

Účinky mikroemulzí s vybranými monoacylglyceroly na mikroorganizmy

Radka Bilíková

Bakalářská práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Radka BILÍKOVÁ
Osobní číslo: T09806
Studijní program: B 2901 Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů

Téma práce: Účinky mikroemulzí s vybranými monoacylglyceroly na mikroorganismy

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. V teoretické části zpracujte literární rešerši zaměřenou na emulze a jejich vlastnosti, věnujte se i problematice přípravy mikroemulzí.
2. V další části se zaměřte na estery glycerolu a mastných kyselin a jejich vliv na růst mikroorganismů.

II. Praktická část

1. V praktické části připravte mikroemulze obsahující monoacylglyceroly nasycených i nenasycených mastných kyselin s různou délkou uhlíkového řetězce.
2. Studujte vliv připravených mikroemulzí na růst gram pozitivních a gram negativních bakterií.
3. Získané výsledky zpracujte a srovnajte jednotlivé mikroemulze z hlediska působení na mikroorganismy.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

1. Gunstone, F. D. The Chemistry of Oils and Fats. Sources, Composition, Properties and Uses. Blackwell Publishing, 2004. ISBN 1-4051-1626-9
2. Whitehurst, R. J. Emulsifiers in Food Technology. Blackwell Publishing, 2004. ISBN 1-4051-1802-4
3. McClements, D. J. Food Emulsions. Principles, Practise and Tecnicques. CRC Press, 1999. ISBN 0-8493-8008-1
4. Buňková, L., Buňka, F., Janiš, R., Krejčí, J., Doležálková, I., Pospíšil, Z., Růžička, J., Tremlová, B. Comparison of antibacterial effect of seven 1-monoglycerides on food-borne pathogens or spoilage bacteria. Acta Vet. BRNO. 2011, 80, 29-39
5. Davidson, P. M., Sofos, J. N., Branen, A. L. Antimicrobials in Food. CRC Press, 2005. ISBN 0-8247-4037-8

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Iva Doležálková

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce:

24. února 2012

Termín odevzdání bakalářské práce:

21. května 2012

Ve Zlíně dne 24. února 2012


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno:

Obor:

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 užit 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, považuji 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

.....

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;

(2) 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 odevzdaním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²¹ 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, ušije-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).

²² 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 užit 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 výdětku jim 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 přihlídí ke výši výdětku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Práce je zaměřená na přípravu mikroemulzí obsahujících butanol jako kosurfaktanta s určitým přídavkem vybraných monoacylglycerolů. Teoretická část se zabývá klasifikací emulzí, jejich vlastnostmi, přípravou a zánikem. Další část je zaměřena na problematiku monoacylglycerolů. Popsány jsou jejich vlastnosti a především jejich antibakteriální účinky. Praktická část se zabývá přípravou mikroemulzí s MAG v alkoholu. Následuje sledování inhibičních účinků MAG v mikroemulzi na růst grampozitivních a gramnegativních bakterií.

Klíčová slova: mikroemulze, monoacylglyceroly, antibakteriální aktivita, grampozitivní a gramnegativní bakterie.

ABSTRACT

The bachelor thesis aimed at preparing microemulsions with the addition of selected monoacylglycerols in the presence of alcohol (butanol). The theoretical part deals with the classification of emulsions, their properties, preparation and dissolution. The next section is focused on monoacylglycerols. A brief description of monoacylglycerols is given, and especially their antibacterial effect is discussed. The practical part deals with the preparation of microemulsion with MAG in alcohol. Prepared microemulsions were subsequently examined for their inhibitory effects against gram-positive and gram-negative bacteria.

Keywords: microemulsion, monoacylglycerols, antibacterial activity, gram-positive and gram-negative bacteria.

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce, kterou byla RNDr. Iva Doležálková, za její podporu, vedení a čas, který mi věnovala během zpracování mé bakalářské práce. A zároveň bych jí chtěla poděkovat za poskytnutí rad při vyhodnocování mikrobiologických dat a ochotnou spolupráci.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 HETEROGENNÍ DISPERZNÍ SYSTÉMY	13
1.1 EMULZE	13
1.2 KLASIFIKACE EMULZÍ	14
1.2.1 Podle polarity disperzního podílu a prostředí	14
1.2.2 Podle koncentrace disperzního podílu	14
1.2.3 Podle velikosti dispergovaných částic	15
1.3 PŘÍPRAVA EMULZÍ	16
1.4 VLASTNOSTI EMULZÍ	17
1.5 ZÁNİK EMULZÍ.....	17
2 MONOACYLGLYCEROLY.....	19
2.1 VLASTNOSTI MONOACYLGLYCEROLŮ	19
2.2 EMULGÁTOR	20
2.3 VÝROBA MONOACYLGLYCEROLŮ.....	21
2.3.1 Interesterifikace	21
2.3.2 Parciální hydrolyza triacylglycerolů.....	23
2.4 PRŮMYSLOVÉ VYUŽITÍ MONOACYLGLYCEROLŮ.....	24
2.5 ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINKY MONOACYLGLYCEROLŮ	24
3 RŮST BAKTERIÍ	27
3.1 LAG-FÁZE	28
3.2 EXPONENCIÁLNÍ FÁZE	29
3.3 STACIONÁRNÍ FÁZE	29
3.4 FÁZE ODUMÍRÁNÍ	29
4 GRAMPOZITIVNÍ BAKTERIE.....	31
4.1 GRAMPOZITIVNÍ KOKY	31
4.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	31
4.1.2 <i>Enterococcus faecalis</i>	32
4.1.3 <i>Micrococcus luteus</i>	32
4.2 GRAMPOZITIVNÍ TYČINKY TVOŘÍCÍ ENDOSPORY	33
4.2.1 <i>Bacillus cereus</i>	33
4.2.2 <i>Bacillus subtilis</i>	34
5 GRAMNEGATIVNÍ BAKTERIE.....	35
5.1 GRAMNEGATIVNÍ AEROBNÍ TYČINKY A KOKY	35
5.1.1 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	35
5.2 GRAMNEGATIVNÍ TYČINKY FAKULTATIVNĚ ANAEROBNÍ.....	36
5.2.1 <i>Escherichia coli</i>	36
5.2.2 <i>Salmonella enterica</i>	37
5.2.3 <i>Citrobacter freundii</i>	37
5.2.4 <i>Serratia marcescens</i>	38
II PRAKTICKÁ ČÁST	39

6	POUŽITÉ MATERIÁLY A PŘÍSTROJE	40
6.1	MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE	40
	Monoacylglyceroly.....	40
	Alkohol 40	
	Surfaktant.....	40
6.2	POUŽITÉ MIKROORGANIZMY A KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	40
6.3	PŘÍSTROJE.....	41
7	METODIKA.....	43
7.1	PŘÍPRAVA MIKROEMULZÍ.....	43
7.2	PŘÍPRAVA SUSPENZE BAKTERIÍ	43
7.3	SLEDOVÁNÍ ÚČINKŮ MIKROEMULZÍ S MONOACYLGLYCEROLY NA RŮST MIKROORGANIZMŮ	43
8	VÝSLEDKY A DISKUZE	47
8.1	Vliv MONOACYLGLYCEROLŮ V MIKROEMULZI NA RŮST G ⁺ A G ⁻ BAKTERIÍ.....	47
8.1.1	Vliv mikroemulze bez přídavku MAG na růst gram pozitivních bakterií	47
8.1.2	Vliv mikroemulze bez přídavku MAG na růst gram negativních bakterií	49
8.1.3	Vliv mikroemulze s monoacylglycerolem kyseliny kaprinové MAG (C _{10:0}) na růst gram pozitivních bakterií	50
8.1.4	Vliv monoacylglycerolu kyseliny kaprinové MAG (C _{10:0}) na růst gram negativních bakterií	52
8.1.5	Vliv monoacylglycerolu kyseliny undekanové MAG (C _{11:0}) na růst gram pozitivních bakterií	53
8.1.6	Vliv monoacylglycerolu kyseliny undekanové MAG (C _{11:0}) na růst gram negativních bakterií	54
8.1.7	Vliv monoacylglycerolu kyseliny undecenové MAG (C _{11:1}) na růst gram pozitivních bakterií	56
8.1.8	Vliv monoacylglycerolu kyseliny undecenové MAG (C _{11:1}) na růst gram negativních bakterií	57
8.1.9	Vliv monoacylglycerolu kyseliny laurové MAG (C _{12:0}) na růst gram pozitivních bakterií	58
8.1.10	Vliv monoacylglycerolu kyseliny laurové MAG (C _{12:0}) na růst gram negativních bakterií	60
8.1.11	Vliv monoacylglycerolů na růst <i>Bacillus cereus</i>	61
8.1.12	Vliv monoacylglycerolů na růst <i>Escherichia coli</i>	61
	ZÁVĚR	63
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	64
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	70
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	72
	SEZNAM TABULEK	74

ÚVOD

Commission Internationale de Terminologie definovala emulze jako heterogenní disperze jemných kapek jedné kapaliny v druhé, z nichž jedna tvoří kontinuální, kapalně prostředí. Kapaliny, které spolu vytvářejí emulzi, musí být navzájem nemísitelné nebo omezeně mísitelné a v soustavě bývají přítomny látky, schopné zabránit slévání dispergovaných kapiček – koalescenci. Emulze je tedy systém energeticky bohatší, a proto termodynamicky méně stálý. Aby byla vytvořena emulze stálá, musí jedna z kapalin obsahovat povrchově aktivní látku – emulgátor. V praxi se setkáváme s přirozenými i uměle připravenými emulzemi v potravinářském průmyslu, v průmyslu plastických hmot, ve farmacii, kosmetice, v zemědělství a v mnoha jiných oborech.

Mikroemulze jsou emulze s velikostí částic obvykle v rozsahu 10-100 nm. Jsou to čiré a termodynamicky stabilní disperze.

Monoacylglyceroly (MAG) jsou parciální estery glycerolu s mastnými kyselinami. V molekule MAG je na trojsytný alkohol glycerol vázána pouze jedna mastná kyselina, což poskytuje těmto látkám některé výjimečné vlastnosti. MAG jsou rozpustné v alkoholu a nerozpustné v petroletheru. Molekula MAG je amfipatická, tvoří ji polární (hydrofilní) a nepolární (lipofilní) část. MAG mají široké využití v průmyslu potravinářském, kosmetickém, farmaceutickém, plastikářském a textilním a v nemalé míře jsou využívány také pro výrobu krmiv. Kromě výše uvedených vlastností mají monoacylglyceroly i schopnost inhibovat růst některých mikroorganismů, což by bylo možné využít například v potravinářství, kde by tak monoacylglyceroly mohly přispět k vyšší údržnosti některých potravin.

Překládaná bakalářská práce studuje vliv MAG ve formě mikroemulzí na růst potravinářsky významných bakterií. Z tohoto důvodu byla do teoretické části zařazena i kapitola zaměřená na růst bakterií. Růstem bakteriální buňky rozumíme zvětšování její hmotnosti a objemu a syntézu svých vlastních komponent. Mikroorganismy mohou v daném prostředí růst a množit se tak dlouho, dokud mají dostatečný zdroj živin, vhodný parciální tlak kyslíku, vhodnou teplotu, odpovídající hodnotu pH a redox potenciálu. Růst mikroorganismů lze znázornit graficky pomocí růstové křivky. Tato křivka popisuje koncentraci bakterií v závislosti na čase a má tvar písmene S. Vliv jednotlivých mikroemulzí na růst a množení bakterií byl sledován v tekutém médiu a charakterizován sestavením růstových křivek pro jednotlivé mikroorganismy rostoucí v přítomnosti různých koncentrací mikroemulzí. Pro

hodnocení případných inhibičních účinků mikroemulzí obsahujících různé monoacylglyceroly bylo vybráno pět gram pozitivních a pět gram negativních druhů bakterií. Zvoleny byly jednak mikroorganismy, které mohou kontaminovat potraviny a představují zdravotní riziko pro konzumenta, ale i mikroorganismy, které se svou životní činností mohou podílet na kažení potravin.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 HETEROGENNÍ DISPERZNÍ SYSTÉMY

Heterogenní disperze jsou systémy, u nichž disperzní podíl představuje samostatnou fázi, oddělenou od disperzního prostředí fázovým rozhraním. V důsledku velké mezifázové energie jsou tyto disperzní soustavy termodynamicky nestálé. Není-li soustava vhodným způsobem stabilizována, probíhají v ní různé procesy, které vedou ke snižování stupně disperzity, až nakonec dojde k rozdělení – destrukci disperzní soustavy [1, 2, 3].

O skupenství heterogenních disperzí, pokud nejsou příliš koncentrované, rozhoduje skupenský stav spojitého prostředí [3].

1.1 Emulze

Jsou jemně disperzní systémy nejméně dvou vzájemně nemísitelných kapalin. Commission Internationale de Terminologie definovala emulze jako heterogenní disperze jemných kapek jedné kapaliny v druhé, z nichž jedna tvoří kontinuální, kapalně prostředí [1].

Kapaliny, které spolu vytvářejí emulzi, musí být navzájem nemísitelné nebo omezeně mísitelné a v soustavě bývají přítomny látky, schopné zabránit slévání dispergovaných kapiček – koalescenci [2, 3]. Za normálních podmínek se snaží každá kapalina získat takový tvar, který zaujímá nejmenší povrch vzhledem k svému objemu. Při jemném rozptýlení kapaliny se značně zvětší její povrch a také obsah volné energie. Emulze je tedy systém energeticky bohatší, a proto termodynamicky méně stálý. Aby byla vytvořena emulze stálá, musí jedna z kapalin obsahovat povrchově aktivní látku – emulgátor [4]. Emulgátory snižují mezipovrchové napětí dvou vzájemně nemísitelných kapalin natolik, že vytvořená emulze se už samovolně nerozděluje [5]. Emulgátorů je dnes k dispozici velké množství typů, které umožňují snadnou přípravu emulzí typu jak olej ve vodě (O/V – emulze I. typu), i voda v oleji (V/O – emulze II. typu) [1]. Molekula emulgátoru tvoří mezi tukovou a vodní fází tenkou vrstvičku (film), kde k vodě je obrácena (orientována) a přitahována hydrofilní skupina emulgátoru a k tuku hydrofobní skupina emulgátoru, takže emulgátor tvoří spojovací vrstvičku mezi vodnou a tukovou fází. Hydrofilní skupiny se snáze rozpouštějí ve vodě, patří mezi ně např. skupina alkoholová – OH, karboxylová – COOH, esterová -O-CO-. Hydrofobní skupina se snáze rozpouští v tuku a bývá jí nejčastěji uhlíkatý řetězec s 12 až 18 atomy. Látky, které nemají emulgační schopnosti, ale emulze jen stabilizují, se nazývají stabilizátory [5].

V praxi se setkáváme s přirozenými i uměle připravenými emulzemi v potravinářském průmyslu, v průmyslu plastických hmot, ve farmacii, kosmetice, v zemědělství a v mnoha jiných oborech [2, 3].

1.2 Klasifikace emulzí

Emulze lze rozdělit podle různých hledisek, např. podle polarit disperzního podílu a prostředí, podle koncentrace disperzního podílu nebo podle velikosti částic.

1.2.1 Podle polarit disperzního podílu a prostředí

Emulze přímé (emulze I. typu), označované jako O/V (olej ve vodě), ve kterých je disperzním prostředím polárnější kapalina [2, 3].

Emulze obrácené (emulze II. typu), jejichž disperzním prostředím je nepolární kapalina, ty jsou označovány jako emulze V/O (voda v oleji) [2, 3].

Typ emulze je možno určit:

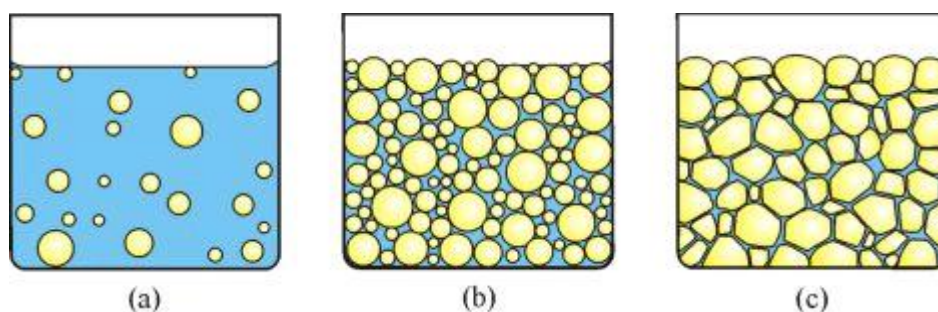
- podle elektrické vodivosti, která je dána vodivostí jejího disperzního prostředí – emulze O/V jsou mnohem vodivější než emulze V/O
- podle schopnosti rozpouštět polární nebo nepolární barviva
- podle schopnosti mísit se s polárními nebo nepolárními rozpouštědly – emulzi je možno ředit kapalinou, která se mísí s jejím disperzním prostředím
- pozorováním v ultrafialovém světle – olejová fáze fluoreskuje
- podle smáčivosti – emulze smáčí ten povrch, který je smáčen jejím disperzním prostředím [1, 2, 3].

1.2.2 Podle koncentrace disperzního podílu

Emulze zředěné – v nichž dispergovaná fáze zaujímá maximálně 2 % celkového objemu. Průměr kapiček je zpravidla řádově 10^{-7} m, tedy blízký rozměru koloidních částic.

Emulze koncentrované – s nedeformovanými sférickými kapkami, které v monodisperzních systémech mohou dosáhnout koncentrace disperzního podílu až 74 obj. % , což odpovídá nejtěsnějšímu geometrickému uspořádání kulovitých částic. Polydisperzní emulze, kde malé kapénky mohou vyplnit prostory mezi velkými, lze připravit i koncentrovanější.

Emulze koncentrované (gelovitě) – emulze s kapkami disperzního podílu uloženými tak těsně, že se vzájemně deformují, nabývají tvaru mnohostěnů, oddělených od sebe tenkými filmy koloidních rozměrů – vrstvičkami disperzního prostředí a emulgátoru [2, 3]. Jednotlivé typy emulzí jsou znázorněny na obrázku 1.



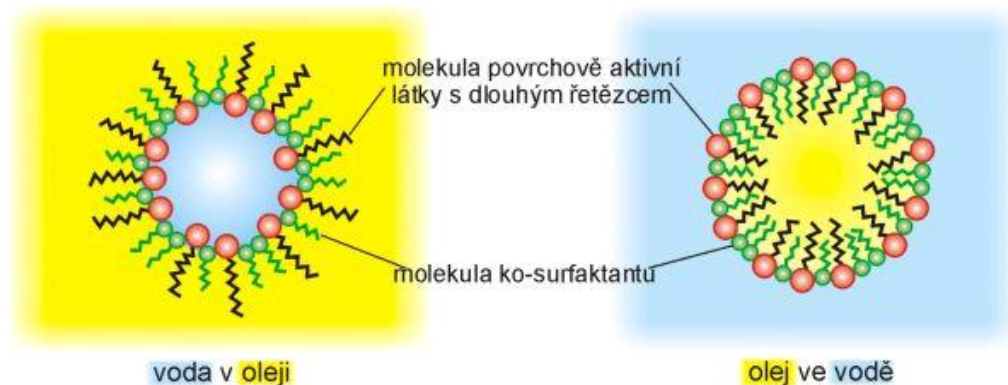
Obr. 1. Různé typy emulzí (a) zředěné, (b) koncentrované, (c) vysoce koncentrované (gelovitě) [6].

Zvláštním druhem emulzí jsou tzv. *kritické emulze* – soustavy tvořící se obvykle ze dvou omezeně mísitelných kapalin při teplotě blízké kritické teplotě rozpouštěcí, kdy mezifázové napětí na rozhraní fází je velmi malé (10^{-5} N/m) a k dispergování jedné kapaliny druhou stačí jen tepelný pohyb molekul [3].

V potravinářství, při zpracování odpadních vod, při různých separačních procesech, ve farmacii, v kosmetickém průmyslu se uplatňují tzv. dvojité emulze, O/V/O, popř. V/O/V, v nichž např. kapky oleje emulze O/V obsahují drobné kapičky vody, popř. i složitější systémy (ty jsou označovány jako mnohočetné emulze) [3].

1.2.3 Podle velikosti dispergovaných částic

Mikroemulze - s velikostí částic obvykle v rozsahu 10-100 nm. Jsou to čiré a termodynamicky stabilní disperze [7].



Obr. 2. Schematické znázornění kapky mikroemulze [10].

Nanoemulze - jejich velikost částic leží obvykle v rozsahu 50-200 nm, jsou průsvitné a kineticky stabilní. Některé literární zdroje blíže specifikují také miniemulze s velikostí rozptýlených částic 80-150 nm [8, 9].

Makroemulze - s velikostí částic > 100 nm (zpravidla v rozsahu 100 – 1000 nm). Jsou mléčně zbarvené a termodynamicky nestabilní. Z potravinářského hlediska jsou nejvýznamnější právě makroemulze [7].

1.3 Příprava emulzí

Emulze se připravují mechanickou dispergací disperzního podílu v disperzním prostředí za přítomnosti příslušného emulgátoru – emulzifikací. Dispergované kapaliny se intenzivně promíchávají, protřepávají, podrobují se vibracím pomocí míchadel, speciálních emulgátorů, koloidních mlýnů nebo ultrazvuku. Někdy se získané polydisperzní emulze ještě dodatečně homogenizují ve speciálních homogenizátorech různé konstrukce.

Při emulzifikaci je mechanická práce přeměňována v mezifázovou energii rozhraní olej/voda, emulgátory vedle stabilizačního účinku snižují mezifázovou energii a tím tento proces usnadňují. Emulzifikace je velmi snadná, poklesne-li mezifázové napětí pod 10 mN/m. Některé emulgátory s rozvětveným řetězcem dokonce snižují mezifázovou energii pod 1 mN/m. Pak stačí k dispergování velmi malé turbulence a dochází k tzv. spontánní emulzifikaci [2, 3].

1.4 Vlastnosti emulzí

Barva a vzhled – závisí na koncentraci a velikosti částic disperzního podílu a na indexu lomu obou kapalných fází. Emulze jsou většinou kalné, koncentrovanější emulze jsou neprůhledné. Pouze při stejném indexu lomu jsou emulze průsvitné.

Elektrické vlastnosti – u zředěných emulzí jsou podobné vlastnostem zředěných solí. Částice těchto emulzí typu O/V nesou záporný elektrický náboj, vykazují elektroforetickou pohyblivost.

Sedimentace – sedimentace disperzní fáze závisí na poměru hustot obou kapalin, může docházet jak k sedimentaci směrem dolů, tak k sedimentaci směrem vzhůru, na hladině pak vzniká koncentrovaná vrstva disperzní fáze.

Viskozita – u zředěných emulzí se často řídí Einsteinovou rovnicí. Viskozita koncentrovaných emulzí závisí mnohem více na poměru objemů obou kapalných fází než pouze na viskozitě disperzního prostředí a uplatňuje se také viskozita emulgátoru. Systémy vykazují nenewtonské chování [3].

Zvláštní vlastností emulzí je možnost změnit typ emulze. Dojde-li ke změně podmínek, které stabilizují emulzi určitého typu, může dojít k obrácení (inverzi) fází, kdy emulze daného typu přechází na emulzi opačného typu. Příčinou může být buď fyzikální změna, nebo chemická reakce, převádějící emulgátor na látku stabilizující opačný typ emulze. Jsou-li tyto změny vyvolány fyzikálními faktory, bývají vratné [2, 3].

1.5 Zánik emulzí

Separace na makroskopické fáze – zánik emulze – je proces spojený s poklesem Gibbsovy energie. Při vzájemných srážkách se malé kapky spojují, tvoří větší kapky – dochází ke koalescenci – a plocha fázového rozhraní se zmenšuje. Velké kapky pak sedimentují [2].

V řadě případů bývají emulze nevídaným jevem a je nutno je odstraňovat. K rozrážení emulzí (oddělení jedné fáze od druhé) existuje mnoho metod, z nichž každá je použitelná jen pro některé emulze.

Mechanické metody – jako např. rytmické vibrace, šlehání, filtrace materiálem, který je smáčen jen disperzním prostředím.

Termické metody – zahřívání emulzí na vysoké teploty pod tlakem, nebo naopak vymrazování.

Elektrické rozrážení – stejnosměrné napětí je vhodné pro emulze O/V, kapénky se oddělují od vodné fáze elektroforézou. Střídavé napětí rozráží emulze typu V/O.

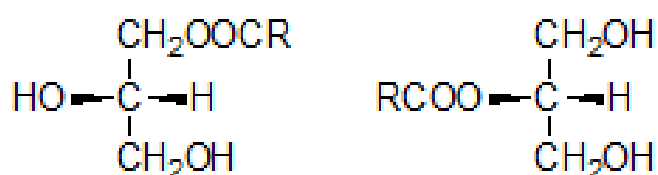
Chemické metody – zředěné emulze, stabilizované elektrickou dvojrůstvou, lze koagulovat jako lyofobní soli – elektrolyty s vícemocnými ionty. Emulze stabilizované emulgátorem filmem lze rozrušit:

- Přídavkem povrchově aktivní látky, která vytěsňuje emulgátor z fázového rozhraní, ale není schopná stabilizovat emulzi.
- Přídavkem emulgátoru, který podporuje emulzi opačného typu.
- Vysolením emulgátoru, tj. snížením jeho rozpustnosti přídavkem velkého množství elektrolytu.

Pro všechny metody rozrážení emulzí platí obecné pravidlo, že koncentrované emulze se rozrušují lépe. Proto se často před vlastním rozrážením zvýší koncentrace emulze přídavkem disperzního podílu (při nezměněné koncentraci emulgátoru) [2, 3].

2 MONOACYLGLYCEROLY

Monoacylglyceroly (MAG) jsou parciální estery glycerolu s mastnými kyselinami [12]. Na molekulu glycerolu může být vázána jen jedna mastná kyselina, pak vznikají monoacylglyceroly, pokud jsou navázány dvě či tři mastné kyseliny jedná se o diacylglyceroly (DAG) a triacylglyceroly (TAG). Podle toho, na kterou OH skupinu glycerolu je mastná kyselina navázána, lze rozlišit dvě izomerní formy MAG: 1-monoacylglycerol a 2-monoacylglycerol [34]. Na obrázku 3 jsou tyto izomerní formy znázorněny.



Obr. 3. Izomerní formy MAG[13].

2.1 Vlastnosti monoacylglycerolů

MAG jsou rozpustné v alkoholu a nerozpustné v petroletheru [18].

Monoacylglyceroly podobně jako TAG vykazují polymorfii. Krystalizují ve třech formách α , β' a β . Po roztavení a rychlém zchlazení se tvoří málo stabilní forma α , která postupně přechází až na formu β . Hodnoty HLB běžných MAG jsou nízké <5 , a proto jsou tyto látky nerozpustné ve vodě, rozpouštějí se v tucích a olejích a jsou schopny stabilizovat emulze V/O. Při zahřívání MAG ve vodě dochází k jejich roztavení (bod tání 80°C) a vytváří se gel. Struktura gelu je lamelární a podobá se lipidním dvojvrstvám.

Monoacylglyceroly patří mezi významné potravinářské emulgátory (E 471). I když se jedná o přirozené deriváty tuků, je jejich množství v potravinách regulováno, jak uvádí tabulka 1 [11].

Tab. 1. Povolené přídavky E 471 v potravinách [11].

Název potraviny	Množství E 471
Piškoty, sušenky, suchary, obilné výrobky a ostatní druhy dětské výživy	5000 mg/kg
Neemulgované tuky a oleje (kromě olivového oleje)	10000 mg/kg
Chléb	nez. množství
Kakao	nez. množství
Mléčná výživa určená k výživě kojenců	4000 mg/kg

Molekula MAG je amfipatická, tvoří ji polární (hydrofilní) a nepolární (lipofilní) část. V disperzích se proto molekuly orientují na rozhraní mezi nepolární fází (olej nebo vzduch) a polární fází (voda) tak, že hydrofobní konce molekul, tvořené převážně řetězci mastných kyselin, směřují do hydrofobní fáze, zatímco hydrofilní části molekul směřují do vodné fáze. Molekuly tak vytvoří mezi fázemi orientovaný molekulární film, který usnadňuje dispergaci a stabilizuje disperzi [21].

2.2 Emulgátor

Emulgátor slouží hlavně jako látka usnadňující emulgaci tuků. U nás se v tukovém průmyslu používají jen emulgátory monoacylglycerolového typu. Vhodnými potravinářskými emulgátory jsou i cukerné estery, které se při výrobě margarínu neuplatňují [5].

Emulgátory jsou povrchově aktivní látky, které usnadňují vznik a stabilizaci emulzí. Jsou to tedy látky, které snižují mezipovrchové napětí na fázovém rozhraní dvou nemísitelných kapalin o rozdílné polaritě. Emulgátory o nízké HLB (hydrofilní-lipofilní rovnováha) hodnotě (obvykle do 6) vytváří a stabilizují emulze typu voda v oleji a emulgátory o HLB hodnotě než 8 stabilizují emulze typu olej ve vodě. Protože margarín je emulze typu

V/O, jsou vhodné ke stabilizaci této emulze emulgátory o nízké hodnotě HLB [4]. Emulgátory se dělí na neionické, kationické a anionické. Monoacylglyceroly patří mezi neionické. Tabulka č. 2 znázorňuje rozpustnost emulgátorů ve vodě.

Tab. 2. Vztah mezi hodnotou HLB a rozpustnosti emulgátorů ve vodě[16].

Vztah mezi hodnotou HLB a rozpustnosti emulgátorů ve vodě	
Hodnota HLB	Rozpustnost emulgátorů ve vodě
1 - 4	Velmi obtížně dispergovatelné
3 - 6	Obtížně dispergovatelné
6 - 8	Mléčná disperze po míchání
8 - 10	Stabilní mléčná disperze
10 - 13	Poločirá disperze
13 a výše	Čirý roztok

2.3 Výroba monoacylglycerolů

Emulgátory typu MAG se průmyslově vyrábí několika způsoby:

- interesterifikací (alkoholýzou, acidolýzou, transesterifikací)
- parciální hydrolyzou triacylglycerolů (TAG)

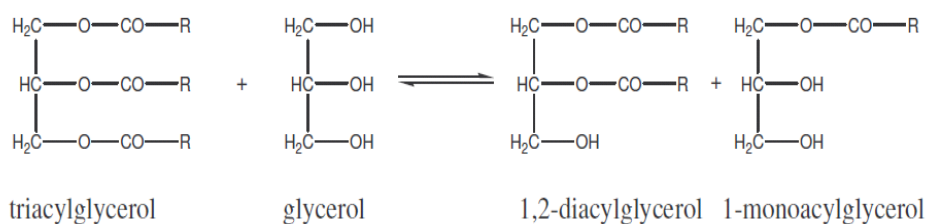
2.3.1 Interesterifikace

Interesterifikace představuje proces, při kterém se přesunují acylové skupiny. K přesunu může dojít buď v rámci jedné molekuly tuku (intramolekulární interesterifikace) nebo mezi molekulami různých acylglycerolů (intermolekulární interesterifikace). Finálním jevem přeskupení acylů v molekulách tuku je zvýšení entropie dané směsí TAG [4].

Interesterifikace zahrnuje tři typy reakcí:

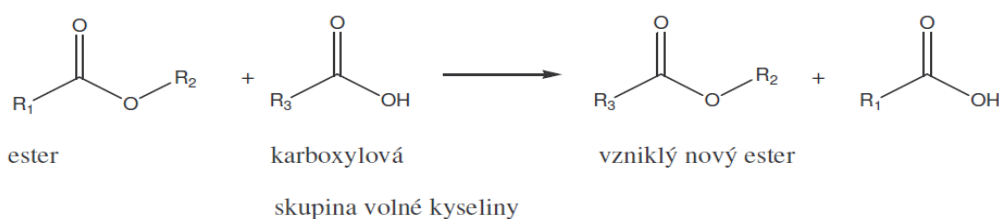
Alkoholýza – je katalyzována kyselými i alkalickými katalyzátory. Patří sem především glycerolýza, která se používá při výrobě monoacylglycerolových emulgátorů [17]. Glyce-

rolýza je zvláštním případem alkoholýzy, kdy se tuk štěpí glycerolem za vzniku směsi MAG a DAG. Reakce probíhá za vysoké teploty 150 – 200 °C a za přítomnosti katalyzátorů, nejčastěji hydroxidu vápenatého $\text{Ca}(\text{OH})_2$ nebo hydroxidů jiných kovů. Má průmyslový význam. Vyrábí se tak emulgátory pro tukový a potravinářský průmysl [15]. Obrázek 4 znázorňuje reakční schéma glycerolýzy.



Obr. 4. Obecné schéma glycerolýzy.[20].

Acidolýza – reaguje karboxylová skupina volné kyseliny s esterem za vzniku meziprodktu, z něhož se uvolní kyselina dříve vázaná v esteru a vytvoří se nový ester. V tomto esteru je na alkohol vázána kyselina, která byla před reakcí volná. Protože reakce je vratná, vytvoří se mezi kyselinami a oběma typy esterů rovnovážný stav. Acidolytické reakce jsou důležité hlavně u netěkavých kyselin a esterů, tedy především u vícefunkčních kyselin nebo hydroxy kyselin [21]. Obrázek 5 znázorňuje průběh acidolýzy.



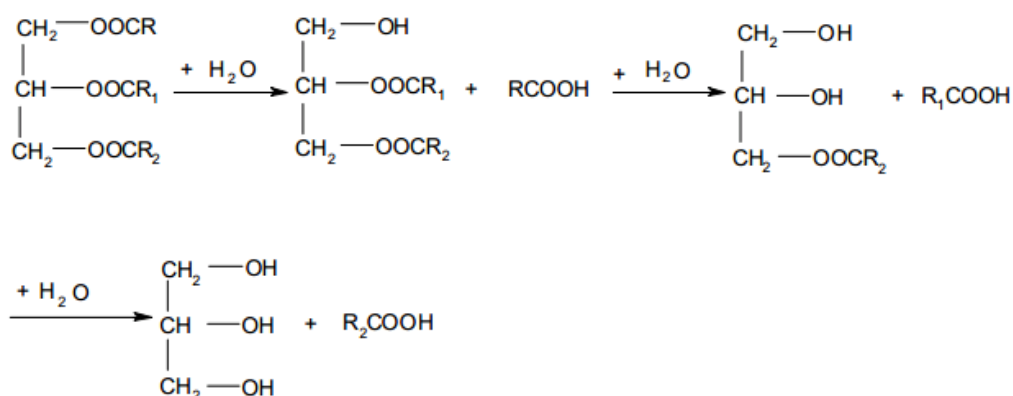
Obr. 5. Obecné schéma acidolýzy [20].

Transesterifikace – transesterifikace, nebo-li esterová výměna slouží jako úprava některých tuků [17]. Esterová výměna probíhá při teplotě 20-200 °C [14]. Při transesterifikaci se vymění kyselá nebo alkoholická složky mezi dvěma molekulami esterů. Esterová výměna mastných kyselin vázaných TAG je reakce, která značně ovlivní vlastnosti produktu. V přírodních tucích a olejích je totiž zastoupení mastných kyselin v jednotlivých moleku-

lách TAG specifické, kdežto při esterové výměně se stane nahodilým – tomuto procesu se říká randomizace [21].

2.3.2 Parciální hydrolýza triacylglycerolů

V průběhu hydrolýzy dochází k postupnému přijímání vody molekulou TAG. Jako katalyzátory se používají většinou oxidy případně hydroxidy kovů II. skupiny (ZnO), případně se využívá vysokého tlaku a teploty. Kromě alkalicky působících katalyzátorů, lze hydrolýzu provést i působením kyselých reagujících katalyzátorů (Twitchellovo činidlo). Spolu s katalyzátorem se přidávala H_2SO_4 . V současné době se provádí méně. V reakční směsi je množství DAG a MAG zanedbatelné, vzhledem k jejich snadnější rozpustnosti. Hladce probíhá hydrolýza pomocí hydroxidů alkalických kovů (NaOH, KOH). Hydrolýzu lze provést za mírných podmínek enzymaticky lipázami. Působí často selektivně. Hydrolýza slouží především k přípravě volných mastných kyselin jako základní látky pro další výroby [17]. Obrázek č. 6 znázorňuje obecné schéma hydrolýzy. Hydrolytické žluknutí může být zcela chemického rázu (např. při dlouhém vaření potraviny), obvyklejší je však hydrolýza katalyzovaná enzymy, hlavně lipázami a fosfolipázami. Enzymová hydrolýza probíhá při skladovacích teplotách, pokud je přítomno dostatečné množství vody. Většina rostlinných i živočišných lipáz je nespecifická a může katalyzovat hydrolýzu všech mastných kyselin vázaných v TAG. Protože hydrolýza TAG na DAG je pomalejší než jejich další hydrolýza na MAG a těch na mastné kyseliny a glycerol, nehromadí se ve skladovaném materiálu parciální estery glycerolu, ale pouze volné mastné kyseliny [18, 21].



Obr. 6. Reakční schéma hydrolýzy [17].

2.4 Průmyslové využití monoacylglycerolů

MAG mají široké využití v průmyslu potravinářském, kosmetickém, farmaceutickém, plastikářském a textilním a v nemalé míře jsou využívány také pro výrobu krmiv [36]. V potravinářském průmyslu jsou MAG nenasycených mastných kyselin velmi dobrými surfaktanty při výrobě margarínů s vyšším obsahem vodné fáze [56]. Dále jsou využívány při výrobě pečiva, zmrzlin, šlehaných krémů, tavených sýrů nebo kondenzovaného mléka. V poslední době jsou také využívány při výrobě nízkotučných výrobků a instantních pokrmů [57]. V kosmetickém průmyslu se využívají MAG obsahující nasycené mastné kyseliny. Jsou využívány především pro svou stabilitu, chemickou netečnost v přítomnosti bioaktivních látek, pro dobrou snášenlivost pokožkou a sliznicí, pro schopnost penetrace a také proto, že jsou to látky bezbarvé a stabilní vůči oxidaci. Dále mají dobré změkčující a emulgační vlastnosti. Uplatňují se také v prostředcích proti pocení, kdy se monolaurin přidává do deodorantů společně s jeho diacetátem jako omezovač pocení. Příklad MAG do mýdel zase zvyšuje odolnost proti jejich popraskání [36, 58, 59]. Díky svým lubrikačním, emulgačním a změkčovacím vlastnostem jsou MAG využívány i v textilním a plastikářském průmyslu [60].

2.5 Antibakteriální účinky monoacylglycerolů

Antimikrobiální aktivita mastných kyselin a jejich derivátů je známá po mnoho let. Přestože soli mastných kyselin (mýdla) jsou po stovky let využívány k čištění a dezinfekci, výzkum zaměřený na antimikrobiální působení mastných kyselin začal až ve 30. letech 20. století a teprve v 70. letech bylo prokázáno, že antimikrobiální vlastnosti mléčného tuku závisí na aktivitě lipáz, které uvolňují volné mastné kyseliny a jejich monoacylglyceroly [37, 38]. Vliv mastných kyselin a monoacylglycerolů na růst a množení mikroorganismů závisí především na charakteru molekuly těchto látek. Důležitá je zejména délka uhlíkového řetězce a počet a poloha nenasycených vazeb [23, 24]. Obecně lze říci, že MAG mastných kyselin s krátkým či středně dlouhým řetězcem ($> C_{12}$) jsou účinnějšími antibakteriálními látkami než MAG mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Nižší účinek je zde pravděpodobně spojen se vzrůstající hydrofobicitou a nižší rozpustností [25]. Účinek MAG na bakterie je také ovlivněn typem buněčné stěny, tedy rozdílností stavby a složení buněčné stěny u grampozitivních a gramnegativních bakterií, přičemž gramnegativní bakterie jsou vůči působení MAG odolnější [23, 39].

Vlivem mastných kyselin a jejich MAG na gramnegativní bakterie se zabývali například Altieri a kol. [22]. Studovali účinnost kyseliny laurové, palmitové a myristové a jejich MAG proti *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella sp.* a *Yersinia enterocolitica*. Kyseliny myristová a palmitová a jejich monoacylglyceroly vykazovaly slibnou inhibiční aktivitu vůči *E. coli* po dobu 10-24 hod. Po dobu 96-ti hodin způsobil monolaurin v koncentraci 50 µg/ml inhibici (redukci) růstu *Y. enterocolitica* o více než 90 % oproti kontrole, nižší koncentrace monolaurinu 40 µg/ml a samotná kyselina laurová v koncentraci 30-50 µg/ml redukovaly růst *Y. enterocolitica* o více než 65 % ve srovnání s kontrolním vzorkem. Účinek kyseliny laurové a její MAG proti *Salmonella sp.* byl mírný (inhibice cca 30%) [22].

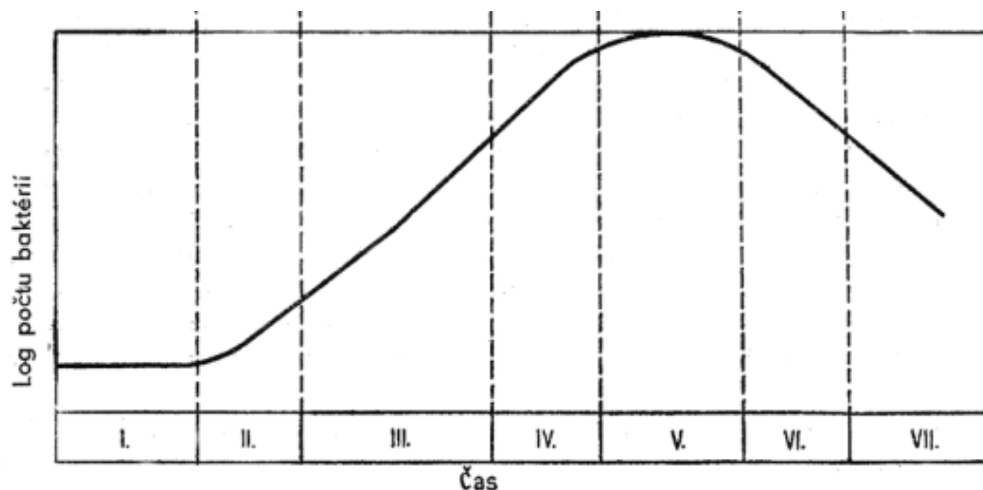
Gramnegativní bakterie byly zahrnuty i do studie Buňkové a kol. [23]. Cílem této studie bylo porovnat za stejných podmínek in vitro inhibiční účinky sedmi 1-monoacylglycerolů (MAG), které obsahují mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem na 10 kmenů potravinami přenosných patogenů a bakterií podílejících se na kažení potravin (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica* ser. *Enteritidis* a *Pseudomonas aeruginosa*). Kromě samotných inhibičních účinků na růst bakterií autoři sledovali i vliv MAG na jejich růstové parametry. Růstové křivky získané měřením optické hustoty bakteriálních suspenzí po dobu 24 hodin byly modelována pomocí Gompertzovy rovnice a byly vypočteny hodnoty délky lag-fáze, maximální specifické růstové rychlosti a maximální dosažené hodnoty růstu. Monoacylglyceroly potlačovaly především růst grampozitivních bakterií, což se projevilo prodloužením délky lag-fáze, poklesem specifické růstové rychlosti a snížením hustoty buněčné suspenze. Inhibiční účinek testovaných monoacylglycerolů klesal v pořadí: MAG-C_{12:0}>MAG-C_{11:0}>MAG-C_{10:0}>MAG-C_{14:0}>MAG-C_{11:1}>MAG-C_{8:0}>MAG-C_{16:0}. Z testovaných monoacylglycerolů měly na gramnegativní bakterie výraznější inhibiční účinky pouze MAG C_{8:0}, MAG C_{10:0} a MAG C_{12:0} a to pouze ve vyšších koncentracích 1000 až 1500 µg/ml [23]. Jednou z mála gramnegativních bakterií, která je k působení monoacylglycerolů značně citlivá, je bakterie *Helicobacter pylori*. Tento mikroorganismus napadá žaludeční sliznici a podílí se na vzniku žaludečních vředů. Monoacylglyceroly mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem jsou podle mnohých studií schopny velmi účinně a rychle inaktivovat buňky *H. pylori* [40, 41].

Existuje celá řada studií zaměřených na antibakteriální působení MAG na bakterie s grampozitivním typem buněčné stěny. Příkladem může být studie Růžičky a kol. [42]. Tato studie byla zaměřena na posouzení vlivu dvou typů MAG (monokaprin MAG C_{10:0} a

monolaurin MAG C_{12:0}, připravených reakcí glycidolu s odpovídajícími mastnými kyselinami) na růst významných druhů bakterií, vláknitých hub a kvasinek. Výsledky stanovení minimální inhibiční koncentrace ukázaly, že monokaprin v koncentraci 100 - 250 mg/l je schopen zcela zastavit růst všech testovaných grampozitivních bakterií a kvasinek, a v koncentraci 100 - 400 mg/l zastavuje i růst většiny vláknitých hub [42]. Vysoká účinnost těchto dvou MAG byla zjištěna u mnoha grampozitivních bakterií, například u *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* ale i u sporulujících bakterií rodu *Bacillus* a *Clostridium* [43, 44, 45]. Byla zkoumána antimikrobiální aktivita MAG s lichým počtem uhlíků připravené z undekanová (MAG C_{11:0}) a undecenová (MAG C_{11:1}). Data ukázala, že obě studované látky úspěšně inhibovaly Gram-pozitivní koky (*Staphylococcus aureus*) a sporulující tyčinky (*Bacillus cereus*). Gram-negativní bakterie jsou velmi odolné proti MAG C_{11:0} a ukázaly značnou toleranci vůči MAG C_{11:1}. Minimální inhibiční koncentraci (MIC) v MAG C_{11:1} bylo možné určit pouze u *Escherichia coli* [46].

3 RŮST BAKTERIÍ

Růstem bakteriální buňky rozumíme zvětšování její hmotnosti a objemu a syntézu svých vlastních komponent. Tento individuální vývoj je dán geneticky, ale je i významně ovlivněn podmínkami prostředí a přítomností vhodných živin. Po dosažení jisté velikosti se rostoucí buňka dělí na dvě buňky dceřiné, které opět podstupují individuální růst a vývoj za předpokladu, že pro něj mají vhodné podmínky. Dělení mateřské buňky na dvě buňky dceřiné je základem růstu bakteriální populace, který lze definovat jako zvyšování počtu bakteriálních buněk způsobené jejich množением [31, 29]. Nachází-li se mikrobiální buňka v prostředí s vhodnými fyzikálními a chemickými podmínkami, tak roste. Mikroorganismy mohou v daném prostředí růst a množit se tak dlouho, dokud mají dostatečný zdroj živin, vhodný parciální tlak kyslíku, vhodnou teplotu, odpovídající hodnotu pH a redox potenciálu [31]. Při kultivaci mikroorganismů, rozlišujeme kultivaci v otevřeném systému (kontinuální kultivace) a v systému uzavřeném (statická kultivace). Při kontinuální kultivaci rostou mikroorganismy v prostředí, jehož vlastnosti se nemění, tzn. do systému je přiváděna čerstvá živná půda a staré médium je ze systému odváděno. Při statické kultivaci rostou mikroorganismy v prostředí, jehož vlastnosti a složení se mění v závislosti na životních činnostech bakteriálních buněk. V podmínkách statické kultivace lze růst populace graficky vyjádřit pomocí růstové křivky [29]. Znázorníme-li si graficky vzrůst počtu živých buněk za těchto podmínek tak, že na osu x nanese čas (h) a na osu y logaritmus počtu živých buněk (x) v 1 ml, dostaneme růstovou křivku, která má několik úseků [27, 28]. Na obrázku 7 je znázorněna typická růstová křivka bakterií.



Obr. 7. Růstová křivka mikroorganismů. I – lag-fáze, II – fáze zrychleného růstu, III – exponenciální fáze růstu, IV – fáze zpomaleného růstu, V – stacionární fáze, VI – fáze odumírání.

Hned od prvních studií růstu a množení bakteriální populace, datujících se z počátku tohoto století, bylo zřejmé, že křivka popisující koncentraci bakterií v závislosti na čase má tvar písmene S. Již v roce 1909 v ní byly rozlišeny 4 růstové fáze, které jsou rozlišovány dodnes [30].

- *lag-fáze* (počáteční fáze) – bakterií zatím nepřibývá
- *exponenciální fáze* – fáze intenzivního a pravidelného růstu
- *stacionární fáze* – růst a množení ustalo a bakterií nepřibývá
- *fáze odumírání* – bakterie hynou a jejich koncentrace v čase klesá

Přechod z jedné fáze do druhé se neděje skokem a v zanedbatelně krátké době, nýbrž naopak, trvá jistou dobu, a proto mezi jednotlivými 4 fázemi jsou fáze přechodné [30].

3.1 Lag-fáze

Lag-fáze se někdy také označuje jako přípravná fáze nebo fáze zdržení. Je to období, následující zpravidla po přenosu MO do nového prostředí [31]. V této fázi se buňky ještě nemnoží nebo se množí jen velmi pomalu. Délka lag-fáze závisí na tom, do jaké míry jsou bakterie enzymaticky připraveny na růst v novém prostředí na druhu MO, fyziologickém stavu buněk, velikosti inokula [29, 31]. Příčinou existence lag-fáze je nutnost adaptace buněk na nové prostředí, a to zejména v případě, že nové prostředí vyžaduje syntézu nových enzymů. Aby se mohly buňky v novém prostředí intenzivně množit, často vyžadují

nahromadění dostatečného množství některých metabolitů. Lag-fáze je v tomto případě zapříčiněna nutností úpravy nového prostředí vlastní metabolickou činností buněk [48]. Délka lag-fáze může být zanedbatelná, popřípadě může tato fáze zcela chybět, k tomu dochází například při přenosu rostoucí kultury do bohatého médiastejného složení. K prodloužení lag-fázedochází, pokud jsou buňky vystaveny působení fyzikálních nebo chemických faktorů, které mají na buňky nepříznivý vliv [49]. Příkladem může být prodloužení lag-fáze po přidavku monoacylglycerolů do média [23].

3.2 Exponenciální fáze

Exponenciální fáze (logaritmická fáze) je charakteristická intenzivním množením buněk, jejichž počet narůstá geometrickou řadou s kvocientem 2 [31]. Z jedné bakterie vznikají 2, ze 2 pak 4, ze 4 buněk 8 [30]. Rychlost dělení je v celé této fázi konstantní. Buňky jsou novému prostředí plně přizpůsobeny [29]. V exponenciální fázi buňky podstupují dělení a jejich generační doba, tedy dobu od vzniku buňky do jejího rozdělení, závisí jednak na druhu mikroorganismu, ale i na podmínkách prostředí [50]. V exponenciální fázi mají tedy buňky velkou intenzitu metabolismu a vysokou rychlost dělení, tato značná fyziologická aktivita buněk je ale provázena jejich zvýšenou citlivostí k nepříznivým faktorům prostředí [51].

3.3 Stacionární fáze

Ve stacionární fázi dochází k vyrovnání počtu odumírajících buněk a jejich přírůstku. Rychlost dělení buněk je tedy nulová, množství buněk je konstantní a nabývá ve stacionární fázi maxima. Maximální délka této fáze je dána citlivostí buněk k hladovění. Pokud je přechod do stacionární fáze způsoben vyčerpáním jedné limitující živiny, je to přechod náhlý. Je-li přechod pozvolný, pak to většinou znamená, že příčiny přechodu do stacionární fáze jsou komplexnější, nejčastěji se jedná o vysokou koncentraci zplodin metabolismu nebo nedostatek kyslíku. Ve stacionární fázi není populace buněk v ustáleném stavu, populace je heterogenní – obsahuje buňky odumírající a autolyzující, buňky rostoucí a buňky klidové [31].

3.4 Fáze odumírání

Fáze odumírání je charakterizována tím, že živých bakterií ubývá (za mrtvou bakterií považujeme tu bakterií, která není schopna dát potomstvo) [30]. Rychlost dělení klesá pod

nulovou hodnotu. Tento stav je podmíněn nadále se zhoršujícími podmínkami prostředí [31].

4 GRAMPOZITIVNÍ BAKTERIE

Grampozitivní (G^+) bakterie představují rozsáhlou skupinu bakterií s nespočetnými druhy nacházejícími se v nejrůznějších životních prostředích. Druhy významné z hlediska potravinářské technologie a hygieny lze rozdělit do několika skupin:

- G^+ koky
- G^+ tyčinky a koky tvořící endospory
- pravidelné nesporulující G^+ tyčinky
- nepravidelné nesporulující G^+ tyčinky
- mykobakterie [32]

V dalším textu jsou blíže popsány pouze ty druhy bakterií, které byly vybrány pro testování antibakteriálních účinků emulzí obsahujících monoacylglyceroly.

4.1 Grampozitivní koky

Společnou charakteristikou bakterií této skupiny jsou morfologické (koky) a fyziologické vlastnosti (mezofilie a organofilie). Za základní znaky používané k rozlišení jednotlivých rodů slouží např. uspořádání buněk, vztah ke kyslíku a produkce některých enzymů (katalázy, oxidázy...) [33].

4.1.1 *Staphylococcus aureus*

Stafylokoky jsou grampozitivní koky o průměru přibližně 1 μm . Uspořádány mohou být jednotlivě, v párech, v tetradách, v krátkých řetězcích a především v nepravidelných shlucích tvaru hroznu. Jsou nepohyblivé, fakultativně anaerobní, se schopností růstu i v prostředí s 10% koncentrací NaCl [52]. Kolonie jsou obvykle neprůhledné a mohou být bílé nebo krémové, občas žluté až žlutooranžové barvy. Optimální růstová teplota je 30 až 37 °C a výskyt stafylokoků je primárně vázán na teplotokrevné obratlovce [53]. *Staphylococcus aureus* je saprofyt a epifyt kůže a sliznic, který jako potenciální patogen vyvolává hnisavá onemocnění kůže, sliznic a orgánů savců a ptáků. Ekonomicky nejzávažnějším onemocněním zvířat jsou záněty mléčné žlázy skotu [33]. Některé kmeny *S. aureus* mají schopnost produkce enterotoxinů. Dostanou-li se tyto toxinogenní kmeny do potravin, produkuje toxiny bílkovinné povahy, které mohou způsobit lehké i vážné otravy. Nebezpečí otrav hrozí především u těch potravin, jež se dále tepelně neopracovávají (majonézy, saláty, zmrzliny...), ale i tepelně ošetřené potraviny mohou být příčinou stafylokokové intoxi-

kace díky tomu, že tyto enterotoxiny jsou značně termostabilní [54]. Do potravin se *S. aureus* může dostat z hnisajících ložisek na ruku lidí připravujících příslušné potraviny. Příznaky otravy se projevují 1 až 6 hodin po požití potraviny a vyznačují se žaludeční nevolností až křečemi, zvracením, průjmami, bolestí hlavy a někdy pocením a poklesem tělesné teploty. Příznaky trvají 1 až 2 dny, onemocnění obvykle samo odezní a nevyžaduje léčení. Minimální dávka stafylokokových enterotoxinů potřebná pro vznik onemocnění se odhaduje na 1 – 100 mg a k vyprodukování tohoto množství toxinu dochází tehdy, je-li koncentrace buněk *S. aureus* v potravine řádově 10^5 až 10^7 / g [27, 28, 55]. K léčbě stafylokokových infekcí se užívají betalaktamová nebo makrolidová antibiotika (erytromycin) [33].

4.1.2 *Enterococcus faecalis*

Mikroskopicky se jedná o grampozitivní sférické až ovoidní koky uspořádané ve dvojicích, drobných shlucích nebo krátkých řetězcích. Enterokoky jsou fakultativně anaerobní, schopné růst při 10 °C i při 45 °C, rostou také v přítomnosti 6,5% NaCl nebo 40% žluče v médiu a při pH 9,6. původně byly enterokoky řazeny do rodu *Streptococcus* [27, 28, 53]. *Enterococcus faecalis* má optimální teplotu růstu 37 °C. Na polotuhých živných půdách tvoří hladké smetanové až bílé kolonie, na médiu podle Slanetz-Bartleyové má kolonie o průměru 1 až 2 mm, většinou okrouhlého tvaru, hladké, lesklé, hnědočerveně až růžově zabarvené [47]. *Enterococcus faecalis* (*faecalis*, lat. = mající vztah k výkalům) se běžně vyskytuje ve výkalech teplokrevných živočichů a člověka [32]. Enterokoky byly navrženy také jako indikátory fekálního znečištění, avšak vyskytují se i na rostlinách, které nepřišly s fekáliemi do styku, jsou méně specifické než *Escherichia coli*. Jsou odolnější k nepříznivým podmínkám (např. k uzení) než ostatní střevní bakterie, a proto se někdy nacházejí v uzeném mase a uzeninách [27, 28]. Z hlediska klinické mikrobiologie patří *E. faecalis* mezi závažné oportunní patogeny. Často je původcem nozokomiálních infekcí, zejména infekcí močových cest, ale bývá spojován i s infekcemi ran a endokarditidou [52].

4.1.3 *Micrococcus luteus*

Rod *Micrococcus* zahrnuje grampozitivní koky sférického tvaru, vyskytující se po dvou, ve čtveřicích nebo v nepravidelných shlucích, ale ne v řetězcích. Mikrokoky jsou nepohyblivé, striktně aerobní, častá je produkce karotenoidních pigmentů. Optimální růstová teplota se pohybuje v rozmezí 25 až 37 °C [53]. *Micrococcus luteus* je saprofytem a epifytem kůže savců včetně člověka. Dále se nachází v prostředí (půda, voda, vzduch) a v potravinách, obecně je považován za nepatogenní. Na agarových půdách roste ve vypouklých koloniích

žluté, žlutozelené nebo oranžové barvy. Na krevním agaru podobně jako ostatní druhy nevyvolává hemolýzu [33].

4.2 Grampozitivní tyčinky tvořící endospory

Sporulace se považuje za speciální případ buněčného cyklu bakterií, při kterém vznikají uvnitř buněk endospory vysoce odolné proti účinkům fyzikálních a chemických vlivů. Klidový stav endospor umožňuje dlouhodobé přežívání v přírodě, což má zásadní význam pro ekologii sporulujících bakterií [33]. Ke sporulaci dochází na konci exponenciální fáze, respektive na počátku stacionární fáze růstu, tedy v okamžiku, kdy dojde k úbytku zdrojů uhlíku a dusíku v prostředí a hustota populace dosahuje kritických hodnot. Proces tvorby endospor je zahájen replikací bakteriálního chromozomu a asymetrickým dělením, při kterém menší dceřiná buňka (prespora) je základem budoucí endospory a větší buňka se podílí na tvorbě obalů endospory. Díky nízkému obsahu vody jsou endospory značně odolné k účinkům tepla, kromě toho však spory vykazují rezistenci k vysychání, chemickým látkám nebo záření. Pokud se endospora dostane do prostředí s vhodnými podmínkami, ochranné obaly se rozrušují a začíná proces klíčení spory a její přestavby na vegetativní buňku [50]. Uplatnění sporulujících bakterií je mnohostranné. Mohou mít význam jako:

- technologicky škodlivé MO
- indikátory úrovně hygieny a dodržení některých technologických postupů
- původci rozkladných procesů v potravinách, jejichž produkty mohou ohrozit zdraví spotřebitelů
- patogenní a podmíněně patogenní MO
- technologicky prospěšné organismy.

Sporulující bakterie jsou většinou mezofilní a dobře rostou při běžných teplotách v potravinářských surovinách a výrobcích. Vyznačují se schopností rozkládat velké množství organických sloučenin. Často zkvašují cukry (máselné kvašení) hydrolyzují škrob, rozkládají bílkoviny i tuky [32].

4.2.1 *Bacillus cereus*

Zástupci rodu *Bacillus* jsou grampozitivní mikroorganismy tvaru rovných tyček různé délky se zakulacenými nebo čtvercovými konci, často uspořádaných ve dvojicích nebo v řetězcích. Tyto bakterie jsou pohyblivé díky peritrichálním bičíkům, aerobní nebo fakultativně anaerobní s optimální růstovou teplotou od 15 do 55°C [53]. Důležitým znakem

tohoto rodu je schopnost tvořit jednu endosporu. Sporulace probíhá pouze za přítomnosti kyslíku, protože pro sporulaci buňka získává energii především oxidací zásobních látek z cytoplazmy [52]. Druhová diferenciací je obtížná a pro rozlišení více než 60 zástupců rodu *Bacillus* se využívá charakteristika endospor. Tvar endospor stejně jako tvar mateřské buňky je charakteristickým znakem jednotlivých druhů bacilů a na základě těchto charakteristik je možné rozdělit zástupce rodu do tří morfologických skupin. *Bacillus cereus* náleží do I. morfologické skupiny, jejíž zástupci mají endospory oválného tvaru a endospora neztlušťuje mateřskou buňku [53]. *B. cereus* je kultivačně nenáročná bakterie s optimální teplotou růstu 28 až 35 °C. Na běžných půdách tvoří velké plstnaté kolonie s nepravidelnými okraji, na krevním agaru se zónou hemolýzy [52]. *B. cereus* je běžný saprofyt hojně rozšířený v prostředí, převážně v půdě, vodě a na rostlinách a často kontaminuje potraviny [55]. Při růstu na polysacharidových substrátech produkuje *Bacillus cereus* toxiny, které mohou být příčinou otrav. K otravám dochází při pomnožení této bakterie v potravine na koncentraci buněk 10^7 / g potraviny. Nejčastější příčinou těchto otrav jsou potraviny obsahující obiloviny nebo škrob (polévky, vařená rýže, pudinky, bramborová kaše, játrová paštika). Otrava se projevuje za 12 až 13 hodin po požití potraviny a k jejím příznakům patří nevolnost, břišní křeče, průjem nebo zvracení [27, 28].

4.2.2 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis je grampozitivní bakterie s buňkami tvaru tyček, oválnými endosporami, které nezduřují mateřskou buňku. Podobně jako *B. cereus* tedy patří do I. morfologické skupiny. Optimální kultivační teplota se pohybuje okolo 30 °C. Vyskytuje se hojně v prostředí, zejména v půdě a vodě [35]. Jako potenciální patogen vyvolává sporadické mastitidy skotu. Na krevním agaru rostou kolonie v S-fázi, na vlhkém agaru se aktivně šíří. Velmi snadno sporuluje [33]. Spory jsou velmi odolné k působení tepla a přečkávají až tříhodinový var. *B. subtilis* často kontaminuje potraviny, způsobuje sladké srážení sterilizovaného a pasterovaného mléka [32].

5 GRAMNEGATIVNÍ BAKTERIE

Gramnegativní (G⁻) bakterie se nacházejí všude v přírodě a běžně se vyskytují v potravinářských surovinách a výrobcích. Jen velmi málo druhů je možno považovat z praktického hlediska za užitečné. Průmyslové využití má rod *Acetobacter* pro výrobu octa. Bakterie *Escherichia coli* je modelovým organismem pro vědecký výzkum. Slouží též jako objekt genového inženýrství. Druhy významné z hlediska potravinářské technologie a hygieny lze rozdělit do dvou skupin (dříve 4. a 5. sekce oddělení Gracilicutes):

- G⁻ aerobní tyčinky a koky
- G⁻ fakultativně anaerobní tyčinky [32].

5.1 Gramnegativní aerobní tyčinky a koky

Jsou chemoheterotrofní. Některé se však vyznačují autotrofií a využívají H₂ jako donoru elektronů. Rostou za obligátně aerobních podmínek. Kyslík O₂ je konečným akceptorem elektronů. Jen některé z nich se vyznačují schopností anaerobní respirace. Vyskytují se v půdě, ve sladkovodním prostředí, ale i v moři, na kořenech rostlin, ve střevech, v ústní dutině člověka i zvířat [29].

5.1.1 *Pseudomonas fluorescens*

Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou gramnegativní rovné nebo mírně zakřivené tyčky, většinou pohyblivé díky polárním bičíkům, pouze velmi zřídka jsou nepohyblivé. Pseudomonády jsou aerobní se striktně respiratorním typem metabolismu, kdy kyslík je konečným akceptorem elektronů, výjimečně může být alternativním akceptorem elektronů nitrát, což umožňuje anaerobní růst. Většina druhů nevyžaduje žádné růstové faktory a jsou široce rozšířené v prostředí, kde se mohou nacházet ve formě biofilmu i planktonicky, v přírodních i odpadových vodách, v půdě, u volně žijících i domácích zvířat, v potravinách zejména v mase [53, 26]. Pseudomonády jsou relativně rezistentní k fyzikálním a chemickým vlivům. Mohou se množit i při nízké teplotě a minimálním obsahu živin pokud rostou v prostředí s dostatečnou vlhkostí. Díky své značné rezistenci odolávají i účinkům některých dekontaminačních a dezinfekčních činidel, díky čemuž může být eliminace pseudomonád z prostředí velmi obtížná [47]. *P. fluorescens* se vyskytuje v půdě, vodě i potravinách, bývá izolována i z humánního klinického materiálu. Některé kmeny jsou patogenní pro rostliny. Typická je tvorba pigmentu fluoresceinu [53].

5.2 Gramnegativní tyčinky fakultativně anaerobní

Jsou chemoheterotrofní. Některé však mohou růst i autotrofně, přičemž využívají H_2 jako donoru elektronů. Vyznačují se aerobní respirací a za anaerobních podmínek fermentací. Vyskytují se volně nebo v asociaci se zvířetem, člověkem nebo rostlinou. Některé jsou patogenní. Buňky jsou tvaru přímých tyček s výjimkou rodu *Vibrio*, jehož druhy se vyznačují vibriodním tvarem. Mezi nejvýznamnější druhy z této skupiny patří především zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*. Řada těchto druhů má celosvětový výskyt a způsobuje u člověka průjmová onemocnění, mnohé druhy jsou oportunními patogeny [29].

5.2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli je druhem náležícím do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o rovné tyčky vyskytující se jednotlivě a ve dvojicích, některé kmeny z klinického materiálu tvoří pouzdra. Buňky jsou pohyblivé pomocí peritrichálních bičičků, fakultativně anaerobní, mající jak respiratorní, tak i fermentatorní typ metabolismu [53]. Kultivace je možná na široké škále půd, přičemž za ideálních podmínek dosahuje generační doba *E. coli* 20 minut. Na Endově půdě roste v purpurově zbarvených koloniích. Biochemicky je to průměrně aktivní enterobakterie, zkvašuje cukry (glukózu, laktózu, některé pentózy a alkoholické cukry) za intenzivní tvorby kyselin a plynu [52, 27, 28]. *Escherichia coli* se nachází ve spodní části střevního traktu člověka a teplo krevních zvířat, a vyskytuje se tedy i ve výkalech. Přítomnost této bakterie ve vodách nebo v potravinách je proto ukazatelem, že zde došlo k znečištění fekáliemi [27, 28]. Nesmí se vyskytovat v pitné vodě a v dětské výživě. V ostatních potravinách je její obsah limitován. Slouží též jako indikátor fekálního znečištění a úrovně sanitace a hygieny [32]. *Escherichia coli* je nejprozkoumanější mikrobiálním druhem, neboť slouží jako modelový organizmus pro biochemické, genetické i fyziologické studie [27, 28]. Přestože je *E. coli* běžnou součástí střevní mikroflóry, je také i významným oportunním patogenem, který může vyvolávat chorobné stavy. Ve střevě je to možné tehdy, když je kmen vybaven specifickými faktory virulence, mimo střevo je tato bakterie téměř vždy patogenní [52]. Na základě faktorů virulence a působení ve střevě, lze virulentní kmeny *E. coli* rozdělit do několika skupin: enterohemoragické kmeny (EHEC), enteroinvazivní (EIEC), enteropatogenní (EPEC), enterotoxigenní (ETEC) a enteroagregativní (EAggEC). Enteropatogenní kmeny jsou původci novorozeneckých průjmů, ETEC kmeny vyvolávají průjmová onemocnění prostřednictvím toxinů, invazivní kmeny EIEC způsobují krvavé průjmy, EaggEC kmeny jsou častou příčinou tzv. cestovatelských průjmů. Nejzávažnější

jsou infekce enterohemoragickými kmeny (EHEC), které vyvolávají krvácení ve střevě a častá je i systemizace infekce. Nejběžnějším EHEC kmenem je *E. coli* O157:H7 [52, 54].

5.2.2 *Salmonella enterica*

Bakterie rodu *Salmonella* jsou gramnegativní rovné tyčky, většinou pohyblivé s peritrichálními bičíky. Jsou fakultativně anaerobní a chemoorganotrofní, mají jak respirační, tak i fermentační typ metabolismu. Optimální teplota pro růst salmonel je 37 °C [53]. Všechny salmonely běžně významné pro člověka patří z hlediska taxonomie do druhu *Salmonella enterica* a většinou i do poddruhu *S. enterica* ssp. *enterica*. Vnitrodruhová diferenciace je založena dělení do sérovarů podle somatických, kapsulárních a bičíkových antigenů. V humánní klinické mikrobiologii se odlišují sérovary primárně patogenní pro člověka (sérovar Typhi a Paratyphi) a sérovary zoopatogenní, které u člověka vyvolávají průjemová onemocnění známá pod pojmem salmonelóza. Ve většině evropských zemí je původcem gastroenteritid nejčastěji sérovar Enteritidis [52, 53]. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sv. Enteritidis je původcem náhle vznikajících infekcí, probíhajících rychle s příznaky gastroenteritidy, zvracením, průjmem s mírně zvýšenou teplotou nebo horečkou. Salmonely nejsou přítomny v krvi, jsou ve stolici. Infekce je alimentární, zdrojem jsou zvířata, maso, drůbež, vejce, kontaminované potraviny, lidé [26]. U malých dětí, starších osob nebo oslabených jedinců hrozí i salmonelová sepe [53].

5.2.3 *Citrobacter freundii*

Bakterie rodu *Citrobacter* jsou řazeny do čeledi *Enterobacteriaceae*. Podobně jako u výše uvedených rodů této čeledi se jedná o pohyblivé rovné tyčky, schopné využívat respiraci i fermentaci, s optimální růstovou teplotou 37 °C [53]. *Citrobacter freundii* se nachází ve střevech obratlovců včetně plazů a obojživelníků. Roste i na běžných půdách, při kultivaci na krevním agaru nedochází k hemolýze [33]. Tyto mikroorganismy bývají často izolovány z klinického materiálu jako oportunní patogeny, jejich přítomnost je běžná i v půdě, vodě, potravinách či odpadních vodách [53]. U telat, selat a drůbeže může *Citrobacter freundii* vyvolat gastrointestinální poruchy. Byl izolován také z případů akutní mastitidy u skotu a prasnic. Kmeny jsou citlivé na chloramfenikol a většinou i na streptomycin a tetracyklin [33].

5.2.4 *Serratia marcescens*

Dalším zástupcem čeledi *Enterobacteriaceae* je gramnegativní rovná tyčka rodu *Serratia*. Tyto bakterie jsou pohyblivé, fakultativně anerobní a chemoorganotrofní s optimální teplotou růstu v rozmezí 30 až 37 °C [53]. Od ostatních rodů čeledi se *Serratia marcescens* liší produkcí červeného nerozpustného pigmentu, který zbarvuje kolonie a odlišuje se také biochemicky [26]. Serácie se vyskytují v humánním klinickém materiálu, vodě, půdě i na povrchu rostlin, kromě toho je můžeme nalézt i ve střevním traktu hlodavců nebo hmyzu. *S. marcescens* je význačným oportunním patogenem především pro hospitalizované pacienty. Nejčastější jsou infekce dýchacího traktu zejména při asistovaném dýchání, septikémie a infekce močových cest [26, 53].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 POUŽITÉ MATERIÁLY A PŘÍSTROJE

6.1 Materiály a chemikálie

Monoacylglyceroly

Monoacylglyceroly (MAG) byly vyrobeny adicí příslušné mastné kyseliny na glycidol za katalytického působení chromitých iontů (chromium III acetát hydroxid, $[\text{Cr}_3(\text{CH}_3\text{COO})_7](\text{OH})_2$) dle postupu publikovaného Janišem a kol. [61]. Výroba proběhla v laboratořích Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky Fakulty technologické a deklarovaná čistota připravených MAG byla p.a. [61].

Pro práci byly vybrány následující MAG:

- monoacylglycerol kyseliny kaprinové (MAG C_{10:0})
- monoacylglycerol kyseliny undekanové (MAG C_{11:0})
- monoacylglycerol kyseliny undecenové (MAG C_{11:1})
- monoacylglycerol kyseliny laurové (MAG C_{12:0})

Alkohol

- butanol (terc – butylalkohol, C₄H₁₀O), Ing. Petr Lukeš (Uherský Brod)

Surfaktant

Tween 80 (Polyethylene glycerol sorbitanmonooleate), Sigma-Aldrich (Francie)

6.2 Použité mikroorganismy a kultivační média

Kmeny použité v experimentální části bakalářské práce byly získány z České sbírky mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms, www.sci.muni.cz/ccm/). Kultury byly uchovávány na Petriho miskách při teplotě 4 ± 2 °C a přeočkovány každé 3 až 4 týdny. Pro stanovení antimikrobní aktivity připravených emulzí byly zvoleny následující kmeny mikroorganismů:

G⁺ mikroorganismy:

- *Bacillus cereus* CCM 2010
- *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* CCM 2216
- *Micrococcus luteus* CCM 732

- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953
- *Enterococcus faecalis* CCM 4224

G⁻ mikroorganismy:

- *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798
- *Citrobacter freundii* CCM 7187
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *Enteritidis* CCM 4420
- *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303
- *Escherichia coli* CCM 3954

Pro stanovení inhibičních účinků monoacylglycerolů bylo připraveno inokulum bakteriálních buněk v masopeptonovém bujónu (MPB) o následujícím složení:

Beefextract (Hi-Media)	4,0 g
Pepton (Hi-Media)	4,0 g
NaCl (Lach-Ner)	2,0 g
destilovaná voda	400 ml

Konečné pH (při 25°C) bylo upraveno na hodnotu $7,0 \pm 0,2$.

Médium bylo po rozplnění do zkumavek sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut.

6.3 Přístroje

- Vortex Heidolph REAX top (Německo)
- Digitální váhy OHAUS (Švýcarsko)
- Biohazard box EUROFLOW, Clean Air (Holandsko)
- Biologický termostat Memmert INE 600
- Microplate reader Benchmark, Bio-Rad (USA)
- Software Microplate Manager, Bio-Rad (USA)
- Mikropipety (100 – 1000 µl, 20 – 200 µl, 0,5 – 10 µl)
- Laboratorní sklo (pipety, kádinky, zkumavky)
- Sterilní špičky na mikropipety
- Plastové zkumavky
- Mikrotitrační destičky
- Stříkačkové filtry o velikosti pórů 0,22 µm (Millipore, Velká Británie)

- Injekční stříkačka 10 ml
- Očkovací klíčky

7 METODIKA

7.1 Příprava mikroemulzí

Mikroemulze se vyrábí mícháním jednotlivých složek za přítomnosti surfaktantů. Pro experimentální část bakalářské práce byly připraveny mikroemulze typu olej ve vodě (o/v). Jako surfaktant byl použit Tween 80 o hodnotě HLB = 15, který je pro tvorbu emulzí typu olej ve vodě vhodný. Kosurfaktantem byl butanol (terc-butylalkohol, $C_4H_{10}O$). Mikroemulze byly připravovány z různých typů monoacylglycerolů, které jsou uvedeny v kapitole 6.1. Olejová fáze mikroemulze byla tvořena monoacylglycerolem rozpuštěným v alkoholu. Na vahách byl navážen 1 g MAG a toto množství bylo rozpuštěno v 5 ml butanolu, čímž byl získán roztok o koncentraci 0,2 g/ml. Pro lepší rozpustnost byly některé roztoky MAG zahřívány na vodní lázni a následně ochlazeny na laboratorní teplotu. Poté bylo rozpuštěno 2,25 g surfaktantu (Tween 80) ve 20 ml destilované vody a vše bylo důkladně rozmícháno na Vortexu. K 20 ml vodné fáze obsahující surfaktant bylo pipetováno 250 μ l roztoku MAG v butanolu a vše bylo protřepáno za vzniku homogenní mikroemulze. Mikroemulze byly připravovány do plastových zkumavek o objemu 25 ml, které byly předem sterilizovány UV zářením. Sterilita samotných mikroemulzí byla zajištěna filtrací přes stříkačkový filtr s velikostí pórů 0,22 μ m. Pro testování antibakteriálních vlastností mikroemulzí obsahujících monoacylglyceroly byl připraven i slepý pokus, tedy emulze která neobsahovala monoacylglyceroly.

7.2 Příprava suspenze bakterií

Pro testování antibakteriálních účinků mikroemulzí byly použity 24 - hodinové kultury mikroorganismů. Suspenze buněk příslušných grampozitivních a gramnegativních bakterií byly připraveny zaočkováním 5 ml sterilního živného média (MPB). Zkumavky byly kultivovány v termostatu při 30 °C po dobu 24 hodin.

7.3 Sledování účinků mikroemulzí s monoacylglyceroly na růst mikroorganismů

Pro sledování vlivu mikroemulzí na růst bakterií byla zvolena mikrodiluční metoda využívající kultivaci mikroorganismů v jamkách mikrotitrační destičky. Bakteriální růst byl sledován pomocí měření zákalu suspenze při vlnové délce 655 nm s využitím přístroje Microplate reader Benchmark (Bio-Rad).

V první fázi experimentu byly emulze ředěny dvojkovou řadou kultivačním médiem a jednotlivá ředění byla pipetována do jamek mikrotitrační destičky v objemu 200 μ l. Jamky byly následně zaočkovány 5 - ti μ l suspenze mikroorganismů a mikrotitrační destička byla inkubována v Microplate readeru po dobu 24 hodin. Každých 30 minut byla měřena hodnota optické denzity při 655 nm. Ze získaných dat byly sestaveny růstové křivky a bylo určeno rozmezí koncentrací emulzí, které ovlivňuje růst mikroorganismů. Na základě této fáze experimentu bylo navrženo 7 ředění emulzí v kultivačním médiu o koncentraci monoacylglycerolů 100 – 1500 μ g/ml. Jednotlivá ředění a pipetované objemy emulze a živného média jsou uvedeny v tabulkách 3. a 4.

Tab. 3. Koncentrace MAG v jednotlivých ředěních mikroemulze.

ředění	koncentrace MAG [μ g/ml]
1.	1500
2.	1250
3.	1000
4.	750
5.	500
6.	250
7.	100

Tab. 4. Objem mikroemulze a MPB v jednotlivých ředěních.

ředění	mikroemulze [ml]	MPB [ml]
1.	2,4	1,6
2.	2	2
3.	1,6	2,4
4.	1,2	2,8
5.	0,8	3,2
6.	0,4	3,6
7.	0,16	3,84

Ředění připravená podle výše uvedeného schématu byla pipetována v objemu 200 μ l do jamek mikrotitrační destičky a zaočkována 5 - ti μ l suspenze testovaných mikroorganismů. Zaočkování mikrotitrační destičky bylo provedeno za aseptických podmínek v Biohazard boxu. Součástí mikrotitrační destičky byla i pozitivní a negativní kontrola. Jako pozitivní kontrola sloužilo samotné kultivační médium, tedy MPB bez přídavku mikroemulze, zaočkované příslušným mikroorganizmem. Nezaočkované jamky obsahující kultivační médium s příslušným přídavkem mikroemulze sloužily jako negativní kontrola. Mikrotitrační destičky byly inkubovány při laboratorní teplotě v přístroji Microplate reader Benchmark po dobu 24 hodin, přičemž každých 30 minut byla měřena hodnota optické denzity při vlnové délce 655 nm. Před každým měřením byly vzorky protřepávány po dobu 10 sekund a pro každou koncentraci emulze a každý mikroorganismus byl růst sledován minimálně ve dvou jamkách mikrotitrační destičky.

K zaznamenání dat byl použit software Microplate Manager a z průměrů naměřených hodnot od kterých byla odečtena průměrná hodnota zákalu, negativní kontroly byly sestrojeny pomocí růstové křivky. Vliv přídavku mikroemulzí na růst jednotlivých mikroorganismů byl hodnocen pomocí výpočtu indexu růstu po určité době kultivace. Index růstu byl vypočítán podle následujícího vztahu:

$$IR(\%) = \frac{(OD_{655} - OD_{NK})}{OD_{PK}} \cdot 100$$

Kde:

IR.....index růstu

OD₆₅₅.....hodnota zákalu suspenze testované kultury v médiu s příslušnou koncentrací mikroemulze

OD_{NK}.....hodnota zákalu negativní kontroly pro příslušnou koncentraci mikroemulze

OD_{PK}.....hodnota zákalu pozitivní kontroly

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

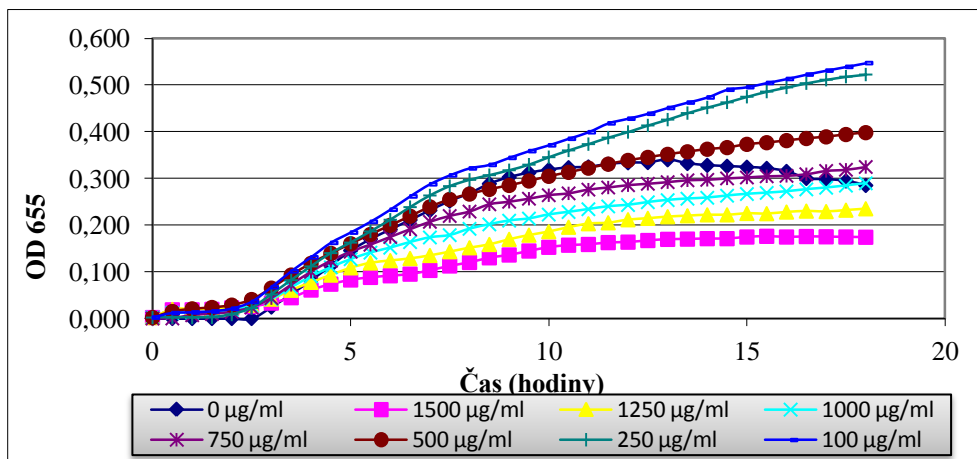
8.1 Vliv monoacylglycerolů v mikroemulzi na růst G^+ a G^- bakterií

Pro studium vlivu monoacylglycerolů v mikroemulzi na růst bakterií byly vybrány monoacylglyceroly lišící se typem navázané kyseliny. Testovány byly MAG nasycených mastných kyselin se sudým počtem uhlíků (MAG kyseliny kaprinové - MAG $C_{10:0}$, MAG kyseliny laurové - MAG $C_{12:0}$), nasycených mastných kyselin s lichým počtem uhlíků (MAG kyseliny undekanové - MAG $C_{11:0}$), nenasyčených mastných kyselin (MAG kyseliny undecenové - MAG $C_{11:1}$). Tyto jednotlivé MAG byly rozpuštěny v alkoholu (butanolu) a následně bylo určité množství tohoto roztoku přidáno k surfaktantu (Tween 80) a vodě, poté byla vytvořena mikroemulze. Mikroemulze byly následně ředěny masopeptonovým bujónem, tak aby koncentrace MAG v jednotlivých ředěních byly 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 a 1500 $\mu\text{g/ml}$. MAG byly testovány na grampozitivních bakteriích (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*) a gramnegativních bakteriích (*Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*). Pomocí spektrofotometru Microplate reader Benchmark byl zaznamenáván růst bakterií po dobu 24 hodin při vlnové délce 655 nm. Z těchto údajů byly sestrojeny růstové křivky. Antimikrobní účinky jednotlivých MAG v mikroemulzi byly vyjádřeny jako index růstu v čase 12 hodin a znázorněny graficky.

8.1.1 Vliv mikroemulze bez přídavku MAG na růst grampozitivních bakterií

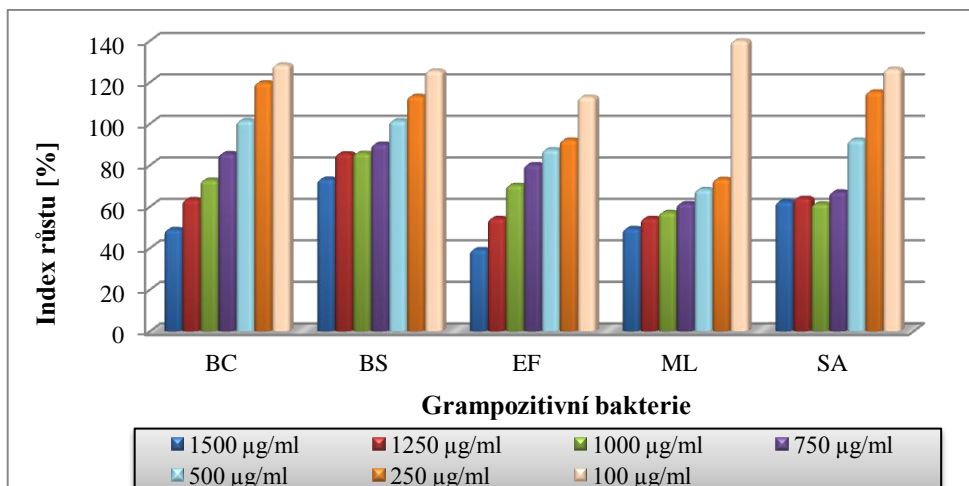
Vzhledem k tomu, že jednotlivé složky mikroemulze mohou ovlivňovat růst mikroorganismů, byla připravena mikroemulze bez přídavku monoacylglycerolu. Postup přípravy mikroemulze a obsah jednotlivých složek zůstal stejný jako u mikroemulzí, do kterých byl jako kosurfaktant přidán monoacylglycerol. I při testování antibakteriálních vlastností této emulze bylo postupováno stejně jako v případě mikroemulzí s MAG. Cílem tohoto slepého pokusu bylo zjistit, zda přídavek MAG do kompozice mikroemulze mění její schopnost ovlivňovat růst mikroorganismů. Příkladem grampozitivní bakterie rostoucí v přítomnosti mikroemulze bez přídavku MAG je *Bacillus cereus*. Jak je patrné z obr. 8 nejvyšší testované koncentrace mikroemulze (1000 - 1500 $\mu\text{g/ml}$) působí na tuto grampozitivní bakterii inhibičně. Při nejvyšších testovaných koncentracích 100 a 250 $\mu\text{g/ml}$ byla pozorována i zvýšená hodnota indexu růstu ve srovnání s kontrolní kulturou rostoucí v samotném kultivač-

ním médiu. Z toho vyplývá, že i složky mikroemulze, tedy Tween a butanol ovlivňují růst bakterií.



Obr. 8. Vliv mikroemulze bez přídavku MAG na růst *Bacillus cereus*.

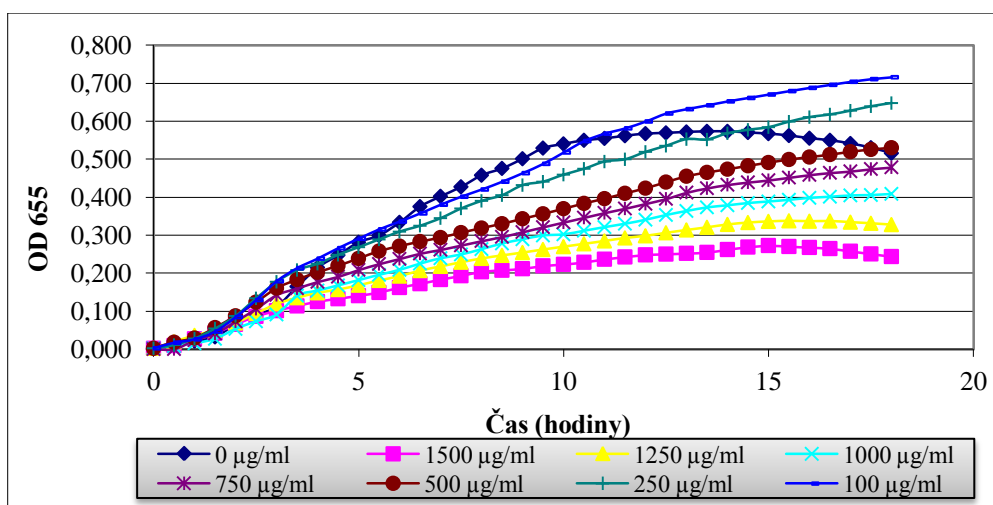
Antimikrobní účinky mikroemulze bez přídavku MAG na všechny grampozitivní bakterie jsou zaznamenány jako index růstu v čase 12 hodin a znázorněny na obrázku č. 9. Do kulturačního média byla mikroemulze přidána ve stejném objemu, který byl vypočten pro testování MAG v mikroemulzi. Pro názornost a snazší srovnání byla označení jednotlivých ředění zachována a v grafu jsou tedy označena jako koncentrace 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 a 1500 µg/ml. Podobně jako u *B. cereus*, i u ostatních grampozitivních druhů vedl přídavek mikroemulze k poklesu hodnot indexu růstu, a to zejména ve vyšších testovaných koncentracích. Jednotlivé druhy bakterií se však lišily v citlivosti k působení mikroemulze. U *M. luteus* klesl index růstu pod 70 % už při koncentraci 250 µg/ml, stejná koncentrace mikroemulze v médiu však působila spíše stimulačně na *S. aureus*, *B. cereus* a *B. subtilis*.



Obr. 9. Vliv mikroemulze na růst gram pozitivních bakterií v čase 12 hodin.

8.1.2 Vliv mikroemulze bez přídavku MAG na růst gramnegativních bakterií

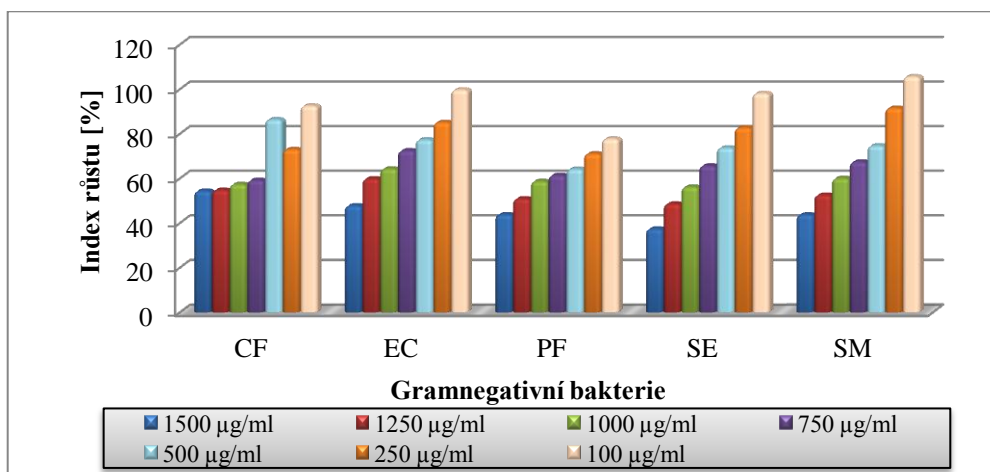
Stejně jako u gram pozitivních bakterií, i u gramnegativních druhů byl proveden slepý pokus s mikroemulzemi bez přídavku MAG. Na ukázkou jsou uvedeny růstové křivky bakterie *Serratia marcescens*, která byla kultivována v médiu obsahujícím různé množství mikroemulze (Obr. 10). V koncentraci 500 – 1500 µg/ml došlo účinkem mikroemulze k potlačení růstu *S. marcescens*. Tento inhibiční účinek může být způsoben přítomností alkoholu v mikroemulzi a i Tween, jakožto povrchově aktivní látka, může ovlivňovat mikroorganismy. Růst *S. marcescens* v přítomnosti mikroemulze v nízkých koncentracích byl srovnatelný s kontrolou.



Obr. 10. Vliv mikroemulze bez přídavku MAG na růst *Serratia marcescens*.

Antimikrobní účinky mikroemulze bez přídavku MAG na gramnegativní bakterie byly zaznamenány jako index růstu v čase 12 hodin a jsou znázorněny na obrázku č. 11. Index růstu mikroorganismů byl pozorován v následujících koncentracích mikroemulze v médiu: 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 a 1500 $\mu\text{g/ml}$. Ve všech koncentracích bylo pozorováno snížení indexu růstu gramnegativních bakterií a inhibiční účinek se zvyšoval s rostoucí koncentrací mikroemulze v médiu.

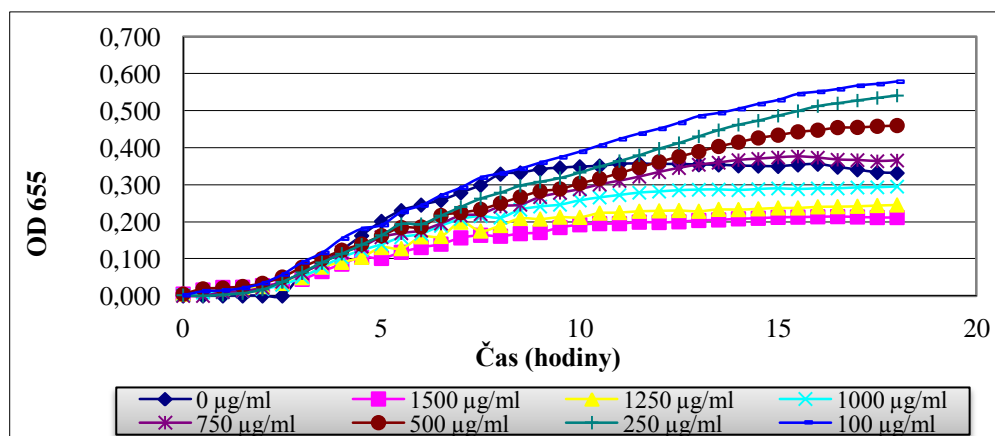
Lze tedy konstatovat, že už samotná mikroemulze obsahující alkohol a Tween omezuje růst grampozitivních i gramnegativních bakterií. V následující části práce bylo zkoumáno, zda přídavek monoacylglycerolů do kompozice mikroemulze tento inhibiční efekt dále zvýší.



Obr. 11. Vliv mikroemulze bez přídavku MAG na růst gramnegativních bakterií v čase 12 hodin.

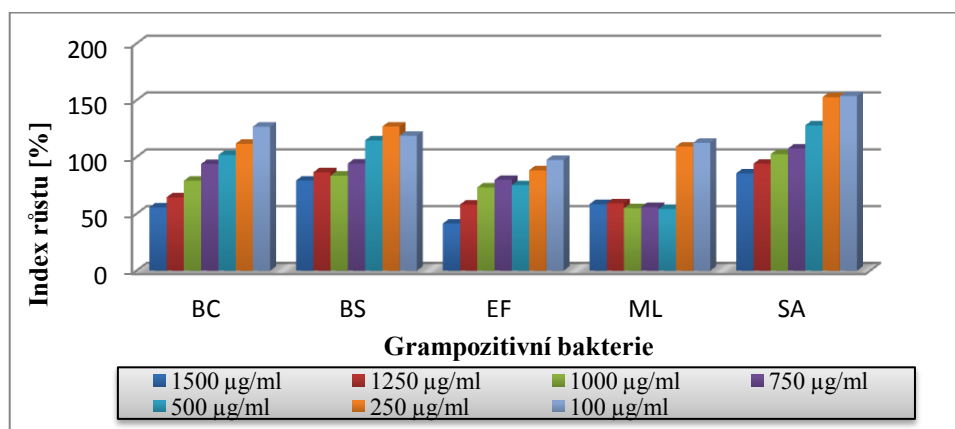
8.1.3 Vliv mikroemulze s monoacylglycerolem kyseliny kaprinové MAG ($\text{C}_{10:0}$) na růst grampozitivních bakterií

Na obrázku č. 12 je znázorněn růst grampozitivní bakterie, konkrétně *Bacillus cereus*, v přítomnosti určitých koncentrací mikroemulzí s MAG $\text{C}_{10:0}$. Je patrné, že vlivem přítomnosti mikroemulze s MAG v koncentraci 1000 - 1500 $\mu\text{g/ml}$ dochází ke snížení hustoty bakteriální suspenze, a růst *B. cereus* je tedy touto mikroemulzí inhibován.



Obr. 12. Vliv mikroemulze s MAG ($C_{10:0}$) na růst *Bacillus cereus*.

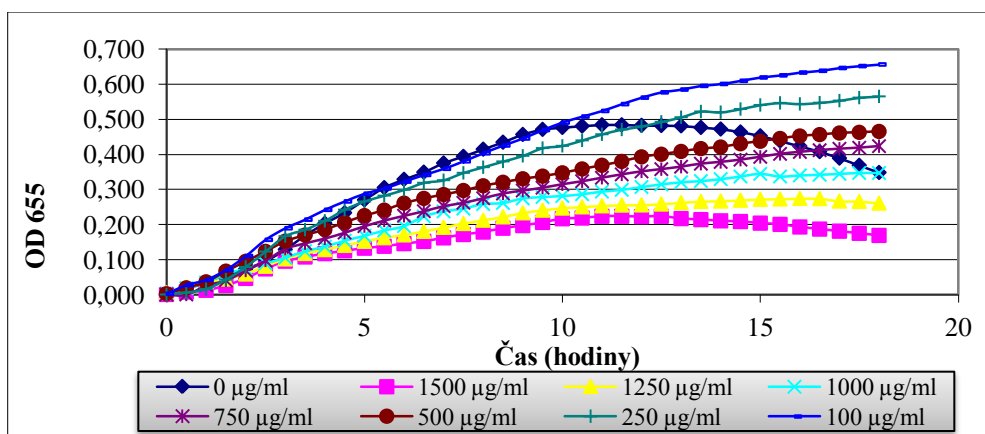
Antimikrobní účinky mikroemulze s MAG $C_{10:0}$ na grampozitivní bakterie byly vyjádřeny jako index růstu v čase 12 hodin a znázorněny graficky. Účinky mikroemulze s MAG byly sledovány v určitých koncentracích 100, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 $\mu\text{g/ml}$. Výraznější inhibiční účinkyna G^+ bakterie byly pozorovány až při koncentracích 500 $\mu\text{g/ml}$ a vyšších. Mikroemulze s MAG $C_{10:0}$ v koncentraci 100 a 250 $\mu\text{g/ml}$ nevedly ke snížení hodnot indexu růstu u žádné z grampozitivních bakterií. Nejedolnějším druhem byl *Staphylococcus aureus*. Ani v přítomnosti mikroemulze v nejvyšší koncentraci neklesla hodnota indexu růstu pod 80 % a koncentrace 100, 250 a 500 $\mu\text{g/ml}$ růst dokonce podporovala. Nejvyšší citlivost k MAG $C_{10:0}$ v mikroemulzi vykazoval *Micrococcus luteus*. U této bakterie byl index růstu v koncentracích vyšších než 500 $\mu\text{g/ml}$ výrazně snížen a pohyboval se v rozmezí 40 až 60 %.



Obr. 13. Vliv MAG ($C_{10:0}$) na růst grampozitivních bakterií v čase 12 hodin.

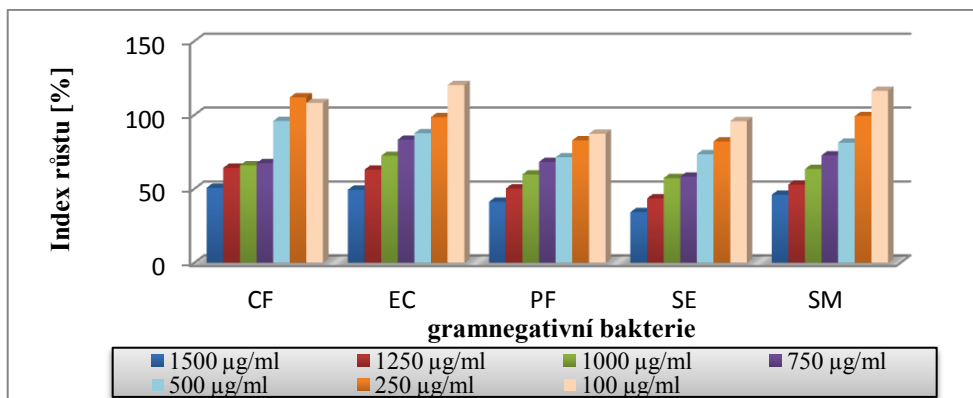
8.1.4 Vliv monoacylglycerolu kyseliny kaprinové MAG (C_{10:0}) na růst gramnegativních bakterií

Vliv monoacylglycerolu kyseliny kaprinové MAG (C_{10:0}) ve formě mikroemulze byl sledován i na skupině gramnegativních bakterií. Jako příklad jsou na obrázku č. 14 uvedeny růstové křivky získané kultivací *Serratia marcescens* v médiu s přidavkem mikroemulze MAG C_{10:0}. V koncentracích 500, 750, 1000 a 1500 µg/ml působila mikroemulze s MAG C_{10:0} na růst bakterie *S. marcescens* inhibičně. U koncentrace 250 µg/ml měl MAG také inhibiční účinek, avšak slabý a trvajícím pouze během první poloviny kultivace. Nejnižší testovaná koncentrace 100 µg/ml nepotlačila růst této gramnegativní bakterie.



Obr. 14. Vliv mikroemulze s MAG (C_{10:0}) na růst *Serratia marcescens*.

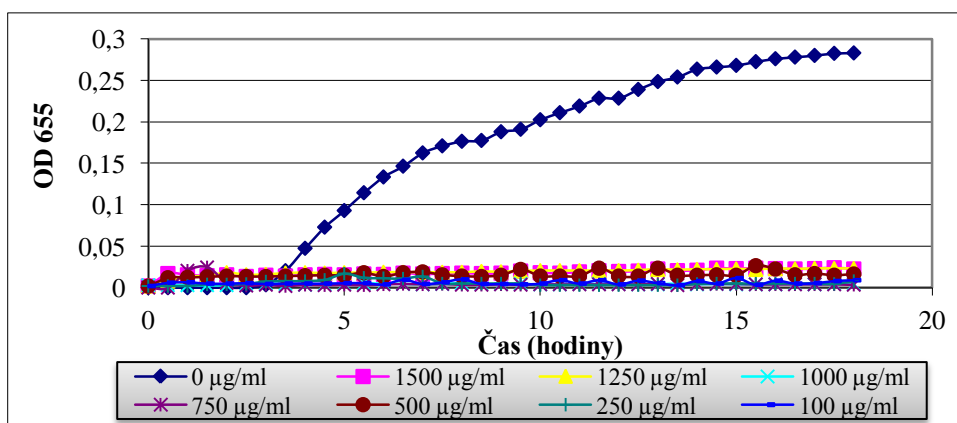
Vliv monoacylglycerolu kyseliny kaprinové byl také testován na dalších gramnegativních bakteriích a výsledky jsou uvedeny jako indexy růstu pro koncentrace MAG 250, 500, 750, 1000, 1250 a 1500 µg/ml (Obr. 15). U bakterií *Pseudomonas fluorescens* a *Salmonella enterica* byl inhibiční účinek vlivem MAG prokázán ve všech koncentracích, v nejvyšší testované koncentraci byly indexy růstu pouze v rozmezí 30 až 40 %. U bakterie *Citrobacter freundii* byly hodnoty indexu růstu při koncentraci 100 a 250 µg/ml vyšší než u samotné kontroly, nárůst byl vyšší než 100 %. U bakterií *Escherichia coli* a *Serratia marcescens* nejvyšší koncentrace MAG také nepůsobí inhibičně, ale spíše růst podporuje. Růst gramnegativních bakterií při různých koncentracích je znázorněn na obrázku č. 15.



Obr. 15. Vliv MAG ($C_{10:0}$) na růst gramnegativních bakterií v čase 12 hodin.

8.1.5 Vliv monoacylglycerolu kyseliny undekanové MAG ($C_{11:0}$) na růst grampozitivních bakterií

Vliv mikroemulze s monoacylglycerolem kyseliny undekanové MAG ($C_{11:0}$) na růst grampozitivních bakterií byl testován v koncentracích 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 a 1500 $\mu\text{g/ml}$. Vliv MAG $C_{11:0}$ na růst bakterie *Bacillus cereus* je znázorněn na obrázku č. 16. Z růstových křivek lze konstatovat, že mikroemulze obsahující tento monoacylglycerol měla značné inhibiční účinky na růst *B. cereus*. Ve všech testovaných koncentracích nebyl růst téměř zaznamenán.

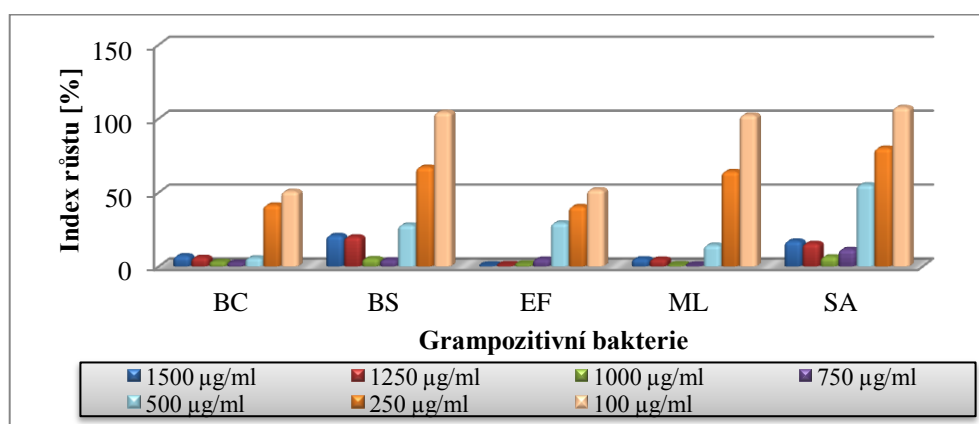


Obr. 16. Vliv mikroemulze s MAG ($C_{11:0}$) na růst *Bacillus cereus*.

Účinky mikroemulze s MAG $C_{11:0}$ byly studovány i na dalších grampozitivních bakteriích. Kompletní výsledky jsou uvedeny na obrázku č. 17 formou hodnot indexu růstu. Monoa-

cylglycerol kyseliny undekanové se jeví jako velmi účinné antibakteriální agens. U všech grampozitivních bakterií se v koncentraci 500 $\mu\text{g/ml}$ index růstu snížil přinejmenším na polovinu a v koncentraci 750 $\mu\text{g/ml}$ byly hodnoty IR nižší než 10 %. Nejnižší testovaná koncentrace MAG $\text{C}_{11:0}$, tedy koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$, působila inhibičně na dva grampozitivní druhy, *Enterococcus faecalis* a *Bacillus cereus*. Koncentrace 250 $\mu\text{g/ml}$ už vedla k potlačení růstu u všech grampozitivních bakterií.

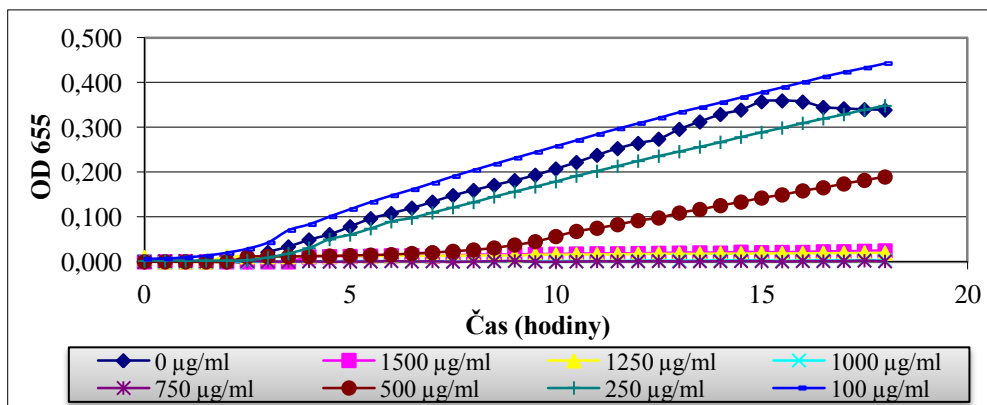
V kapitole 8.1.1. byl studován účinek mikroemulze bez přídavku monoacylglycerolu a bylo zjištěno, že i samotná mikroemulze má schopnost mírně inhibovat růst grampozitivních bakterií. Na základě výsledků získaných pro mikroemulze obsahující MAG $\text{C}_{11:0}$ je možné říci, že přídavkem MAG $\text{C}_{11:0}$ do kompozice mikroemulze se její inhibiční aktivita zvyšuje.



Obr. 17. Vliv mikroemulze s MAG ($\text{C}_{11:0}$) na růst grampozitivních bakterií v čase 12 hodin.

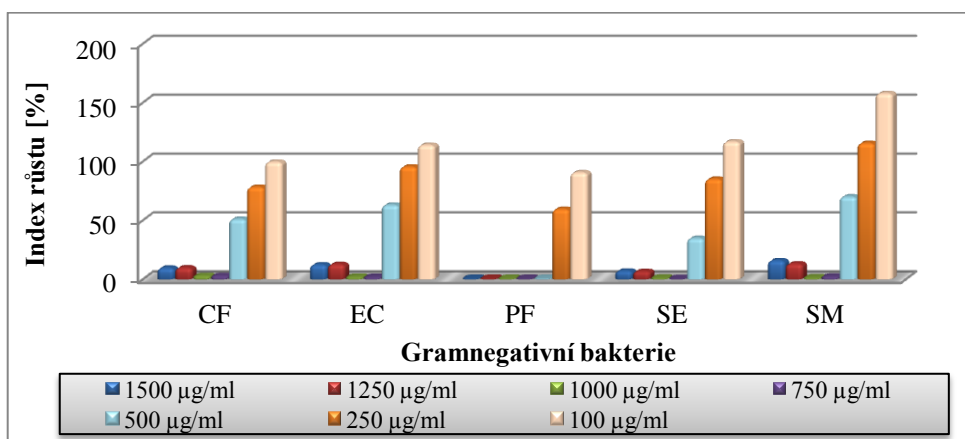
8.1.6 Vliv monoacylglycerolu kyseliny undekanové MAG ($\text{C}_{11:0}$) na růst gramnegativních bakterií

Vliv mikroemulze s monoacylglycerolem kyseliny undekanové MAG ($\text{C}_{11:0}$) na růst gramnegativních bakterií byl testován v rozmezí koncentrací 100 až 1500 $\mu\text{g/ml}$. Růstové křivky pro bakterii *Salmonella enterica* rostoucí v médiu s přídavkem mikroemulze s MAG $\text{C}_{11:0}$ jsou znázorněny na obrázku č. 18. Z grafu je patrné, že v koncentraci MAG 500 $\mu\text{g/ml}$ byla prodloužena lag-fáze a došlo k částečné inhibici růstu salmonel. Vyšší testované koncentrace vedly ke kompletní inhibici růstu této bakterie. Nejnižší testovaná koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$ vedla k mírnému zvýšení počtu buněk oproti kontrolnímu vzorku.



Obr. 18. Vliv mikroemulze s MAG ($C_{11:0}$) na růst *Salmonella enterica*.

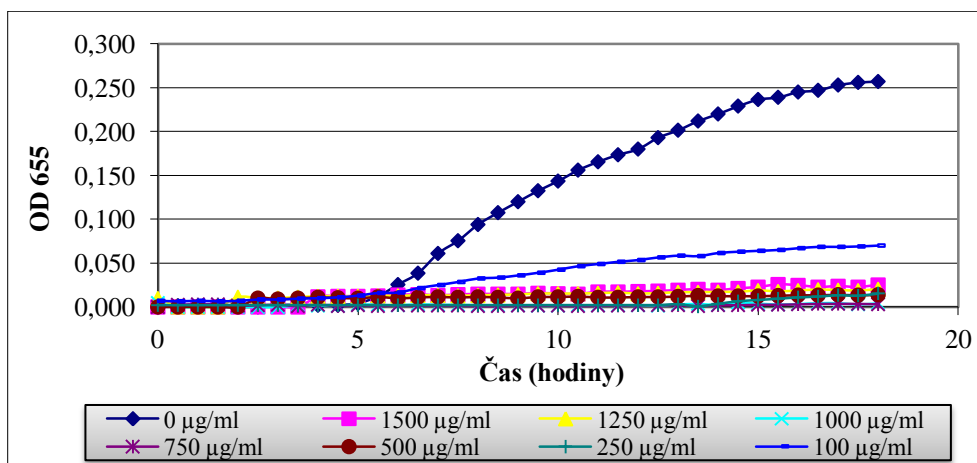
Indexy růstu dalších gramnegativních bakterií jsou graficky znázorněny na obrázku č. 19. Podobě jako u grampozitivních druhů i zde lze konstatovat, že mikroemulze obsahující MAG $C_{11:0}$ má antibakteriální účinek. U nejvyšších testovaných koncentrací (750 - 1500 $\mu\text{g/ml}$) byl zaznamenán index růst bakterií nižší než 20 %. Nejcitlivěji reagovala na přítomnost MAG $C_{11:0}$ *Pseudomonas fluorescens*, naopak nejodolnější se zdá být *Serratia marcescens*, jejíž růst byl v nízkých koncentracích mikroemulze s MAG $C_{11:0}$ spíše podporován.



Obr. 19. Vliv mikroemulze s MAG ($C_{11:0}$) na růst gramnegativních bakterií v čase 12 hodin.

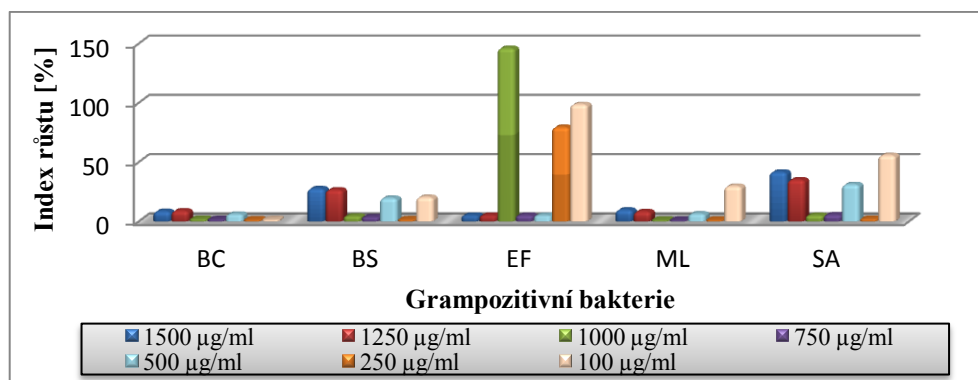
8.1.7 Vliv monoacylglycerolu kyseliny undecenové MAG ($C_{11:1}$) na růst gram pozitivních bakterií

Byly připraveny i mikroemulze obsahující monoacylglycerol nenasycené mastné kyseliny, konkrétně kyseliny undecenové. Vliv monoacylglycerolu kyseliny undecenové MAG $C_{11:1}$ na růst gram pozitivní bakterie *Micrococcus luteus* je znázorněn na obrázku č. 20. I pro studium aktivity tohoto MAG byly zvoleny koncentrace v rozmezí 100 až 1500 $\mu\text{g/ml}$. Při nejnižší testované koncentraci MAG $C_{11:1}$ byla hustota suspenze buněk po celou dobu inkubace významně nižší než u kontroly rostoucí pouze v čistém médiu. Vyšší testované koncentrace pak působily na růst *M. luteus* inhibičně a růst této bakterie byl nepatrný nebo dokonce žádný.



Obr. 20. Vliv mikroemulze s MAG ($C_{11:1}$) na růst *Micrococcus luteus*.

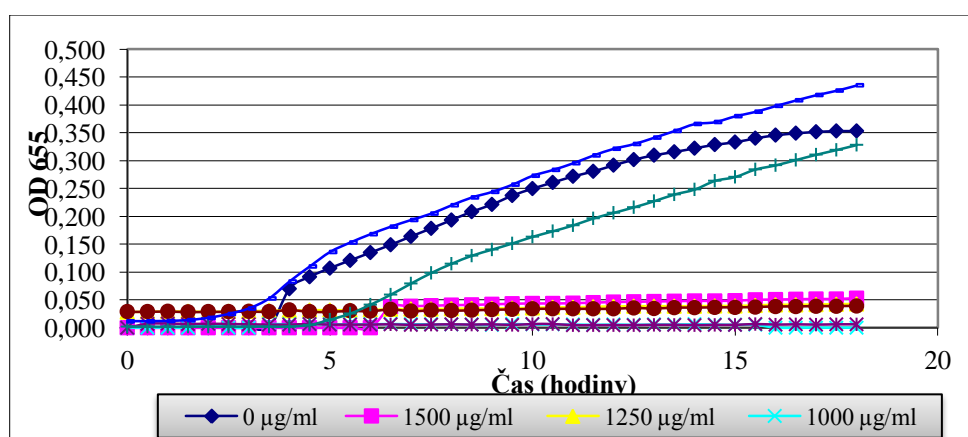
Vliv monoacylglycerolu kyseliny undecenové na růst ostatních gram pozitivních bakterií je znázorněn na Obrázku 21. Z hodnot indexu růstu je patrné, že nejnižší inhibiční účinek má tento MAG na bakterii *Enterococcus faecalis*. U některých bakterií je růst minimální, pod 30 %. Většina gram pozitivních bakterií reaguje na MAG $C_{11:1}$ citlivěji než na podobný monoacylglycerol, tedy MAG $C_{11:0}$. Velmi citlivé jsou zejména bacily a *Micrococcus luteus*.



Obr. 21. Vliv mikroemulze s MAG ($C_{11:1}$) na růst gram pozitivních bakterií v čase 12 hodin.

8.1.8 Vliv monoacylglycerolu kyseliny undecenové MAG ($C_{11:1}$) na růst gramnegativních bakterií

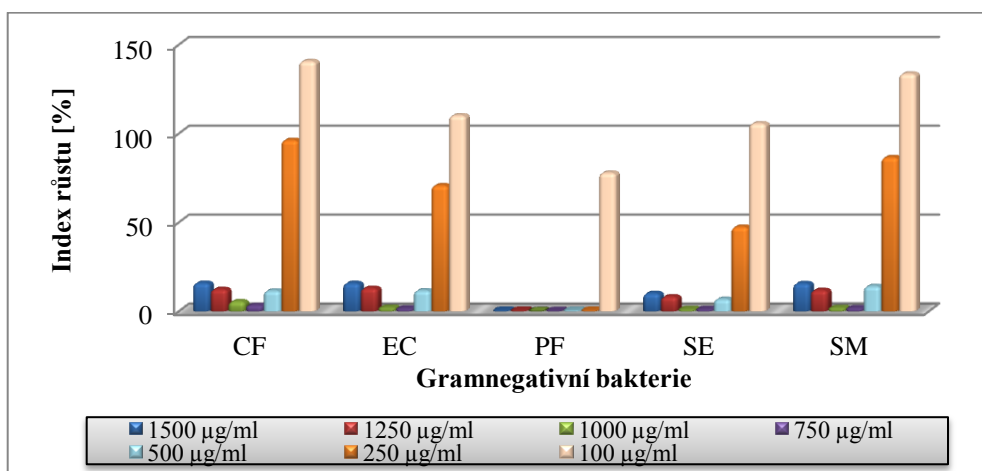
Ve srovnání s gram pozitivními bakteriemi jsou gramnegativní druhy méně citlivé k působení MAG $C_{11:1}$ ve formě mikroemulze, což dokumentují růstové křivky *Escherichia coli* (Obr. 22). Z grafu je patrné, že nejnižší testovaná koncentrace MAG $C_{11:1}$ má mírný stimulační účinek na růst *E. coli*. Koncentrace 250 µg/ml mírně prodlužuje lag-fázi a hustota bakteriální suspenze byla po celou dobu kultivace nižší než v kontrolním vzorku. Od koncentrace 500 µg/ml však byl opět pozorován značný antibakteriální účinek na růst *E. coli*.



Obr. 22. Vliv mikroemulze s MAG ($C_{11:1}$) na růst *Escherichia coli*.

Přítomnost mikroemulze s MAG $C_{11:1}$ v médiu potlačovala také růst dalších gramnegativních druhů (Obr. 23). Nejcitlivějším gramnegativním druhem byla *Pseudomonas fluo-*

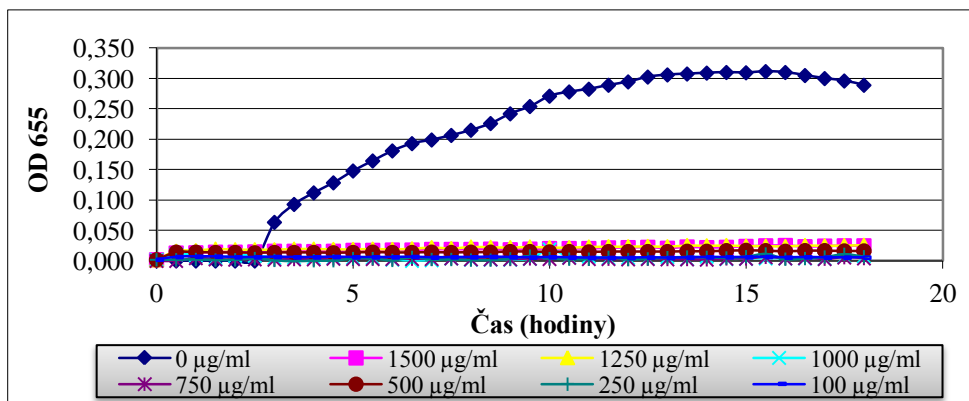
rescens. U této bakterie došlo ke kompletní inhibici růstu v přítomnosti MAG C_{11:1} v koncentraci 250 - 1500 µg/ml a i nejnižší testovaná koncentrace způsobila snížení hodnoty indexu růstu. Z hodnot indexu růstu je patrné, že vlivem přidavku MAG mají inhibiční účinek na bakterie. Přítomnost MAG v mikroemulzi potlačuje růst bakterií. U bakterií *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* a *Serratia marcescens* byla v koncentraci 100 µg/ml pozorována stimulační aktivita této mikroemulze. U některých druhů byla tato stimulace růstu velmi výrazná a index růstu dosáhl téměř 140 %.



Obr. 23. Vliv mikroemulze s MAG (C_{11:1}) na růst gramnegativních bakterií v čase 12 hodin.

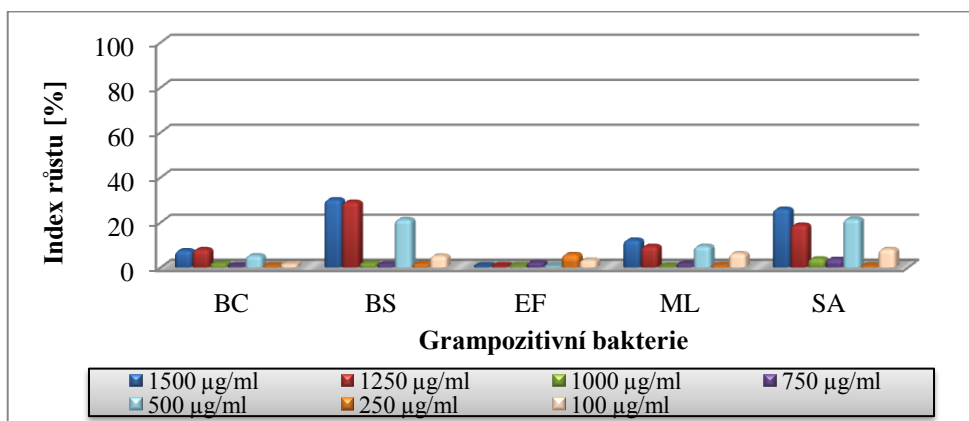
8.1.9 Vliv monoacylglycerolu kyseliny laurové MAG (C_{12:0}) na růst grampozitivních bakterií

Podle dostupné literatury, která je sumarizována v teoretické části, patří MAG kyseliny laurové mezi monoacylglyceroly s nejvyšší antibakteriální aktivitou. Tento MAG byl také přidán do kompozice mikroemulze a účinek mikroemulze byl studován na skupině grampozitivních bakterií. Na obrázku č. 24 jsou uvedeny růstové křivky získané kultivací bakterie *Bacillus cereus* v médiu s přidavkem mikroemulze s MAG C_{12:0}. Ve všech koncentracích mikroemulze byla zaznamenána kompletní inhibice růstu *B. cereus*.



Obr. 24. Vliv mikroemulze s MAG ($C_{12:0}$) na růst *Bacillus cereus*.

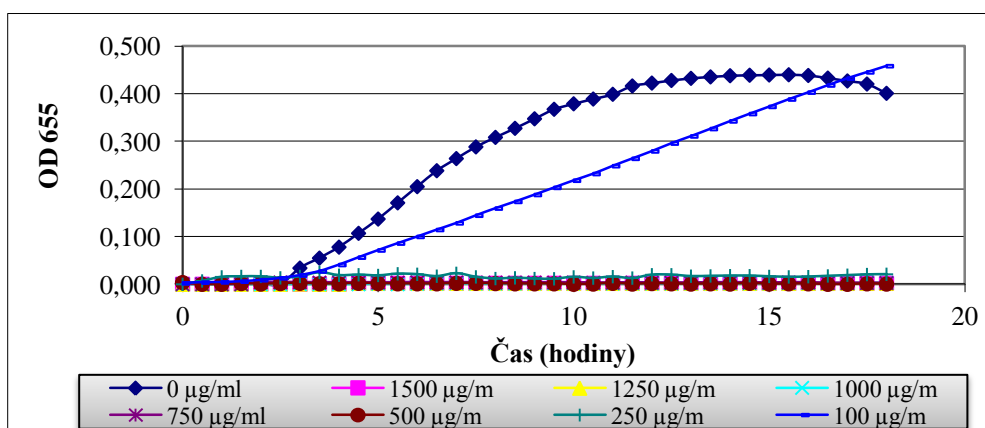
I další grampozitivní bakterie byly kultivovány v přítomnosti mikroemulze s MAG $C_{12:0}$ v koncentracích 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 a 1500 $\mu\text{g/ml}$. Vypočtené hodnoty indexu růstu grampozitivních druhů jsou shrnuty na obrázku č. 25. Z hodnot indexu růstu je patrné, že vlivem přídavku MAG $C_{12:0}$ mají mikroemulze inhibiční účinek na bakterie velmi dobrý. Index růstu všech grampozitivních bakterií ve všech testovaných koncentracích MAG $C_{12:0}$ byl nižší než 30 %.



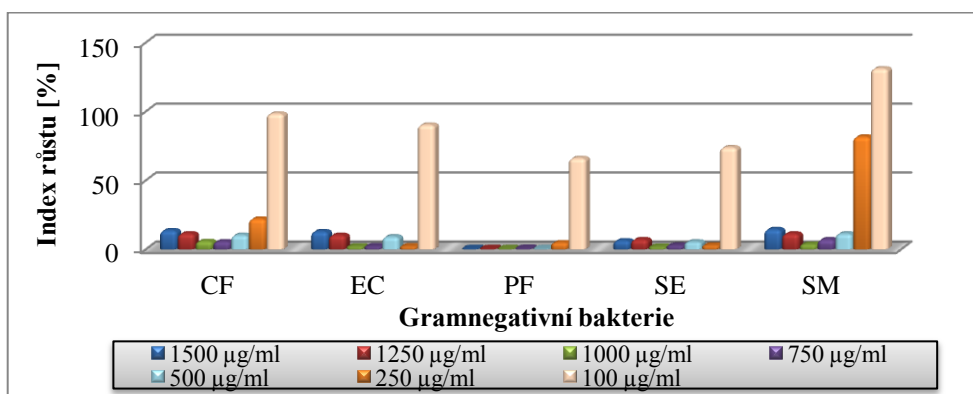
Obr. 25. Vliv mikroemulze s MAG ($C_{12:0}$) na růst grampozitivních bakterií v čase 12 hodin

8.1.10 Vliv monoacylglycerolu kyseliny laurové MAG ($C_{12:0}$) na růst gramnegativních bakterií

Monoacylglycerol kyseliny laurové MAG ($C_{12:0}$) působil antibakteriálně nejen na grampozitivní bakterie, ale i na bakterie gramnegativní. Růstové křivky získané pro *Pseudomonas fluorescens* jsou graficky znázorněny na obrázku č. 26. Z grafu je patrné, že všechny testované koncentrace MAG $C_{12:0}$ s výjimkou nejnižší koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$ bránily růstu této gramnegativní bakterie. Ze studovaných gramnegativních bakterií byla právě *P. fluorescens* nejcitlivějším druhem, což dokumentuje obrázek č. 27. Velmi citlivá k působení MAG $C_{12:0}$ v mikroemulze byla i *Escherichia coli* a *Salmonella enterica*. U *Serratia marcescens* byl při použití koncentrace 250 $\mu\text{g/ml}$ index růstu snížen na 80 %, vyšší koncentrace vedly k výraznějšímu snížení indexu růstu na 10 - 20 %.



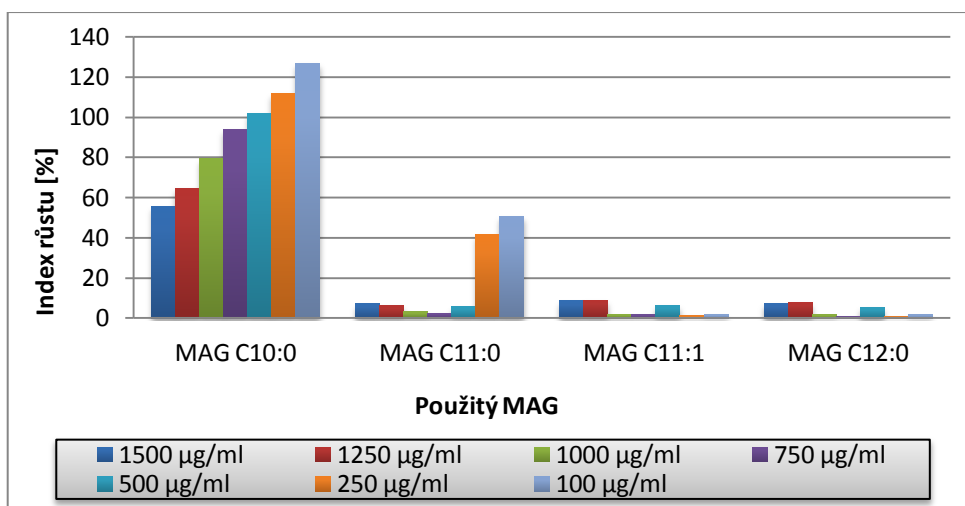
Obr. 26. Vliv mikroemulze s MAG ($C_{12:0}$) na růst *Pseudomonas fluorescens*.



Obr. 27. Vliv mikroemulze s MAG ($C_{12:0}$) na růst gramnegativních bakterií v čase 12 hodin.

8.1.11 Vliv monoacylglycerolů na růst *Bacillus cereus*.

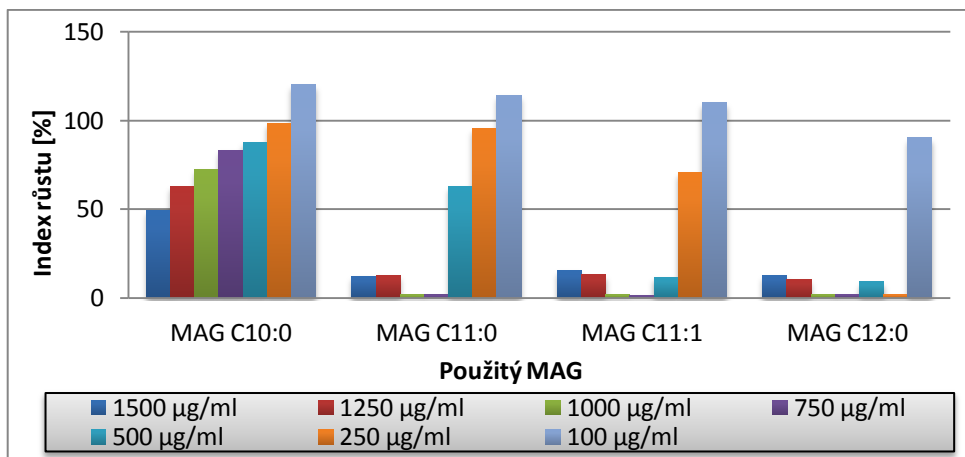
Pro názornější srovnání účinků jednotlivých monoacylglycerolů byla vybrána grampozitivní bakterie *Bacillus cereus*. Účinky různých MAG byly sledovány v sedmi různých koncentracích 100, 250, 500, 750, 1000, 1250 a 1500 $\mu\text{g/ml}$ (obrázek č. 28). Z grafu je patrné, že ze čtyř studovaných monoacylglycerolů měl nejslabší inhibiční účinky MAG kyseliny laurové kaprinové MAG C_{10:0}. MAG C_{11:0} působil výraznou inhibici v koncentraci 500 $\mu\text{g/ml}$ a vyšších. K největšímu snížení indexu růstu *B. cereus* došlo po přidání mikroemulze s MAG C_{11:1} a MAG C_{12:0} do kultivačního média. Tyto dva monoacylglyceroly se tedy zdají být velmi dobrými inhibitory růstu a množení bacilů.



Obr. 28. Vliv monoacylglycerolů na růst *Bacillus cereus*.

8.1.12 Vliv monoacylglycerolů na růst *Escherichia coli*.

Pro srovnání účinků monoacylglycerolů na gramnegativní bakterie byla vybrána bakterie *Escherichia coli*. Účinky různých MAG v sedmi testovaných koncentracích jsou graficky znázorněny na obrázku č. 29. Z grafu je na první pohled patrné, že pro potlačení růstu gramnegativních bakterií jsou potřebné vyšší koncentrace MAG v mléčiu. Monoacylglyceroly v nejnižší testované koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ nevedly ke snížení indexu růstu, ale spíše růst *E. coli* stimulovaly. Jedinou výjimkou byl MAG C_{12:0}, který i v koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ způsobil mírnou růstovou inhibici a IR klesl přibližně o 10 %. Mikroemulze obsahující monoacylglycerol kyseliny laurové MAG C_{12:0} se stejně jako u *B. cereus* jeví jako nejúčinnější antibakteriální agens vůči *E. coli*.



Obr. 29. Vliv monoacylglycerolů na růst *Escherichia coli*.

ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo vytvoření mikroemulzí monoacylglycerolů s přídavkem alkoholu (butanolu) a sledování případných antimikrobních účinků těchto mikroemulzí. Z monoacylglycerolů byly vybrány MAG kyseliny kaprinové (C_{10:0}), MAG kyseliny undekanové (C_{11:0}), MAG kyseliny undecenové (C_{11:1}) a MAG kyseliny laurové (C_{12:0}). Inhibiční účinky vlivem MAG byly testovány na grampozitivních bakteriích (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*) a na gramnegativních bakteriích (*Citrobakter freundii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*). Výsledky experimentální části bakalářské práce lze shrnout do několika bodů:

- přídavek mikroemulzí do kultivačního média ovlivňuje růst mikroorganismů
- mikroemulze bez přídavku monoacylglycerolu potlačuje růst bakterií a se stoupající koncentrací mikroemulze v médiu klesá hodnota indexu růstu u grampozitivních i gramnegativních bakterií
- inhibiční účinek mikroemulzí lze zvýšit přídavkem některých monoacylglycerolů do kompozice emulze
- grampozitivní bakterie jsou vůči působení mikroemulzí s MAG citlivější než gramnegativní druhy
- přídavkem MAG C_{10:0} do kompozice mikroemulze nebyla zvýšena její schopnost potlačit růst mikroorganismů
- přídavkem MAG C_{11:0}, MAG C_{11:1} a MAG C_{12:0} se antibakteriální působení mikroemulzí zvyšuje
- nejvýraznějšího inhibičního efektu bylo dosaženo pomocí mikroemulzí obsahujících monoacylglyceroly kyseliny undecenové a laurové (MAG C_{11:1} a MAG C_{12:0})

U monoacylglycerolů v mikroemulzi byla prokázána schopnost inhibovat růst grampozitivních i gramnegativních bakterií, které mohou kontaminovat potraviny či kosmetické produkty. Toto antibakteriální působení monoacylglycerolů by tedy mohlo být využito potravinářským či kosmetickým průmyslem pro zajištění kvality a bezpečnosti potravin a kosmetických prostředků. Vzhledem k tomu, že monoacylglyceroly jsou všeobecně považovány za bezpečné z hlediska lidského zdraví a mají i emulgační účinky, možnost jejich aplikace např. v potravinářství se zdá být slibná.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LANGMAIER, F. *Základy kosmetických výrob.* Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2001. ISBN 8073180162.
- [2] NOVÁK, J. *Fyzikální chemie II.* 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 807080436X.
- [3] BARTOVSKÁ, L., ŠIŠKOVÁ, M. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav.* 5. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 807080579X.
- [4] ZAJÍC, J., BAREŠ, M. *Chemie a technologie tuků.* 1. vyd. Praha: MON, 1988.
- [5] KARLBERGER, J. *Technologie tuků a kosmetiky II pro OU a UŠ.* 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1979.
- [6] Emulze. [on-line]. [cit. 2012-03-10]. Dostupné z WWW: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/emulze.html.
- [7] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin.* 2. vyd. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902391-4-5.
- [8] BINKS, B. P. *Modern aspects of emulsion science.* Royal Society of Chemistry. Cambridge, 1998. ISBN 0-85-404439-6.
- [9] HIEMENZ, P. C., RAJAGOPALAN, R. *Principles of Colloid and Surface Chemistry.* 3rd. BocaRaton: CRC, 1997. ISBN 0824793978.
- [10] Mikroemulze. [on-line]. [cit. 2012-03-10]. Dostupné z WWW: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/mikroemulze.html.
- [11] Vzdělávací portál [on-line]. [cit. 2011-10-10]. Chemie a technologie tuků a detergentů. Distanční text III. Dostupné z WWW:
<http://utb.cepac.cz/Screens/Default.aspx>
- [12] Vzdělávací portál. [on-line]. [cit. 2011-10-10]. Biochemie. Distanční text. Dostupné z WWW:
<http://utb.cepac.cz/Screens/Default.aspx>
- [13] Monoacylglycerols. [on-line]. [cit. 2012-03-10]. Dostupné z WWW: <http://lipidlibrary.aocs.org/lipids/mg/index.htm>

- [14] DAVÍDEK, J., HAJŠLOVÁ, J., POKORNÝ, J., VELÍŠEK. *Chemie potravin*. 1. vyd. Praha, 1991. ISBN 80-7080-097-6.
- [15] Reakce mastných kyselin a lipidů. [on-line]. [cit. 2012-03-10]. Dostupné z WWW: http://share.centrax.cz/CPO-4_Reakce_mastnych_kyselin_a_lipidu,_str_79-104.pdf
- [16] Disperzní soustavy. [on-line]. [cit. 2011-10-10]. Dostupné z WWW: http://www.soudom.cz/Ucebnice/Materialy/Treti_rocnik/DISPERZNI_SOUSTAVY.pdf
- [17] Vzdělávací portál. [on-line]. [cit. 2011-10-10]. Chemie a technologie tuků. Distanční text II. Dostupné z WWW:
http://utb-fi-les.cepac.cz/moduly/M0007_chemie_a_technologie_tuku/distancni_text_II/modul.xml#kapitola_4_2
- [18] Vzdělávací portál. [on-line]. [cit. 2011-10-10]. Chemie a analýza potravin. Dostupné z WWW:
<http://utb.cepac.cz/Screens/Default.aspx>
- [19] Vzdělávací portál [on-line]. [cit. 2011-10-10]. Chemie a technologie tuků. Distanční text II. Dostupné z WWW:
http://utb-fi-les.cepac.cz/moduly/M0007_chemie_a_technologie_tuku/distancni_text_II/M0007_chemie_a_technologie_tuku_distancni_text_ii.pdf
- [20] POKORNÝ, J., DUBSKÁ, L. *Technologie tuků*. Praha: SNTL, 1986.
- [21] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G. *Chemie potravin*. 1. vyd. Praha, 1983.
- [22] ALTIERI, C., BEVILACQUA, A., CARDILLO, D., SINIGAGLIA, M. Effectiveness of fattyacids and their monoglycerides against gram-negative pathogens. *International Journalof Food Science and Technology*. 2009, vol. 44, p. 359-366.

- [23] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., JANIŠ, R., KREJČÍ, J., DOLEŽALCOVÁ, I., POSPÍŠIL, Z., RŮŽIČKA, J., TREMLOVÁ, B. Comparison of antibacterial effect of seven 1-monoglycerides on food-borne pathogens or spoilage bacteria. *Acta Veterinaria BRNO*. 2011, vol. 80, p. 029-039. DOI: 10.2754/avb201180010029.
- [24] DOLEŽALCOVÁ, I. Účinky vybraných monoacylglycerolů na růst bakterií a mikroskopických vláknitých hub. Rigorózní práce, Masarykova univerzita, Brno 2010.
- [25] WANG, L. L., JOHNSON, E. A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992, vol. 58, p. 624 - 629.
- [26] SCHINDLER, J. *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3170-4.
- [27] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha: Academia, 2008. ISBN 978-80-200-1703-1.
- [28] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1983.
- [29] ROSYPAL, S. a KOLEKTIV. *Nový přehled biologie*. 1. vyd. Praha: Scientia, 2003. ISBN 80-7183-268-5.
- [30] KAPRÁLEK, F. *Základy bakteriologie*. Praha, 2000. ISBN 8071848115.
- [31] ČECHOVÁ, L., JANALÍKOVÁ, M. *Obecná mikrobiologie*. 1. vyd. Zlín, 2007. ISBN 978-80-7318-516-9.
- [32] ŽIŽKA, B., KORBELOVÁ, M. *Mikrobiologie I pro SPŠ potravinářské*. 1. vyd. Praha, 1992.
- [33] VAŘEJKA, F., MRÁZ, O., SMOLA, J. *Speciální veterinární mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1989. ISBN 802090042X.
- [34] HASENHUETTL, G. L., HARTEL, R. W. Food Emulsifiers and Their Applications. Springer. *New York*. ISBN 0-38-775283-8.
- [35] Mikrobiologie. [on-line]. [cit. 2012-03-12]. Dostupné z WWW: <http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/bac-sub.htm>

- [36] MOULOUGUI, Z., RAKOTONDRAZAFY, V., PEYROU, G., GACHEN, CH., EYCHENNE, V. Pure α -monoglycerides for industrial applications. *Agro Food Industry Hi-Tech*. 1998, vol. 9, p. 10 - 14.
- [37] SUN, C. Q., O'CONNOR, CH. J., ROBERTON, A. M. The antimicrobial properties of milk fat after partial hydrolysis by calf pregastric lipase. *Chemico-Biological Interactions*. 2002, vol. 140, p. 185 - 198.
- [38] DAVIDSON, P. M., SOFOS, J. N., BRANEN, A. L. *Antimicrobials in Food*. 3rded. BocaRaton: London : Taylor & Francis, 2005. ISBN 0-8247-4037-8.
- [39] SKŘIVANOVÁ, E., MAROUNEK, M., BENDA, V., BŘEZINA, P. Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin. *Veterinarni Medicina*. 2006, vol. 51, p. 81 - 88.
- [40] PREUSS, H. G., ECHARD, B., ENIG, M., BROOK, I., ELLIOTT, T. B. Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2005, vol. 272, p. 29 - 34.
- [41] BERGSSON, G., STEINGRÍMSSON, O., THORMAR, H. Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on *Helicobacter pylori*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2002, vol. 20, p. 258 - 262.
- [42] RŮŽIČKA, J., VELCLOVÁ, K., JANIŠ, R., KREJČÍ, J. Antimicrobial effects of 1-monoacylglycerols prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids. *Eur Food Res Technol*. 2003, vol. 217, p. 329 - 331.
- [43] CONLEY, A. J., KABARA, J. J. Antimicrobial action of esters of polyhydric alcohols. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1973, vol. 4, p. 501 - 506.
- [44] OH, D. H., MARSHALL, D. L. Antimicrobial activity of glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 1993, vol. 20, p. 239 - 246.
- [45] CHAIBI, A., ABABOUCHE, L. H., BUSTA, F. F. Inhibition of bacterial spores and vegetative cells by glycerides. *Journal of Food Protection*. 1996, vol. 59, p. 716 - 722.

- [46] DOLEŽALOVÁ, M., JANIŠ, R., SVOBODOVÁ, H., KAŠPÁRKOVÁ, V., HUMPOLÍČEK, P., KREJČÍ, J. Antimicrobial properties of 1-monoacylglycerols prepared from undecanoic (C_{11:0}) and undecenoic (C_{11:1}) acid. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2010, vol. 112, p. 1106 - 1114
- [47] GÖRNER, F., VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiologie požívatin*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004. ISBN 8096706497.
- [48] KAPRÁLEK, F. *Fyziologie bakterií*. Praha: SPN, 1986.
- [49] BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Marvil, 1996.
- [50] POMMERVILLE, J. C. *Alcamo's fundamentals of microbiology*. Sudbury: Jones & Bartlett Publishers, 2011. ISBN 978-0-7637-6258-2.
- [51] Vzdělávací portál.[on-line]. [cit. 2011-10-10]. Obecná mikrobiologie. Distanční text. Dostupné z WWW:
http://utb-files.cepac.cz/moduly/M0023_obecna_mikrobiologie/distanzni_text/modul.xml
- [52] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.
- [53] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN ISBN 80-210-4207-9.
- [54] JAY, J. M. *Modern Food Microbiology*. Maryland: Aspen publication, 2000. ISBN 0-8342-1671-X.
- [55] Vzdělávací portál [on-line]. [cit. 2011-10-10]. Potravinářská mikrobiologie. Distanční text. Dostupné z WWW:
http://utb-fi-les.cepac.cz/moduly/M0010_potravinarska_mikrobiologie/distanzni_text/modul.xml
- [56] ZAJÍC, J., BAREŠ, M. *Chemie a technologie tuků*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1987.

- [57] NINO RODRÍGUEZ, M. R., PATINO RODRÍGUEZ, J. M., SÁNCHEZ CARERA, C. Relaxation phenomena in Monoglyceride films at the air-water interface, *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*. 1999, vol. 12, p. 175 - 192.
- [58] KABARA, J. J. Chemistry and biology of monoglycerides in cosmetic formulations. *Cosmetic Science and Technology*. 1991, vol. 11, p. 311-344.
- [59] BAREL, A. O., PAYE, M., MAIBACH, M. I. *Handbook of cosmetic science and technology*. New York:Marcel Dekker, Inc., 2001.
- [60] VALÉRIO, A., FIAMENTTI, K. G., ROVANI, S., FRANCESCHI, E. Enzymatic production of mono- and diglycerides in compressed n-butane and AOT surfactant. *Journal of Supercritical Fluids*. 2009, vol. 49, p. 216 - 220.
- [61] JANIŠ, R., KREJČÍ, J., KLÁSEK, A. Preparation of 1-monoacylglycerols from glycidol and fatty acid catalyzed by the chromium(III)-fatty acid system, *European Journal of Lipid Science and Technology* 2000, vol. 102, p. 351 - 354.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

např	například
obj.	objemové procenta
tzv.	takzvaně
popř.	popřípadě
tj.	to je
V/O	voda v oleji
O/V	olej ve vodě
MAG	monoacylglycerol
DAG	diacylglycerol
TAG	triacylglycerol
HLB	hydrofilně-lipofilní rovnováha
MK	mastná kyselina
Ca(OH) ₂	hydroxid vápenatý
ZnO	oxid zinečnatý
NaOH	hydroxid sodný
KOH	hydroxid draselný
G ⁺	grampozitivní
G ⁻	gramnegativní
lat.	latinsky
MPB	masopeptonový bujón
BE	masový extrakt
NaCl	chlorid sodný
CCM	Česká sbírka miroorganismů
BC	<i>Bacillus cereus</i>
BS	<i>Bacillus subtilis</i>

EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
ML	<i>Mikrococcus luteus</i>
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
CF	<i>Citrobacter freundii</i>
EC	<i>Escherichia coli</i>
PF	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
SE	<i>Salmonella enterica</i>
SM	<i>Serratia marcescens</i>
EHEC	Enterohemoragické kmeny
EIEC	Enteroinvazivní kmeny
EPEC	Enteropatogenní kmeny
ETEC	Enterotoxigenní kmeny
EAggEC	Enteroagregativní kmeny

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Různé typy emulzí (a) zředěné, (b) koncentrované, (c) vysoce koncentrované (gelovité) [6].	15
Obr. 2. Schematické znázornění kapky mikroemulze [10].	16
Obr. 3. Izomerní formy MAG[13].	19
Obr. 4. Obecné schéma glycerolýzy.[20].	22
Obr. 5. Obecné schéma acidolýzy [20].	22
Obr. 6. Reakční schéma hydrolyzy [17].	23
Obr. 7. Růstová křivka mikroorganismů. I – lag-fáze, II – fáze zrychleného růstu, III – exponenciální fáze růstu, IV – fáze zpomaleného růstu, V – stacionární fáze, VI – fáze odumírání.	28
Obr. 8. Vliv mikroemulze bez přídavku MAG na růst <i>Bacillus cereus</i> .	48
Obr. 9. Vliv mikroemulze na růst grampozitivních bakterií v čase 12 hodin.	49
Obr. 10. Vliv mikroemulze bez přídavku MAG na růst <i>Serratia marcescens</i> .	49
Obr. 11. Vliv mikroemulze bez přídavku MAG na růst gramnegativních bakterií v čase 12 hodin.	50
Obr. 12. Vliv mikroemulze s MAG (C _{10:0}) na růst <i>Bacillus cereus</i> .	51
Obr. 13. Vliv MAG (C _{10:0}) na růst grampozitivních bakterií v čase 12 hodin.	51
Obr. 14. Vliv mikroemulze s MAG (C _{10:0}) na růst <i>Serratia marcescens</i> .	52
Obr. 15. Vliv MAG (C _{10:0}) na růst gramnegativních bakterií v čase 12 hodin.	53
Obr. 16. Vliv mikroemulze s MAG (C _{11:0}) na růst <i>Bacillus cereus</i> .	53
Obr. 17. Vliv mikroemulze s MAG (C _{11:0}) na růst grampozitivních bakterií v čase 12 hodin.	54
Obr. 18. Vliv mikroemulze s MAG (C _{11:0}) na růst <i>Salmonella enterica</i> .	55
Obr. 19. Vliv mikroemulze s MAG (C _{11:0}) na růst gramnegativních bakterií v čase 12 hodin.	55
Obr. 20. Vliv mikroemulze s MAG (C _{11:1}) na růst <i>Micrococcus luteus</i> .	56
Obr. 21. Vliv mikroemulze s MAG (C _{11:1}) na růst grampozitivních bakterií v čase 12 hodin.	57
Obr. 22. Vliv mikroemulze s MAG (C _{11:1}) na růst <i>Escherichia coli</i> .	57
Obr. 23. Vliv mikroemulze s MAG (C _{11:1}) na růst gramnegativních bakterií v čase 12 hodin.	58
Obr. 24. Vliv mikroemulze s MAG (C _{12:0}) na růst <i>Bacillus cereus</i> .	59

<i>Obr. 25. Vliv mikroemulze s MAG (C_{12:0}) na růst grampozitivních bakterií v čase 12 hodin.....</i>	<i>59</i>
<i>Obr. 26. Vliv mikroemulze s MAG (C_{12:0}) na růst Pseudomonas fluorescens.</i>	<i>60</i>
<i>Obr. 27. Vliv mikroemulze s MAG (C_{12:0}) na růst gramnegativních bakterií v čase 12 hodin.....</i>	<i>60</i>
<i>Obr. 28. Vliv monoacylglycerolů na růst Bacillus cereus.</i>	<i>61</i>
<i>Obr. 29. Vliv monoacylglycerolů na růst Escherichia coli.</i>	<i>62</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Povolené přídavky E 471 v potravinách [11].</i>	20
<i>Tab. 2. Vztah mezi hodnotou HLB a rozpustností emulgátorů ve vodě[16].</i>	21
<i>Tab. 3. Koncentrace MAG v jednotlivých ředěních mikroemulze.</i>	44
<i>Tab. 4. Objem mikroemulze a MPB v jednotlivých ředěních.</i>	45