše rostliny v lékařství*. 2. Praha: Polygrafia, n.p., 1968, 480 s. ISBN 9780802010094.
- [27] ALY, Soher, Bassem SABRY, Mohamed SHAHEEN a Amal HATHOUT. Assessment of antimycotoxigenic and antioxidant activity of star anise (*Illicium verum*) in vitro. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* [online]. 2016, **15**(1), 20-27 [cit. 2018-01-05]. DOI: 10.1016/j.jssas.2014.05.003. ISSN 1658-077X. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S1658077X14000368?via%3Dihub>
- [28] DHANAVADE, Maruti, Chidamber JALKUTE a Jai GHOSH. Study Antimicrobial Activity of Lemon (*Citrus lemon* L.) Peel Extract. *British Journal of Pharmacology and Toxicology* [online]. 2011, **2**(3), 119-121 [cit. 2018-01-06]. ISSN 2044-2467. Dostupné z: http://www.jonnsaromatherapy.com/pdf/Dhanavade_Antimicrobial_Activity_of_Lemon_2011.pdf

- [29] NZEAKO, B, Zahra S N AL-KHAROUSI a Zahra MAHROOUQUI. Antimicrobial Activities of Clove and Thyme Extracts. *Sultan Qaboos Univ Med J* [online]. 2006, **6**(1), 33-39 [cit. 2018-01-05]. ISSN 2075-0528. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3074903/>
- [30] JEBUR, Mays, Ilham BNUYAN, Amean YASRI a Nada HINDI. Antimicrobial effect of seed extracts, leaves and crude oil of cardamom (*Elettaria cardamomum*) against different types of bacteria. *World Journal of Pharmaceutical Research* [online]. 2014, **3**(3), 4934-4944 [cit. 2018-01-06]. ISSN 2277 – 7105. Dostupné z: www.wjpr.net/download/article/1420110414.pdf
- [31] DAMLE, Monica. Glycyrrhiza glabra (Liquorice) - a potent medicinal herb. *International journal of herb medicine* [online]. 2014, **2**(2), 132-136 [cit. 2018-01-06]. ISSN 2321-2187. Dostupné z: <http://www.florajournal.com/vol2issue2/june2014/23.1.pdf>
- [32] BUHNER, Stephen. *Přírodní antibiotika*. 2. Praha: Euromedia Group k. s., 2015. ISBN 978-80-87543-98-6.
- [33] DA CRUZ, Ritiel, Laura DENARDI, Natalia MOSSMANN, Mariana PIANA, Sydney ALVES a Marli DE CAMPOS. Antimicrobial Activity and Chromatographic Analysis of Extracts from *Tropaeolum pentaphyllum* Lam. Tubers. *Molecules* [online]. 2016, **21**(5) [cit. 2018-01-10]. DOI: 10.3390/molecules21050566. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/5/566>
- [34] NABAVI, Seyed, Arianna DI LORENZO, Morteza IZADI, Eduardo SOBARZO-SÁNCHEZ a Maria DAGLIA. Antibacterial Effects of Cinnamon: From Farm to Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries. *Nutrients* [online]. 2015, **7**(9), 7729-7748 [cit. 2018-01-06]. DOI: 10.3390/nu7095359. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4586554/pdf/nutrients-07-05359.pdf>
- [35] MIR M, Amin a Sawhney SS. Antimicrobial Activity of Various Extracts of *Taraxacum officinale*. *Journal of oJ Microbial & Biochemical Technology* [online]. 2016, **8**(3), 210-215 [cit. 2018-01-10]. DOI: 10.4172/1948-5948.1000287. ISSN 1948-5948. Dostupné z: <https://www.omicsonline.org/open-access/antimicrobial-activity-of-various-extracts-of-taraxacum-officinale-1948-5948-1000287.php?aid=76191>
- [36] OKMEN, Gulden, Sukran KARDAS, Duygu BAYRAK, Ali ARSLAN a Haldun CAKAR. The antibacterial activities of crocus sativus against mastitis pathogens and its antioxidant activities. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences* [online]. 2016, **5**(3), 146-156 [cit. 2018-01-10]. ISSN 2278 – 4357. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/298346171_THE_ANTIBACTERIAL_ACTIVITIES_OF_CROCUS_SATIVUS_AGAINST_MASTITIS_PATHOGENS_AND_ITS_ANTIOXIDANT_ACTIVITIES

- [37] KARUPPIAH, Ponmurugan a Shyamkumar RAJARAM. Antibacterial effect of *Allium sativum* cloves and *Zingiber officinale* rhizomes against multiple-drug resistant clinical pathogens. *Asian pacific journal of tropical biomedicine* [online]. 2012, **2**(8), 597-601 [cit. 2018-01-05]. DOI: 10.1016/S2221-1691(12)60104-X. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S222116911260104X?via%3Dihub>
- [38] ARABLOU, Tahereh a Naheed ARYAEIAN. The effect of ginger (*Zingiber Officinale*) as an ancient medicinal plant on improving blood lipids. *Journal of herbal medicine* [online]. 2017 [cit. 2018-01-05]. DOI: 10.1016/j.hermed.2017.09.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2210803317300696>
- [39] LOCHMANN, Otto. *Základy antimikrobní terapie*. 2. Praha: Triton, 1994. ISBN 8085875055.
- [40] KRAMÁŘ, Radim. *Lékařská mikrobiologie*. 1. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2007. ISBN 978-80-7394-021-8.
- [41] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie - obecná*. 2. Praha: Neptun, 2005. ISBN 80-86850-00-5.
- [42] BURSOVÁ, Šárka, Marta DUŠKOVÁ, Lenka NECIDOVÁ, Renáta KARPÍŠKOVÁ a Petra MYŠKOVÁ. *Mikrobiologické laboratorní metody*. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-676-6.
- [43] VESELÁ, Mária. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 3. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2004. ISBN 80-214-2567-5.
- [44] ŠMARDA, Jan, Jiří DOŠKAŘ, Roman PANTŮČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jana KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. 1. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [45] Polymerase Chain Reaction (PCR): Steps, Types and Applications. In: *Microbe online* [online]. Nepal: MH Magazine WordPress, 2016 [cit. 2018-05-02]. Dostupné z: <https://microbeonline.com/polymerase-chain-reaction-pcr-steps-types-applications/>
- [46] JOSHI, Mohini a J. DESHPANDE. POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *International Journal of Biomedical Research* [online]. 2011, **2**(1), 81-97 [cit. 2018-01-10]. DOI: 10.7439/ijbr.v2i1.83. Dostupné z: <http://ssjournals.com/index.php/ijbr/article/view/640>

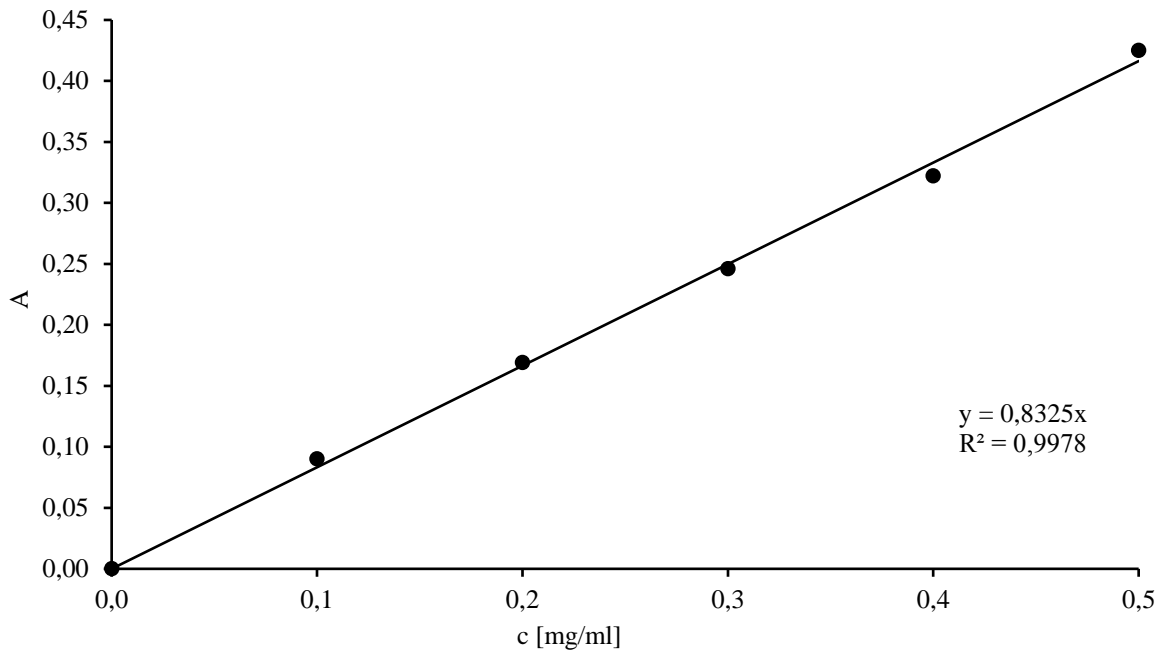
- [47] ŠPANOVÁ, A. a B. RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 9788021440043.
- [48] MÁROVÁ, Ivana a Stanislav OBRUČA. *Vybrané instrumentální úlohy z aplikované biochemie*. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. ISBN 978- 80-214-4788-2.
- [49] HAARMAN, Monique a Jan KNOL. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *American Society for Microbiology* [online]. 2006, **72**(4), 2359-2365 [cit. 2018-05-08]. DOI: 10.1128/AEM.72.4. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/5bf6/29fb507da5ed15dbcb28a8fdca1c3b288087.pdf>
- [50] TOFALO, Rosanna, Maria SCHIRONE, Giorgia PERPETUINI, Giovanna SUZZI a Aldo CORSETTI. Development and application of a real-time PCR-based assay to enumerate total yeasts and *Pichia anomala*, *Pichia guillermondii* and *Pichia kluyveri* in fermented table olives. *Food Control* [online]. 2012, **23**(2), 356-362 [cit. 2018-03-29]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.07.032. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713511003057>
- [51] BARAK, J.D., K. SANANIKONE a M.J. DELWICHE. Comparison of primers for the detection of pathogenic *Escherichia coli* using real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2005, **41**, 112-118 [cit. 2018-03-28]. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2005.01746.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2005.01746.x>
- [52] CHEN, M.L. a H.Y. TSEN. Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2002, **92**(1), 92-919 [cit. 2018-03-28]. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01606.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2002.01606.x>
- [53] SUGITA, Chise, Koichi MAKIMURA, Katsuhisa UCHIDA, Hideyo YAMAGUCHI a Atsushi NAGAI. PCR identification system for the genus *Aspergillus* and three major pathogenic species: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *Medical Mycology* [online]. 2004, **42**(5), 433-437 [cit. 2018-03-28]. DOI: 10.1080/13693780310001656786. Dostupné z: <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1080/13693780310001656786>
- [54] MOHAMMAD ARIF, . Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (*TEF-1 α*) gene. *African Journal of Biotechnology* [online]. 2012, **11**(2) [cit. 2018-03-28]. DOI: 10.5897/AJB10.489. Dostupné z: [http://www.academicjournals.org/AJb/abstracts/abs2012/5Jan/Arif et al.htm](http://www.academicjournals.org/AJb/abstracts/abs2012/5Jan/Arif%20et%20al.htm)

- [55] NACZK, Marian a Fereidoon SHAHIDI. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2007, **43**(2), 798 [cit. 2018-05-08]. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.04.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708506003062>
- [56] GRUBEŠIĆ, Renata, Dario KREMER, Marijana KONČIĆ, Jadranka RODRÍGUEZ a Marko RANDIĆ. Quantitative analysis of polyphenols and antioxidant activity in four *Daphne L.* species. *Central European Journal of Biology* [online]. 2012, **7**(6), 1092-1100 [cit. 2018-05-08]. DOI: 10.2478/s11535-012-0102-8. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/biol.2012.7.issue-6/s11535-012-0102-8/s11535-012-0102-8.xml>
- [57] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2004, **98**(4), 174-179 [cit. 2018-02-11]. ISSN 0009-2770. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf
- [58] SHAN, Bin, Yizhong CAI, Mei SUN a Harold CORKE. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. 2005, **53**(20), 7749-7759 [cit. 2018-05-09]. DOI: 10.1021/jf051513y. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf051513y>
- [59] KAMEL, A. Antioxidant and antibacterial activities of clove and cardamom extract. *Food and Nutrition Sciences Department* [online]. 2014, **201**(39), 35-57 [cit. 2018-05-09]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/...cardamom_extracts.../a2.pdf
- [60] BEGUM, Halima a Sayeda KHANOM. Effect of Ethanolic extract of Aloe vera gel on certain common clinical pathogens. *Borneo Journal of Medical Sciences* [online]. 2016, **10**(2), 19-25 [cit. 2018-05-09]. Dostupné z: <http://jurcon.ums.edu.my/ojums/index.php/bjms/article/.../626/420>
- [61] Vyhláška o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení. In: . Ostrava: Sagit a.s., 2004, ročník 2004, 132/2004 Sb.

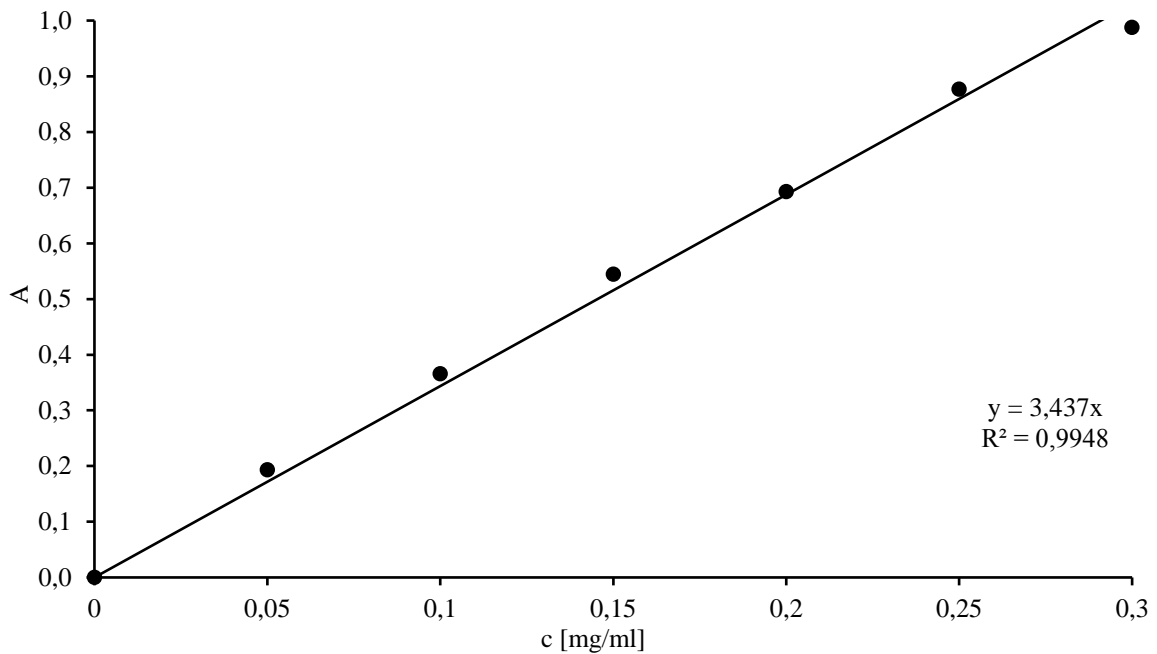
9 Seznam použitých zkratk a symbolů

ABTS	2,2–azinobis (3–ethylbenzothioazolin–6–sulfonoová kyselina)
bp	pár bází (base pair)
CCM	Česká sbírka mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	2'-deoxynukleotid-5'-trifosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
HDL	high density lipoprotein
KTJ (CFU)	kolonie tvořící jednotku (colony–forming unit)
LB	Luria – Bertani broth
LDL	low density lipoprotein
MO	mikroorganismy
NB	Nutrient Broth
NK	negativní kontrola
PCR	polymerázová řetězová reakce
PK	pozitivní kontrola
RNA	ribonukleová kyselina
TBE pufr	tris-borát-EDTA pufr
TE pufr	tris-EDTA pufr
YPD	Yeast pepton dextrose

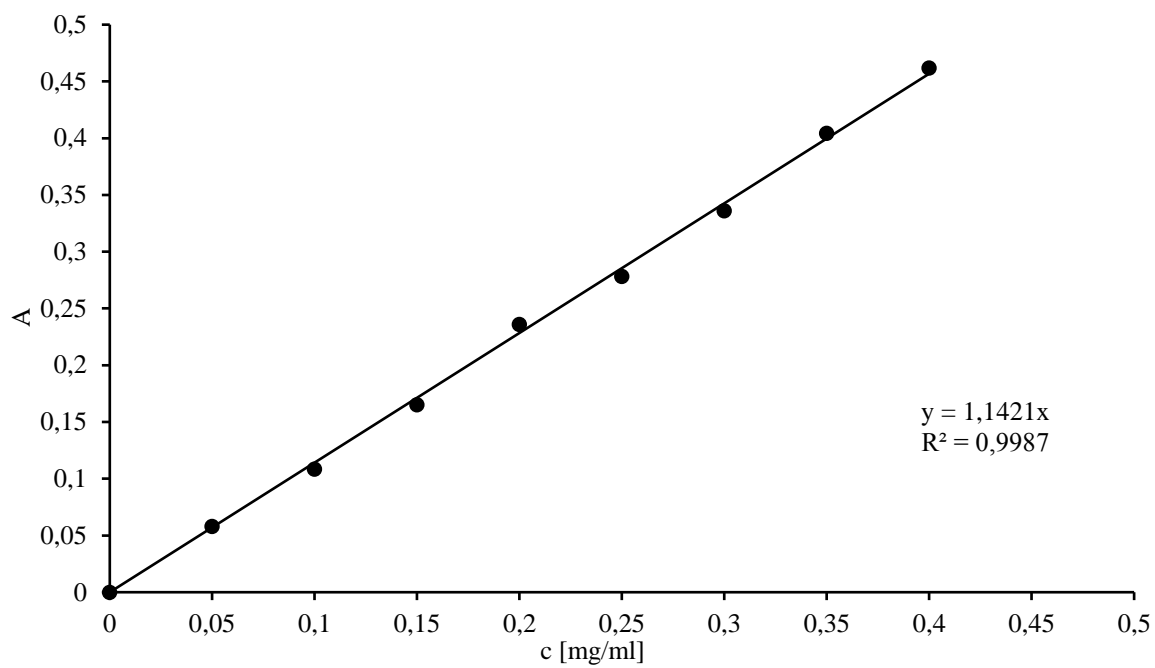
10 Přílohy



Obrázek 38: Kalibrační křivka pro stanovení polyfenolů – kyselina gallová



Obrázek 39: Kalibrační křivka pro stanovení flavonoidů – katechin



Obrázek 40: Kalibrační křivka pro stanovení antioxidační aktivity – Trolox