

Antibakteriální účinky monoacylglycerolů v podmínkách *in vitro* a v přírodních ovocných šťávách

Bc. Adéla Butkovičová

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla BUTKOVIČOVÁ**
Osobní číslo: **T09579**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů
a kosmetiky**

Téma práce: **Antibakteriální účinky monoacylglycerolů
v podmínkách in vitro a v přírodních ovocných
šťávách**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Zpracujte literární rešerši týkající se antibakteriálních účinků emulgátorů acylglycerolového typu.
2. Zabývejte se mikroorganismy, které mohou být izolovány z přírodních ovocných šťáv a charakterizujte jejich možný vliv na údržnost a zdravotní nezávadnost těchto produktů.

II. Praktická část

1. Sledujte inhibiční účinky acylglycerolů na bakterie v podmínkách in vitro.
2. Provedte mikrobiologickou analýzu vzorků jablečného moštu, izolujte čisté kultury mikroorganismů a proveďte základní biochemické testy vedoucí k rodové identifikaci.
3. Sledujte vliv přídavku acylglycerolů do jablečného moštu na přítomné mikroorganismy.
4. Zhodnoťte využitelnost aplikovaných látek pro prodloužení údržnosti ovocných šťáv.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

- [1] ALTIERI, C., BEVILACQUA, A., CARDILLO, D., M. SINIGAGLIA. Effectiveness of fatty acids and their monoglycerides against gram-negative pathogens. *International Journal of Food Science and Technology*. 2009, 44, s. 359-366.
- [2] BLACKBURN, C. W. Food spoilage microorganisms. Boca Raton: CRC Press, 2006. 712 s. ISBN 0-849-391563.
- [3] HUI, Y.H. Handbook of fruits and fruit processing. Ames : Blackwell Publishing, 2006. 699 s.
- [4] JAY, J. M. Modern Food Microbiology. 6th edition. Gaithersburg : Aspen Publishers, Inc., 2000. 767 s. ISBN 0-8342-1671-X.
- [5] RŮŽIČKA, J., VELCLOVÁ, K., JANIŠ, R., KREJČÍ, J. Antimicrobial effects of 1-monoacylglycerols prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids. *European Food Research and Technology*. 2003, 217, s. 329-331.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

25. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

20. května 2011

Ve Zlíně dne 25. února 2011

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Butkovičová Adéla

Obor: TEVTDK

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 13. 5. 2011

Adela Butkovicova

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací;

⁽¹⁾ Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) *Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.*

(3) *Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.*

²⁾ *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:*

(3) *Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).*

³⁾ *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:*

(1) *Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.*

(2) *Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.*

(3) *Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.*

ABSTRAKT

Zdravý životní styl zahrnuje několik faktorů, mezi které patří i zdravá výživa. Spousta lidí se začíná vracet k pěstování zeleniny a ovoce nebo například k výrobě domácích ovocných šťáv. Trvanlivost u těchto šťáv však není dlouhá a poměrně rychle dochází k jejich kažení, způsobeném řadou mikroorganismů. Ovocné šťávy obsahují důležité nutriční látky, které jsou však většinou pasterací zničeny. Tato práce se tedy zabývá inhibičními účinky vybraných monoacylglycerolů, které by mohly zabránit kažení nepasterizovaných čerstvých ovocných šťáv a tím prodloužit jejich trvanlivost. I když se monoacylglyceroly hojně využívají v potravinářském průmyslu jako emulgátory, jejich potenciální využití pro inhibici růstu nežádoucích mikroorganismů v potravinách dosud nebylo dostatečně studováno.

Klíčová slova: monoacylglyceroly, inhibiční účinky

ABSTRACT

A healthy lifestyle includes a number of factors, including healthy food. Lots of people are starting to return to the cultivation of vegetables and fruit, or for example production of fruit juice at home. The durability of these juices is not long and its deterioration caused by many microorganisms is fast. Fruit juices contain important nutritional substances that are usually destroyed by pasteurization. This work deals with the inhibitory effect of selected monoacylglycerols, which could prevent the spoilage of unpasteurised fresh juice and thereby extend their shelf life. Although monoacylglycerols are widely used in the food industry as emulsifying agents, their application as inhibitors of undesirable microbial flora has not been studied sufficiently.

Keywords: monoacylglycerols, inhibitory effects

Touto cestou bych chtěla poděkovat především vedoucímu práce doc. Ing. Rahulovi Janišovi CSc., dále RNDr. Ivě Doležákové a RNDr. Leoně Buňkové za trpělivost, cenné rady a konzultace, které mi poskytli. Rovněž chci poděkovat Ing. Hance Miklíkové a Olze Haukové za jejich ochotu a pomoc v laboratoři.

Poděkování patří hlavně mému příteli, mé rodině a přátelům za jejich pomoc a podporu.

„Konec světa nastane, až si zodpovíme všechny otázky, na které zatím neznáme odpověď!“

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 MONOACYLGLYCEROLY	12
1.1 VLASTNOSTI.....	12
1.2 VÝROBA A VYUŽITÍ	13
1.3 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY	14
1.3.1 Bakterie	15
1.3.2 Plísně a kvasinky.....	16
1.3.3 Viry	16
2 OVOCNÉ ŠŤÁVY	17
2.1 CHARAKTERISTIKA OVOCNÝCH ŠŤÁV	17
2.2 VLASTNOSTI OVOCNÝCH ŠŤÁV	18
2.3 TECHNOLOGICKÁ VÝROBA A POUŽITÍ OVOCNÝCH ŠŤÁV	19
3 MIKROORGANIZMY	21
3.1 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH BAKTERIÍ	21
3.2 MODELOVÉ BAKTERIE S BUNĚČNOU STĚNOU GRAMPOZITIVNÍHO TYPU	22
3.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	22
3.2.2 <i>Bacillus cereus</i>	23
3.2.3 <i>Bacillus subtilis</i>	23
3.2.4 <i>Micrococcus luteus</i>	24
3.2.5 <i>Enterococcus faecalis</i>	24
3.3 MODELOVÉ BAKTERIE S BUNĚČNOU STĚNOU GRAMNEGATIVNÍHO TYPU	25
3.3.1 <i>Escherichia coli</i>	25
3.3.2 <i>Serratia marcescens</i>	26
3.3.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
3.3.4 <i>Salmonella enterica</i>	27
3.3.5 <i>Citrobacter freundii</i>	27
3.4 CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ ZPŮSOBUJÍCÍ KAŽENÍ OVOCNÝCH ŠŤÁV	28
3.4.1 Rod <i>Acetobacter</i>	28
3.4.2 Rod <i>Alicyclobacillus</i>	28
3.4.3 Rod <i>Bacillus</i>	29
3.4.4 Rod <i>Clostridium</i>	29
3.4.5 Rod <i>Gluconobacter</i>	29
3.4.6 Rod <i>Lactobacillus</i>	30
3.4.7 Rod <i>Leuconostoc</i>	30
3.4.8 Rod <i>Saccharobacter</i>	30
3.4.9 Rod <i>Zymobacter</i>	30
3.4.10 Rod <i>Zymomonas</i>	31
3.5 SHRNUTÍ TEORETICKÉ ČÁSTI	31
II PRAKTICKÁ ČÁST	32

4	CÍL PRÁCE	33
5	POUŽITÁ ZAŘÍZENÍ A MATERIÁLY	34
5.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY	34
5.2	POUŽITÉ BAKTERIE	35
5.3	ŽIVNÁ MÉDIA	35
5.4	CHEMIKÁLIE	37
6	METODY	39
6.1	PŘÍPRAVA MAG	39
6.2	PŘÍPRAVA SUSPENZE BAKTERIÍ A SLEDOVÁNÍ INHIBIČNÍCH ÚČINKU MAG	40
6.3	PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO OVOCNÉ ŠŤÁVY	41
6.4	MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA	42
6.5	IZOLACE BAKTERIÍ	43
6.6	METODY POUŽITÉ PRO CHARAKTERIZACI BAKTERIÍ	43
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	46
7.1	VÝSLEDNÁ KONVERZE MAG	46
7.2	INHIBICE MAG <i>IN VITRO</i>	46
7.3	KULTIVACE MOŠTŮ	53
7.3.1	První týden	54
7.3.2	Druhý týden	55
7.3.3	Třetí týden	55
7.3.4	Čtvrtý týden	56
7.4	CHARAKTERIZACE BAKTERIÍ	58
7.4.1	Makroskopická morfologie kolonií	58
7.4.2	Mikroskopická morfologie kolonií a biochemické testy	59
7.4.3	Oxidačně fermentační test – O/F test, Oxidázový test - OXItest	60
7.4.4	Diagnostická půda M17	61
7.4.5	ENTEROtest 16 a 24	61
7.4.6	NEFERMENTtest 24	61
	ZÁVĚR	63
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	65
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	71
	SEZNAM OBRÁZKŮ	72
	SEZNAM TABULEK	73
	SEZNAM PŘÍLOH	74

ÚVOD

Prioritou výrobců je vyrábět kvalitní a bezpečné výrobky, které si spotřebitel rád koupí. Na přesyceném trhu je poměrně těžké prorazit s něčím novým neboť spotřebitelé jsou čím dál náročnější.

S dnešní uspěchanou dobou, která přináší spoustu stresu a starostí, si lidé uvědomují, že tento životní styl má negativní dopad na jejich zdraví, proto také začíná vzrůstat poptávka po výrobcích, které jsou šetrně vyrobeny, zachovávají si nutriční hodnotu a obsah vitamínů a neobsahují větší množství syntetických látek.

Do popředí se dostávají výrobky se značkou EKO či BIO. Nejdůležitějším cílem pro udržení celkové kvality je zdravotní nezávadnost, která může být narušena nežádoucí mikroflórou. Snahou je tedy využít látky, které by se daly použít jako přímá náhrada chemických konzervantů, a navíc by neměly nežádoucí vliv na organismus.

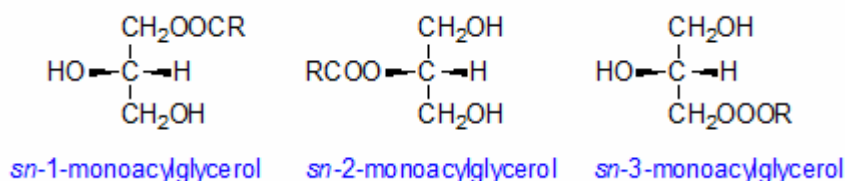
Právě monoacylglyceroly, které se hojně využívají nejen v potravinářském průmyslu, představují skupinu přírodních látek, u kterých byla v řadě studií prokázána antimikrobiální aktivita.

Snahou této práce je prozkoumání inhibičních vlastností vybraných monoacylglycerolů na mikrobiální kontaminanty čerstvých ovocných šťáv. Pokud by se prokázaly pozitivní výsledky, je možné uvažovat o uplatnění těchto přírodních, biokompatibilních látek jako náhradních řešení pro zajištění delší trvanlivosti čerstvých ovocných šťáv, které by nemusely být podrobeny pasteraci nebo jiné chemické úpravě.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MONOACYLGLYCEROLY

K nepostradatelným složkám ve většině zpracovaných potravin obsahujících jedlé tuky nebo oleje patří potravinářské emulgátory, jejichž hlavním zástupcem jsou monoacylglyceroly [1]. Monoacylglyceroly (MAG) nebo také někdy zvané monoglyceridy jsou parciální estery glycerolu, které mají pouze jednu hydroxylovou skupinu esterifikovanou vyšší mastnou kyselinou. Podle polohy zbytku mastné kyseliny mohou vznikat tři různé izomerní formy:



Obrázek 1: Izomerní formy monoacylglycerolu [2]

Jelikož se *sn-1* a *sn-3* izomer monoacylglycerolů od sebe neliší, uvádí se pouze dvě izomerní formy a to 1-monoacylglyceroly a 2- monoacylglyceroly [2].

1.1 Vlastnosti

Chemické a fyzikální vlastnosti monoacylglycerolů závisí především na poloze a typu mastné kyseliny navázané na glycerol [3]. Charakter mastné kyseliny určuje, zda jsou monoacylglyceroly kapalné nebo pevné. Kapalné monoacylglyceroly mohou být bílé, slámově žluté nebo až tmavě zbarvené, jejich konzistence je většinou olejovitá. U pevných monoacylglycerolů je možné se setkat s vločkami, práškem nebo drobnými kuličkami [4]. Co se týče bodu tání monoacylglycerolů, ten stoupá s rostoucím počtem atomů uhlíku v molekule [5]. Monoacylglyceroly jsou rozpustné v alkoholu, chloroformu a diethyletheru, nerozpustné jsou v petroletheru a ve vodě [6]. Amfipatický charakter molekul MAG je podstatou jejich schopnosti snižovat povrchové napětí na rozhraní dvou nemísitelných fází a monoacylglyceroly mají tedy povahu povrchově aktivních látek [7]. Mezi významné vlastnosti monoacylglycerolů patří i jejich antimikrobiální účinky, o kterých bude blíže pojednáno v kapitole 1.3. Jelikož se MAG nachází ve stopovém množství v rostlinných lipidech, živočišných tkáních [8] a vyskytují se jako meziprodukt metabolismu tuků, jsou dobře snášeny lidským organismem a jejich uplatnění v průmyslu je široké [9].

1.2 Výroba a využití

V současné době jsou monoacylglyceroly vyráběny ve velkém množství a to kolem 200 000 tun ročně. Lze je vyrobit několika způsoby a to interesterifikací, kde se využívá alkoholýza (glycerolýza), acidolýza nebo transesterifikace, dále esterifikací mastné kyseliny s glycerolem, hydrolýzou triacylglycerolů a posledním způsobem je adice mastné kyseliny na glycidol [5]. V průmyslovém měřítku se monoacylglyceroly nejčastěji vyrábí glycerolýzou z triacylglycerolů za přítomnosti alkalického katalyzátoru [10], pro reakci jsou však nutné vysoké teploty 170 – 280 °C. Další možností je hydrolýza tuků a olejů za vysokých teplot s pod tlakem. Při této reakci dochází k odštěpování mastných kyselin a diacylglycerolů přičemž další hydrolýzou vznikají monoacylglyceroly. Je taktéž zapotřebí katalyzátoru. V současnosti se spíše tato metoda využívá pro výrobu mastných kyselin

a monoacylglyceroly tvoří vedlejší produkt [5]. Dnes se pomalu dostává do popředí hydrolýza triacylglycerolů [11], která je katalyzována specifickými lipázami, nevýhodou této metody je však nízká výnosnost [12].

Monoacylglyceroly patří mezi nejpoužívanější emulgátory v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu [12]. V potravinářství, kde nachází uplatnění asi 60 % celkové produkce MAG [13], se využívají například jako emulgační činidla při výrobě směsných emulgovaných tuků a mražených krémů. Existují taktéž zmínky o použitelnosti monoacylglycerolů v produkci masných výrobků, a to jak tepelně opracovaných, tak i tepelně neopracovaných. Taktéž se využívají v pekárenském průmyslu, kde prodlužují dobu čerstvosti pečiva a zlepšují některé jeho vlastnosti. Využívají se i při výrobě bramborových kaší nebo cukrovinek, kde snižují lepivost, zvětšují objem a zvyšují stabilitu. Dále se dají využít také při výrobě těstovin [14].

Spotřeba kosmetického a farmaceutického průmyslu představuje ročně asi 12 % celosvětové produkce monoacylglycerolů. V kosmetice se využívají jako aktivní substance. Vykazují stabilitu vůči vzdušné oxidaci, mají dobré emulgační a měkčící vlastnosti, kůži a sliznici jsou dobře snášeny a jsou schopny penetrace. Dále se uplatňují ve výrobcích pro péči o pleť, v barvách na vlasy nebo v deodorantech [13].

Ve farmacii jsou monoacylglyceroly aplikovány jako součást gelových komponent usnadňujících transport léčiv a resorpci aktivních komponent ve tkáních [10,15], dále jako

protizánětlivé komponenty [13] nebo také jako alternativa při léčbě a prevenci sexuálně přenosných infekcí ve formě vaginálních gelů [16].

V plastikářském průmyslu se monoacylglyceroly přidávají do plastů kvůli zlepšení plasticity, antistatických a lubrikačních vlastností. V textilním průmyslu se monoacylglyceroly využívají taktéž díky antistatickým vlastnostem, a také kvůli zvýšené odolnosti vůči vodě, kdy zároveň zlepšují barevnou stálost a kontrast tkaniny. V těchto průmyslových oblastech zaujímají monoacylglyceroly 12 % z celkové produkce [13].

1.3 Antimikrobiální účinky

Mikrobiologická bezpečnost potravin patří mezi hlavní cíle potravinářského průmyslu i mezi cíle spotřebitelů. Bohužel tepelné procesy, které se využívají k zajištění bezpečnosti potravin, mají většinou destruktivní účinky na nutriční a sensorické složky. Pro zachování původní kvality potravin se začalo využívat alternativ, mezi které patří i monoacylglyceroly [17]. Antimikrobiálních účinků monoacylglycerolů se však nevyužívá jen v potravinářství, ale také i v kosmetice a medicíně [18]. Monoacylglyceroly jsou účinné vůči některým sexuálně přenášeným patogenům, jako jsou například *Herpes simplex virus 2* (HSV-2) nebo původce kapavky *Neisseria gonorrhoeae* [16], dále vůči kvasinkám [18], některým plísním, grampozitivním a gramnegativním bakteriím. Citlivost gramnegativních bakterií k antimikrobnímu působení monoacylglycerolů je nižší než u grampozitivních bakterií. Důvodem je jejich vnější membrána, která může působit jako překážka. Účinnost MAG vůči gramnegativním druhům může být zvýšena přidavkem některých chelatačních činidel jako je například kyselina citronová nebo fosforečná [17]. Antimikrobiální účinky monoacylglycerolů jsou závislé na počtu uhlíku a poloze a počtu dvojných vazeb v molekule mastné kyseliny. Mezi nejúčinnější inhibitory patří především monoacylglyceroly kyseliny kaprinové (MAG C_{10:0}) a laurové (MAG C_{12:0}) [19]. Účinnost monoacylglycerolů však klesá se zvyšující se délkou řetězce, s čímž může souviset i jejich rozpustnost [20]. Aktivita monoacylglycerolů vůči mikroorganismům byla také snížena v přítomnosti škrobu, želatiny anebo albuminu [21].

Mechanismus působení monoacylglycerolů není zcela objasněn, podle některých autorů dochází k narušení buněčné stěny, zablokování receptorů a inhibici replikace [22]. Další studie předpokládají narušení funkce cytoplazmatické membrány a inhibici transportu aminokyselin [16, 23].

1.3.1 Bakterie

Studie Růžičky et al. [18] prokázala, že monoacylglyceroly kyseliny kaprinové (monokaprin) a laurové (monolaurin), byly účinnější proti grampozitivním bakteriím v porovnání s gramnegativními bakteriemi. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) monokaprinu a monolaurinu pro *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis* se pohybovaly v rozmezí 20 - 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, naopak odolné se ukázaly být gramnegativní bakterie *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*, u kterých nebyl zastaven růst ani při nejvyšší studované koncentraci 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. U gramnegativních bakterií *Klebsiella pneumoniae* a *Acinetobacter lwoffii* monokaprin inhiboval růst již při relativně nízké koncentraci a to 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Antimikrobiální aktivita monolaurinu byla i předmětem studie Chaibi a kol. [24]. Byly sledovány účinky MAG v kombinaci s vysokou teplotou na inaktivaci spor *Bacillus cereus*, kde monolaurin výrazně snižoval tepelnou odolnost spor.

Bergsson et al. [16, 25] prokázal inhibiční účinky monokaprinu na gramnegativní sexuálně přenosné patogeny *Chlamydia trachomatis* a *Neisseria gonorrhoeae*, což naznačuje možnost využití MAG jako komponent intravaginálních gelů pro prevenci a léčbu sexuálně přenosných infekcí.

Výsledky studie Nair et al. [26] ukázaly, že kyselina kaprylová a její monoacylglycerol monokaprylin (MAG C_{8:0}) mohou být slibnou alternativou při léčbě mastitidy skotu, neboť jejich inhibiční účinek byl prokázán u patogenních mikroorganismů, mezi které patří *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* [26]. Antimikrobiální aktivita monoalaurinu byla prokázána také vůči patogenní grampozitivní bakterii *Listeria monocytogenes*, přičemž minimální inhibiční koncentrace byla relativně nízká [27]. Na této bakterii byly prováděny i další studie například Wang [20], Nobmann [28], Branen a Davidson [29] atd. zaměřené na účinky různých monoacylglycerolů.

Ve studii Skřivanové a Marounka [30] byly kmeny gramnegativních bakterií *Salmonella* sp., *Escherichia coli* a grampozitivní bakterie *Clostridium perfringens* vystaveny účinkům mastných kyselin a monolaurinu. Růst *Clostridium perfringens* byl inhibován monolaurinem, kyselinou kaprylovou, kaprinovou, laurovou, myristovou, a olejovou. U *Escherichia coli* se projevila inhibice u kyseliny kaprylové a kaprinové, na *Salmonella*

sp. působila inhibičně pouze kyselina kaprylová. Petschow et al. [31] zkoumali účinky monoacylglycerolů s deseti až čtrnácti uhlíky v řetězci mastné kyseliny proti gramnegativní bakterii *Helicobacter pylori*. Monoacylglyceroly dokázaly rychle a účinně inaktivovat tyto bakterie podílející se na vzniku žaludečních vředů.

1.3.2 Plísně a kvasinky

Účinky monoacylglycerolů na kvasinky a plísně se také zabývaly některé studie. Například u testovaných kvasinek (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Zygosaccharomyces rouxii* a *Aureobasidium pullulans*) byl zcela zastaven růst při koncentracích monokaprinu 100 – 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Koncentrace 100 – 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ blokovala i růst všech studovaných plísní, až na výjimku *Mucor racemosus* [18]. Vlivem monoacylglycerolů na růst plísní se zabývali také Buňková a kol. [19]. Přesněji byla zkoumána aktivita monokaprylinu, monokaprinu a monolaurinu na plísních izolovaných z kontaminovaného chleba, konkrétně na *Penicillium* sp. a *Mucor ruber*. Dále byly inhibiční účinky MAG sledovány na vybraných mikroorganismech *Aspergillus niger*, *Alternaria* sp. a *Phoma* sp. U všech testovaných monoacylglycerolů byly prokázány antimykotické účinky.

1.3.3 Viry

Jak už bylo zmíněno na začátku, monoacylglyceroly jsou účinné i vůči některým obaleným virům. Hillmarsson et al. [32] sledovali účinky některých MAG na HSV - 1 a HSV - 2 (*Herpes simplex virus*), kdy monokaprylin, monokaprin a monolaurin byly plně účinné proti oběma typům tohoto viru.

Stejný účinek byl popsán i u několika dalších obalených virů, jako je například VSV (virus vezikulární stomatitidy), virus spalniček, respirační syncytiální virus, virus visna atd. [33].

2 OVOCNÉ ŠŤÁVY

Ovocné šťávy a nealkoholické nápoje jsou k dispozici v podstatě ve stejné podobě téměř kdekoli na světě a patří k velmi pokrokovému odvětví potravinářského průmyslu. Na zvyšování spotřeby těchto nápojů působí růst životní úrovně, změny ve stravovacích návycích, rozvoje automobilismu, turistiky, gastronomie, globalizace trhu atd. [34]. Jsou k dostání v lahvích, plechovkách, v TetraPacích, sáčcích, kelímcích a dalších známých obalech [35]. Ve vyhlášce Ministerstva zemědělství ČR č. 335/1997 Sb. v platném znění vyhlášky č. 289/2004 Sb. Nealkoholickým nápojem se rozumí nápoj obsahující nejvýše 0,5 % objemových ethanolu (naměřeno při 20 °C), vyrobený zejména z pitné vody, pramenité vody, přírodní minerální vody nebo kojenecké vody, ovocné, zeleninové, rostlinné nebo živočišné suroviny, přírodních sladidel, sladidel, medu a dalších látek, a popřípadě sycený oxidem uhličitým [36]. Základními surovinami pro výrobu nealkoholických nápojů jsou pitná voda, pramenitá voda, přírodní minerální voda, kojenecká voda, ovoce, některé druhy zeleniny, oxid uhličitý, sladidla, kyseliny, aromatické látky a barviva [37].

2.1 Charakteristika ovocných šťáv

Dle vyhlášky č. 335/1997 Sb. v platném znění vyhlášky č. 289/2004 Sb. Ministerstva zemědělství lze ovocné šťávy dělit na:

- ovocnou nebo zeleninovou šťávou - šťáva, zkvasitelný, ale nezkvašený výrobek získaný z přiměřeně zralého a zdravého, čerstvého nebo chlazeného ovoce nebo zeleniny, a to jednoho nebo více druhů, s charakteristickou barvou, vůní a chutí, které jsou typické pro šťávu pocházející z příslušného ovoce nebo zeleniny; aroma, dužnina a buňky ze šťávy, které jsou odděleny v průběhu zpracování, mohou být do téže šťávy vráceny; rajčata se považují za zeleninu
- ovocnou šťávou z citrusových plodů - šťáva získaná z endokarpu jejich vnitřní části; limetková šťáva však může být získávána z celého plodu, použije-li se vhodný výrobní postup, který omezí podíl složek z vnější části plodu na minimum

- ovocnou nebo zeleninovou šťávou z koncentrované ovocné nebo zeleninové šťávy (ovocnou nebo zeleninovou šťávou z koncentrátu) - šťáva získaná z koncentrované ovocné nebo zeleninové šťávy opětovným doplněním podílu vody, která byla odstraněna při koncentraci šťávy a obnovením aroma pomocí těkavých složek, které byly zachyceny v průběhu koncentrace příslušné ovocné nebo zeleninové šťávy, popřípadě opětovným doplněním ztracené dužniny a buněk zachycených při výrobě ovocné šťávy stejného druhu; ovocná nebo zeleninová šťáva z koncentrované ovocné nebo zeleninové šťávy musí vykazovat přinejmenším rovnocenné organoleptické a analytické vlastnosti odpovídající průměrným hodnotám šťávy získané z téhož druhu ovoce nebo zeleniny podle písmene d) [36].

2.2 Vlastnosti ovocných šťáv

Ovocné a zeleninové šťávy obsahují průměrně 85 – 92 % vody a 8 – 15 % sušiny. Převážnou část sušiny tvoří cukry a to především glukóza, fruktóza a v menším množství sacharóza [34]. Díky tomuto podílu jsou ovocné šťávy pokládány za možné zdroje rychlého přísunu energie [35]. Obsah bílkovin je velmi nízký a téměř vůbec se nevyskytuje tuk, což je vzhledem k vysoké spotřebě příznivé. Z nutričního hlediska je důležitý obsah vitamínů (převážně vitamín C) a minerálních látek jako je například draslík, sodík, vápník, hořčík, mangan nebo fosfor [34]. Některé vitamíny nacházející se v ovocných šťávách mají antioxidační vlastnosti. Mezi tyto látky patří kyselina askorbová (vitamín C), tokoferoly (vitamin E), beta-karoten a flavonoidy [35].

V ovocných šťávách se vedle kyseliny citrónové nachází například kyselina jablečná či vinná. Kyselost šťáv je ovlivněna přítomností uvedených kyselin, kdy pH používaných ovocných šťáv je poměrně nízké a to v rozmezí od 2 – 4,5. Samozřejmě, že některé druhy ovocných šťáv, jako je například ananasová šťáva, mohou mít pH vyšší [38].

Vodní aktivita (a_w) hraje při zachování nezávadnosti důležitou roli. Koncentrované ovocné šťávy díky vyššímu obsahu cukru mají a_w kolem 0,90 avšak u méně koncentrovaných ovocných šťáv může vodní aktivita vzrůstat, což je vhodné pro patogenní mikroorganismy a to především pro plísně a kvasinky [38].

Mezi vlastnosti ovocných šťáv patří jejich příznivé účinky na zdravotní stav, v některých případech i účinky léčivé, kdy se například při poruchách látkové výměny doporučuje šťáva z černého rybízu [34].

2.3 Technologická výroba a použití ovocných šťáv

Technologie výroby ovocných šťáv se skládá z několika hlavních kroků a to získávání ovocné šťávy, odkalování šťáv, čiření šťáv a konzervování šťáv [37]. Nejčastější surovinou pro výrobu ovocných šťáv související se značným rozšířením jsou jablka, dále je to černý a červený rybíz nebo višně. Z cizokrajného ovoce patří k nejpoužívanějším pomeranče, ananas a grapefruit [39].

Ovocná šťáva lze získat dvojitým způsobem a to lisováním nebo macerací, kdy dochází k vyluhování teplou vodou. Častějším způsobem získání ovocných šťáv je lisování [37].

Po sběru, třídění a důkladném umytí a následném drcení se ovoce dle daného druhu lisuje. Obecně se většinou lisy používají na více druhů ovoce, však u citrusů, ananasu či peckového ovoce se využívají ke zpracování speciálně konstruované zařízení. Čerstvě lisované ovoce splňuje vesměs všechny požadavky, mezi které patří uhašení žizně, čerstvost, zdravotní prospěšnost, příjemnou chuť a samozřejmě pro dnešní populaci důležitý faktor a to, že je přírodní. Proč tedy využívat další postupy? Problémem je udržitelnost ovocné šťávy, která rychle podléhá fermentaci mikroorganismů [35].

Po lisování se šťávy odkalují a to prostou sedimentací, což je nejjednodušší způsob, filtrací či odstředováním. Čiření šťáv se provádí pomocí čiřidel, které způsobují vysrážení koloidních nečistot za vzniku rychle se usazující sraženiny. Dle účinku se čiřidla rozdělují na čiřidla mechanická (křemelina, kaolin), chemicko-mechanická (kasein, kyselina křemičitá, ferrokyanid draselný) a čiřidla enzymatická působící na principu pektolytických enzymů. Posledním krokem je konzervace ovocné šťávy a to přímo ke spotřebě nebo jako polotvar. Mezi základní polotovary patří ovocné šťávy konzervované chemicky, kdy se šťáva bleskově pasteruje a dále se použijí povolená konzervační činidla (benzoan sodný, kyselina sorbová, oxid siřičitý), dále ovocné šťávy konzervované sycením oxidem uhličitým a posledním typem je konzervování zahušťováním, kdy se zahušťuje na sušinu 60 – 65 % RS ve vakuových odparkách [37].

Pro přímou spotřebu se šťáva pasteruje nebo se využívá UHT záhřevu. Například u pasterace citrusových šťáv je pasterační teplota dosahuje 95 °C, kdy dochází nejen k odstranění nežádoucí mikroflóry, ale také dojde k inaktivaci pektolytických enzymů. Takto pasterovaná se asepticky balí do obalů [35].

Ovocná šťáva může být konzervována pro přímou spotřebu jako koncentrát, nebo se konzervuje jako polotovar pro další využití a to například k výrobě limonádových a konzumních sirupů. Kromě toho jsou také cennou surovinou pro výrobu přírodních aromat a základních látek pro přípravu nealkoholických nápojů [34].

3 MIKROORGANIZMY

Mikrobiologie je věda, která zahrnuje význam a výskyt nejen bakterií, ale také i plísní, kvasinek, prvoků a řas. Mikroorganizmy tvoří jak začátek, tak i konec potravního řetězce, na kterém záleží všechen život [40].

Je důležité si uvědomit, že potrava, kterou přijímáme je buď živočišného nebo rostlinného původu a mikroorganizmy ať už se zdá, že se nám snaží zničit naše potravinové zdroje, plní přitom pouze svou biologickou roli. Podle zdroje, ze kterého se potrava skládá, je možné předvídat přítomnost charakteristických mikroorganismů, které se v dané potravine postupem času objeví. Některé mikroorganizmy jsou v potravě žádoucí, některé nikoli. Tyto nežádoucí mohou způsobovat například různé gastroenteritidy. Díky těmto „problémům“ byla sestavena taxonomie, která se postupem času mělnila a dodnes se mění, neboť jsou doplňovány stále nové objevené mikroorganizmy. Zařazení mikroorganismů do systému je založeno na molekulárních genetických metodách [41].

3.1 Charakteristika vybraných bakterií

Už podle názvu se tato diplomové práce bude nejdříve zabývat charakteristikou modelových mikroorganismů, a poté charakteristikou mikroorganismů, které mohou způsobovat kažení ovocných šťáv.

Abychom však mohli jednotlivé bakterie charakterizovat, musíme znát jejich zařazení do bakteriálních taxonomů. Neuznávanější systém na celém světě obsahuje kniha „Bergey's Manual of Systematic Bakteriology“. Zde je říše *Procaryotae* rozdělena podle stavby buněčné stěny a to do 4 oddělení.

- Oddělení I. *Gracilicutes* (gracilit = tenký, curie = kůže) – Prokaryota mající tenkou a komplexní buněčnou stěnu složenou z tenké vrstvy peptidoglykanu a vnější membrány. Netvoří endospory a jsou **gramnegativní**.
- Oddělení II. *Firmicutes* (firmus = pevný) – Prokaryota s pevnou a tlustou buněčnou stěnou. Některé tvoří endospory a jsou **grampozitivní**.
- Oddělení III. *Tenericutes* (tener = jemný) – Prokaryota nemající buněčnou stěnu. Na povrchu vícetvarých buněk je cytoplazmatická membrána.

- Oddělení IV. *Mendosicutes* (mendosus = vadný) – Prokaryota mající atypickou buněčnou stěnu [42].

3.2 Modelové bakterie s buněčnou stěnou grampozitivního typu

Asi 20 nm tlustá buněčná stěna grampozitivních bakterií je tvořena mohutnou vrstvou peptidoglykanu skrze níž na povrch pronikají lineární řetězce teichoové kyseliny, která je hlavním povrchovým antigenem. Základní metodou diferenciací bakterií je Gramovo barvení. U grampozitivních bakterií se po použití Gramovy barvicí metody buněčná stěna zbarví modrofialově [42].

3.2.1 *Staphylococcus aureus*

Stafylokoky jsou grampozitivní koky o velikosti zhruba 1 μm , jsou nepohyblivé a nesporulující. Díky způsobu dělení buněk tvoří většinou nepravidelné shluky připomínající hrozny. Na neselektivních půdách jsou kolonie *S. aureus* neprůhledné, hladkého povrchu a rovných okrajů, krémové konzistence, vždy pigmentované. Pigment bývá většinou smetanový, krémový nebo zlatožlutý, kolonie mají asi 1 - 3 mm v průměru [43]. *S. aureus* je kataláza pozitivní, oxidáza negativní a fakultativně anaerobní bakterie, je typicky mezofilní s teplotním rozmezím pro růst od 7 do 48 °C. Optimální teplota růstu je 37 °C, optimální pH prostředí se pohybuje mezi 6 – 7 [40]. *Staphylococcus aureus* je potencionálním patogenem nejen u lidí, ale také u zvířat. Vyvolává onemocnění sahající od banálních kožních hnisavých afekcí po závažné záněty vnitřních orgánů až smrtelně probíhající sepse [43]. Kromě hnisavých (pyogenních) infekcí, je také původcem nejběžnějšího typu otravy potravinami díky produkci stafylokokového enterotoxinu [44]. Otrava se vyznačuje krátkou inkubační dobou, obvykle 2 - 4 hodiny. Mezi převládající symptomy patří nevolnost, zvracení, žaludeční křeče, říhání, může se dostavit i průjem. Tyto problémy odezní během 1 – 2 dní. V závažných případech může dojít k dehydrataci, a kolapsu, kdy se poté vyžaduje léčba nitrožilní infuzí. Důležitou charakteristikou, na kterou by výrobci potravin měli brát zřetel je u *S. aureus* tolerance soli a snížené aktivity vody v některých potravinách. Je schopen růst při 5 – 7 % koncentraci NaCl a a_w 0,83. Výskyt *S. aureus* v malém množství v potravinách není neobvyklý. Vyskytuje se v syrovém mase nebo mléce, většinou je však eliminován vysokou teplotou při kulinární úpravě nebo při pasteraci. Tato bakterie se může objevit ve větším množství například

v šunkách, nakládaném hovězím mase, sýrech, trvanlivých salámech nebo ve zmrzlínách, zde však většinou došlo k pomnožení křížovou kontaminací, či nevhodným skladováním [40].

3.2.2 *Bacillus cereus*

Rod *Bacillus* je v přírodě velmi rozšířený, zahrnuje grampozitivní aerobní, případně fakultativně anaerobní tyčinky. Buňky bývají poměrně velké (1 x 3-10 μm), jsou pohyblivé díky peritrichálně umístěným bičíkům. Důležitým znakem tohoto rodu je schopnost tvorby endospor, které odolávají nepříznivým podmínkám a vysokým teplotám. Spory *B. cereus* jsou elipsoidního tvaru a nezduřují buňku [43]. *B. cereus* je kultivačně nenáročná fakultativně anaerobní bakterie, schopná růstu v teplotním rozmezí 8 – 55 °C a optimálně kolem 28 – 35 °C. Snáší široké rozmezí pH 4,9 – 9,3 [40]. Na běžných půdách tvoří velké (průměr 3 - 8 mm), plstnaté kolonie s nepravidelnými okraji. Nejčastěji se vyskytuje v půdě, vodě, může se snadno přenášet na vegetaci. Nachází se v různých potravinách včetně mléčných výrobků, masa, koření a obilovin. *B. cereus* způsobuje dvě formy alimentárních onemocnění, jejichž příčinou je požití kontaminovaných potravin, ve kterých se *B. cereus* množí a produkuje enterotoxiny (emetický a průjmový toxin) zodpovědné za klinické příznaky [43]. První formou je onemocnění dávicího typu, které je nejvíce spojováno s konzumací rýže, a druhou je onemocnění průjmového typu [41]. Dávicí forma se projevuje nevolností, zvracením a křečemi, příznaky se objeví během 1-5 hodin po požití kontaminovaných potravin [45]. Nevolnost a zvracení většinou odezní během 6 – 24 hodin. U průjmových obtíží se příznaky mohou objevit až po 8 až 16 hodinách a většinou bývají doprovázeny bolestí břicha. Tento typ onemocnění trvá většinou 12 – 24 hodin [41].

3.2.3 *Bacillus subtilis*

Stejně jako *Bacillus cereus* se tato aerobní bakterie rodu *Bacillus* vyznačuje tvorbou spor [44]. Jedná se o pohyblivé tyčinky vyskytující se jednotlivě nebo v nepravidelných shlucích, spory *B. subtilis* jsou oválné a nezduřují buňku [46]. Roste v teplotním rozmezí 25 - 43 °C, optimálně kolem 30 °C a při pH 5,5 – 8,5. Běžně se nachází v půdě a na vegetaci. Pro člověka nepředstavuje potencionální patogen, není však vyloučeno, že tato všudypřítomná bakterie se nemůže nacházet v kombinaci s jinými mikroorganismy u

infikovaných lidí [44]. *Bacillus subtilis* se stejně jako *E. coli* využívá hlavně jako experimentální bakterie [47].

3.2.4 *Micrococcus luteus*

Bakterie rodu *Micrococcus* tvoří sférické buňky, vyskytující ve shlucích většinou po dvou či ve čtveřicích. Tyto nepohyblivé, nesporelující striktně anaerobní koky mohou produkovat pigmenty, konkrétně *Micrococcus luteus* je žlutě pigmentující. Optimální teplota růstu je 25 – 37 °C [48]. Bakterie toho rodu je striktně aerobní, kataláza a oxidáza pozitivní, halotolerantní, avšak při 15 % koncentraci NaCl už neroste [46]. Běžně osidluje kůži savců, u lidí se konkrétně nachází na čele, ramenech a nohách, kde se živí odumřelou kůží a potem [49]. Maso a mléčné výrobky se považují za sekundární zdroj výskytu, kde způsobují kažení, nepředstavují však významnou hrozbu infekce. Obecně se považuje za nepatogenní, onemocnění může vyvolat pouze u osob s oslabenou imunitou. Využívá se na různé biologické testy, a to například pro zjištění rezistence vůči reziduím antibiotik v potravinách [44].

3.2.5 *Enterococcus faecalis*

Bakterie rodu *Enterococcus* tvoří nepohyblivé sférické nebo ovoidní buňky vyskytující se ve dvojicích, drobných shlucích nebo v krátkých řetězcích, jsou schopny růst v přítomnosti 6,5 % NaCl nebo ve 40 % žluče a při pH 9,6 [48]. *Enterococcus faecalis* dříve označována jako *Streptococcus faecalis* je fakultativně anaerobní, kataláza negativní nesporelující bakterie s optimální teplotou růstu 37 °C [46]. Enterokoky jsou kultivačně nenáročné, pro jejich záchyt se využívá selektivně diagnostická půda Slanetz-Bartley agar, na které enterokoky rostou v růžových až červených koloniích [43]. Enterokoky tvoří součást normální střevní flóry jak u člověka tak i zvířat, vyskytují se také na rostlinách [44]. Patří však mezi závažné oportunní patogeny, často jsou původci nozokomiálních infekcí rezistentních na všechna konvenčně používaná antibiotika. Enterokokové infekce u člověka jsou přibližně v 90 % případů vyvolány druhem *E. faecalis*, v 7 % *E. faecium*, další druhy se uplatňují vzácně. *E. faecalis* může způsobovat infekce močového měchýře, různé respirační choroby, onemocnění zvané endokarditida (zánět srdeční nitroblány) [46]. Využívá se jako indikátor pro zjištění bezpečnosti potravin a vod [44].

3.3 Modelové bakterie s buněčnou stěnou gramnegativního typu

Buněčná stěna gramnegativních bakterií je značně odlišná od buněčné stěny grampozitivních bakterií [42]. Skládá se z tenké vrstvy peptidoglykanu obsahující kyselinu muramovou a nad ní je vnější membrána [48]. Vnější membrána je tvořena fosfolipidovou dvojvrstvou a proteiny, v zevní vrstvě jsou zakotveny molekuly lipopolysacharidu, které udílí bakterii antigenní vlastnosti [43]. Mezi vnější membránou a peptidoglykanovou vrstvou je tzv. periplazmatický prostor. Obsah lipidů ve vnější stěně gramnegativních bakterií je příčinou jejich odolnosti vůči povrchově aktivním látkám [50]. U gramnegativních bakterií se po použití Gramovy barvicí metody buněčná stěna zbarví červeně nebo růžově karbolfuchsinem neboť komplex barviva s jódem je vyplaven ethanolem nebo acetonem [51].

3.3.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli je nejprozkoumanější bakterie, neboť slouží jako modelový mikroorganismus pro biochemické, genetické i fyziologické studie [50]. Jedná se o fakultativně anaerobní bakterii rodu *Escherichia* tvořící rovné tyčinky, které se nacházejí jednotlivě nebo ve dvojicích. Je oxidáza negativní a kataláza pozitivní, pohybuje se pomocí peritrichálních bičíků nebo je nepohyblivá [48]. Roste v teplotním rozmezí 7 – 50 °C a optimálně kolem 37 °C. Neutrální pH je optimální pro růst, ale za jinak optimálních podmínek může růst i v pH 4,4 [40]. Mezi vlastnosti této bakterie patří například schopnost zkvašovat cukry (glukosu, laktózu) za intenzivní tvorby kyselin (mléčná, pyrohroznová, octová a mravenčí) a plynu [50]. Na půdách tvoří hladké, lesklé kolonie [41]. Je univerzálním obyvatelům lidského i zvířecího střevního traktu. Využívá se jako indikátor fekální kontaminace a možné přítomnosti dalších patogenů jako například *Salmonella Typhi* [40]. *Escherichia coli* patří mezi podmíněně patogenní mikroorganismy, představuje jednu z nejčastějších příčin infekce močových cest a to hlavně u mladých žen [45]. Ve střevním traktu je schopna vyvolat chorobné stavy v případě, že se jedná o kmen vybavený specifickými faktory virulence například schopností produkce toxinů. Na základě virulence se tyto kmeny rozdělují na [43]:

- enteropatogenní *E. coli* (EPEC)
- enteroinvazivní *E. coli* (EIEC)

- enterotoxigení *E. coli* (ETEC)
- enterohemorragické *E. coli* (EHEC)
- enteroagregativní *E. coli* (EAaggEC)

Tyto kmeny mohou způsobovat různá průjemová onemocnění. Například kmen enterotoxigení *E. coli* (ETEC) způsobuje tzv. cestovatelský průjem. Mezi další onemocnění, které může tato bakterie způsobit je novorozenecká meningitida [40].

3.3.2 *Serratia marcescens*

Serratia marcescens je fakultativně aerobní, kataláza pozitivní, oxidáza negativní bakterie tvořící rovné tyčky, které jsou pohyblivé pomocí peritrichálních bičíků. Červený pigment je způsoben tvorbou prodigosinu, které tvoří některé její kmeny. Je schopna růstu v širokém rozmezí pH 5 – 9. Optimální teplota růstu je kolem 30 – 37 °C. Nachází se ve vodě, půdě, na rostlinách, podílí se při kažení potravin a je významným nozokomiálním patogenem. Způsobuje infekci močových cest [44], zápal plic, bakteriémie, endokarditidy. *S. marcescens* bývá často rezistentní na aminoglykosidy a peniciliny [45].

3.3.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Bakterie rodu *Pseudomonas* se vyznačuje rovnými mobilními tyčkami, kdy pohyb umožňují polární bičíky [48]. Vyskytují se většinou jednotlivě, ve dvojicích nebo v řetězcích. *Pseudomonas aeruginosa* je aerobní bakterie s optimální teplotou růstu kolem 37 °C [44] může však růst i při 42 °C na mnoha typech kultivačních médií, je oxidáza pozitivní. Tvoří hladké kulaté kolonie často s fluorescenční nazelenalou barvu, někdy však může tvořit i modrý pigment [45]. *Pseudomonas aeruginosa* je obecně považována za všudypřítomnou bakterii. Velice často se nachází ve vlhkém prostředí s nízkou dostupností živin, byla izolována z povrchových vod, půdy a vegetace. Jedná se o typický příklad oportunního patogena zejména pro citlivé jedince, navíc vytváří slizové vrstvy, které mohou odolávat vůči různým antimikrobním látkám [44]. Způsobuje infekce močových cest, infekce dýchacích cest zejména u pacientů s cystickou fibrózou, meningitidu, záněty kůže, měkkých tkání, a různé systémové infekce, a to zejména u pacientů s těžkými popáleninami nebo u jedinců trpící rakovinou [47].

3.3.4 *Salmonella enterica*

Většina salmonel je považována za lidské patogeny, ačkoli se liší v charakteristice a závažnosti onemocnění, které způsobují [40]. V současnosti jsou platná pouze dvě druhová jména salmonel a to *Salmonella bongori* a *Salmonella enterica*, které obsahují šest poddruhů. Mezi poddruhy *Salmonella enterica* patří například subspecies *enterica*, *salamae* nebo *arizonae* [52]. Pod tyto podruhy se řadí spousty další sérovarů, kterých je dnes známo kolem 2500. Obecně se jedná o gramnegativní rovné tyčky, které jsou pohyblivé díky peritrichiálním bičíkům [48]. Tyto tyčinky jsou dlouhé asi 1 -3,5 μm a široké 0,5 – 0,8 μm , většinou se vyskytují v řetězcích, ale mohou být i jednotlivě nebo ve dvojicích [52]. *Salmonella enterica* je fakultativně anaerobní, kataláza pozitivní a oxidáza negativní bakterie, která má optimální teplotu růstu 37 °C. Je schopna tvorby sirovodíku. Velmi dobře bývá usmrcována teplotou nad 66 °C [46]. V klinické mikrobiologii se rozlišují sérovary, které jsou primárně patogenní pro člověka (antropogenní) a sérovary primárně zoopatogenní. Mezi primárně antropogenní salmonely patří například sérovary Typhi a Paratyphi, tedy původci závažných systémových onemocnění tyfu a paratyfu. Zoopatogenní salmonely mají často své zvířecí hostitele a člověka nakazí spíše náhodou [43]. Mohou kontaminovat jak potraviny rostlinného původu tak hlavně potraviny živočišného původu a zaujímají už po řadu let první místo mezi původci alimentárních infekcí [53]. Mezi hlavní příznaky střevních infekcí vyvolaných salmonelami patří mírná horečka, nevolnost a zvracení, bolesti břicha a průjem, který trvá několik dní, popřípadě může přetrvávat i týden nebo více [40].

3.3.5 *Citrobacter freundii*

Tato bakterie rodu *Citrobacter* je charakteristická rovnými pohyblivými tyčkami, které se vyskytují jednotlivě nebo po dvou. Stejně jako salmonela je fakultativně anaerobní, kataláza pozitivní a oxidáza negativní. Vyznačuje se taktéž produkcí sirovodíku a optimální teplotou 37 °C [46]. Tato střevní bakterie využívá citrát jako zdroj uhlíku [41]. Vyskytuje se ve vodě, půdě a podílí se na kažení potravin [46]. Je běžným obyvatelům střevního traktu člověka, ve vyšších koncentracích však může způsobit gastroenteritidy u oslabených jedinců [50]. U dětí může způsobit novorozeneckou meningitidu spojenou s abscesem mozku, která může být až z 50 % smrtelná a velmi často vznikají dlouhodobé či trvalé neurologické následky [54].

3.4 Charakteristika bakterií způsobující kažení ovocných šťáv

Ovocné šťávy jsou díky svým fyzikálním a chemickým vlastnostem mikrobiologicky téměř stabilní. Mikrobiologická stabilita je do značné míry ovlivněna hodnotou pH, vodní aktivitou a poté pozdějšími úpravami jako je například pasterace [38]. I přes tyto vlastnosti však může docházet ke kažení [40]. I když jsou ovocné šťávy většinou napadeny plísněmi a kvasinkami, mezi kontaminující flóru mohou patřit i některé bakterie. Mezi nejčastější rody bakterií, které jsou spojovány s kažením ovocných šťáv patří *Acetobacter*, *Alicyclobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Saccharobacter*, *Zymobacter*, *Zymomonas* a další. [35].

3.4.1 Rod *Acetobacter*

Bakterie toho rodu jsou gramnegativní popřípadě gramvariabilní elipsoidní tyčky. Většinou se vyskytují jednotlivě, po dvou nebo v řetězcích. Tyto kataláza pozitivní a oxidáza negativní obligátně aerobní bakterie mohou produkovat pigmenty [48]. Vykazují poměrně vysokou toleranci ke kyselému pH 4 – 7, optimum růstu je však kolem pH 5,4 – 6,3 a to při teplotě 25 – 30 °C. Acetobaktery se vyskytují na různých rostlinných materiálech, jako je ovoce a květiny [44]. Zástupce tohoto rodu, který se může nacházet nejen v jablečném moštu je *Acetobacter acetin* [46]. *Acetobacter* může být také nalezen v zahradní půdě a odpadní vodě [55]. Pro člověka a zvířata jsou acetobaktery nepatogenní [48]. Nejčastěji se využívají pro výrobu octa [50].

3.4.2 Rod *Alicyclobacillus*

Tyto tyčinkovité bakterie jsou schopny vytvářet spory, které jsou odolné vůči vysokým pasteračním teplotám. Grampozitivní termofilní aerobní bakterie rostou při teplotách 35 – 70 °C a nejlépe při pH 3 – 5, přežívají však i při pH 2. Netvoří plyn, proto kontaminaci tímto rodem bakterií lze rozpoznat až po otevření a konzumaci. Pro člověka však tento rod není patogenní [56]. Bakterie se do šťáv dostávají s ovocem kontaminovaným při kontaktu s půdou, kažení se projevuje nepříjemným zápachem [57]. Zástupci tohoto rodu podílející se na kažení ovocných šťáv, které bylo pozorováno v jablečné šťávě, hruškovém džusu, pomerančové, broskvové a hroznové šťávě, jsou *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus acidocaldarius* a *Alicyclobacillus pomorum* [58].

3.4.3 Rod *Bacillus*

V současné době rodu *Bacillus* zahrnuje více než 60 druhů. Společným znakem je sporulace. Většinou se jedná o grampozitivní bakterie, které jsou schopny růst v rámci aerobních a fakultativně anaerobních podmínek, tímto se liší od rodu *Clostridium*, které jsou striktně anaerobní. Tento rod je rozšířen v přírodě a může být izolován z potravin, půdy, vody a dokonce i z eukaryotických organismů. Využívá se především pro výrobu různých metabolitů a enzymů. Většina zástupců tohoto rodu je nepatogenní pro člověka, až na výjimky (některé z nich byly uvedeny v kapitole 3.2.), a proto jsou využívány v potravinářském a jiném průmyslu [44]. Z ovocných šťáv byly izolovány například druhy *Bacillus acidocaldarius* [59], všude přítomný *Bacillus subtilis* [47], *Bacillus coagulans*, *Bacillus macerans*, *Bacillus polymyxa* [60] atd.

3.4.4 Rod *Clostridium*

Klostridie jsou grampozitivní sporulující tyčky, striktně anaerobní, avšak některé druhy jsou díky enzymatickému vybavení schopny tolerovat v prostředí malá množství kyslíku. energii získávají fermentačními procesy, bohatá enzymatická výbava umožňuje většině klostridií rozkládat proteiny či sacharidy. Klostridie jsou všudypřítomné, je možné je nalézt v půdě, v rostlinných produktech, zaživacích traktech, v otevřených ránách atd. Jen pár druhů je schopno vyvolat onemocnění člověka, nejčastěji jsou to toxikózy, sepse a nekrotizující infekce měkkých tkání [43]. Většina roste nejlépe při pH 6,5 - 7,0 a při teplotě 30 – 37 °C. Některé druhy jsou velmi odolné vůči pasteračním teplotám [44]. V ovocných šťávách se mohou nacházet například *Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium acetobutylicum* [60] a další.

3.4.5 Rod *Gluconobacter*

Buňky tohoto rodu bakterií jsou elipsoidní až tyčinkovité, většinou jsou uspořádány jednotlivě, po dvou nebo vzácně v řetízích. Jsou gramnegativní občas však gramvariabilní s optimální teplotou růstu 25 – 30 °C [48] a pH 5 – 6 [44]. Světlé kolonie jsou kataláza pozitivní a oxidáza negativní [48]. Přísně aerobní organismy jsou dobře přizpůsobeny k životu v potravinách a to hlavně v sladkých nealkoholických a alkoholických nápojích s kyselým pH nebo na rostlinných materiálech, především na ovoci. Stejně jako acetobaktery oxidují ethanol na kyselinu octovou [44].

3.4.6 Rod *Lactobacillus*

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou poměrně rozmanité a jsou řazeny do několika různých druhů [44]. Buňky mají pravidelný tvar tyček, které jsou obvykle delší. Tyto grampozitivní nesporeující bakterie jsou fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní, jsou schopny optimálního růstu při teplotě 30 – 40 °C a pH 5,5 – 6,2. Laktobacily jsou široce rozšířené nejen v nejrůznějších potravinách rostlinného a živočišného původu, ale i znečištěné vodě, v silážích a jsou běžnými mikroorganismy gastrointestinálního traktu živočichů včetně člověka. Z toho vyplývá, že tento rod není patogenní pro člověka až na některé vzácné výjimky [48]. V jablečné šťávě se jako kontaminující bakterie mohou objevit tyto zástupci *Lactobacillus delbrueckii*, *L. plantarum* a *L. leichmannii* [61].

3.4.7 Rod *Leuconostoc*

Rod *Leuconostoc* patří do skupiny bakterií mléčného kvašení [44]. Buňky mají občas tvar krátkých tyček se zakulacenými konci vyskytující se po dvou nebo v řetízích. Optimální růstová teplota těchto grampozitivních nesporeujících bakterií je 20 - 30 °C. Nachází se na rostlinách a v mléčných produktech, běžně jsou přítomny i v jiných potravinách [48]. Jsou považovány až na výjimky za nepatogenní [44]. Hlavním zástupcem, který v důsledku tvorby slizu může způsobit houstnutí nápojů je *Leuconostoc mesentroides* [34].

3.4.8 Rod *Saccharobacter*

Gramnegativní rod bakterií se vyznačuje malými rovnými pohyblivými tyčkami, které tvoří spory. Kolonie těchto fakultativně anaerobních bakterií jsou hladké, mléčně bílé. Tyto bakterie jsou oxidáza negativní a kataláza pozitivní. Optimální teplota růstu je kolem 30 – 46 °C [55]. Tvoří pigment, fermentují glukózu za tvorby ethanolu, CO₂ a malého množství kyselin [48]. Zatím jediným známým zástupcem, který byl nalezen v jablečném moštu a ve šťávě agáve, je *Saccharobacter fermentatus* [41].

3.4.9 Rod *Zymobacter*

Tento zástupce mikroorganismů, které se také mohou vyskytovat v ovocném moštu, je gramnegativní fakultativně anaerobní tyčka se zaoblenými konci. Roste v rozmezí 15 – 37 °C, optimálně při 30 °C a pH 6. Tvoří spory a pro svůj růst vyžaduje kyselinu nikotinovou. Kolonie tohoto rodu jsou kulaté, hladké a mléčně bílé. Podobně jako

Saccharobacter a *Zymomonas* je rod *Zymobacter* schopen tvořit ethanol, CO₂ a malé množství kyselin. Jediný zástupce tohoto rodu je *Zymobacter palmae* [55].

3.4.10 Rod *Zymomonas*

Gramnegativní tyčinky vyskytující se většinou ve dvojicích a obvykle nepohyblivé. Rostou v poměrně širokém rozmezí pH 3,5 – 7,5 a při optimální teplotě 25 – 30 °C [48]. Rod *Zymomonas* je kataláza pozitivní a oxidáza negativní a je neškodný pro člověka [44], například v tropických oblastech se po staletí využívá jejich kvasných schopností pro přípravu přirozeně kvašených alkoholických nápojů. Tento rod má jediného reprezentativního zástupce *Zymomonas mobilis* se dvěma poddruhy, kdy *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* je právě původcem kažení ovocných moštů a piva [62].

3.5 Shrnutí teoretické části

Literárním průzkumem bylo zjištěno že:

- monoacylglyceroly mají široké využití v nejrůznějších průmyslových oblastech, zejména díky svým povrchově aktivním vlastnostem
- u některých MAG se střední délkou kyselinového řetězce byly zjištěny pozitivní antimikrobiální účinky vůči bakteriím, plísním, kvasinkám a virům
- perspektivní metodou přípravy MAG je adice mastných kyselin na glycidol díky její univerzálnosti a vysokým konverzím
- ovocné šťávy jsou dostupné kdekoliv na světě, obsahují významný podíl jednoduchých cukrů, vitamínů a minerálních látek
- pro zajištění údržnosti je nutné použít pasteraci a další konzervační metody, které však ničí nutričně významné látky
- uvedené modelové mikroorganismy, které se především využívají jako vhodné mikroorganismy pro různé biochemické testy, se většinou řadí mezi lidské patogeny
- k bakteriím podílející se na kažení ovocných šťáv patří tyto rody - *Acetobacter*, *Alicyclobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Saccharobacter*, *Zymobacter*, *Zymomonas* a další.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Východiska pro praktickou část jsou z intencí poznatků teoretické části, kde byla zpracována rešerše odborné literatury zaměřená na vlastnosti, výrobu a antimikrobiální účinky monoacylglycerolů.

Pro experimentální část byly stanoveny následující cíle:

- příprava MAG adicí příslušných mastných kyselin na glycidol za katalýzy chromium (III) acetát hydroxidu
- studium inhibičních účinků MAG kyseliny kaprinové, laurové, 1- adamantankarboxylové, a jejich kombinací na modelové bakterie grampozitivního a gramnegativního typu. Testování jednotlivých typů monoacylglycerolů na mikrotitračních destičkách spolu se suspenzí mikroorganismů pomnožených v živném médiu MPB
- studium inhibičních účinků MAG kyseliny kaprinové, laurové, 1- adamantankarboxylové, a jejich kombinací na bakterie, které se nacházejí v jablečné šťávě. Monoacylglyceroly budou přidávány přímo do vzorků jablečné šťávy.
- charakterizace bakterií vyizolovaných z ovocné šťávy jak na počátku, tak i na konci měření.

5 POUŽITÁ ZAŘÍZENÍ A MATERIÁLY

5.1 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy Sartorius, BA 110S

Autokláv Varioklav H+P

Autokláv Systec 2540 EL

Automatický dávkovač Dispensette BRAND

Automatické mikropipety BIOHIT

Automatické mikropipety Eppendorf

Běžný laboratorní materiál

Biohazard box EUROFLOW (Clean Air)

Biologický termostat Memmert INE 600

Denzitometr - DENZI-LA-METER

Digitální byreta 25 ml - BH, BRAND

Filtr s modrou páskou - Schleicher & Schuell

Fotoaparát OLYMPUS C3040

Laboratorní předvážky - KERN

Magnetické míchadlo MM4 (LAVAT)

Mikrotitrační destičky

Microplate reader Benchmark (Bio-Rad)

Mikroskop OLYMPUS CX 41

Mikroskop laboratorní Motic BA200

Mikrovlná trouba Elektrolux

Rotační vakuová odparka – Hei – VAPadvantage, Německo

Software Microplate Manager (Bio-Rad)

Vortex Heidolph, Reax top

5.2 Použité bakterie

Ústav technologie a mikrobiologie potravin Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně poskytl níže uvedené mikroorganismy.

<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	CCM 3653
<i>Bacillus cereus</i>	CCM 2010
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	CCM 4062
<i>Micrococcus luteus</i>	CCM 732
<i>Enterococcus faecalis</i>	CCM 4224
<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	CCM 303
<i>Escherichia coli</i>	CCM 3954
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis	CCM 4420
<i>Citrobacter gerundii</i>	CCM 7187
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 3955

5.3 Živná média

Pro stanovení počtu mikroorganismů v potravinách bylo použito živné médium PCA, jehož složení bylo následující:

PLATE COUNT AGAR – PCA

PCA	23,5 g
Destilovaná voda	1000 ml

Konečné pH (při 25 °C) $7 \pm 0,2$

Pro pomnožení bakterií bylo využito masopeptonového bujónu jako kultivačního média, jehož složení bylo následující:

MASOPEPTONOVÝ BUJÓN – MPB

Beef extract	3,0 g
Pepton	5,0 g
NaCl	5,0 g

Destilovaná voda 1000 ml

Konečné pH (při 25 °C) $7 \pm 0,2$

Pro stanovení koliformních bakterií byl použit ENDO AGAR, jehož příprava byla následující:

ENDO AGAR

ENDO AGAR 41,5 g

Destilovaná voda 1000 ml

Konečné pH (při 25 °C) $7,5 \pm 0,2$

Pro stanovení mléčných bakterií byla použita živná půda MRS, jejíž příprava byla následující:

MRS

MRS Oxoid 55,14 g

Agar 15,0 g

Destilovaná voda 1000 ml

Konečné pH (při 25 °C) $6,2 \pm 0,2$

Jako diagnostická půda pro stanovení přítomnosti mléčných streptokoků byla použita půda M17 s následující přípravou:

M17 AGAR

M17 broth 39,21 g

Agar 15,0 g

10% glukózy 100 ml

10% laktózy 52 ml

Destilovaná voda 1000 ml

Konečné pH (při 25 °C) $6,9 \pm 0,2$

Pro stanovení oxidačně fermentační aktivity glukózy bylo použito médium pro fermentaci cukrů, jehož příprava byla následující:

MÉDIUM PRO FERMENTACI CUKRŮ

Beef extract	3,0 g
Pepton	10,0 g
NaCl	5,0 g
Barva na OF test	1 ml
D - glukóza	1 – 2 g

Všechna živná média byla po rozpuštění v destilované vodě vysterilizována v autoklávu 20 minut při teplotě 121 °C.

5.4 Chemikálie

Aceton p.a. - Sigma - Aldrich, Praha

Benzín - Ing. Bacílek Jaromír, CSc. - Dorapis, Brno

Barva na O/F test

Destilovaná voda

Dimetylsulfoxid (DMSO)

ENTEROtest 16 - PLIVA – Lachema, Brno

ENTEROtest 24 - PLIVA – Lachema, Brno

Ethanol denaturovaný 96 %

Fenolftalein 1 % roztok v ethanolu

Glycidol (2,3-epoxy-propanol) 96% - Sigma - Aldrich, Praha

Hydroxid draselný – Lachema, Brno

Chromium (III) acetát hydroxid - Sigma - Aldrich, Praha

Imerzní olej - PENTA, Ing, Petr Švec, Praha

Parafínový olej - PLIVA – Lachema, Brno

Krystalová violet'

Lugolův roztok

Kyselina kaprinová 96 % - Sigma - Aldrich, Praha

Kyselina laurová 98 % - Sigma - Aldrich, Praha

Monoacylglycerol kyseliny kaprinové (MAG C_{10:0}) 96,5 %

Monoacylglycerol kyseliny laurové (MAG C_{12:0}) 98,1 %

Monoacylglycerol kyseliny 1- adamantankarboxylové (MAG ACA) 98,9 %

NEFERMtest 24 PLIVA – Lachema Diagnostika s.r.o., Brno

NYSTATIN Streptomyces noursei - Calbiochem, Germany

OXItest - PLIVA – Lachema Diagnostika s.r.o., Brno

Peroxid vodíku

Safranin

6 METODY

6.1 Příprava MAG

MAGy kyseliny kaprinové a laurové byly připraveny společně se Zdeňkem Máčalíkem [63] adiční reakcí příslušné kyseliny na glycidol. Reakce probíhala v temperovaném dvouplášťovém válcovém reaktoru při 90 °C. Navážka obou kyselin byla 50 g. Po roztavení kyseliny bylo následně přidáno 0,5 % hmot. katalyzátoru chromium (III) acetát hydroxidu a po 30 minutách byl přidán glycidol v 1,3 násobném molárním přebytku vůči kyselině. Všechny látky byly pomocí magnetického míchadla homogenizovány a zahřívány po dobu 2 hodin.

MAG kyseliny 1 – adamantankarboxylové byl vyroben na ÚTTTK. Jeho preparace není tedy součástí této práce.

Po této reakční době byly odebrány tyčinkou vzorky a stanoveny konverze reakce. Jednotlivé vzorky byly zváženy, rozpuštěny v 5 ml směsi xylen : ethanol v poměru 1 : 1 a titrovány roztokem KOH na indikátor fenolftalein. Hmotnostní procenta dané MK kyseliny vztažené na navážku MK byly vyjádřeny vzorcem přejatým z práce Boehmové [64]:

$$\%C = \frac{a \cdot c_{KOH} \cdot M_k}{1000 \cdot m \cdot p} \cdot 100$$

Kde: a – spotřeba 0,1 M KOH [ml]

c_{KOH} – přesná koncentrace KOH [mol . l⁻¹]

M_k – molární hmotnost dané mastné kyseliny [g.mol⁻¹]

m – navážka odebraného vzorku [g]

p – hmotnostní zlomek kyseliny v reakční směsi

Výtěžek MAG, resp. konverze reakce byla kalkulována ze vzorce uvedeného v práci Boehmové[64]:

$$\%MAG = 100 - \%C$$

Takto vyrobené monoacylglyceroly byly za horka převedeny do 50 ml ethanolu a nerozpustné podíly (rezidua katalyzátoru) filtrovány přes filtr s modrou páskou pomocí

Büchnerovy nálevky. Dále byla provedena purifikace dvojnásobnou rekrystalizací z ethanolu. MAGy pak byly odfiltrovány na Büchnerově nálevce a vysušeny při laboratorní teplotě [10].

6.2 Příprava suspenze bakterií a sledování inhibičních účinku MAG

Suspenze bakterií byla připravena do sterilních zkumavek s 10 ml živného média MPB a kultivována při 30 °C po dobu 24 hodin.

Pomocí mikrodiluční metody a přístroje Microplate reader Benchmark byly sledovány inhibiční účinky jednotlivých 2 % MAG (2 % roztok MAG v ethanolu), které byly aplikovány na mikrotitrační destičky spolu se suspenzí bakterií. Použité koncentrace, které byly připraveny příslušným ředěním do sterilních zkumavek s masopeptonovým bujónem (MPB), byly: 0, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Nulová koncentrace sloužila jako kontrola. U kombinací MAG C10+ACA, MAG 12+ACA byly použity koncentrace 200 a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u MAG 10+12 byly použity koncentrace 200, 300 a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Tab. 1. Příprava jednotlivých koncentrací MAG

Koncentrace MAG [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Objem roztoku MAG [μl]	Objem MPB [ml]
0	0	3
25	3,75	2,996
50	7,5	2,992
100	15	2,985
250	37,5	2,962
500	75	2,925
1000	150	2,850
1500	225	2,775
100 + 100	15 + 15	2,970
250 + 250	37,5 + 37,5	2,925
150 + 150	22,5 + 22,5	2,955

Do jednotlivých jamek mikrotitračních destiček byly aplikovány jednotlivé koncentrace MAG v množství 200 μl a suspenze mikroorganismů v množství 5 μl . U takto připravené mikrotitrační destičky byla měřena v 30 – ti minutových intervalech absorbance při 600 nm a po dobu 24 hodin.

Tab. 2. Systém nanášení na mikrotitrační destičku

	Bez MO		MO1		MO2		MO3		MO4		MO5		
A													0
B													25
C													50
D													100
E													250
F													500
G													1000
H													1500

Z naměřených hodnot na přístroji Microplate reader Benchmark byl vypočítán průměr a byly sestrojeny růstové křivky. Z těchto dat byl stanoven index růstu (IR) bakterií v médiu s MAG proti čistému médiu v intervalech 8, 12 a 16 hodin pomocí uvedeného vzorce [9].

$$IR (\%) = \frac{(A_{600} - A_{NK})}{A_{PK}} \cdot 100$$

Kde: A_{600} - hodnota absorbance

A_{NK} - hodnota absorbance negativní kontroly

A_{PK} - hodnota absorbance pozitivní kontroly

6.3 Příprava vzorků pro ovocné šťávy

Všechny testované monoacylglyceroly byly vyrobeny v laboratořích Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky pomocí adice příslušné kyseliny na glycidol [10].

Zásobní roztoky monoacylglycerolů v ethanolu byly sterilně aplikovány do vzorků čerstvé nepasterované ovocné šťávy, tak aby výsledná koncentrace jednotlivých MAG byla 0, 50, 250, 500, 1000 a 1500 $\mu\text{g/ml}$. Dále byly testovány kombinace monoacylglycerolů: MAG ACA + MAG C_{10:0}, MAG ACA + MAG C_{12:0} a MAG C_{10:0} + MAG C_{12:0} v koncentracích

200 a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Jako kontrola byly použity vzorky ovocné šťávy bez přídavku MAG. Vzorky byly uchovávány v temné místnosti při 5 °C.

Tab. 3. Použité koncentrace MAG a příprava vzorků

Koncentrace MAG [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Objem roztoku MAG [μl]	Objem ovocné šťávy [ml]
0	0	30
50	7,50	29,92
250	37,50	29,62
500	75	29,25
1000	150	28,50
1500	225	27,75
100 + 100	15 + 15	29,70
250 + 250	37,5 + 37,5	29,25

Účinné koncentrace byly vybrány na základě předchozího měření při metodách *in vitro* na modelových mikroorganismech.

6.4 Mikrobiologická analýza

Růst jednotlivých skupin bakterií v ovocné šťávě byl sledován po dobu 4 týdnů s pravidelnými odběry vzorků po každých sedmi dnech skladování.

Vzorky ovocných šťáv pro mikrobiologickou analýzu byly asepticky odebrány a vhodně naředěny fyziologickým roztokem, který byl vysterilizován při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Fyziologický roztok byl připraven z 8,5 g NaCl a 1000 ml destilované vody.

Takto naředěné vzorky byly nanášeny po 0,1 ml a rozetřeny sterilní hokejkou na vybraná živná média vždy ve dvou opakováních a to na PCA, ENDO pro izolaci bakterií čeledi *Enterobacteriace*, MRS pro izolaci mléčných bakterií. Pro potlačení růstu kvasinek a plísní bylo do živných půd přidáváno antimykotikum NYSTATIN, které bylo rozpuštěno v dimethylsulfoxidu (DMSO) a naneseno v objemu 0,1 ml na živná média.

Kultivace probíhala 48 hodin v termostatu při laboratorní teplotě. K jednotlivým měřením byla samozřejmě provedena i kontrola, která neobsahovala žádný MAG a dále kontrola růstu kvasinek a plísní na půdách bez přídavku antimykotika. Po dvoudenní inkubaci byly narostlé kolonie spočítány a byla vyjádřena hodnota CFU/ml dle uvedeného vzorce [51].

$$CFU = \frac{\sum c/n}{d \cdot V} \quad [KTJ \cdot ml^{-1}]$$

kde: $\sum c$ – počet všech kolonie tvořících jednotek

n – počet ploten použitých pro výpočet

d – příslušné použité ředění

V – objem očkovaného inokula [ml]

6.5 Izolace bakterií

Z čerstvé ovocné šťávy byl odebrán vzorek a naředěn desítkovou řadou ve fyziologickém roztoku. Bylo provedeno ředění 10^0 , 10^{-1} a 10^{-2} . Z každého ředění bylo pipetováno 0,1 ml na živné půdy PCA, MRS a ENDO, do kterých byl přidáván NYSTATIN pro potlačení růstu kvasinek a plísní. Naočkované misky byly kultivovány 48 hodin při laboratorní teplotě ve vypnutém termostatu. Vyrostlé kolonie byly izolovány křížovým roztěrem na příslušném živném médiu pro získání čisté kultury. Po čtyřech týdnech kultivace moštů byl taktéž odebrán vzorek a naředěn. Tentokrát bylo použito ředění 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} a 10^{-3} . Postup byl stejný jako u čerstvé ovocné šťávy. Celkem bylo izolováno 14 kultur bakterií.

6.6 Metody použité pro charakterizaci bakterií

Pro charakterizaci bakterií izolovaných z ovocné šťávy byly sledovány morfologické znaky a bylo provedeno několik biochemických testů.

Morfologické znaky

Makroskopické morfologické znaky jsou patrné pouhým okem a ukazují na způsob růstu mikroorganismů v živných půdách. Při vyhodnocování morfologie kolonií byl zjišťován tvar, povrch, profil, okraj konzistence a barva kolonií. U mikroskopické morfologie byl pozorován tvar buněk a jejich uspořádání [51].

Gramovo barvení

Patří k nejdůležitějším barvicím diagnostickým metodám, kdy se fixovaný preparát barví a následně moří roztokem jódu. Vniká komplex barviva a jódu, který lze u některých rodů a druhů mikroorganismů vyplavit ethanolem nebo acetonem. Tyto mikroorganismy jsou potom označovány jako G-.

Sterilní kličkou byla rozestřena část bakteriální kolonie ve fyziologickém roztoku. Po zaschnutí byl preparát fixován několikanásobným protažením plamenem. Poté byl převrstven krystalovou violetí po dobu 60 sekund. Po opláchnutí vodou byl preparát převrstven Lugolovým roztokem na dobu 30 sekund, poté bylo barvivo slito a opláchnuto krátce vodou. Následovalo odbarvení acetonem a dobarvení safraninem po dobu 60 sekund. Vodou opláchnutý preparát byl osušen a po kápnutí imerzního oleje mikroskopován za použití imerzního objektivu při zvětšení 16 x 100 [51].

KOH test

U jednotlivých bakterií lze Gramovu reakci zjistit pomocí rychlého testu s KOH, který je založen na rozdílném složení buněčné stěny G⁺ a G⁻ bakterií. Na podložní sklíčko byl kápnut roztok 3 % KOH a do něj byla pomocí sterilní chladnou kličkou rozetřena část bakteriální kolonie. Při odtahování kličky byla pozorována reakce, zda se vytvoří či nevytvoří táhnoucí viskózní hmota, která se tvoří u G⁻ bakterií [51].

Test na tvorbu katalázy

Peroxid vodíku, který může vznikat při některých biochemických procesech, je pro bakterie toxický. Některé bakterie produkující enzym katalázu dokáží tento peroxid vodíku rozkládat. Na podložní sklíčko byl kápnut 3 % peroxid vodíku a do kapky byla kličkou rozetřena testovaná kultura z agarové plotny. Pozitivní reakce se projevila uvolňováním bublinek kyslíku bezprostředně po přidání kultury [51].

Oxidačně fermentační test – O/F test

Pomocí tohoto testu se stanovuje oxidačně fermentační aktivita glukózy a to za přítomnosti a nepřítomnosti kyslíku. Dvě zkumavky byly současně zaočkovány vpichem testovanou kulturou. Povrch jedné půdy byl přelit parafinovým olejem pro zajištění anaerobního prostředí. Zkumavky byly inkubovány po dobu 48 hodin při laboratorní teplotě ve vypnutém termostatu. Pozitivní reakce se projeví žlutým zbarvením [51].

Oxidázový test - OXItest

Detekční proužky OXItest jsou určeny pro detekci bakteriální cytochromoxidázy. Postupovalo se dle přiloženého návodu, kdy se po otisku impregnované části proužku na izolované kolonii přímo na kultivační půdě odečetla reakce do 1 minuty.

Diagnostická půda M17

Na selektivně diagnostických půdách roste jen velmi malá skupina mikroorganismů, která se projeví charakteristickou biochemickou reakcí. Půda M17 se využívá pro detekci mléčných streptokoků. Čisté 48 - hodinové kultury jednotlivých izolátů byly naočkovány v objemu 0,1 ml na diagnostickou půdu a kultivovány při teplotách 5 °C, 42 °C a laboratorní teplotě. Po dvou dnech byly výsledky odečteny [51].

ENTEROtest 16, 24

Využívá se k identifikaci kmenů čeledi *Enterobacteriaceae*. Z izolovaných kultur byla připravena suspenze odpovídající 1. stupni McFarlandovy zákalové stupnice. Další postup byl proveden dle přiloženého návodu.

NEFERMtest 24

Souprava NEFERMtest 24 je určena pro rutinní identifikaci gramnegativních nefermentujících bakterií, nebo pro identifikaci nejběžnějších zástupců oxidáza pozitivních fermentujících tyček. Suspenze odpovídající 2. stupni McFarlandovy zákalové stupnice byla připravená z izolovaných kultur. Další postup byl proveden dle přiloženého návodu.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

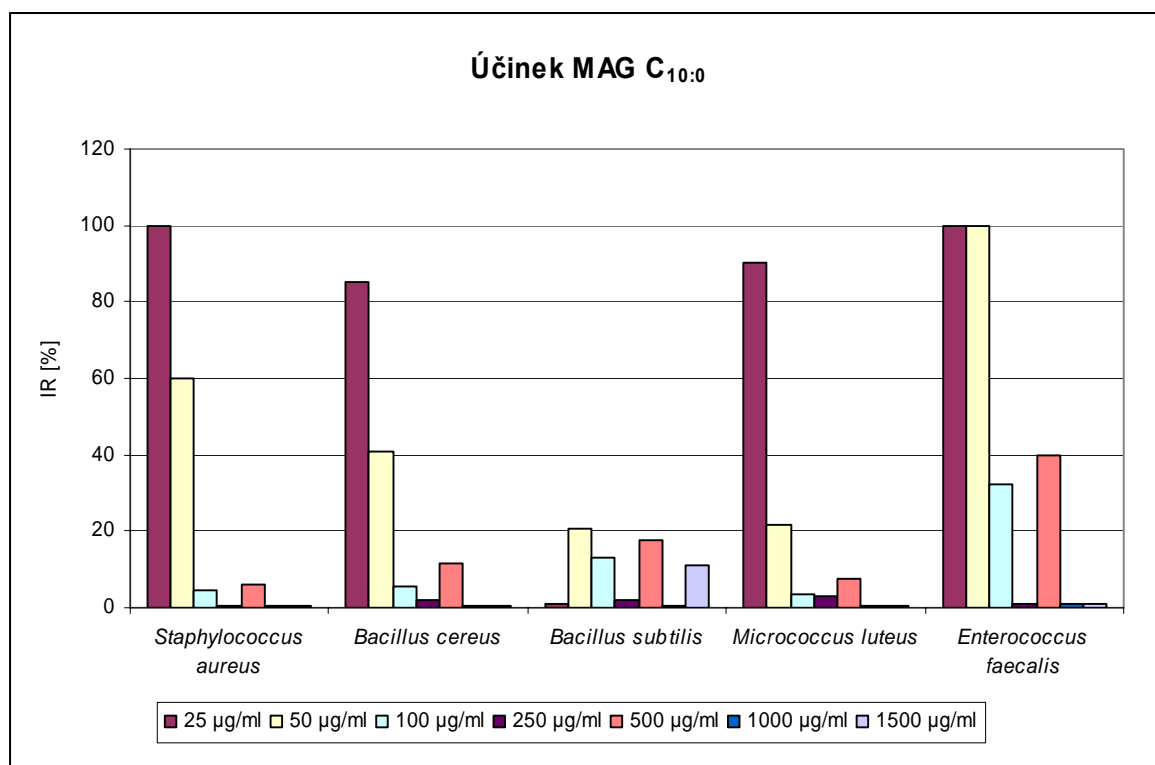
7.1 Výsledná konverze MAG

Dle postupu uvedeného v kapitole 6.1 byla stanovená konverze u vyrobených MAG kyseliny kaprinové a laurové. Výsledná konverze u MAG kyseliny kaprinové byla 96,5 % a u MAG kyseliny laurové byla 98,1 %. Tyto hodnoty svědčí o poměrně vysoké čistotě daných monoacylglycerolů, a tedy vhodnosti jejich dalšího použití. Preparace vzorku MAG kyseliny 1-adamantankarboxylové nebyla součástí této práce. Byl připraven na ÚTTTK [65]. Konverze reakce činila 98,9 %.

7.2 Inhibice MAG *in vitro*

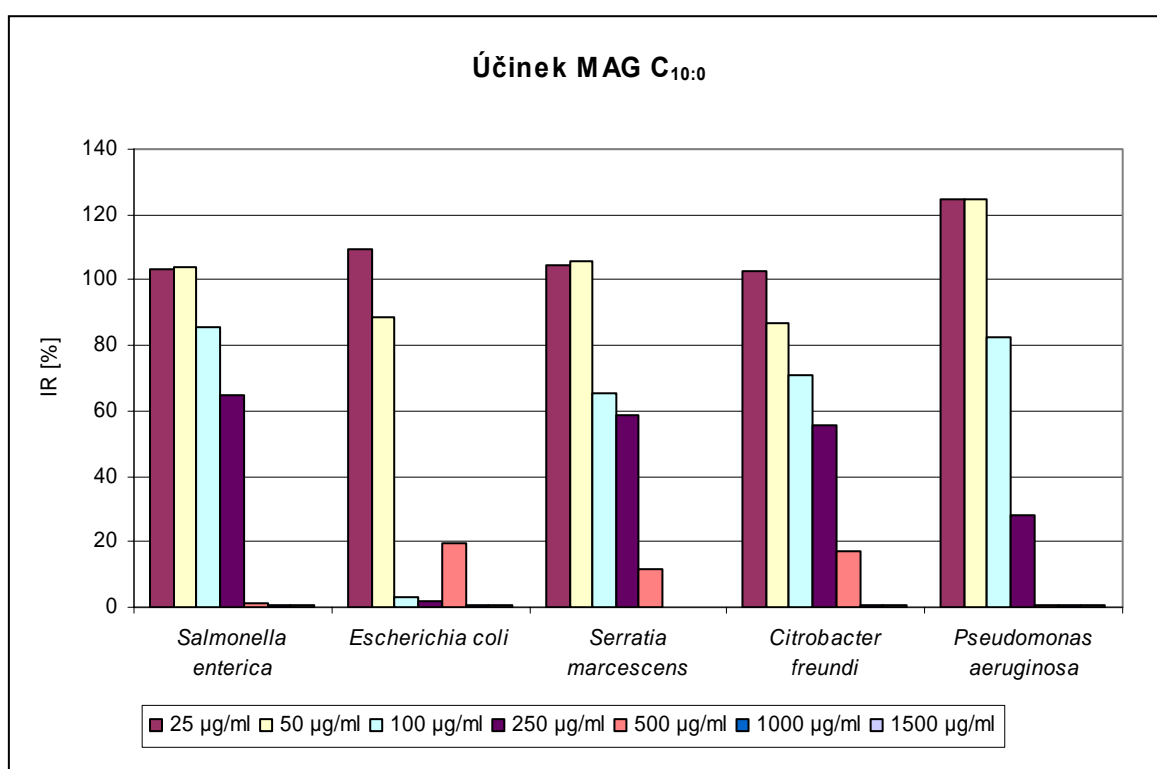
U všech uvedených monoacylglycerolů a jejich kombinací byla odečítána inhibice G+ a G-modelových bakterií po dobu 24 hodin. Hodnoty byly převedeny na IR a to v 8, 12 a 16 hodinách. Jednotlivé výsledky z měření jsou uvedeny na obrázcích, kde je uvedena závislost IR po 8 hodinovém působení MAG. Výsledky získané po 12 a 16 byly prakticky totožné, a proto zde nejsou uvedeny. V přílohách 1 a 2 jsou pro srovnání účinků MAG uvedeny růstové křivky vybraných bakterií.

Obr. 1. Vliv MAG C_{10:0} na G⁺ bakterie



Z obr. 1. lze pozorovat inhibiční účinek MAG C_{10:0} od koncentrace 100 µg.ml⁻¹. Jednotlivé typy mikroorganismů odlišně reagovaly na účinek MAG. U *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* a *Micrococcus luteus* byl účinek téměř stejný, kdy inhibice stoupala se vzrůstající koncentrací MAG, kromě koncentrace 500 µg.ml⁻¹. Naopak u *Bacillus subtilis* byla zaznamenána inhibice již při koncentraci 25 µg.ml⁻¹, avšak při koncentraci 50, 100 a 500 µg.ml⁻¹ inhibiční účinek klesl. *Enterococcus faecalis* byl poměrně odolnější, inhibiční účinky MAG C_{10:0} se projeví pouze v koncentracích 250, 1000 a 1500 µg.ml⁻¹.

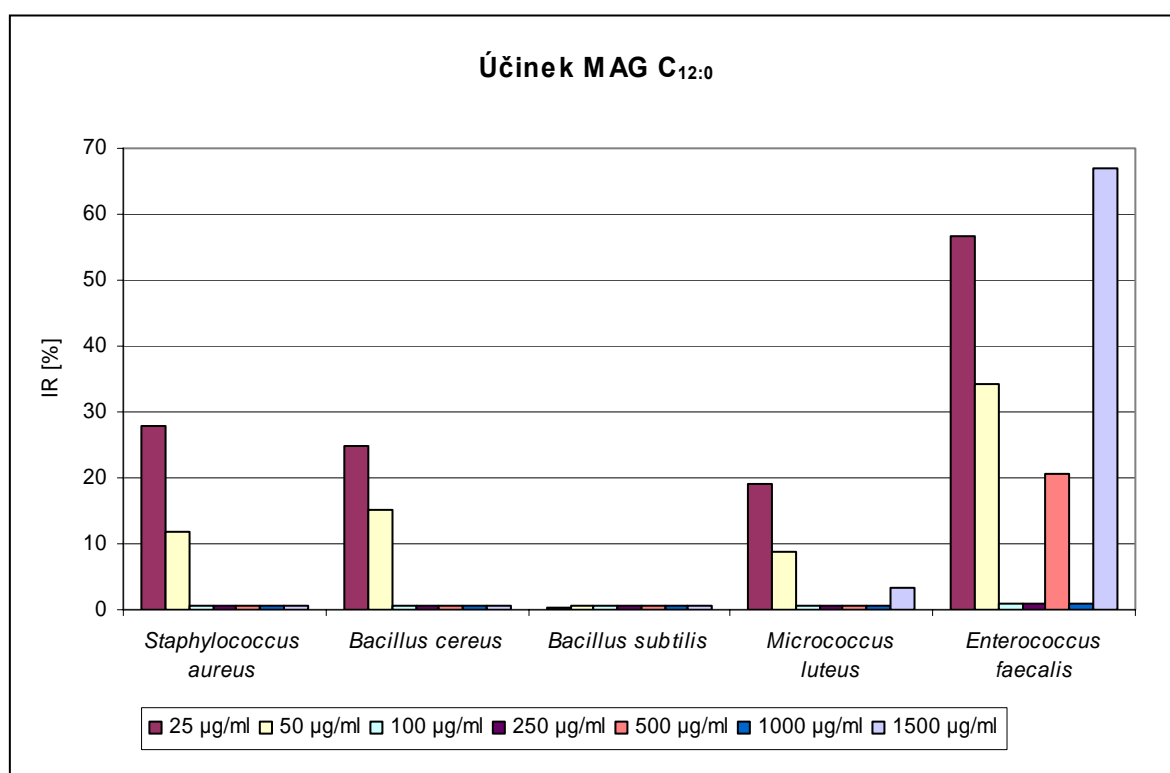
Obr. 2. Vliv MAG C_{10:0} na G- bakterie



Na obr. 2. se u G- bakterií účinek MAG C_{10:0} projevil až při vyšších koncentracích a to většinou od 500 µg.ml⁻¹, pouze u *Escherichia coli* byl účinek zaznamenán již při koncentraci 100 µg.ml⁻¹ a naopak koncentrace 500 µg.ml⁻¹ je méně účinná. Ostatní bakterie měly sníženou odolnost vůči MAG se zvyšující se koncentrací.

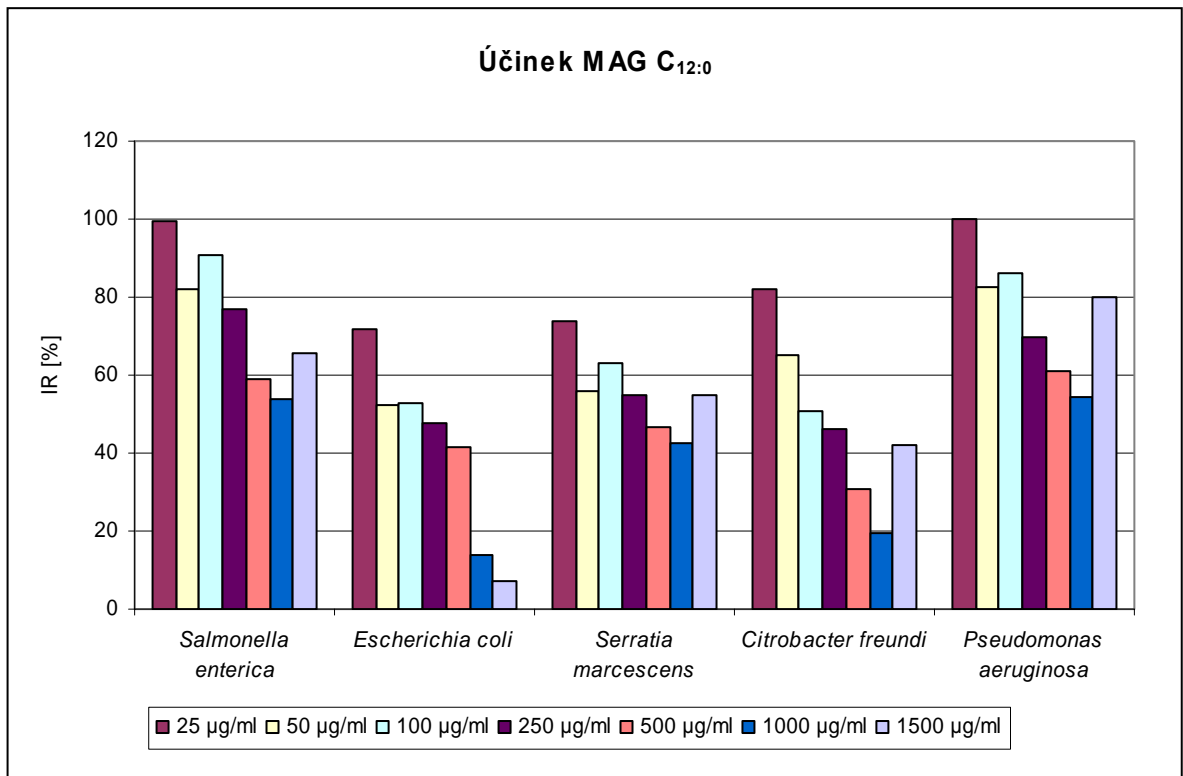
Na dalším obr. 3. je znázorněn účinek MAG C_{12:0} na G⁺ bakterie. Z výsledků lze konstatovat, že u *Staphylococcus aureus* a *Bacillus cereus* byly naměřeny podobné výsledky, kdy se úplný inhibiční účinek MAG projevil při koncentraci 100 µg.ml⁻¹. Téměř stejného výsledku bylo dosaženo u *Micrococcus luteus*, kde byl však zaznamenán drobný nárůst v koncentraci 1500 µg.ml⁻¹. U *Bacillus subtilis* byla zaznamenána inhibice ve všech koncentracích. *Enterococcus faecalis* stejně jako u MAG C_{10:0} více odolával inhibici MAG, účinné koncentrace byly 100, 250, a 1000 µg.ml⁻¹.

Obr. 3. Vliv MAG C_{12:0} na G⁺ bakterie

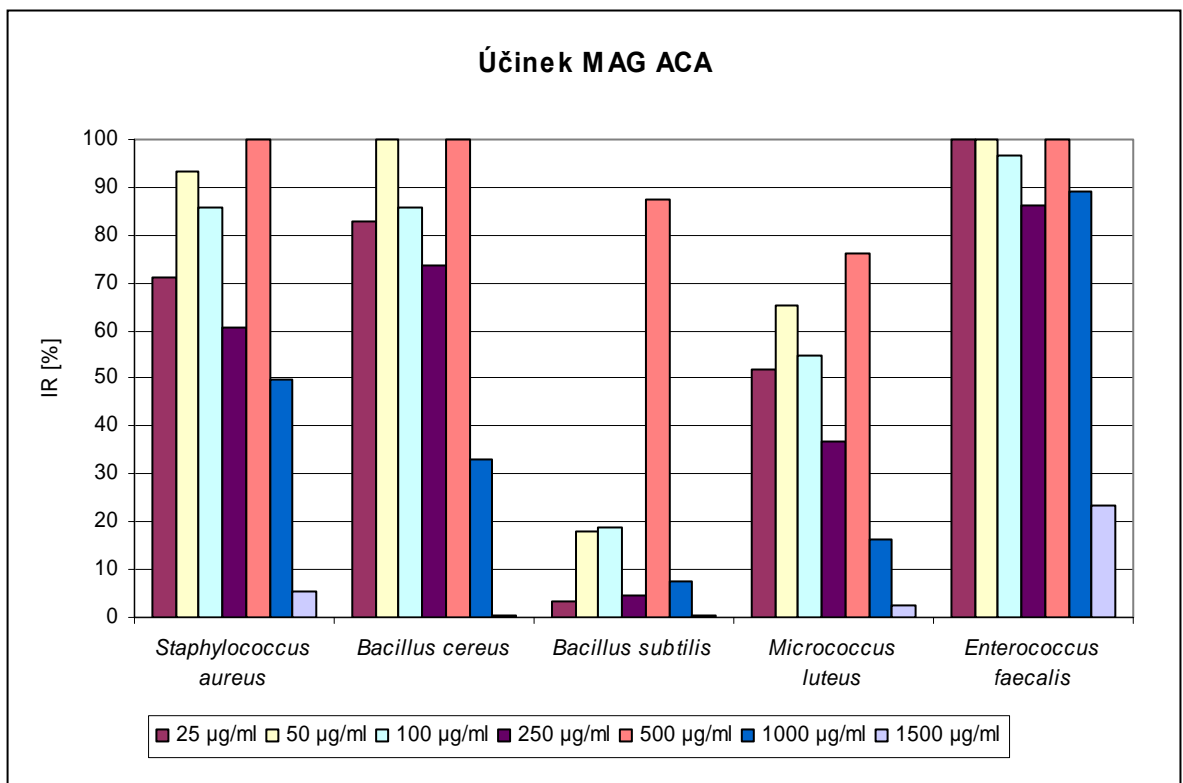


Naopak na obr. 4. lze zaznamenat, že MAG C_{12:0} na G⁻ bakterie neměl téměř žádný inhibiční účinek oproti MAG C_{10:0}. Viditelného účinku bylo dosaženo pouze u *Escherichia coli* a to v koncentracích 1000 a 1500 µg.ml⁻¹.

Obr. 4. Vliv MAG C_{12:0} na G- bakterie

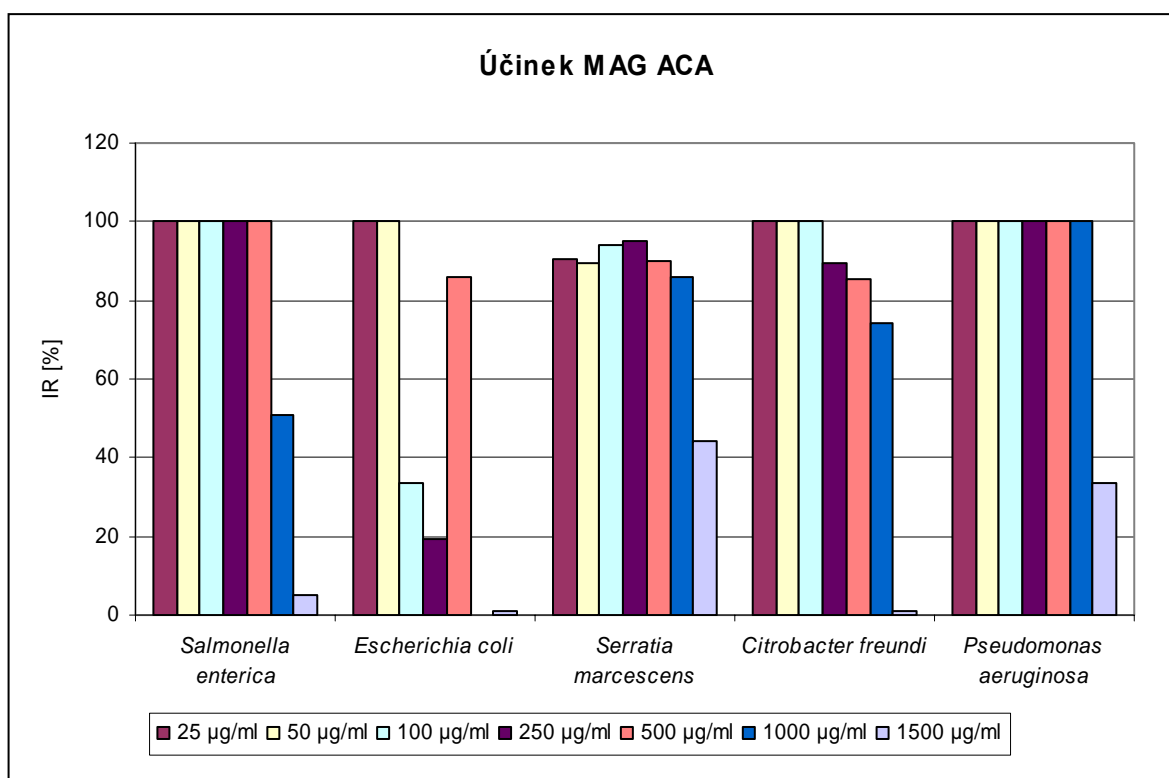


Obr. 5. Vliv MAG C ACA na G+ bakterie



Co se týče MAG kyseliny 1 – adamantankarboxylové lze z obr. 5. konstatovat, že u téměř všech G+ bakterií bylo inhibičního účinků dosaženo pouze v koncentraci 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. U *Bacillus subtilis* byl zaznamenán snížený růst skoro u všech koncentrací kromě 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, *Enterococcus faecalis* odolával všem koncentracím MAG ACA.

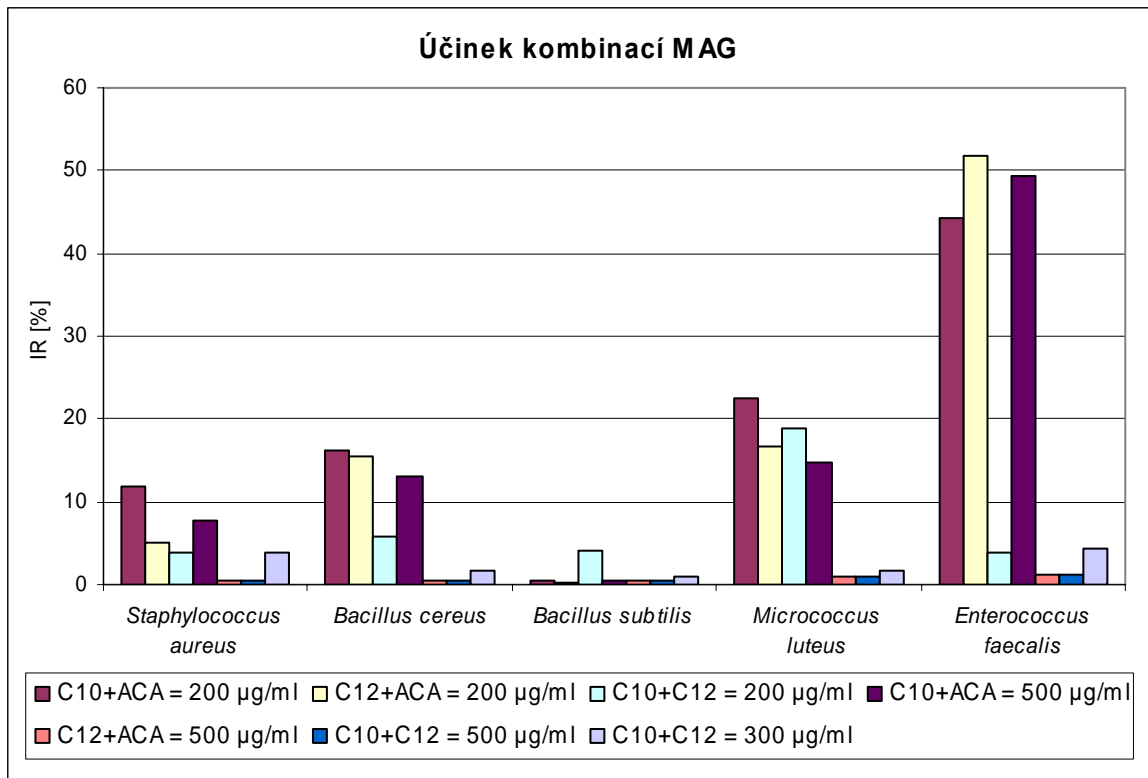
Obr. 6. Vliv MAG ACA na G- bakterie



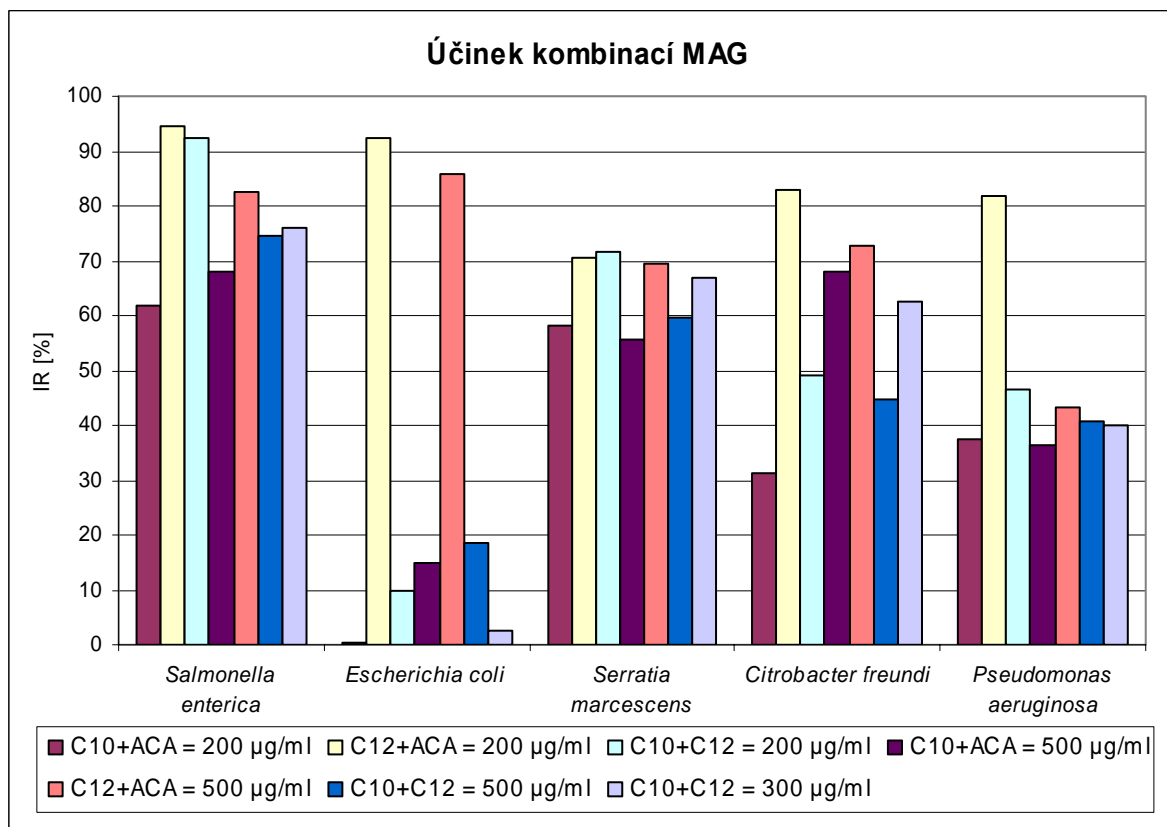
Podobných účinků jak je možné vidět na obr. 6. bylo dosaženo i u G- bakterií. *Escheirchia coli* měla oproti ostatním bakteriím snížený růst v koncentracích 100, 250 a 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, úplná inhibice nastala v koncentraci 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. U *Serratia marcescens* a *Pseudomonas aeruginosa* nebyl zastaven růst ani při koncentraci 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, u *Salmonella enterica* a *Cirtobacter freundii* byla tato koncentrace účinná. Z uvedených výsledků lze usoudit, že MAG ACA vykazuje poměrně mnohem nižší inhibiční aktivitu než předchozí uvedené monoacylglyceroly.

Vybrané kombinace MAG, jak lze vidět na obr. 7., pozitivně zastavovaly růst bakterií a to zejména u *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* a *Bacillus subtilis*, u kterého se inhibice projevila nejvíce. Naopak u *Enterococcus faecalis* byl zaznamenán snížený růst u kombinace MAG C_{10:0} + MAG C_{12:0} v koncentraci 200, 300 a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a u kombinace MAG C_{12:0} + MAG ACA v koncentraci 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Obr. 7. Vliv kombinací MAG na G+ bakterie



Obr. 8. Vliv kombinací MAG na G- bakterie



Na obr. 8. u G- bakterií vykazovaly kombinace MAG pozitivních účinků pouze u *Escherichia coli* a to kombinace MAG C_{10:0} + MAG ACA v koncentraci 200 a 500 µg.ml⁻¹ a kombinace MAG C_{10:0} + MAG C_{12:0} ve všech koncentracích.

Ze všech uvedených obrázků vyplývá, že MAG a jejich kombinace jsou účinnější vůči G+ bakteriím než proti G- bakteriím, a to na základě rozdílné buněčné stěny. Obdobného výsledku bylo dosaženo ve studiích autorů Altieri a kol. [17] a Kabara a kol.[21]. Jako nejméně účinný monoacylglycerol byl MAG ACA a to jak u G+, tak i u G- bakterií a dále kombinace u G- bakterií.

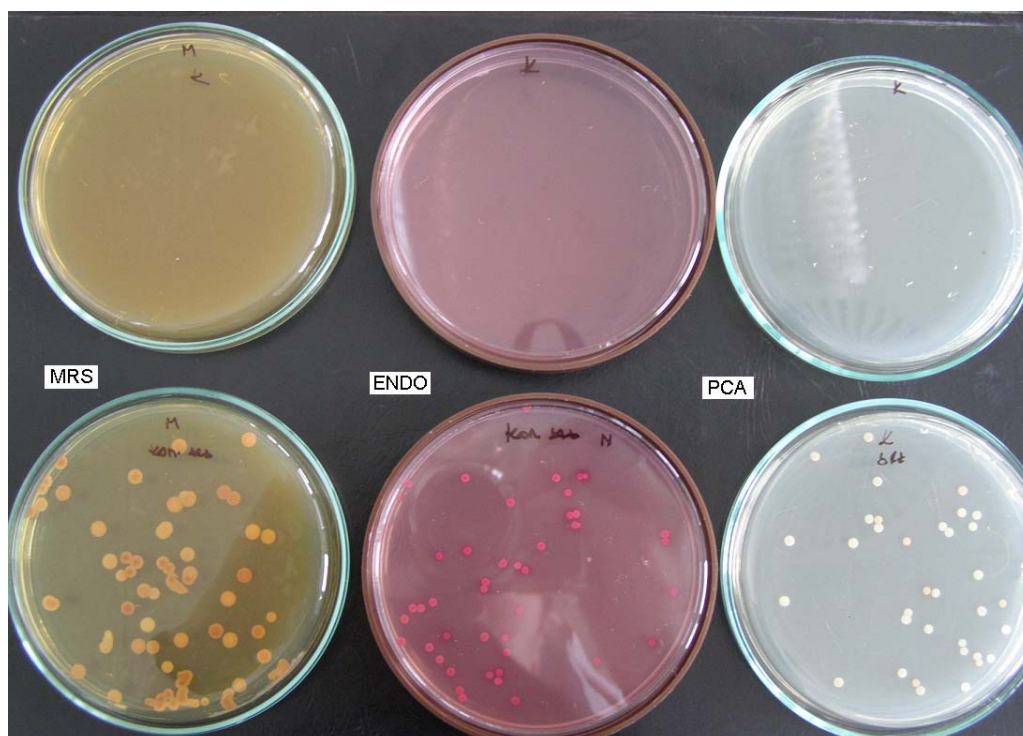
Dále lze konstatovat, že značnou odolnost u G + bakterií vykazoval *Enterococcus faecalis*, naopak za nejméně odolnou bakterii vůči inhibičním účinkům MAG lze považovat *Bacillus subtilis*. U těchto dvou mikroorganismů jsou pro srovnání v příloze 1 uvedeny růstové křivky znázorňující účinky MAG po dobu 24 hodin.

U G – bakterií se inhibiční účinky MAG výrazněji projeví pouze u *Escherichia coli*. Jak dokládá studie Skřivanové a Marounka [30] *Salmonella enterica* patří mezi odolné bakterie. Pro srovnání jsou v příloze 2 taktéž uvedeny růstové křivky.

7.3 Kultivace moštů

Při prvním pokusu o sledování účinku MAG na bakterie přítomné v ovocných šťávách nebylo pro potlačení růstu mikroskopických hub použito antimykotikum. Přesto bylo možné sledovat inhibiční účinky monoacylglycerolů, a to zejména monokaprinu (MAG C_{10:0}) a jeho kombinací s ostatními testovanými MAG. Při těchto testech bylo zjištěno snížení celkového počtu mikroorganismů ve vzorcích šťávy s přídavkem MAG C_{10:0} a jeho kombinací s MAG C_{12:0} a MAG ACA. Pro další experimenty zaměřené na sledování vlivu MAG na růst bakterií ve vzorcích ovocné šťávy však bylo nutné potlačit růst kvasinek a plísní. Kultivace mikroorganismů ze vzorků jablečné šťávy byla tedy prováděna na miskách s příslušnou živnou půdou a polyenovým antimykotikem NYSTATIN. Nystatin byl rozpuštěn v dimetylsulfoxidu (DMSO) a nanášen přímo na živná média sterilní hokejkou v objemu 0,1 ml. Výsledky inhibice kvasinek a plísní byly pozitivní a po ošetření nystatinem rostly na miskách s jednotlivými půdami pouze bakterie. Pro kontrolu byla vždy zaočkována i živná média bez těchto antimykotik.

Obr. 9. Kontrola bez MAG na půdách MRS, ENDO a PCA s NYSTATINEM a bez



Na obr. 9. je uveden příklad srovnání kultivace vzorků ovocných šťáv na PCA, MRS a ENDO s přídavkem a bez přídavku nystatinu.

V souběžně probíhajícím pokusu Zdeňka Máčalíka [63] byl sledován vliv monoacylglycerolů na růst kvasinek a plísní v přírodních ovocných šťávách. Bylo zjištěno, že v kontrolním vzorku bez přídavku MAG dochází ke zvyšování počtu kvasinek v průběhu skladování. Hodnota CFU/ml po týdnu skladování byla $1 \cdot 10^6$, při následujících rozborech hodnota stoupala až na $1 \cdot 10^9$ CFU/ml po čtyřech týdnech skladování. Zároveň byl pozorován inhibiční účinek MAG na kvasinky, který stoupal se vzrůstající koncentrací monoacylglycerolů. Téměř nulové účinky však měly MAG v nejnižší testované koncentraci $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Ve vzorcích ovocných šťáv lze očekávat vzájemné ovlivnění jednotlivých skupin mikroorganismů. Množení a růst kvasinek spojený s produkcí ethanolu a kompeticí o živiny může tedy značně ovlivnit růst a množení prokaryotických bakterií.

7.3.1 První týden

Po prvním týdnu uchovávání vzorků, s přídavkem MAG a kontrolou bez MAG při 5°C v temné místnosti, byly vzorky odebrány a naředěny ve sterilním fyziologickém roztoku. Výsledky po 48 hodinách kultivace jsou uvedeny v tabulkách a jsou vyjádřeny jako CFU v 1 ml vzorku.

Tab. 4. Výsledky kultivace vzorků na PCA s NYSTATINEM v CFU/ml

MAG	Kontrola	Koncentrace MAG ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)					
		50	200	250	500	1000	1500
C10	$0,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	-	0	0	0	0
C12		$6 \cdot 10^4$	-	0	0	0	0
ACA		$3,2 \cdot 10^5$	-	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	0
C10+ACA	$0,5 \cdot 10^4$	-	0	-	0	-	-
C10+C12		-	$0,5 \cdot 10^4$	-	0	-	-
C12+ACA		-	$1 \cdot 10^4$	-	0	-	-

Na základě výsledků uvedených v tabulce lze konstatovat, že inhibiční účinek MAG se nejvíce projevil u MAG C_{10:0} a MAG C_{12:0}. Minimální inhibiční koncentrace obou monoacylglycerolů byla $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. U MAG ACA byla inhibice zaznamenána až v nejvyšší koncentraci. Kompletní inhibice růstu přítomných bakterií byla pozorována také u kombinace MAG C_{10:0} a MAG ACA, které byly přidávány do vzorku šťávy v koncentraci $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a poměru 1:1.

Při mikrobiologickém rozboru vzorků ovocných šťáv po týdnu skladování nebyly na půdách ENDO a MRS zachyceny žádné mikroorganismy.

7.3.2 Druhý týden

Po dalším týdnu kultivace byl proveden opět mikrobiologický rozbor vzorků na půdách PCA, ENDO a MRS. Výsledky vyjádřené jako CFU/ml jsou uvedeny v tabulce 3.

Tab. 5. Výsledky kultivace vzorků na PCA s NYSTATINEM v CFU/ml

	Kontrola	Koncentrace MAG ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)					
		50	200	250	500	1000	1500
C10	0	$1 \cdot 10^4$	-	0	0	0	0
C12		$3,3 \cdot 10^5$	-	$4 \cdot 10^4$	$0,5 \cdot 10^4$	$6,5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$
ACA		0	-	0	0	0	0
C10+ACA	0	-	$0,5 \cdot 10^4$	-	$2 \cdot 10^4$	-	-
C10+C12		-	0	-	0	-	-
C12+ACA		-	0	-	0	-	-

Ze vzorků obsahujících MAG ACA nebyly vykultivovány žádné bakterie. U MAG C_{10:0} byla v nejnižší testované koncentraci zjištěna hodnota $1 \cdot 10^4$ CFU/ml, ve vyšších koncentracích došlo k inhibici růstu těchto bakterií. U MAG C_{12:0} byla hodnota CFU/ml v koncentraci $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ $3,3 \cdot 10^5$, ve vyšších koncentracích se hodnota snížila o jeden řád.

V ovocné šťávě byl zaznamenán růst bakterií v přítomnosti kombinace MAG ACA + MAG C_{10:0} v koncentraci 200 a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. U kontrolních misek nebyl zaznamenán žádný růst bakterií. Výsledky v tabulce z diagnostických půd MRS a ENDO nejsou uvedeny, neboť se zde opět nevyskytovaly žádné bakterie.

7.3.3 Třetí týden

Ve třetím týdnu byl proveden rozbor vzorků stejným způsobem jako při předchozích odběrech. Při orientační čichové zkoušce bylo možné cítit kvašení ovocné šťávy způsobené kvasinkami. U některých vzorků vznikala i slizovitá hmota.

Tab. 6. Výsledky kultivace vzorků na PCA s NYSTATINEM v CFU/ml

	Kontrola	Koncentrace MAG ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)					
		50	200	250	500	1000	1500
C10	0	$1,6 \cdot 10^6$	-	0	0	0	0
C12		0	-	0	$3,5 \cdot 10^5$	0	0
ACA		0	-	0	$5 \cdot 10^4$	0	0
C10+ACA	0	-	0	-	$5 \cdot 10^5$	-	-
C10+C12		-	0	-	$4 \cdot 10^4$	-	-
C12+ACA		-	0	-	0	-	-

I po třech týdnech skladování byla pozorována kompletní inhibice růstu bakterií ve vzorcích obsahujících MAG C₁₀ a to od koncentrace 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Inhibiční účinky si zachovala i kombinace MAG C_{12:0} a MAG ACA, a to v obou testovaných koncentracích. U ostatních vzorků bakterie rostly i při koncentraci 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, MAG C₁₀ a MAG C_{12:0} ve vyšších koncentracích bránily růstu bakterií. Po třech týdnech skladování lze pozorovat úbytek bakterií při nejnižších testovaných koncentracích MAG 50 - 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. To může být způsobeno množením a metabolickou činností kvasinek, jejichž počet se v přítomnosti těchto koncentrací MAG zvyšuje.

Na půdách MRS a ENDO opět nedošlo k záchytu mikroorganismů.

7.3.4 Čtvrtý týden

Čtvrtý týden již nebyl zaznamenán výrazný inhibiční účinek žádného vybraného MAG.

Tab. 7. Výsledky kultivace vzorků na PCA s NYSTATINEM v CFU/ml

	Kontrola	Koncentrace MAG ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)					
		50	200	250	500	1000	1500
C10	190	0	-	$5,4 \cdot 10^6$	$6,1 \cdot 10^6$	$1,75 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^5$
C12		0	-	0	0	$5 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^5$
ACA		0	-	$6,5 \cdot 10^5$	$7 \cdot 10^5$	$5,5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$
C10+ACA	190	-	$7 \cdot 10^5$	-	$9,6 \cdot 10^6$	-	-
C10+C12		-	$1,5 \cdot 10^5$	-	$1,5 \cdot 10^5$	-	-
C12+ACA		-	$9 \cdot 10^5$	-	$7 \cdot 10^6$	-	-

Oproti předchozím analýzám, po čtyřech týdnech skladování došlo na živné půdě MRS k záchytu mléčných bakterií a to nejčastěji v přítomnosti MAG C_{10:0} v koncentraci

250 – 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, u MAG C_{12:0} v koncentraci 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a také u MAG ACA v koncentraci 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Výskyt mléčných bakterií byl zaznamenán i ve vzorcích šťáv obsahujících kombinace dvou různých MAG. Výsledky kultivace vzorků na MRS jsou uvedeny v tabulce. U živné půdy ENDO nebyla potvrzena přítomnost bakterií z čeledi *Enterobacteriace* ani při posledním měření.

Tab. 8. Výsledky kultivace vzorků na MRS s NYSTATINEM v CFU/ml

	Kontrola	Koncentrace MAG ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)					
		50	200	250	500	1000	1500
C10	4 . 10 ⁵	0	-	2,8 . 10 ⁶	4,6 . 10 ⁶	6 . 10 ⁵	2 . 10 ⁵
C12		0	-	3 . 10 ⁵	0	0	0
ACA		0	-	0	0	9 . 10 ⁵	0
C10+ACA	4 . 10 ⁵	-	0	-	7,5 . 10 ⁶	-	-
C10+C12		-	0	-	4,2 . 10 ⁶	-	-
C12+ACA		-	2 . 10 ⁵	-	0	-	-

Jak už na začátku bylo uvedeno, pro tuto práci byly vybrány tři druhy MAG lišící se chemickými a fyzikálními vlastnostmi. Po téměř celou dobu kultivace bylo možné sledovat pozitivní inhibici růstu kvasinek a bakterií u monokaprinu, jehož antimikrobiální účinky se objevují v několika studiích.

Jelikož velké množství kvasinek bránilo růstu bakterií na živných médiích, muselo být pro další měření provedeno opatření. Inhibice kvasinek a plísní na půdách bylo dosaženo pomocí NYSTATINU, který byl pro tyto účely použit i v práci uvedené Frolkovou [66].

Po celou dobu měření si bylo možné všimnout některých výkyvů v růstu bakterií, a to konkrétně u MAG ACA . Tyto rozdíly mohly zapříčinit metabolické činnosti kvasinek. Touto problematikou se zabývala studie vedená Mendoza L. M. et al. [67], která potvrdila domněnku, že různé rody kvasinek mohou svými metabolity inhibovat některé druhy bakterií.

7.4 Charakterizace bakterií

Celkem bylo izolováno 14 kmenů bakterií označených čísly 1 – 14, přičemž kolonie s čísly 1 – 6 byly izolovány z čerstvé ovocné šťávy a kolonie 7 – 14 byly izolovány z ovocné šťávy, která byla po 4 týdenní kultivaci při 5 °C. U všech izolátů byla provedena charakterizace dle výše uvedené metodiky.

7.4.1 Makroskopická morfologie kolonií

Mezi morfologické znaky patřil tvar, povrch, profil, okraje, konzistence a barva, které se sledovaly u čistých izolovaných kultur. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7.

Tab. 9. Sledované morfologické znaky

Izoláty	Sledované morfologické znaky kolonií					
	tvar	povrch	profil	okraj	konzistence	barva
1	laločnatý	hladký	plochý	vlnitý	slizovitá	smetanová
2	okrouhlý	hladký	vypouklý	s koncentrickou stavbou	slizovitá	smetanová
3	laločnatý	suchý	plochý	vlnitý	moučná	smetanová
4	nepravdělný	hladký	plochý	vlnitý	slizovitá	mléčná
5	okrouhlý	hladký	plochý	hladký	kašovitá	slabě růžová
6	sektorový	drsňý	vypouklý	vroubkovaný	kožovitá	smetanová
7	okrouhlý	hladký	plochý	hladký	kašovitá	smetanová
8	okrouhlý	hladký	vypouklý	hladký	kašovitá	růžová
9	okrouhlý	hladký	plochý	hladký	kašovitá	průzračně mléčná
10	okrouhlý	hladký	vypouklý	hladký	kašovitá	žlutá
11	zvlněný	hladký	plochý	vroubkovaný	kašovitá	světle oranžová
12	laločnatý	hladký	plochý	vlnitý	kašovitá	průzračně mléčná
13	zvlněný	hladký	vypouklý	hladký	kašovitá	tmavě oranžová
14	okrouhlý	hladký	plochý	vlnitý	kašovitá	mléčná

Obr. 10. Ukázka izolovaných kultur bakterií



7.4.2 Mikroskopická morfolgie kolonií a biochemické testy

Výsledky mikroskopické morfolgie izolátů, Gramova barvení, KOH testu a testu na tvorbu katalázy jsou uvedeny tabulce 10.

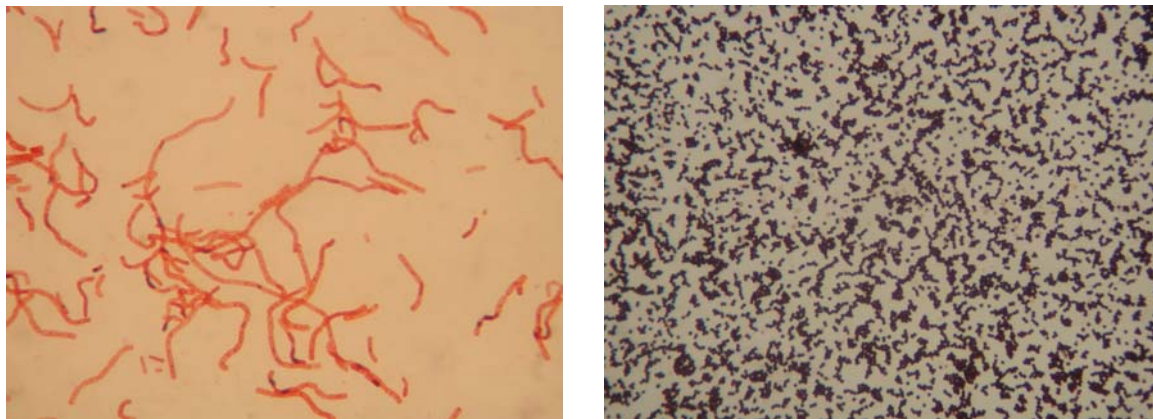
Tab. 10. Výsledky morfolgie a biochemických testů

Izoláty	Tvar buněk	Gramovo barvení	KOH test	Kataláza
1	tyčka	+	+	+
2	tyčka	-	-	-
3	tyčka	-	-	+
4	tyčka	-	+	+
5	kok	-	-	+
6	tyčka	+	+	+
7	tyčka	-	-	+
8	kok	-	-	+
9	tyčka	-	+	+
10	kok	+	+	+
11	kok	+	+	+
12	tyčka	-	+	+
13	tyčka	-	+	+
14	tyčka	-	-	+

Všechny izolované bakterie kromě izolátu č. 2 dávaly pozitivní reakci na tvorbu katalázy za přítomnosti uvolňování kyslíku. Na základě výsledků Gramova barvení byly 4 izoláty gram pozitivní, z toho ve dvou případech se jednalo o tyčky a ve dvou případech o koky.

Ze zbývajících deseti vzorků bylo 7 izolátů určeno jako G- tyčky. Na níže uvedeném obr. 11. je uveden příklad Gramova barvení.

Obr. 11. Příklad výsledku Gramova barvení G- (2) a G+ (11) bakterie



7.4.3 Oxidačně fermentační test – O/F test, Oxidázový test - OXItest

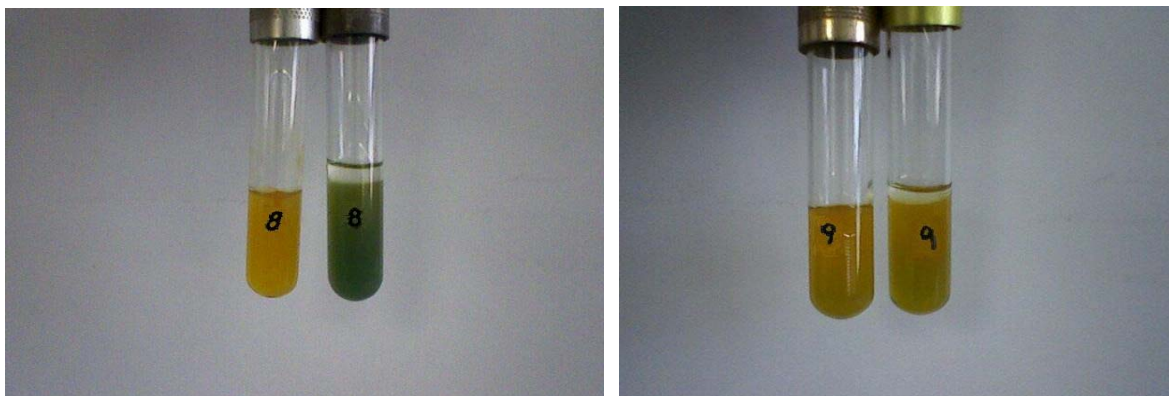
Výsledky O/F testu a OXItestu jsou uvedeny v tabulce 11.

Tab. 11. Výsledky O/F testu

Izoláty	O/F test		OXI test
	oxidativní	fermentační	
1	+	-	-
2	-	-	+
3	+	+	-
4	+	-	-
5	+	+	-
6	-	-	-
7	+	-	+
8	+	-	-
9	+	+	-
10	-	-	-
11	+	+	-
12	+	+	-
13	+	+	-
14	-	-	-

Skoro u všech mikroorganismů došlo k utilizaci glukózy většinou za přístupu vzduchu za vzniku kyseliny, kdy zelená barva média se změnila na žlutou. Pouze u izolátů 2, 6, 10 a 14 nedošlo k oxidační ani fermentační reakci. Pozitivní reakci jak za přítomnosti vzduchu, tak za anaerobních podmínek vykazovaly organismy 3, 5, 9, 11, 12, 13. Při OXItestu byla reakce u všech izolovaných bakterií negativní, s výjimkou vzorku č. 2 a 7.

Obr. 12. Příklad výsledku O/F testu



7.4.4 Diagnostická půda M17

U žádného z izolátů nebyl pozorován růst na půdě pro záchyt mléčných streptokoků (M17), a to ani při teplotě 5 °C, ani při 42 °C.

7.4.5 ENTEROtest 16 a 24

Pro ENTEROtest byly vybrány G- fermentující tyčky s negativní oxidázovou a pozitivní katalázovou reakcí. Po odečtení výsledků byly pomocí diagnostického seznamu a identifikačního programu TNW izolované kmeny zařazeny do taxonů. Z daných výsledků vyhodnotil program se 100 % pravděpodobností u izolátu 14, že se jedná o bakterii *Budvicia aquatica*, dále z 91,65 % pravděpodobností se u izolátu č. 3 jednalo o *Pragia fontium*. Ostatní izolované G- bakterie nebyly dle programu určeny.

7.4.6 NEFERMENTtest 24

Pro tento test byly vybrány nefermentující G- bakterie – 2, 4, 7, 8, 14. Po 48 hodinové kultivaci byly odečteny výsledky dle přiloženého návodu a pomocí diagnostického seznamu a identifikačního programu TNW izolované kmeny zařazeny do taxonů. Z daných výsledků vyhodnotil program s 99,36 % pravděpodobností u izolátu č. 2, že se jedná o

Kingella denitrificans a u izolátu č. 7 se 100 % pravděpodobností, že se jedná o *Agrobacterium radiobacter*. Ostatní vybrané bakterie nebyly dle programu zařazeny.

Obr. 13. Ukázka NEFERMtestu 24 u vybraných druhů bakterií



ZÁVĚR

Cílem práce bylo studium antibakteriálních účinků vybraných MAG na spektru modelových bakterií a následně bakterií, které se nacházejí v ovocných šťávách. Na základě provedených měření lze vyslovit následující závěry:

- byly připraveny MAG kyseliny kaprinové a laurové s čistotou vyšší než 95 %
- u modelových mikroorganismů byly inhibiční účinky MAG zjištěny zejména u MAG C_{10:0} a MAG C_{12:0} a to již od koncentrací 100 µg.ml⁻¹ téměř u všech G+ bakterií a od koncentrace 500 – 1500 µg.ml⁻¹ u G- bakterií
- inhibiční účinky se projevovaly zejména u G+ bakterií a to i u kombinací MAG, kde nejúčinnější byly kombinace MAG C_{12:0} + MAG ACA a MAG C_{10:0} + MAG C_{12:0} v koncentraci 500 µg.ml⁻¹, naopak u G- bakterií byly účinky velmi slabé
- nejcitlivější bakterie vůči inhibičním účinkům MAG byla *Bacillus subtilis* z G + bakterií a *Echerichia coli* z G- bakterií, naopak nejodolnější byla bakterie *Enterococcus faecalis* z G+ bakterií, *Salmonella enterica* a *Pseudomonas aeruginosa* z G- bakterií
- při kultivaci ovocné šťávy byly v prvním i druhém měření sledovány pozitivní inhibiční účinky u MAG kyseliny kaprinové a to od koncentrací 250 µg.ml⁻¹
- úplná inhibice bakterií pomocí MAG C_{10:0} trvala po dobu tří týdnů
- u vzorků ovocných šťáv, kde nebyly aplikovány žádné monoacylglyceroly, docházelo k rychlému pomnožení nežádoucí mikroflóry již při prvním testu po týdenní kultivaci
- pro potlačení růstu kvasinek a plísní byl použit NYSTATIN, jako vhodné antimykotikum
- po celou dobu kultivace ovocných šťáv nebyla zaznamenána přítomnost bakterií rodu *Enterobacteriace*

- u 14 kultur, které byly izolovány z ovocné šťávy, byla provedena charakterizace vybranými biochemickými testy. Programem TNW byly vyhodnoceny celkem 4 izoláty.

Na základě výše uvedených výsledků je zřejmé, že nejdelší prodloužení trvanlivosti čerstvé nepasterizované šťávy lze dosáhnout přidavkem MAG C_{10:0}. Touto modifikací lze prodloužit údržnost surové šťávy cca na tři týdny, aniž by docházelo k jejímu kažení důsledkem činnosti bakterií. Pozitivní skutečností je, že efektu je dosaženo účinkem monoacylglycerolu, který nemá negativní vliv na lidský organismus. Z hlediska skladovatelnosti a zachování původních, tělu prospěšných látek, je prodloužení trvanlivosti důležitým a významným přínosem, který jistě docení hlavně spotřebitelé čerstvých produktů. V dalším pokračování práce je nutné zaměřit pozornost na sensorické hodnocení reálných vzorků ošetřených aktivními MAG.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] CORMA, A., IBORRA, S., MIQUEL, S., PRIMO, J. (1998). *Catalysts for the production of fine chemicals. Production of food emulsifiers, monoglycerides, by glycerolysis of fats with solid base catalysts*. Journal of Catalysis 173: 315-321.
- [2] CHRISTIE W. W., *Monoacylglycerols structure, composition, function and analysis*. [online]. Dostupný z <<http://lipidlibrary.aocs.org/lipids/mg/index.htm>> 15.3. 2011
- [3] VELÍŠEK, J., CEJPEK, K., DAVÍDEK, D., MÍKOVÁ, K., PÁNEK, J., POKORNÝ, J. (1999). *Chemie potravin I*. OSSIS, Tábor, 352 s.
- [4] WHITEHURST, R. J. (2004). *Emulsifiers in food technology*. Blackwell Publishing, Oxford, 244 s.
- [5] POKORNÝ, J., DUBSKÁ, L., ČMOLÍK, J., KLOZAR, V., LIST, J., MALENICKÝ, M., MAREŠ, E., PŘIKRYL, A., SKALSKÝ, J., UHLÍŘ, F., ZAJÍC, J., ZAJÍČEK, L., SOUČEK, J., RŮŽIČKA, J. (1986). *Technologie tuků*. SNTL, Praha. 452 s.
- [6] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. (1983). *Chemie potravin*. SNTL, Praha, 629 s.
- [7] BERÁNKOVÁ J. (2010). *Inhibiční působení 1-monoacylglycerolů* [online]. Dostupný z: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=158&ch=13&typ=1&val=98795> – 21.3. 2011
- [8] DESTAILLATS F., CRUZ-HERNANDEZ C., NAGY K., DIONISI F. (2010) *Identification of monoacylglycerol regio-isomers by gas chromatography–mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1217: 1543–1548
- [9] DOLEŽÁLKOVÁ I. (2010). *Účinky vybraných monoacylglycerolů na růst bakterií a mikroskopických vláknitých hub*. Rigorózní práce.
- [10] JANIŠ, R., KREJČÍ, J., KLÁSEK, A. (2000). *Preparation of 1-monoacylglycerols from glycidoI and fatty acids catalyzed by the chromium (III)- fatty acid system*. European Journal of Lipid Science and Technology 102: 351-354.
- [11] YANG, T., REBSDORF, M., ENGELRUD, U., XU, X. (2005). *Monoacylglycerol synthesis via enzymatic glycerolysis using a simple and efficient reaction system*. Journal of Food Lipids 12: 299-312.
- [12] BORNSCHEUER, U. T. (1995). *Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols*. Enzyme and Microbial Technology 17: 578-586.

- [13] MOULOUNGUI, Z., GAUVRIT, C. (1998). *Synthesis and influence of fatty acid esters on the foliar penetration of herbicides*. Industrial Crops and Products 8: 1–15.
- [14] BUŇKA F., BUŇKOVÁ L., KRÁČMAR S. (2009). *Vybrané hydrokoloidy a emulgátory ve výrobě tavených sýrů*. Acta fytotechnica et zootechnica s. 69-78
- [15] ESPOSITO, E., BORTOLOTTI, F., MENEGATTI, E., CORTESI, R. (2003). *Amphiphilic association systems for Amphotericin B delivery*. International Journal of Pharmaceutics 260: 249- 260.
- [16] BERGSSON, G., ARNFINNSSON, J., KARLSSON, S. M., STEINGRÍMSSON, Ó., THORMAR, H. (1998) *In vitro inactivation of Chlamydia trachomatis by fatty acids and monoglycerides*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42: 2290-2294.
- [17] ALTIERI, C., BEVILACQUA, A., CARDILLO, D., SINIGAGLIA, D. (2009a). *Effectiveness of fatty acids and their monoglycerides against gram-negative pathogens*. International Journal of Food Science and Technology 44: 359-366.
- [18] RŮŽIČKA, J., VELCLOVÁ, K., JANIŠ, R., KREJČÍ, J. (2003). *Antimicrobial effects of 1- monoacylglycerols prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids*. European Food Research and Technology 217: 329-331.
- [19] BUŇKOVÁ, L., KREJČÍ, J., JANIŠ, R., KAŠPÁRKOVÁ, V., VLTAVSKÁ, P., KULEDOVÁ, L., BUŇKA, F. (2010). *Influence of monoacylglycerols on growth inhibition of micromycetes in vitro and on bread*. European Journal of Lipid Science and Technology 112: 173-179.
- [20] WANG, L. L., JOHNSON, E. A. (1992). *Inhibition of Listeria monocytogenes by fatty acids and monoglycerides*. Applied and Environmental Microbiology 58: 624–629.
- [21] KABARA, J. J., SWIECZKOWSKI, D. M., CONLEY, A. J., TRUANT, J. P. (1972). *Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2: 23-28.
- [22] DAVIDSON M. P; SOFOS J. N; BRANEN A. L., *Antimicrobials in food*. 3rd ed. Boca Raton: Taylor, 2005. 706 s. ISBN 0-8247-4037-8
- [23] DUFOUR, M., MANSON, J. M., BREMER, P. J., DUFOUR, J. P., COOK, G. M., SIMMONDS, R. S. (2007). *Characterization of monolaurin resistance in Enterococcus faecalis*. Applied and Environmental Microbiology 73: 5507-5515.
- [24] CHAIBI, A., ABABOUCHE, L. H., GHOUILA, M. R., BUSTA, F. F. (1998). *Effect of monoglycerides on the thermal inactivation kinetics of Bacillus cereus F4165/75 spores*. Food Microbiology 15: 527-237.

- [25] BERGSSON, G., STEINGRÍMSSON, Ó., THORMAR, H. (1999). *In vitro susceptibilities of Neisseria gonorrhoeae to fatty acids and monoglycerides*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43: 2790-2792. OH, D. H., MARSHALL, D. L. (1993). *Antimicrobial activity of glycerol monolaurate or lactic acid against Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 20: 239-246.
- [26] NAIR, M. K. M., VASUDEVAN, J. J. P., HINCKLEY, L., HOAGLAND, T. A., VENKITANARAYANAN, K. S. (2005). *Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens*. Journal of Dairy Science 88: 3488-3495.
- [27] OH, D. H., MARSHALL, D. L. (1993). *Antimicrobial activity of glycerol monolaurate or lactic acid against Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 20: 239-246.
- [28] NOBMAN P., SMITH A., DUNNE J., HENEHAN G., BOURKE P. (2009). *The antimicrobial efficacy and structure activity relationship of novel carbohydrate fatty acid derivatives against Listeria spp. and food spoilage microorganisms*. International Journal of Food Microbiology 128: 440-445
- [29] BRANEN, J., DAVIDSON, P. M. (2004). *Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin*. International Journal of Food Microbiology 90: 63-74.
- [30] SKŘIVANOVÁ, E., MAROUNEK, M., BENDA, V., BŘEZINA, P. (2006). *Susceptibility of Escherichia coli, Salmonella spp. and Clostridium perfringens to organic acids and monolaurin*. Veterinární Medicína 51: 81-88.
- [31] PETSCHOW, B. W., BATEMA, R. P., FORD, L. L. (1996). *Susceptibility of Helicobacter pylori to bactericidal properties of medium-chain monoglycerides and free fatty acids*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 40: 302-306.
- [32] HILMARSSON, H., KRISTMUNDSDÓTTIR, T., THORMAR, H. (2005). *Virucidal activities of medium- and long-chain fatty alcohols, fatty acids, and monoglycerides against herpes simplex virus types 1 and 2: comparison at different pH levels*. APMIS 113: 58-65.
- [33] KRISTMUNDSDÓTTIR, T., ÁRNADÓTTIR, S. G., BERGSSON, G., THORMAR, H. (1999). *Development and evaluation of microbicidal hydrogels containing monoglyceride as the active ingredient*. Journal of Pharmaceutical Sciences 88: 1011-1015.
- [34] HRUDKOVÁ A., MARKVART J., *Nealkoholické nápoje*. Vyd. 1. Praha: SNTL, 1989. 557 s.
- [35] ASHURST P. R. *Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices*. 2nd ed. Oxford: Blackwell, 2005. 374 s. ISBN 9781405122863.

- [36] *Vyhláška Ministerstva zemědělství 335/1997 Sb.*, v platném znění vyhlášky č. 289/2004 Sb.
- [37] ROP O., HRABĚ J., *Nealkoholické a alkoholické nápoje*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009. 129 s. ISBN 978-80-7318-748-4.
- [38] *Microorganisms in foods*. 2nd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005. 763 s. ISBN 030648675X.
- [39] MACHALOVÁ M., *Výroba šťáv, nektarů a ovocných nápojů: Bakalářská práce*. [s.l.], 2009. 68 s. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
- [40] ADAMS, M; MOSS, M. *Food microbiology*. 3rd ed. Cambridge, UK: RSC Publishing, 2008. 463 s. ISBN 978-0-85404-284-5
- [41] JAY J. M., LOESSNER M. J., GOLDEN D. A. *Modern food microbiology*. 7th ed. New York: Springer, 790 s. ISBN 978-0-387-23413-7.
- [42] KAPRÁLEK F. *Základy bakteriologie*. Praha: Karolinum, 1999. 241 s. ISBN 8071848115.
- [43] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
- [44] BATT C. *Encyclopedia of food microbiology*. San Diego: Academic Press. ISBN 978-0-12-227070-3.
- [45] BROOKS G. F., CARROLL K. C., BUTEL J. S., MORSE S. A. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, Twenty-Fourth Edition*. USA: McGraw-Hill Companies. 2007. INTERNATIONAL EDITION ISBN-13: 978-0-07-128735-7, ISBN-10: 0-07-128735-3
- [46] *Miniatlas mikroorganismů*. [online]. Dostupný z: < <http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/atlas.htm> > 25. 2. 2011
- [47] *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. [online]. Dostupný z: < <http://www.textbookofbacteriology.net/> > 16. 3. 2011
- [48] SEDLÁČEK I. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. 2007. 270 s. ISBN 978-80-210-4207-0
- [49] WILSON M. *Bacteriology of humans an ecological perspective*. University College London: Blackwell Publishing. 2008. 364 s. ISBN-13: 978-1-4051-6165-7
- [50] ŠILHÁNKOVÁ L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vyd. Praha 1: Victoria Publishing. 1995. 361 s. ISBN: 80-85605-71-6
- [51] JANDOVÁ B., KOUTOUČKOVÁ J. *Praktikum z mikrobiologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. 1996. 65 s. ISBN 80-210-1374-5.

- [52] *Potravinářské patogeny*. [online]. Dostupný z: <<http://biomikro.vscht.cz>> 14.3.2011
- [53] *Potravinářská mikrobiologie I - Mikroorganizmy v potravinářství* [online]. Dostupný z: <<http://www.cepac.cz>> 9. 3. 2011
- [54] BADGER J. L., STINS M. F., KIM K. S. (1999). *Citrobacter freundii - Invades and Replicates in Human Brain Microvascular Endothelial Cells* [online]. Dostupný z: <<http://iai.asm.org/cgi/content/full/67/8/4208>> 6. 4. 2011
- [55] CASTENHOLZ R. W., BOONE D. R., GARRITY G. M. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria, Parts A – C*. 2nd ed. New York : Springer, 2005. 3060 s. ISBN 978-0-387-95040-2
- [56] YOKOTA A., FUJII T., GOTO K. *Alicyclobacillus -Thermophilic Acidophilic Bacilli*. Springer 2007. 160 s. ISBN: 978-4-431-69849-4
- [57] POSPÍŠILOVÁ M. 2007. *Bakteriální test pro ovocné a zeleninové šťávy*. [online]. Dostupný z: <<http://www.bezpecnostpotravin.cz>> 23. 3. 2011
- [58] *Alicyclobacillus acidoterrestris: A new spoilage organism in fruit juices*. [online]. Dostupný z: <<http://www.kfl.com/atb.html>> 27. 3. 2011
- [59] CERNÝ G., HENNLICH V., PORALLA K. *Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoiling microorganisms*. [online]. Dostupný z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6495870>> 6. 4. 2011
- [60] VERMA L. R., JOSHI V. K. *Postharvest technology of fruits and vegetables: Handling, Processing, Fermentation and Waste Management*. Vol 1. Copyright, 2000. 1194 s. ISBN 81-7387-108-6
- [61] MARSHALL C. R., WALKLEY V. T. (1952). *The homofermentative lactobacilli of apple juice*. J. gen. Microbiol. 6: 374-376
- [62] ČEJKOVÁ A. *Biotechnologické aplikace mikroorganismů*. [online]. Dostupný z: <<http://www.vscht.cz/kch/download/sylaby/bam-mag.pdf>>
- [63] MÁČALÍK Z. *Vliv monoacylglycerolů na růst kvasinek a plísní v přírodních ovocných šťávách*. [s.l.], 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická
- [64] BOEHMOVÁ V. *Odstraňování Cr(III) katalyzátoru z monoacylglycerolů tekutých mastných kyselin* [s.l.], 2009. 85 s. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická
- [65] JANIŠ R., DOLEŽÁLKOVÁ I., VLATAVSKÁ P., KREJČÍ J., BUŇKOVÁ L. (2009). *Monoacylglycerol of 1- adamantane carboxylic acid preparation*. 7 th EURO FED LIPID CONGRESS, 18 - 21 October 2009, Graz, Austria

- [66] FROLKOVÁ P., *Bakterie v procesu výroby vína*. [s.l.], 2008. 103 s. Diplomová práce. Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta.
- [67] MENDOZA L. M., MANCA de NADRA M. C., FARÍAS M. E. (2010). *Antagonistic interaction between yeasts and lactic acid bacteria of oenological relevance. Partial characterization of inhibitory compounds produced by yeasts*. Food Research International 43: 1990 – 1998

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

MAG	Monoacylglycerol
MAG C _{10:0}	Monoacylglycerol kyseliny kaprinové
MAG C _{12:0}	Monoacylglycerol kyseliny laurové
MAG ACA	Monoacylglycerol kyseliny 1-adamantankarboxylové
MK	Mastná kyselina
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
CFU	Počet kolonie tvořících jednotek
G+	Grampozitivní
G-	Gramnegativní
IR	Index růstu

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Vliv MAG C_{10:0} na G⁺ bakterie</i>	<i>46</i>
<i>Obr. 2. Vliv MAG C_{10:0} na G⁻ bakterie</i>	<i>47</i>
<i>Obr. 3. Vliv MAG C_{12:0} na G⁺ bakterie</i>	<i>48</i>
<i>Obr. 4. Vliv MAG C_{12:0} na G⁻ bakterie</i>	<i>49</i>
<i>Obr. 5. Vliv MAG C ACA na G⁺ bakterie</i>	<i>49</i>
<i>Obr. 6. Vliv MAG ACA na G⁻ bakterie</i>	<i>50</i>
<i>Obr. 7. Vliv kombinací MAG na G⁺ bakterie</i>	<i>51</i>
<i>Obr. 8. Vliv kombinací MAG na G⁻ bakterie</i>	<i>51</i>
<i>Obr. 9. Kontrola bez MAG na půdách MRS, ENDO a PCA s NYSTATINEM a bez</i>	<i>53</i>
<i>Obr. 10. Ukázka izolovaných kultur bakterií</i>	<i>59</i>
<i>Obr. 11. Příklad výsledku Gramova barvení G⁻ (2) a G⁺ (11) bakterie</i>	<i>60</i>
<i>Obr. 12. Příklad výsledku O/F testu</i>	<i>61</i>
<i>Obr. 13. Ukázka NEFERMtestu 24 u vybraných druhů bakterií</i>	<i>62</i>

SEZNAM TABULEK

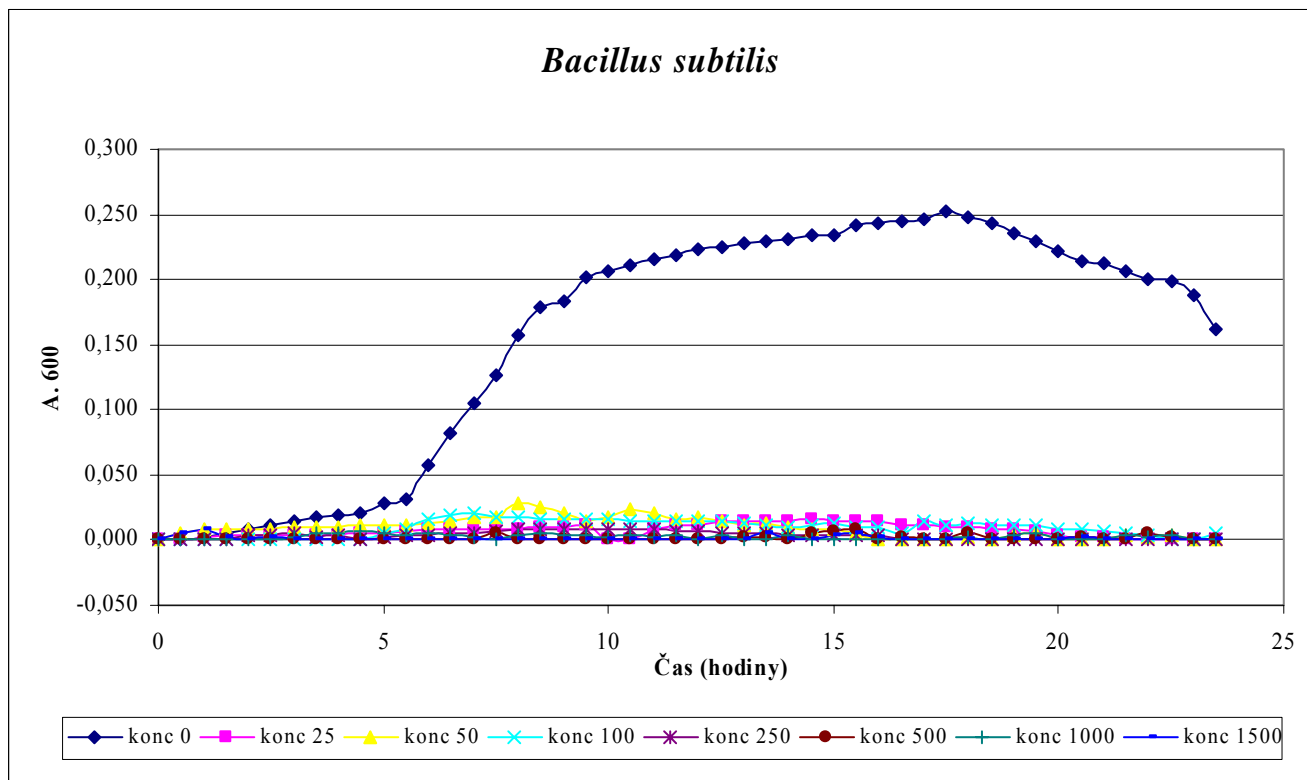
<i>Tab. 1. Příprava jednotlivých koncentrací MAG.....</i>	40
<i>Tab. 2. Systém nanášení na mikrotitrační destičku</i>	41
<i>Tab. 3. Použité koncentrace MAG a příprava vzorků</i>	42
<i>Tab. 4. Výsledky kultivace vzorků na PCA s NYSTATINEM v CFU/ml</i>	54
<i>Tab. 5. Výsledky kultivace vzorků na PCA s NYSTATINEM v CFU/ml</i>	55
<i>Tab. 6. Výsledky kultivace vzorků na PCA s NYSTATINEM v CFU/ml</i>	56
<i>Tab. 7. Výsledky kultivace vzorků na PCA s NYSTATINEM v CFU/ml</i>	56
<i>Tab. 8. Výsledky kultivace vzorků na MRS s NYSTATINEM v CFU/ml</i>	57
<i>Tab. 9. Sledované morfologické znaky</i>	58
<i>Tab. 10. Výsledky morfologie a biochemických testů</i>	59
<i>Tab. 11. Výsledky O/F testu</i>	60

SEZNAM PŘÍLOH

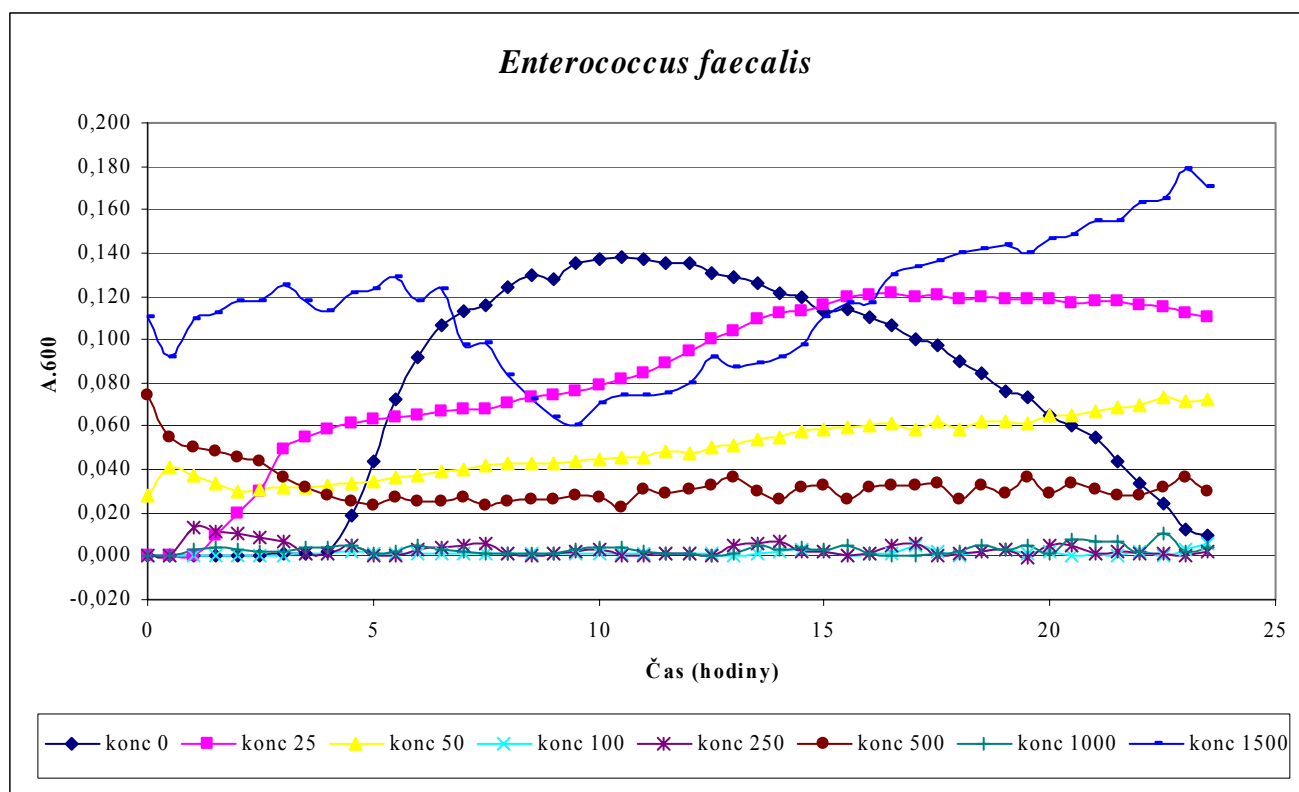
<i>P. I. A. Účinek MAG C_{12:0} na G+ Bacillus subtilis</i>	75
<i>P. I. B. Účinek MAG C_{12:0} na G+ Enterococcus faecalis</i>	75
<i>P. II. A. Účinek MAG C_{12:0} na G- Esecherichia coli</i>	76
<i>P. II. B. Účinek MAG C_{12:0} na G- Salmonella enterica</i>	76

PŘÍLOHA P I: ÚČINEK MAG NA *B. SUBTILIS* A *E. FAECALIS*

P. I. A. Účinek MAG C_{12:0} na G+ *Bacillus subtilis*

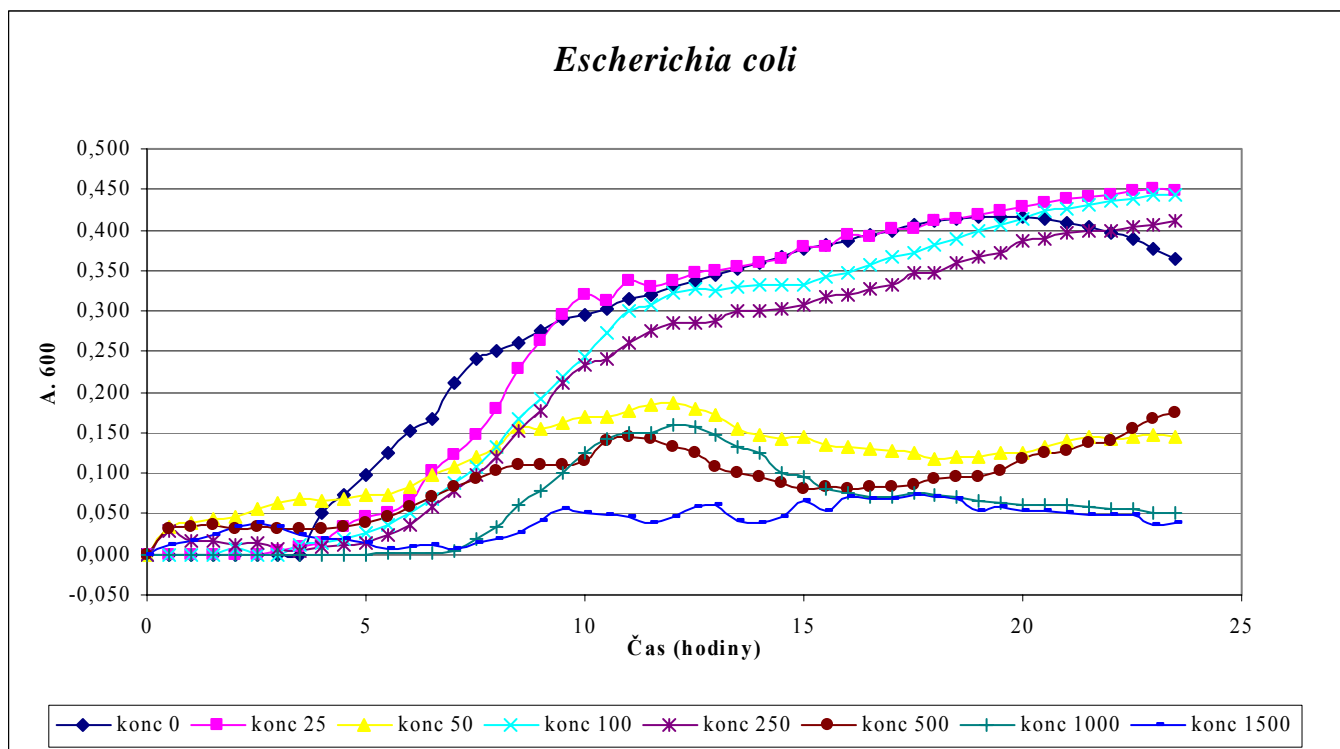


P. I. B. Účinek MAG C_{12:0} na G+ *Enterococcus faecalis*



PŘÍLOHA P II: ÚČINEK MAG NA *E. COLI* A *S. ENTERICA*

P. II. A. Účinek MAG $C_{12:0}$ na *G- Escherichia coli*



P. II. B. Účinek MAG $C_{12:0}$ na *G- Salmonella enterica*

