

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Funkční vlastnosti škrobového filmu s obsahem extraktu
z rakytníkového oleje**
Diplomová práce

2020

Bc. Pavla Vrbická

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Pavla Vrbická**
Osobní číslo: **C18445**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Funkční vlastnosti škrobového filmu s obsahem extraktu z rakytníkového oleje**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. S využitím databází dostupných v knihovně UPa vyhledejte a zpracujte informace o využití škrobových filmů a charakterizujte obsahové látky v plodech (oleji) rakytníku. Popište analytické metody využívané v experimentální práci.
2. Experimentálně zjistěte funkční vlastnosti připravených filmů s různým obsahem extraktu rakytníkového oleje (antimikrobiální a antioxidační vlastnosti).
3. Výsledky statisticky zpracujte a zhodnoťte, zda obohacení škrobových filmů představuje významné zlepšení jejich vlastností.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Michaela Frühbauerová**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích 30. června 2020

.....

Bc. Pavla Vrbická

PODĚKOVÁNÍ:

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce panu doc. Ing. Liboru Červenkovi, Ph.D. za vstřícný přístup, rady a odbornou pomoc. Dále bych ráda poděkovala paní Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. za trpělivost během vedení mikrobiologické části, paní Ing. Michaele Frühbauerové za konzultace a odbornou pomoc v průběhu samotného experimentu.

Velké poděkování patří také mé rodině, která mi byla po celou dobu mého studia oporou.

ANOTACE

Cílem této diplomové práce bylo především zjistit, zda testovaný škrobový materiál, nemodifikovaný i modifikovaný, bude mít antimikrobiální a antioxidační účinky. Testováno bylo 5 vybraných mikroorganismů. Kromě bakterie *B. cereus*, kde byla pozorována zóna inhibice, byly ostatní mikroorganismy rezistentní k antimikrobiálním účinkům rakytníkového oleje. Dalším cílem bylo zjistit, zda vlivem bakterie *B. cereus* na škrobový film dochází ke snížení vodní aktivity, antioxidační účinky filmů pomocí vybraných analytických metod a jejich následné porovnání. Zde bylo zjištěno, že konkrétně metoda využívající DPPH volný radikál není vhodná pro tento vzorek kvůli nehomogenitě filmu. Dále byly porovnány infračervená spektra filmů a povrch škrobových filmů pod elektronovým mikroskopem.

KLÍČOVÁ SLOVA

škrob, rakytník, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Candida*, *Aspergillus*, *Bacillus*, DPPH, ABTS

TITLE

Functional properties of starch film with buckthorn oil extract

ANNOTATION

The purpose of this thesis is to find out, if the tested starch material, unmodified and modified, will have antimicrobial and antioxidant effects. Five species of microorganisms were tested for their zone of inhibition. Apart from *B. cereus*, where an inhibition zone was observed, other microorganisms were resistant to the buckthorn oil. Antioxidant effect of films were detected using selected analytical methods. It has been found that the method using DPPH free radical is not applicable for this sample due to the heterogeneity of the starch film samples. Infrared spectra of starch film and surface under electron microscope were compared.

KEYWORDS

starch, buckthorn, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Candida*, *Aspergillus*, *Bacillus*, DPPH, ABTS

OBSAH

| | |
|---|----|
| SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK..... | 12 |
| SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK..... | 14 |
| ÚVOD..... | 15 |
| 1. TEORETICKÁ ČÁST..... | 16 |
| 1.1. OBALY..... | 16 |
| 1.1.1. Materiály pro výrobu obalů..... | 16 |
| 1.1.2. Význam a funkce obalu..... | 17 |
| 1.2. ŠKROB..... | 18 |
| 1.2.1. Vlastnosti škrobu a jeho využití..... | 18 |
| 1.2.2. Modifikace škrobu..... | 20 |
| 1.3. BIODEGRADOVATELNÉ OBALY..... | 21 |
| 1.4. RAKYTNÍKOVÝ OLEJ..... | 22 |
| 1.5. ANTIMIKROBIÁLNÍ TESTOVÁNÍ..... | 24 |
| 1.5.1. Testované kmeny bakterií..... | 25 |
| 1.5.1.1. Rod <i>Bacillus</i> | 25 |
| 1.5.1.2. Rod <i>Staphylococcus</i> | 27 |
| 1.5.1.3. Rod <i>Escherichia</i> | 28 |
| 1.5.1.4. Rod <i>Candida</i> | 29 |
| 1.5.1.5. Rod <i>Aspergillus</i> | 30 |
| 1.6. AKTIVITA VODY..... | 32 |
| 1.6.1. Vliv a_w na mikroorganismy..... | 33 |
| 1.7. EXTRAKCE..... | 35 |
| 1.7.1. Extrakce z kapaliny do kapaliny..... | 35 |
| 1.7.2. Extrakce z pevné fáze do kapaliny..... | 36 |
| 1.8. ANTIOXIDAČNÍ KAPACITA LÁTEK..... | 36 |
| 1.8.1. Volné radikály..... | 37 |

| | | |
|----------|---|----|
| 1.8.2. | Antioxidanty | 37 |
| 1.8.3. | Metody stanovení antioxidační kapacity | 38 |
| 1.8.3.1. | Metoda využívající DPPH volný radikál v metanolu | 38 |
| 1.8.3.2. | Modifikovaná metoda využívající DPPH volný radikál v isooktanu | 39 |
| 1.8.3.3. | Metoda využívající ABTS | 39 |
| 1.8.3.4. | Porovnání metody DPPH a ABTS | 39 |
| 1.9. | SPEKTROMETRIE V ULTRAFIALOVÉ A VIDITELNÉ OBLASTI | 40 |
| 1.9.1. | Lambert-Beerův zákon | 40 |
| 1.9.2. | Instrumentace | 42 |
| 1.10. | INFRACERVENÁ SPEKTROMETRIE | 43 |
| 1.10.1. | Instrumentace | 44 |
| 1.10.2. | Metoda zeslabené celkové reflexe | 44 |
| 1.10.3. | Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací | 45 |
| 1.11. | SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE | 46 |
| 2. | MATERIÁL A METODY | 47 |
| 2.1. | VZORKY | 47 |
| 2.1.1. | Popis škrobových filmů | 47 |
| 2.1.2. | Výroba škrobových filmů | 48 |
| 2.2. | MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA | 50 |
| 2.2.1. | Přístroje a zařízení | 50 |
| 2.2.2. | Živé půdy, chemikálie a mikroorganismy | 50 |
| 2.2.3. | Příprava živných půd a fyziologického roztoku | 50 |
| 2.2.4. | Příprava kultur | 51 |
| 2.2.5. | Příprava vzorků pro stanovení antimikrobiální účinnosti | 53 |
| 2.2.6. | Příprava misek na stanovení aktivity vody | 53 |
| 2.2.7. | Příprava kultury <i>B. cereus</i> na měření změny aktivity vody | 53 |
| 2.3. | ANALYTICKÁ ANALÝZA | 54 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 2.3.1. | Přístroje, zařízení a pomůcky | 54 |
| 2.3.2. | Standardní látky a chemikálie | 55 |
| 2.3.3. | Příprava roztoků a pracovní postupy | 55 |
| 2.3.3.1. | Extrakce škrobových filmů..... | 55 |
| 2.3.3.2. | Extrakce rakytníkového oleje | 56 |
| 2.3.3.3. | Extrakce rakytníkové oleje do etanolu v poměru 295:5..... | 56 |
| 2.3.3.4. | Příprava roztoku DPPH volného radikálu v metanolu..... | 56 |
| 2.3.3.5. | Optimalizace metody DPPH v metanolu..... | 56 |
| 2.3.3.6. | Příprava roztoku DPPH volného radikálu v isooktanu | 57 |
| 2.3.3.7. | Optimalizace metody DPPH volný radikál v isooktanu..... | 57 |
| 2.3.3.8. | Příprava roztoku ABTS radikál | 57 |
| 2.3.3.9. | Optimalizace metody ABTS..... | 58 |
| 2.3.3.10. | Kalibrační řada Troloxu..... | 58 |
| 2.3.3.11. | Příprava vzorku pro skenovací elektronovou mikroskopii a infračervenou spektroskopii..... | 58 |
| 3. | VÝSLEDKY A DISKUZE..... | 60 |
| 3.1. | Testování antimikrobiálních účinků škrobového filmu | 60 |
| 3.2. | Zjištění změny aktivity vody vlivem bakterie <i>B. cereus</i> | 63 |
| 3.3. | UV/VIS Spektrometrie extraktů škrobových filmů | 66 |
| | Spektrofotometrie extraktů škrobových filmů v n-hexanu | 66 |
| | Spektrofotometrie extraktů škrobových filmů v metanolu | 67 |
| | Spektrofotometrie extraktů škrobových filmů do vody..... | 68 |
| | Spektrofotometrie extraktů škrobových filmů do 80% metanolu a čistého etanolu ... | 68 |
| | Extrakce oleje s rozpouštědly..... | 69 |
| 3.4. | Metoda využívající DPPH volný radikál v metanolu | 70 |
| 3.4.1. | Optimalizace..... | 70 |
| | Metoda QUENCHER – přímá extrakce škrobového filmu do roztok DPPH..... | 70 |

| | |
|---|-----|
| Etanolický extrakt škrobového filmu a roztok DPPH v metanolu | 71 |
| 3.4.2. Stanovení antioxidační kapacity vzorků s využitím DPPH v metanolu | 71 |
| 3.5. Metoda využívající DPPH volný radikál v isooktanu | 74 |
| 3.5.1. Stanovení antioxidační kapacity vzorků s využitím DPPH v isooktanu | 74 |
| 3.6. Metoda využívající ABTS volný radikál | 76 |
| 3.6.1. Optimalizace metody | 76 |
| Metoda QUENCHER– přímá extrakce škrobových filmů do roztoku ABTS | 76 |
| Metanolický a etanolický extrakt s roztokem ABTS | 77 |
| 3.6.2. Stanovení antioxidační kapacity vzorků metodou ABTS | 77 |
| 3.7. Porovnání metod využívající DPPH v metanolu a ABTS | 79 |
| 3.8. Infračervená spektroskopie | 81 |
| 3.9. Skenovací elektronová mikroskopie | 84 |
| 4. ZÁVĚR | 85 |
| 5. REFERENCE | 87 |
| 6. SEZNAM PŘÍLOH | 102 |

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

| | |
|---|----|
| Obrázek 1 – strukturní rozdíl mezi amylozou a amylopektinem [9] | 18 |
| Obrázek 2 – plody rakytníku řešetlákového [18]..... | 23 |
| Obrázek 3 – vlevo disková difúzní metoda [21]; vpravo metoda MIC využívající mikrodiluční destičky [22]..... | 24 |
| Obrázek 4 – <i>B. cereus</i> na krevním agaru za tvorby jasné β -hemolýzy [34]..... | 26 |
| Obrázek 5 – <i>St. aureus</i> na Baird-Parker agaru [35] | 27 |
| Obrázek 6 – obarvená bakterie <i>E. coli</i> pozorována pomocí skenovacího mikroskop [36] | 28 |
| Obrázek 7 – <i>C. albicans</i> pomocí barevné transmisní elektronové mikrofotografie [37]..... | 29 |
| Obrázek 8 – morfologie konidiofor u rodu <i>Aspergillus</i> [38]..... | 30 |
| Obrázek 9 – digitální ilustrace <i>A. brasiliensis</i> [39]..... | 31 |
| Obrázek 10 – schéma dělení záření [70] | 40 |
| Obrázek 11 – Lambert-Beerův zákon [75] | 41 |
| Obrázek 12 – schéma UV/VIS dvoupaprskového spektrofotometru [78]..... | 42 |
| Obrázek 13 – princip ATR [81]..... | 45 |
| Obrázek 14 – Michelsonův interferometr [81] | 45 |
| Obrázek 15 – skenovací elektronový mikroskop [87]..... | 46 |
| Obrázek 16 – biodegradovatelné škrobové filmy (nalevo modifikovaný 7% oktenylsukcinátem o koncentraci 0,1 g rakytníkového oleje na 100 g škrobové pasty; napravo nemodifikovaný film o koncentraci 0,2 g rakytníkového oleje na 100 g škrobové pasty) | 47 |
| Obrázek 17 – modifikovaný škrobový film (0,2g rakytníkového oleje /100 g škrobové pasty) na živné půdě M-H zaočkovaný kulturou <i>B. cereus</i> s viditelnou zakalenou inhibiční zónou.. | 62 |
| Obrázek 18 – nezaočkované misky s čistým agarem a škrobovými filmy po pokapání Lugolovým roztokem | 64 |
| Obrázek 19 – misky zaočkované bakterií <i>B. cereus</i> a se škrobovými filmy po pokapání Lugolovým roztokem | 65 |
| Obrázek 20 – spektra n-hexanových extraktů modifikovaných škrobových filmů v různých časech extrakce | 66 |
| Obrázek 21 – spektra metanolových extraktů modifikovaných filmů v různých časech extrakce | 67 |
| Obrázek 22 – vlevo nemodifikovaný škrobový film; vpravo modifikovaný škrobový film, který po extrakci s vodou vytvořil gelovitou suspenzi..... | 68 |
| Obrázek 23 – extrakce oleje do různých rozpouštědel při 25 °C po dobu 24 h..... | 69 |

| | |
|---|----|
| Obrázek 24 – závislost inhibice roztoku DPPH v metanolu na čase extrakce | 71 |
| Obrázek 25 – kalibrační závislost inhibice roztoku DPPH v metanolu na koncentraci standardní látky Trolox..... | 72 |
| Obrázek 26 – optimalizace roztoku DPPH v isooktanu | 74 |
| Obrázek 27 – porovnání metod využívající DPPH volný radikál u nemodifikovaných škrobových filmů | 75 |
| Obrázek 28 – porovnání metod využívající DPPH volný radikál u modifikovaných škrobových filmů | 75 |
| Obrázek 29 – závislost inhibice roztoku ABTS se škrobovým filmem na čase..... | 76 |
| Obrázek 30 – kalibrační graf – inhibice roztoku ABTS v závislosti na koncentraci standardní látky Trolox..... | 77 |
| Obrázek 31 – schéma chemické reakce DPPH a ABTS [55] | 80 |
| Obrázek 32 – porovnání IČ spekter etanolického extraktu oleje, modifikovaného a nemodifikovaného filmu..... | 82 |
| Obrázek 33 – IČ spektrum nahoře etanolu [102] dole škrobu [103]..... | 83 |
| | |
| Tabulka 1 – vliv vodní aktivity na mikroorganismy [31; 40]..... | 34 |
| Tabulka 2 – příprava MALT agaru | 51 |
| Tabulka 3 – příprava M-H agaru..... | 51 |
| Tabulka 4 – zákaly MO použitých pro antimikrobiální testování | 52 |
| Tabulka 5 – průměrné zóny inhibice bakterií, kvasinek a plísni pro nemodifikované filmy ... | 60 |
| Tabulka 6 – průměrné zóny inhibice bakterií, kvasinek a plísni pro modifikované filmy..... | 61 |
| Tabulka 7 – ekvivalentní koncentrace Troloxu na 1 g škrobového filmu nemodifikovaných (0% OSA) a modifikovaných (7% OSA) filmů získané metodou QUENCHER | 73 |
| Tabulka 8 – koncentrace Troloxu ekvivalentní na 1 g nemodifikovaných (0%OSA) i modifikovaných (7% OSA) škrobových filmů získané pomocí metody QUENCHER..... | 79 |

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

A. – *Aspergillus*

ATR – metoda zeslabené reflexe (Attenuated Total Reflection)

a_w – aktivita vody

B. – *Bacillus*

C. – *Candida*

CCM – Česká sbírka mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms)

E. – *Escherichia*

FTIR – spektrometr s Fourierovou transformací

fyz. – fyziologický roztok

IČ – infračervená

McF – stupeň Mc Farlanda

MO – mikroorganismus

OSA – oktenyl sukcinát anhydrid

SEM – skenovací elektronový mikroskop

St. – *Staphylococcus*

TE – Trolox equivalent

UV/VIS – ultrafialová/viditelná oblast

ÚVOD

V posledních letech je výroba a používání plastů a výrobků z nich velmi diskutovaným tématem. Důvodem je znečišťování planety jednorázovými plasty, jako je například PET lahev, jednorázová plastová taška, různé fólie používané na balení potravin atd. V porovnání s papírovým odpadem se plast rozkládá až několik stovek let, a proto dochází k jeho hromadění ve volné přírodě. V médiích se objevují informace o ohrožení mořských živočichů vlivem plastového odpadu. Řešením mohou být plasty s přídavkem složky, která podpoří jejich rozklad v přírodě například vlivem mikroorganismů, vlhkosti, slunečního záření.

Škrobový film obohacený rakytníkovým extraktem, na který se zaměřuje tato diplomová práce, je při relativní vlhkosti 55 % pevný, tvarovatelný a zároveň by díky svému složení mohl být požitelný. Tyto vlastnosti by z něj mohly udělat obal, který by se dal využít například místo obalu na okurky. Jejich balení do plastových fólií se stalo v posledních letech jistým trendem.

Přítomnost mikroorganismů na potravinách a jejich následný vliv na ně by se dal potlačit přidáním antimikrobiální látky do obalu. Škrobový film s různou koncentrací rakytníkového oleje, který má prokázané antimikrobiální účinky, by se dal použít jako obalový materiál a zároveň se mohl potlačit růst bakterií, kvasinek i plísní, které by mohli mít negativní vliv na naše zdraví.

Rakytníkové bobule jsou bohaté na přirozené antioxidanty, kterými jsou fenoly, flavonoidy, askorbová kyselina, tokoferoly, mastné kyseliny, karotenoidy a organické kyseliny a tím by kromě antibakteriálních mohl mít i antioxidační účinky.

Cílem této diplomové práce je prokázat antimikrobiální a antioxidační účinky škrobových filmů. Tyto filmy jsou vyrobeny z bramborového škrobu a obsahují koncentrací rakytníkového oleje, která se pohybuje od 0g do 0,3 g oleje na 100 g škrobové pasty.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. OBALY

Balené výrobky jsou považovány za výrobky vyšší jakosti a jsou spojovány s kvalitou a základní hygienou výrobku [1]. Vzhledem k znečišťování veřejných a přírodních ploch se klade velký důraz na možnost několikanásobného oběhu, opětovného využití nebo případné přepracování obalu, či možnost ekologické likvidace obalu [1]. U některých obalů dochází k přímému kontaktu s potravinami, a aby se zabránilo případnému znehodnocení potravin nebo klamání spotřebitele, vznikly předpisy a nařízení, které se věnují problematice balení potravin [2].

Mezi tyto předpisy patří základní požadavky na obaly, které jsou formulovány v zákoně č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích. V zákoně č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví najdeme hygienické požadavky na obaly, které přicházejí do přímého kontaktu s potravinami. Pokud se budeme bavit o likvidaci obalového odpadu, je zde zákon č. 477/2001 Sb., o obalech. Tento zákon vypovídá o tom, že osoby, které uvádějí obal do oběhu/na trh jsou povinné vydat prohlášení, že tento obal je možné využít i jinak než skládkováním. Zároveň tyto osoby musí splnit povinnost zpětného odběru a likvidace obalu, které byly jimi dány do oběhu. České technické normy, které byly harmonizované, ale i ty neharmonizované, nejsou pro výrobce závazné a výrobci je mohou brát pouze jako doporučení [3].

1.1.1. Materiály pro výrobu obalů

Při balení potravin je využívána celá škála materiálů. Mezi nejpoužívanější obalové materiály patří plast, papír, lepenka, sklo, kov. Použití jednotlivých materiálů se liší dle jeho vlastností. Nejstarším materiálem je sklo. Je charakteristické vyšším obsahem sodíku a vápníku. Čistota, odolnost vůči chemickým vlivům a opětovné použití z něj dělá vhodný materiál například pro výrobu lahví. Mezi kladné vlastnosti skla patří například snadná recyklace, neovlivňuje životní prostředí díky své neutralitě. Nevýhoda je křehkost, vyšší hmotnost, citlivost ke změnám teploty, aj. [1; 3].

Papírové a lepenkové obaly se používají převážně díky dostupnosti suroviny. Takový obal není vhodný pro přímý kontakt s potravinou kvůli vodě, kterou většina potravin obsahuje. Dochází ke zvlčení materiálu a tím se snižuje jeho mikrobiální stabilita a mechanická odolnost. Pro potraviny s vyšším obsahem vody je vhodné kombinovat ho například s hliníkovou fólií nebo plastem. Hlavní složkou je recyklovatelný materiál – papír [1; 3].

Kovové obaly se používají převážně na výrobu plechovek nebo kovových fólií. Důležitou surovinou je ocel, hliník a cín. Výhodou hliníku je například lehkost, měkkost, což se odráží na menší mechanické pevnosti. Cín je používán převážně pro povrchovou ochranu, aby se zabránilo korozi. Hlavní nevýhoda a problém obalů z kovu je jejich koroze [1; 3].

Obaly z plastu jsou stále velmi diskutované, i přesto jsou obaly na bázi polymerů velmi rozsáhlá skupina obalů. Mají charakteristické vlastnosti, díky kterým se odlišují od ostatních materiálů. Nejvýznamnější vlastností je plasticita, která při vyšších teplotách umožňuje snadné tvarování nebo spojování materiálů např. svařováním [1–3].

Od dřeva jako tradičního obalového materiálu se dnes již upouští. Hlavním důvodem je vysoká cena dřeva, vyšší hmotnost, uvolňováním složek dřeva. Stále ale zůstává použití dřeva například pro palety, sudy na víno [3]. Jako obal se dá použít i tkanina nebo požitelné látky [2; 3].

1.1.2. Význam a funkce obalu

Během přepravy, skladování a distribuce může docházet ke znehodnocení potravin biologickými, fyzikálními, ale i chemickými vlivy. Proti znehodnocení a pro prodloužení skladovatelnosti je dobré použít právě vhodný obalový materiál. Vhodnost obalu závisí na mnoha faktorech. Mezi základní požadavky výrobců patří vhodnost pro případné technologické zpracování baleného výrobků. Musí být odolný např. vůči mražení u mražených potravin. Jeho další důležitou funkcí je vytvoření jednotky, která bude přizpůsobena tvarem a požadavkům přepravy. Tím je hlavně pevnost obalu, ale i jeho samotná hmotnost. Na obalovém materiálu najdeme informace, které bývají důležité pro spotřebitele. Zároveň obal musí mít úlohu vizuálně-komunikační – určuje, jaké bude mít výrobek uplatnění na trhu, zda zákazníka upoutá více než jiný produkt a tím u něj vzbudí zájem o koupi. Proto je důležitá i estetická stránka [2; 3]. Pro obal je v neposlední řadě důležitý i postoj spotřebitelů, kam bychom mohli zahrnout například velikost balení – jednorčcová nebo rodinná balení, jednoduchost otevírání, možnost znovu uzavření balení [3].

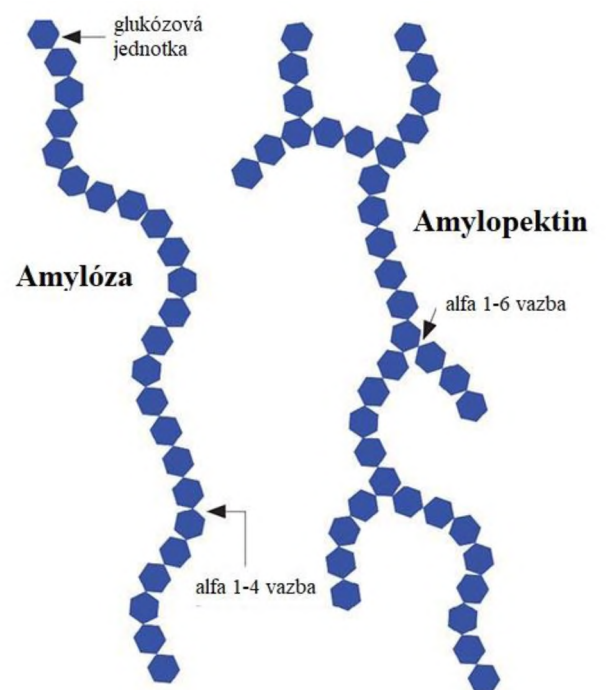
1.2. ŠKROB

Škrob patří mezi nejdůležitější zásobní polysacharidy většiny rostlin a zároveň mezi hlavní energetický zdroj potravin, kde ovlivňuje jejich texturu a vlastnosti. Vzniká jako produkt fotosyntézy zelených částí rostlin [4; 5]. Zde je degradován na rozpustný sacharid, následně transportován a v zásobních orgánech rostlin syntetizován jako škrob. Ten je uložen v amyloplastech¹ v podobě škrobových zrn. Prakticky se škroby dají vyrobit pouze z malého počtu rostlin [2; 6].

Pro nás zajímavé části rostlin, ze kterých lze škrob získat, jsou zrna (kukuřice, rýže, pšenice), nebo z kořenovo-hlízovitých surovin (brambory, batáty) [4]. Škrob získaný ze zrn obsahuje zhruba kolem 20 % vody, na rozdíl od škrobu získaného z brambor [5]. Škrobová zrna lze oddělit v naprosto čisté formě, a to pouhým mechanickým rozdrcením zrn, vypíráním a dekantací na sítích (v případě různé hmotnosti na hydrocyklonech a odstředivkách) [5].

1.2.1. Vlastnosti škrobu a jeho využití

Obecně jsou škrobové částice, zrna, ve volné formě [5]. Suchá látka (škrob) je bílé až nažloutlé barvy, hygroskopická² a je nerozpustná ve vodě s nižší teplotou. Zrna se liší tvarem a velikostí v závislosti na odrůdě, ze které byly získány. Škroby jsou tvořeny dvěma frakcemi, lineární amylozou (ve vodě rozpustná složka škrobu [7]) a větveným amylopektinem (ve vodě nerozpustná složka [7]) (základní rozdíl je vidět vpravo na obrázku 1). Množství je proměnlivé v závislosti na typu škrobu [5]. Tyto polymery mají stejnou základní strukturu, která se liší délkou a stupněm větvení [8]. Poměr jednotlivých frakcí určuje vlastnosti škrobu. Mezi důležité vlastnosti, které se používají v potravinářství, patří mazovatění a retrogradace [5].



Obrázek 1 – strukturní rozdíl mezi amylozou a amylopektinem [9]

¹ plazmid shromažďující škrob

² pohlcuje nebo udržuje vlhkost

Mazovatění neboli želatínace je proces, kdy nepoškozená škrobová zrna, která jsou ve studené vodě nerozpustná a tvoří jakousi suspenzi, po zahřevu absorbují množství vody, aniž by se měnil objem a tvar zrn. Toto se děje až do určité teploty, která se nazývá želatinační teplotou, během které začínají zrna bobtnat. Tato teplota se liší v závislosti na škrobu, poměru škrob: voda, pH, prostředí a dalších [6]. Na rozdíl od bobtnání, kdy se jedná o vratný proces, je želatínace škrobových zrn nevratná [6]. V důsledku hydratace a uvolnění amylozy vzniká při dostatečné koncentraci škrobu škrobový maz. Z toho se po ochlazení stává škrobový gel. Pokud nebyl tento roztok škrobu dostatečně koncentrovaný, vzniká škrobová pasta [6].

Pokud dochází ke skladování gelů po delší dobu při nízkých teplotách, dochází k procesu, který se nazývá *retrogradace*. Během té se mění struktura gelu i samotné vlastnosti. Gely a koncentrované pasty získávají gumovitou texturu a vyšší pevnost, v důsledku interakce mezi dvěma nebo více řetězci amylozy a tím se omezují vazebná místa, na které by se mohla poutat voda. V případě méně koncentrovaných škrobových past dochází ke srážení, kdy následným vylučováním vody získáme dvoufázový systém kapalina–pevná látka [6]. Tyto vlastnosti souvisejí s vlastnostmi amylozy a tento proces, proces retrogradace, je děj opačným želatínace [6]. Retrogradace je ovlivněna mnoha faktory. Jsou jimi například příliš nízká teplota, nebo naopak teplota vyšší, množství vody ve škrobovém gelu. Stupeň retrogradace je potlačen, pokud jsou v gelu přítomny soli, cukry nebo i lipidy [6].

Samotná technologie získávání škrobu závisí na výchozí surovině [4; 5]. Následně izolovaný škrob má široké využití – váže vodu, čehož se využívá například při zahušťování, zajištění šťavnatosti výrobku nebo proti tvorbě hrudek. Bramborový škrob se v potravinářském průmyslu využívá především kvůli čirosti škrobových mazů, neutrální chuti a v neposlední řadě, protože neobsahuje lepek. Kromě potravinářství nachází využití i v papírenském, textilním a oděvním průmyslu. V potravinářství jsou škroby bezkonkurenčně nejlevnější a dostupné ve všech zemích. Zároveň je můžeme modifikovat, čímž upravujeme jeho vlastnosti. V hydrolyzovaném stavu, ve formě sirupu, je surovinou pro nápojový průmysl [2].

1.2.2. Modifikace škrobu

Modifikace škrobu je jeho úprava pomocí fyzikálních či chemických reakcí. To způsobí, že je škrob přizpůsobený pro specifickou aplikaci nebo se zvýší jeho stabilita a tím dojde ke zlepšení vlastností použitelnosti [4]. Chemickou cestou získáme například degradované škroby, škroby oxidované, termicky upravené a extrudované škroby. Mohou sem být zařazeny i jeho deriváty. Nevýhoda chemicky modifikovaných škrobů je v tom, že jsou velmi drahé a nepovažují se za přirozené na rozdíl od fyzikálních modifikací [2; 10].

V závislosti na druhu změn můžeme modifikované škroby rozdělit na dvě velké části. První z nich jsou *rozštěpené škroby*. Ty se připravují celou řadou způsobů například termickým způsobem, mechanickým působením, zpracování polysacharidu kyselinou, oxidačními činidly. Zde dochází k rozštěpení glykosidových vazeb, někdy se štěpí i jiné chemické vazby. Polysacharid se zmenšuje, mění se jeho molekulová hmotnost a vznikají nové skupiny a mezimolekulové vazby. Struktura škrobu se nezmění, pouze občas může dojít k poruše struktury zrna a tím pádem vzniká druhotná struktura. Patří sem hydrolyzované, oxidované, ozářené škroby a dextriny [4]. Druhou skupinou modifikovaných škrobů jsou *substituované škroby*. Glukózové zbytky, které obsahují reaktivní alkoholové skupiny, reagují s organickými a anorganickými sloučeninami. Vznikají tak substituované škroby jako jsou etery, estery, estery škrobů. Zavedením i malého množství anorganických nebo organických sloučenin se mohou velmi podstatně změnit vlastnosti škrobu [4].

Jiná literatura rozlišuje modifikované škroby na *přeměnné*, kam patří škroby získané z nativních kyselou hydrolyzou, oxidací nebo záhřevem. U *zesítěných* škrobů se můžeme bavit o dvou typech příprav. První je pomocí reakce škrobu s adipanhydridem, kdy nám vzniká první skupina zesítěných škrobů adipáty. Reakcí s oxychloridem fosforečným nám vzniká druhá skupina fosfáty. Substitucí některých hydroxylových skupin polysacharidů připravuje škroby *stabilizované*, do kterých patří estery a ethery škrobů. Poslední skupinu zde tvoří *jinak modifikované*, kdy zvyšujeme dodatečnými modifikacemi funkčnost již modifikovaných škrobů. To zahrnuje zpravidla kombinaci modifikací. Další možnost je modifikace pomocí enzymů jako jsou pullulanasy, amylopektinu a dextrinů. Tyto škroby pak mohou bobtnat ve studené vodě/mléce a mohou se využívat například pro přípravu pudingu za studena [6].

Mezi všeobecné požadavky na modifikované škroby patří: *a) stabilita* vůči vlivu teploty. Potravina podléhá vyšším teplotám během sterilace, pečení nebo vaření. Naopak nižším teplotám bývá vystavena, pokud dochází ke zmrazování. Dále musí být modifikovaný škrob stabilní vůči mechanickému namáhání, jako je například mísení, homogenizace nebo během

plnění do obalů. V neposlední řadě musí být modifikovaný škrob stabilní vůči vlivu chemickému, kam patří zejména vliv kyseliny. Musí *b) bránit dělení fází*. Měl by bránit vločkování, koagulaci, synerezi (během té dochází uvolňování séra např. ze syrovátky) a nesmí retrogradovat, *c) musí tvořit čiré gely a pasty* a v případě potřeby musí mít *d) zahušťující schopnosti* [5].

1.3. BIODEGRADOVATELNÉ OBALY

Degradovatelné obaly obsahují ve své struktuře iniciátory, které se za určitých vnějších podmínek rozpadají na látky, které jsou součástí biosféry. Degradování obalu může být způsobeno vlivem slunečního světla, vodou, vzduchem, kyslíkem, případnými mikroorganismy, nebo pomocí mechanické degradace, která může být způsobena větrem [1]. Tyto filmy mohou být nosičem funkčních složek – antimikrobiální a antioxidační vlastnosti [11]. Jak již bylo zmíněno, má škrob různý poměr množství amylozy a amylopektinu. To závisí na rostlině, ze které je získáván, a následně poměr těchto složek charakterizuje materiál a určuje finální vlastnosti. Už dříve byly sledovány materiály s přídavkem škrobu, jelikož je biologicky rozložitelný, má velkou dostupnost a náklady na pořízení jsou velice nízké (bramborový škrob je možné pořídit zhruba za 60 Kč/kg)³. U těchto materiálů se prozatím sledovala hlavně jejich biodegradovatelnost. Granulovaný škrob se přidával jako funkční aditivum, během vlastního procesu zpracování polymeru [1; 12].

Baldev Raj ve své studii prohlašuje, že biodegradovatelné plasty byly již obchodně využity například v pytlích do odpadkových košů, u kompostovacích pytlů na odpady, atd. Přirozeně dostupný škrob jako plnič polyethylenu o nízké hustotě splňuje požadavky na tepelnou stabilitu. Plastový film s přídavkem kukuřičného škrobu, který byl použit místo klasické plastové fólie na balení potravin, neměl nepříznivé účinky na jakost potravin nebo na jejich bezpečnost. To by mohlo znamenat zvýšení využití škrobu [7].

Škrob splňuje všechny hlavní aspekty, díky kterým je vhodným materiálem pro jedlé povlaky [8]. Jak již bylo zmíněno, jeho velkou výhodou je snadná dostupnost, vysoký výtěžek extrakce, biologická rozložitelnost a biokompabilita. Jako obalový materiál upoutal pozornost u akademiků ale i v průmyslu. V praxi jsou pak tyto obaly bez zápachu, bez chuti, bezbarvé, netoxické, biologicky vstřebatelné, polopropustné například pro vlhkost, nebo kyslík [8].

³ informace dostupná k dubnu 2020 (Bramborový škrob od firmy Amylon - <https://www.puritas.cz/bramborovy-skrob-jemny--500g-amylon/>)

Škrobový film se stal diskutovaným materiálem pro již existující výzvy, které jsou spojeny s obalovým materiálem. Vedou ke zvýšení trvanlivosti, kvality a bezpečnosti potravin. Byly vyvinuty různé metody modifikace pro výrobu filmů. Tento film vykazoval vynikající tvarovací vlastnost díky přidání aditiv – ty vytvoří pružnější materiál [8]. Zároveň bylo již v minulosti zjištěno, že obsah amylozy je zodpovědný za tuhost a pevnost filmů. Proto kukuřičný škrob, který má vyšší obsah amylozy než třeba bramborový, vytváří silnější a tužší filmy než ostatní škroby. Jsou zároveň křehké a přirozeně hydrofilní, čímž by mohl ovlivnit balený potravinový produkt. Tyto vlastnosti se dají změnit přidáním změkčovadel jako je například sorbitol, glykol, glycerol a polyethylen. Vhodné změkčovadlo pro škrobové filmy bývá glycerol kvůli své kompatibilitě s amylozou. Fólie z měkčeného škrobu, konkrétně s přítomností glycerolu, hrají významnou roli pro lepší zpracovatelnost filmů [11].

1.4. RAKYTNÍKOVÝ OLEJ

Trnitý keř rakytník rešetlákový (*Hippophae rhamnoides*) vyrůstá do výšky až 7 m [13]. Tento keř toleruje sucho, mráz i znečištěné ovzduší. Rostlina má dlouhé kopinaté listy pokryté stříbrnými chloupky. Produkuje velké množství zelených a hnědých květů, ze kterých se po období květu stávají chutné a výživné bobule. Tyto bobule (obrázek 2) jsou malé, mají žlutou až tmavě oranžovou barvu a dozrávají až v září [13–15].

Výroba rakytníkového oleje je složitá. Získává se lisováním částí rostlin za studena – nejčastěji to jsou semena nebo plody rakytníku. Kvůli ochraně plodů před zvířaty je rostlina obklopena ostrými trny. Z tohoto důvodu je snazší odříznout celou větev a následně až sebrat bobule. Ty jsou dále čištěny např. vodou. Naopak oddělování nečistot pomocí otřesů nebo kartáčování by mohlo kontaminovat bobule ještě před tím, než dojde k procesu extrakce [16]. Extrakcí je možno získat i menší množství cenných látek, které jsou obsaženy v bobulích nebo semenech. Používá se několik technik [17]. Tradiční způsob byl namáčení bobulí do rozpouštědel (např. hexanu [17]), která ale mohou mít nežádoucí účinek na složení olejů, tzn. že některé výhody získaného oleje se tak mohou ztratit a v neposlední řadě může dojít k ohrožení zdraví konzumenta [16]. Naopak bezpečnější je extrakce nadkritickým CO₂ [17]. K oxidu uhličitému, který je zkapalněn pomocí vysoké teploty a vysokého tlaku, se přidají bobule nebo semena. Pomocí nadkritického oxidu uhličitého z nich dostaneme olej s obsahem veškerých potřebných a zdraví prospěšných složek [16].

Tato rostlina má velké množství účinných látek, bylo identifikováno zhruba 100–200 složek [13] (např. volné mastné kyseliny, estery, alkany, antioxidanty, velké množství vitamínů,

hlavně vitamin C, flavonoidy, polyfenoly, polysacharidy, velké zastoupení mají i karotenoidy a minerály) [13–15]. V samotných bobulích bylo identifikováno asi 14 vitamínů [13]. Díky tomuto skvělému složení poskytuje řadu výhod a zároveň je vhodný na vnitřní i vnější použití, proto se hojně využívá v kosmetice nebo i medicíně [13; 14]. Tento olej zlepšuje krevní oběh, usnadňuje okysličování kůže, odstraňuje přebytečné toxiny z těla. Dále chrání před infekcemi, zabraňuje alergiím, eliminuje záněty a zpomaluje proces stárnutí [14].

Rakytník lze konzumovat ve formě zavařeniny, čaje, sirupu, džusu, výše zmíněného oleje nebo ho lze konzumovat i v syrovém nebo vysušeném stavu.



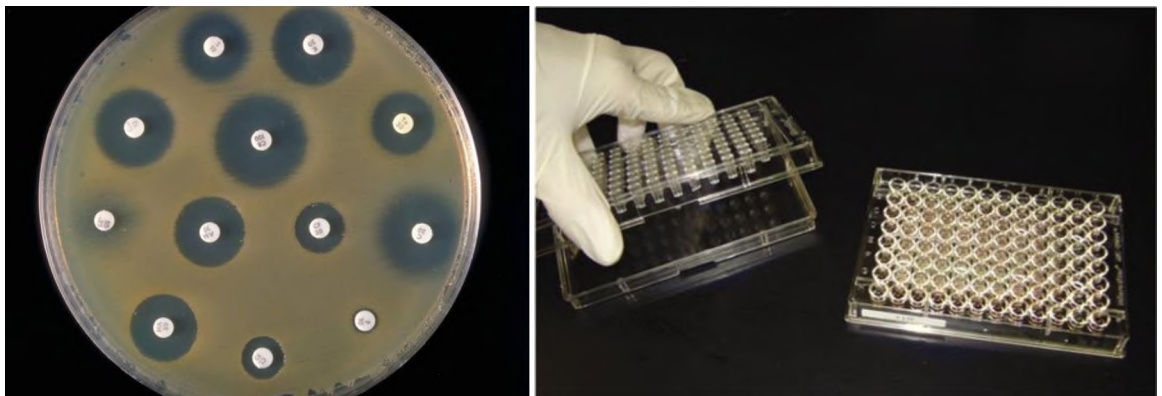
Obrázek 2 – plody rakytníku rešetlákového [18]

1.5. ANTIMIKROBIÁLNÍ TESTOVÁNÍ

Poměrně velká část infekčních chorob jsou bakteriálního původu. Společně s objevem laboratorních metod, které stanovují vhodné půdy pro růst těchto mikroorganismů, je potřebné stanovit i citlivost a odolnost patogenů k širokému spektru antimikrobiálních látek. To pak například ve zdravotnictví pomáhá v zahájení léčby pacientů [18].

Testování citlivosti na antimikrobiální látky je doporučeno provést u každého mikroorganismu podílejícího se na infekci [19]. Testy citlivosti jsou doporučeny i v případě, že by se mohlo jednat o mikroorganismus, který může vykazovat odolnost k antimikrobiálním látkám, které jsou běžně používány. K tomuto testování lze použít diskovou difúzní metodu a metodu minimální inhibiční koncentrace (MIC) [18] (metody pro představu zobrazené na obrázku 3). Další použitelnou metodou může být například E-test [20].

Veškeré tyto metody bez ohledu na to, která to je, musí být provedeny v souladu s postupem, který je mezinárodně uznávaný [20]. U diskové difúzní metody je postup následující: příprava standardizovaného inokula z bakteriální kultury, kde vybereme dobře izolované typické kolonie. Dále vytvoření bakteriální suspenze pomocí zákalové stupnice podle McFarlanda. Takto připravené suspenze se následně inokulují na vhodné růstové médium (Mueller Hinton agar). V případě diskové difúzní metody se přidávají ještě před inkubací antimikrobiální disky. Po inkubaci, která probíhala s ohledem na typ patogenu, se změří zóna inhibice a následně se interpretují výsledky testování [18].



Obrázek 3 – vlevo disková difúzní metoda [21]; vpravo metoda MIC využívající mikrodiluční destičky [22]

Disková difúzní metoda je jednou z nejstarších metod. Tím, že je univerzální pro testování většiny bakteriální patogenů, především k citlivosti na antibiotika, zůstává nejrozšířenější v klinických a mikrobiologických laboratořích [23].

Postupy pro antimikrobiální testování jsou publikovány Institutem pro klinické a laboratorní standardy (CLSI) anebo Evropským výborem pro testování antimikrobiální susceptibility (EUCAST). Tyto postupy jsou často aktualizovány [20]. V České republice stanovuje kvantitativní zkušební metody ke zjišťování antimikrobiálního účinku antibakteriálně upravených textilních výrobků a netkaných textilií mezinárodní norma ČSN EN ISO 20743 [24].

1.5.1. Testované kmeny bakterií

1.5.1.1. Rod *Bacillus*

Termín „bacillus“ je latinský výraz pro tyčinku, a proto původně tento rod zahrnoval všechny bakterie, které měly tyčinkovitý nebo válcovitý tvar. Nyní se rod *Bacillus* (*B.*) skládá ze sporotvorných, gram pozitivních peritrichních tyčinek [25–27]. Některé kultury se mohou spolu se stářím změnit v gram negativní, a proto tento rod řadíme například spolu s rodem *Clostridium*, mykobakteriemi aj. do gram variabilních [28–30].

Obecně je tento rod v přírodě velmi rozšířený, neboť zahrnuje aerobní i fakultativně anaerobní druhy. Má pozitivní katalázu, tvoří dlouhé paličky, které mohou být spojeny v řetězky [26]. Díky bohatému enzymovému vybavení většina druhů pak dokáže štěpit škrob, rostlinné pektiny. Velmi aktivní je i proteolytický enzym, který hraje důležitou roli při rozkladu bílkovin aerobním i anaerobním způsobem. Řada druhů produkuje antibiotika např. bacitracin, polymixin B (*B. polymyxa*). Tato antibiotika mají polypeptidovou povahu. Tvorba slizovitých pouzder některých druhů může způsobovat nitkovitost pečiva. Za to enzymy získané z některých druhů jsou uplatňovány například v pivovarnictví, textilním průmyslu (amylasy získané z *B. subtilis*) nebo například jako přísada do pracích prostředků (proteinasy) [27].

Optimální podmínky pro růst bakterií rod *Bacillus* je v teplotním rozmezí 30–33 °C [31] při pH 5,5–8,5 [26]. Přijatelná optimální teplota je i 37 °C. Teplotní rozmezí růstu je ovšem už od 5 °C až k 50 °C [31]. Toto rozmezí nelze přesně určit. Záleží na druhu bakterie a zároveň je růst ovlivňován mnoha faktory, mezi které patří například pH, vodní aktivita atd.

Z potravinářského hlediska je *B. cereus* jednou z nejdůležitějších bakterií tohoto rodu. Je fakultativně anaerobní a na krevní agaru tvoří zónu β-hemolýzy. Tu můžeme vidět na obrázku 4. Jeho bakterie jsou poměrně velké v porovnání s *B. subtilis*, pod mikroskopem ve visuté kapce pohyblivé. V případě, že je bakterie vystavena stresujícím podmínkám prostředí, vytváří uvnitř buňky endospory, které jsou umístěny centrálně v buňce a k jejich vyklíčení není nutný tepelný šok. [1; 26; 32] Spory produkované touto bakterií jsou důležitým ukazatelem při onemocnění způsobeném potravinami. Jsou sice méně odolné než například u kmene

Clostridium perfringens. Mohou být zničeny již při 100 °C za 5–30 minut [25]. Některé kmeny tvoří tak odolné spory, že snesou vysoké teploty, toxické chemikálie, UV záření i dávku ionizujícího záření [26; 31; 33].

Patří k toxigenním mikroorganismům, neboť na polysacharidových substrátech produkuje toxiny, které mohou kazit potraviny a následně vyvolat otravu u konzumenta. Na intoxikaci bakterií *B. cereus* je potřeba poměrně velký počet buněk [26; 31]. Vyskytuje se v každodenním jídle jako je například rýže, mléko, nudle [33]. K vyvolání chorobných stavů dochází poměrně brzy, v závislosti na přítomném toxinu. U emetického toxinu, který je termostabilní, se projevy otravy projeví už za 1–5 h v podobě nevolnosti a zvracení („emetický“ = vyvolávající zvracení) [26; 31]. U otravy diarhogenním toxinem můžeme po 8–16 h pozorovat bolesti v břiše, nutkání na stolici až průjem („průjmový syndrom“). Intoxikace ať jedním, nebo druhým toxinem má ve většině případů krátký a lehký průběh, a proto povětšinou uniká pozornosti [25; 27; 31].

Prevencí proti intoxikaci je řádný sanitační režim. Vzhledem k faktu, že tato bakterie je všudypřítomná, v malé míře je kontaminovaná většina poživatin. Proto je důležité, aby potraviny/ suroviny nebyly uchovávány při pokojové teplotě a po prohřátí byla rychle schlazena a uložena v chladničce. Tím zabráníme vyklíčení spor, které mohly prohřátí, popř. var přežít, a tudíž i masivnímu pomnožení *B. cereus* [31].

Pro průkaz a stanovení počtu bakterie *B. cereus* v potravinách, krmivech a pro vzorky z potravinářského prostředí se dle normy ČSN EN ISO 7932 využívá speciální půda MYP agar (Mannitol egg Yolk Polymyxin agar), který obsahuje žloutkovou emulzi a polymyxin-B-sulfát [31], což způsobí, že kolonie této bakterie jsou zbarvené do růžova a mají velkou zónu precipitátu. Je zde vidět charakteristický růst a zároveň je zde i průkaz hemolýzy.



Obrázek 4 – *B. cereus* na krevním agaru za tvorby jasné β -hemolýzy [34]

1.5.1.2. Rod *Staphylococcus*

Staphylococcus aureus je v lidské populaci velmi rozšířeným, proto ho můžeme řadit mezi nejdůležitější patogenní druh rodu *Staphylococcus* (*St.*). Je to gram pozitivní malá kokovitá buňka. Pod mikroskopem může být viděn spojen do nepravidelných útvarů – shluků, které připomínají hrozny [25]. Tento rod je nepohyblivý, schopný růst za aerobních i fakultativně anaerobních podmínek, což znamená, že dokáže zkvašovat cukry za tvorby kyselin a fermentuje glukózu [1; 27; 30]. Má široké rozmezí růstu od 6,5 až do 45 °C při pH 4–10, ale optimum má okolo 37 °C. Tyto kmeny jsou tolerantní k nízkým aktivitám vody a tím pádem i k solím (až 10% NaCl [27]) a přežívají i 11% alkohol, čehož se využívá pro inhibici doprovodné mikroflóry. Katalázový test vykazuje silně pozitivní reakci a díky svým enzymům koaguluje krevní plazmu [1; 25; 26; 30].

St. aureus neboli také zlatý stafylokok způsobuje angínu, hnisavá onemocnění aj. Zdrojem infekce může být i zdravý jedinec tzv. bacilonosič (na pokožce, v nosohltanu) kdy stačí pouhé zakašláni nebo kýchnutí. V případě, že dojde ke kontaminaci potravin, původce otravy nejsou živé buňky kmene, ale jeho vytvořený enterotoxin [25; 27; 31], který dokáže přežít var po dobu 30 minut. Vytvořený enterotoxin je produkován uvnitř neporušené buňky a následně je uvolňován do potravin. Stafylokokové enterotoxikózy mohou způsobit vážná onemocnění nebo až smrt [25–27; 31].

Rizikové potraviny jsou hlavně ty, které se teplem již nepracovávají, jako jsou majonézy, saláty [27]. Příznaky otravy se projevují poměrně brzy po požití potravin, zhruba do 6 hodin. Intoxikace má ve většině případů lehký průběh – zvracení, nevolnost, průjem, bolest břicha. Toto však odezní během jednoho až dvou dnů [25; 27; 31].

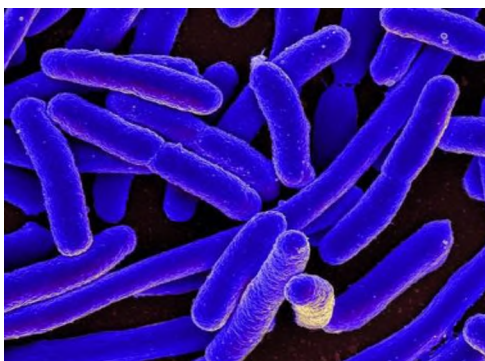
Dle normy ČSN EN ISO 6888-1 je arbitrážní půda, která se používá pro stanovení koaguláza-pozitivních stafylokoků, Baird-Parker s vaječnou emulzí [1; 30]. Zde dochází k redukci teluričitanu na telurid, čímž dostaneme typické černé lesklé kolonie, které mají zónu projasnění jako tomu je v případě na obrázku 5. Chlorid litný a telurid draselný inhibuje doprovodnou mikroflóru.



Obrázek 5 – *St. aureus* na Baird-Parker agaru [35]

1.5.1.3. Rod *Escherichia*

Rod *Escherichia* (*E.*) se řadí do čeledi *Enterobacteriaceae* konkrétně mezi koliformní mikroorganismy. Vzhledem k faktu, že se bakterie *Escherichia coli* běžně vyskytuje ve stolici a tím pádem i ve spodní části trávicího traktu lidí a zvířat, je brána jako indikátor fekálního znečištění [30]. Díky výskytu ve výkalech jsou tyto bakterie rozšířené i ve volné přírodě. Jedná se o gram negativní fakultativně anaerobní tyčinky, které se dají pozorovat například pomocí elektronového mikroskopu [26], jako tomu je na obrázku 6. Oxidázový test vykazuje negativní reakci, katalázový pozitivní. Jako ostatní koliformní bakterie fermentuje laktózu za tvorby organických kyseliny a plynů, méně často se vyskytuje kmen, který štěpí laktózu pomaleji nebo vůbec, čehož se využívá pro odlišení od *Salmonel*. Je používána jako indikátorový mikroorganismus sanitace, hygienických a technických požadavků [1; 26]. Má široké rozmezí růstu (0–10 °C), optimální teplota okolo 37 °C a pH, které je blízké neutrálnímu [30].



Obrázek 6 – obarvená bakterie *E. coli* pozorována pomocí skenovacího mikroskop [36]

E. coli je nejprozkoumanější mikrobiálním druhem. Vedle ní rozlišujeme ještě enteropatogenní *E. coli*, jejíž kmeny způsobují různé typy chorob zažívacího traktu.

Stanovení koliformních mikroorganismů v potravinách se řídí dle normy ČSN ISO 4832. Zde se provádí stanovení pomocí půdy VČŽL. Ta obsahuje krystalovou violet, neutrální červeně, žlučové soli a laktózu. V případě, že odhadujeme nízký počet mikroorganismů ve vzorku, je možno využít metodu MNP (Most Probable Number). Ta se provádí dle normy ČSN ISO 4831.

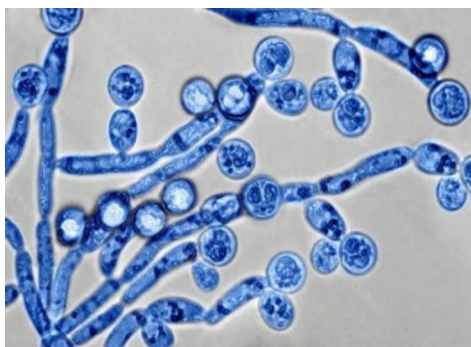
1.5.1.4. Rod *Candida*

Kvasinky se společně s plísněmi v přírodě nacházejí zcela přirozeně. Jsou často vzdušnou kontaminací nebo je můžeme najít na ovoci a květním nektaru. Potřebují ke svému růstu sacharidy nebo materiály obsahující cukry a mohou růst i za nepřítomnosti vzduchu [1]. Pro kvasinky tohoto druhu je charakteristická tvorba pseudomycelia a pravého mycelia na vhodných živných půdách [27].

Kvasiny se všeobecně rozmnožují pomaleji než bakterie. Proto se vyskytují za podmínek, které jsou pro bakterie nevýhodné. Na rozdíl od bakterií je můžeme najít hlavně při kažení kompotů, ovocných moštů, slazených minerálních vod. Rozmnožování kvasinek je závislé na fyziologických vlastnostech, například potřebě cukru, odolnosti ke kyselému prostředí. Výskyt kvasinek ovlivňuje také nízká tepelná odolnost [27]. Kdy pro kvasinky je většinou optimální teplota růstu v rozmezí 22–25 °C. Dají se najít i druhy, které rostou při nižších nebo naopak vyšších teplotách [31].

Rod *Candida* (*C.*) obsahuje až 160 druhů. Je nejrozsáhlejším rodem kvasinek, které se nazývají nepravými kvasinkami, kvasinkovitými mikroorganismy. Není u nich známa tvorba pohlavních spor, rozmnožuje se pučením, kdy z rodičovské buňky vznikají buňky dceřinné [26; 27]. Některé druhy se využívají například k přípravě krmného droždí. Rod *Candida* zahrnuje kmeny podmíněně patogenní, ale také i patogenní kmeny, které mohou být nebezpečné pro člověka. Mezi podmíněně patogenní patří především *Candida albicans*. Nepatogenní druh tohoto rodu se vyskytuje jako nežádoucí kontaminace pekařského droždí [27].

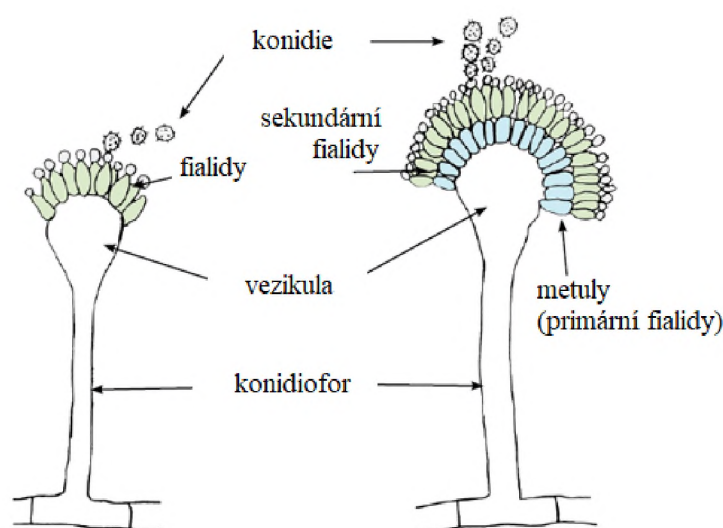
C. albicans (obrázek 7) může způsobovat onemocnění, které se nazývá kandidóza. Objevuje se převážně na kůži a nehtech lidí, kteří pracují s půdou, nebo ovocem a cukernými nálevy. Kandidóza se mohou objevit i uvnitř těla jedince a postihovat i sliznici úst, dýchací cesty, u žen může způsobovat i vaginální infekce. Ty vznikají především u oslabených jedinců a pokud nejsou včas rozpoznány mohou vést až ke smrti jedince [26; 27].



Obrázek 7 – *C. albicans* pomocí barevné transmisní elektronové mikrofotografie [37]

1.5.1.5. Rod *Aspergillus*

Plísně na rozdíl od kvasinek jsou přísně aerobní a nejsou náročné na živiny a mohou se rozmnožovat i za podmínek, které nejsou pro bakterie a kvasinky dostačující např. v potravinách s nižším obsahem vody [1]. Rod *Aspergillus* (*A.*) je mezi plísněmi velmi rozšířený. Rozmnožuje se vegetativně pomocí konidií, které vznikají v řetězcích z fialid (morfologie je viditelná na obrázku 8). Na Petriho miskách můžeme pozorovat chlupaté až vatovité kolonie, které jsou nápadně zbarvené vrstvou spor (obvykle se jedná o černou, hnědou, zelenou, žlutou až bílou barvu) [26].



Obrázek 8 – morfologie konidiofor u rodu *Aspergillus* [38]

Tento rod má velmi bohaté enzymové vybavení (proteolytické, amylolytické, pektolytické). Některé druhy jsou vhodné pro přípravu enzymů, které se dále používají v potravinářství – pivovarský, konzervářství při přípravě ovocných šťáv; nebo při výrobě pracích prášků [27]. Mykotoxiny⁴, které tvoří plísně, jsou rozmanitější než toxiny vytvořené bakteriemi. Mezi nejnebezpečnější patří aflatoxiny, které jsou tvořeny druhy *A. flavus* a *A. parasiticus*. Nejčastěji je najdeme například na arašidech a sóje [27]. Dále se mohou vyskytovat na kukuřici, v kakau, koření, různých druzích ořechů. Aflatoxiny je možno nalézt i v mléce a výrobcích z mléka. Zde se vyskytuje především aflatoxin M [31]. Tento toxin způsobuje vážná onemocnění, zejména rakovinu jater u drůbeže [27] nebo poruchy centrální nervové soustavy včetně postižení periferních nervů [31]. Veškeré plísně, které jsou schopny tvořit mykotoxiny, můžeme použít označení „potenciálně toxigenní plíseň“ [31].

⁴ toxické sekundární metabolity, které jsou produkovány plísněmi, za určitých podmínek

Na obrázku 9 můžeme vidět digitální ilustraci plísňe *A. niger*, která byla překvalifikována na *A. brasiliensis* [39]. Černá barva konidií chrání plíseň před nepříznivými vlivy slunečního světla [27]. Má velmi široké rozmezí pH pro růst, kdy jako optimální pH pro růst se považuje 3,0–8,0. Přežívá a dokáže se rozmnožovat i v extrémně kyselém prostředí (kolem 1,2) anebo silně alkalickém (okolo 11,0) [27]. Jeho vlastností se využívá na výrobu kyseliny citrónové kvasnou cestou. *A. brasiliensis* produkuje antibiotika, které kvůli své vysoké toxicitě nenašla uplatnění v medicíně [27]. Některé kmeny *A. niger* produkuje mykotoxiny – ochratoxiny. Ty mohou u různých druhů zvířat vyvolat nefrotoxicitu (toxické onemocnění ledvin) a renální nádory, což jsou primární zhoubné nádory ledvin. Na základě toho jsou po jejich konzumaci potenciálně nebezpečné pro lidské zdraví [39].

Tato plíseň může být příčina některých případů pneumonie. Může způsobovat černé plísně, které najdeme na vnitřní straně nějakých potravin, například meruněk, cibule, hrozny atd. a tím způsobují kažení potravin [39].



Obrázek 9 – digitální ilustrace *A. brasiliensis* [39]

1.6. AKTIVITA VODY

Voda je velmi významnou složkou potravin. Ovlivňuje jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a podílí se na změnách, které se odehrávají v potravinách [40]. Než samotný obsah vody je pro změny v potravinách důležité i to, jak je voda dostupná (jak je vázaná v potravine). Voda, která je vázaná pevně je méně dostupná než voda, voda slabě vázaná nebo volná voda. Míru dostupnosti je aktivita vody [6; 40].

Aktivita vody označována jako a_w se používá jako veličina pro odhad chemické a mikrobiální stability potravin. Aktivita vody je dána vztahem (1):

$$a_w = \frac{p_w}{p_{w0}} \quad (1)$$

kde p_w je parciální tlak vodní páry nad roztokem nebo potravinou; p_{w0} je parciální tlak vodní páry čisté vody stejné teploty. Tato hodnota je bezrozměrná, závislá na teplotě a pohybuje se v rozmezí hodnot 0 (minima) až 1 (maxima) [6; 40]. Aktivita vody nemá lineární vztah k procentuálnímu obsahu vody v sušině [31].

Metody pro stanovení aktivity vody jsou rozděleny podle toho, zda daná laboratoř požaduje jednoduché stanovení a_w a tím pádem si vystačí s jednodušším přístrojem, nebo zda se jedná o laboratoř, který vyžaduje specializované přístroje. Metody, které vyžadují pouze jednoduché laboratorní přístroje, mají nevýhodu v omezeném počtu měření a před každým měření musí dojít k vytvoření rovnováhy [41].

Vlastní měření může tak probíhat pomocí a_w – metrů. Ty měří na základě různých principů. Jedním z nich může být měření teploty rosného bodu. Zde během uzavření vzorku do prostoru se stálou teplotou dochází k nasycení. Tímto prostorem poté prochází paprsek, který se odráží od zrcátka. Při snížení teploty dochází ke kondenzaci vlhkosti, zamlžení zrcátka, čímž je způsobeno, že paprsek prochází jinak. Pomocí tabulek je poté odečtena teplota rosného bodu. Gravimetrická metoda, kdy se sledují změny obsahu vody a aktivita vody je odečítána na základě sorpčních izoterm, které jsou připraveny pro daný materiál. Dalším častějším měřením může být elektrochemické metoda, kdy je sledována vlhkost. Tyto elektroměry jsou vodivostní nebo kapacitní. Méně využívaná je metoda manometrická, kdy se měří tlak vodní páry ve vakuovaných nádobách [40].

Obsah vody v potravinách můžeme určit pomocí sorpčních izoterm, která nám vyjadřuje závislost obsahu vody na její aktivitě.

Dle vlhkosti okolí a teploty dochází k desorpci a sorpci vody a tím dochází ke změnám obsahu vody v potravinách. Například aktivita vody při konstantním obsahu vody v potravine roste se zvyšující se teplotou tzn, že pokud se teplota zvýší o 10 °C, způsobí to nárůst a_w o

hodnotu 0,03–0,20. To může mít za následek zhoršení stability potravin balených potravin. Mohou se zde například pomnožovat nežádoucí mikroorganismy nebo může dojít k nežádoucím reakcím [6; 40; 42]. Větší přídavek soli nebo cukru do potraviny, má konzervační účinky. V tomto případě procento vody zůstává stejné, ale osmoticky vázaná voda se stává pro mikroorganismy nedosažitelná [31].

1.6.1. Vliv a_w na mikroorganismy

Znalost a_w potravin je důležitá, abychom mohli zjistit, zda bude potravina náchylná k případným mikrobiálním změnám. To má za následek, že dokážeme určit trvanlivost, skladovatelnost a také zdravotní nezávadnost potravin [31]. Potřeba vody může být u MO vyjádřena rozmezím a_w prostředí, ve kterém se může daný MO rozmnožovat. Při poklesu vodní aktivity dochází k zástavě jejích životních pochodů, proto při znalosti aktivity vody, která je pro daný MO limitující, a aktivita vody potraviny můžeme určit jaké skupiny MO očekávat v dané potravine, zda dojde k poklesu nebo vzestupu růstu MO. V tabulce 1 můžeme vidět hodnoty aktivit, které jsou limitující pro růst MO a některé druhy živin v závislosti na aktivitě vody.

Tabulka 1 – vliv vodní aktivity na mikroorganismy [31; 40]

| a_w | projev | příklad poživatiny |
|-------|---|--|
| 1,00 | | Vysoce neúdržné čerstvé potraviny |
| 0,95 | <i>Pseudomonas, Bacillus, Clostridium perfringens</i> , inhibice některých kvasinek | Potraviny, které obsahují cca 40 % sacharózy nebo 70 % vody (masné výrobky, chléb) |
| 0,90 | Spodní limit pro růst bakterií; <i>Sallmonela, Vibrio parahaemolyticus, Clostridium Botulinium, Lactobacillus</i> , některé kvasinky a plísně (<i>Sachcaromyces cerevisiae, Mucor plumbeus</i>) | Potraviny obsahující cca 55% sacharózy nebo 12 % soli (sušená šunka, tvrdé sýry, potraviny se středním obsahem vody) |
| 0,85 | Inhibice většiny kvasinek | Potraviny s cca 65 % sacharózy nebo 15 % soli (fermentované salámy, zrající sýry, margarín) |
| 0,80 | Úplná inhibice <i>Staphylococcus aureus</i> ; spodní limit pro většinu enzymů a růst většiny hub (<i>Penicilium, Aspergillus</i>) | Potraviny s 15–17 % vody (mouka, rýže, slazené kondenzované mléko, fondánové hmoty, ...) |
| 0,75 | Spodní limit pro halofilní bakterie | Marcipán, džemy, ovocné pomazánky |
| 0,70 | Spodní limit pro růst většiny xerofilních hub | |
| 0,65 | | Melasa, pražení ořechy |
| 0,60 | Spodní limit pro růst osmofilních nebo xerofilních kvasinek a hub | Potraviny s obsahem vody 15–20 % (karamelky, med, sušené ovoce) |
| 0,50 | | Sušené potraviny, koření, těstoviny |
| 0,40 | | Potraviny s obsahem vody 5 % (sušená melanz) |
| 0,30 | | Potraviny s obsahem 3–5 % vody (crackery, kůrka chleba) |
| 0,25 | Maximální termorezistence bakteriálních spor | |
| 0,20 | | Potraviny s obsahem vody cca 2–5 % (sušené mléko, sušená zelenina, kukuřičné lupínky) |

1.7. EXTRAKCE

Extrakce se v chemii používá jako separační metoda, během které dochází k přesunu látek z pevné látky nebo z kapaliny do jiného rozpouštědla nebo fáze, jinými slovy je tato technika založena na rovnovážné distribuci analytu mezi dvěma fázemi, které se navzájem nemísí. Extrakce vyžaduje těsný kontakt mezi oběma fázemi. Ve většině případů se jedná o organickou a vodnou fázi, extrakce kapalina-kapalina. Tento proces nám umožňuje stanovení některých látek, které bychom v matici bez předchozí úpravy nestanovili, například je vhodná pro izolaci tepelně nestálých látek, protože se může provádět i za laboratorní teploty, nebo za chladu [43; 44].

Při volbě rozpouštědla se řídíme převážně základním pravidlem, kdy se použije hrubý odhad – polární látky se budou rozpouštět převážně v polárním rozpouštědle, nepolární látky zase v nepolárním rozpouštědle. Tento odhad vychází z Liebigova pravidla, které říká: „Podobné se rozpouští v podobném.“ Jako druhou možnost můžeme použít semikvantitativní způsob, který je založen na parametru rozpustnosti – látka se rozpouští lépe v určitém rozpouštědle, čím bližší jsou hodnoty rozpustnosti pro rozpouštědlo a rozpuštěnou látku [45].

Existuje mnoho extrakčních technik. Můžeme rozdělit podle skupenství, mezi kterými přechází analyt. Jednou z běžně využívaných technik je extrakce z kapaliny do kapaliny nebo z tuhé fáze do kapaliny. Další typy extrakcí jsou extrakce z tuhé fáze nebo kapaliny do plynu, z kapaliny nebo plynu do tuhé fáze je využívána především v environmentální analýze pro kontrolu například ovzduší, v potravinářství, toxikologii atd. Do extrakcí řadíme i mikroextrakční techniky, které jsou například mikroextrakce na tuhou fázi, mikroextrakce do jedné kapky rozpouštědla, mikroextrakce v kapalné fázi pomocí dutého vlákna.

Extrakci můžeme ještě rozdělit na jednostupňovou a vícestupňovou neboli opakovanou extrakci. Během jednostupňové extrakce se obvykle získá menší podíl extrahované látky, a proto je vhodné víceokrová extrakce, kdy se odebere extrakt, k rafinátu přidá další menší podíl extrakčního činidla a následně všechny extrakční podíly spojit [44].

1.7.1. Extrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakce z kapaliny do kapaliny patří díky své jednoduchosti a rychlosti mezi základní metody. Výběr podmínek, které budou vhodné, je ovšem složitější než při extrakci tuhé látky kapalinou. Provádí se nejčastěji pomocí dělicích nálevek nebo v extraktoru. Použité kapaliny musí být vzájemně nemísitelné, z pravidla je tvoří vodná a organická fáze. Díky třepání dochází k jejich promíchání a zároveň ke zefektivnění metody. I přes fakt, že tato extrakce bývá někdy

též nazývána vytřepáváním, není vhodné obě fáze intenzivně protřepávat, protože může docházet ke zhoršení fázového oddělení [45–47].

1.7.2. Extrakce z pevné fáze do kapaliny

Tento druh extrakce se nazývá macerací. Dochází během ní k převedení analytů z pevného vzorku do extrakčního roztoku. Zde je důležitá velikost částic, kdy u pevných vzorků je potřeba krájení, mletí, aj. Díky homogenizaci vzorku dochází k usnadnění extrakce tzn., že je účinnější. Mezi nejznámější extrakce tohoto typu, která má vysokou výtěžnost, patří Soxhletova extrakce, která využívá patronek (např. z tvrzeného filtračního papíru) ve kterých je umístěna pevný vzorek. Pomocí směsi extrakčních činidel pak dochází k vymývání analytu ze vzorku. Velkou nevýhodou je dlouhá doba extrakce (v řádech hodin) a velké množství použitého rozpouštědla. Další metodou je tzv. macerace, kdy dochází k výluhu do extrakčního činidla. Po ukončení extrakce dochází k oddělení fází například pomocí filtrace, odstředění. V laboratoři se běžně využívá i extrakce pomocí ultrazvuku. Další rozšířenou metodou je i extrakce pomocí tekutiny v nadkritickém stavu, která je rychlá a snadno automatizovatelná [47]. Vzhledem k vlastnostem, jako je netoxicity, nehořlavost, nízká cena, nízké kritické teplotě (31 °C), tlaku aj. se převážně využívá oxid uhličitý [48].

1.8. ANTIOXIDAČNÍ KAPACITA LÁTEK

Antioxidační kapacita je určována koncentrací a chemickou strukturou sloučenin, které mají možnost působit jako antioxidanty. Pro měření antioxidační kapacity bylo vyvinuto mnoho testů, které se mohou provádět v předem vytvořených podmínkách, tzv. *in vitro*. Při porovnání výsledků musíme pamatovat na to, že principy metod mohou být založeny na různých principech. Pokud se jedná o potravinu, musíme pamatovat na to, že tyto testy neposkytují informace o účincích antioxidantů nebo sloučenin po požití [49].

Klíčový krok pro hodnocení antioxidační kapacity je extrakce antioxidantů. Ta se provádí obvykle pomocí metanolu, acetonu nebo etanolu s vodou. Pokud chceme zajistit účinnou extrakci, doporučuje se kombinace alespoň dvou extrakčních cyklů s vodou a organickými rozpouštědly o různé polaritě [50].

1.8.1. Volné radikály

Volné radikály jsou vysoce nestabilní molekuly. Vytvářejí se v našem těle přirozeně v momentech, kdy tělo přeměňuje jídlo na energii nebo během cvičení. Volným radikálům se vystavujeme i v mnoha různých životních situacích. Zdrojem může být cigaretový kouř, znečištěné ovzduší, sluneční paprsky, smažené jídlo. Vlivem velkého množství volných radikálů a nedostatku antioxidantů může docházet k tzv. oxidačnímu stresu. Při něm dochází k poškození buněk a hraje velkou roli u různých chorob (rakovina, kardiovaskulární onemocnění, cukrovka, Alzheimerova nemoc, Parkinsonova choroba atd.) [51; 52]. Volný radikál je jakákoliv molekula nebo její část obsahující alespoň jeden nepárový elektron [53]. Nejjednodušším volným radikálem je atom vodíku s jedním protonem a jedním neutronem. Abychom zabránili jejich tvorbě a následný vliv na naše zdraví, je potřeba mít dostatečný příjem antioxidantů například ve stravě [54].

V případě, že se tvoří volné radikály, může dojít k řetězové reakci. Volný radikál vytáhne elektron z molekuly, která poté není stabilní a změní se na volný radikál. Tato molekula následně bere též elektron z další molekuly a následně ji mění na volný radikál atd. Tato řetězová reakce může mít za následek rozbití buněčných membrán, a tím způsobit změnu toho, co jde do buňky a co z ní vyjde. Tento efekt může změnit DNA kód [52].

1.8.2. Antioxidanty

Tyto přírodní látky jsou schopné poskytnout volným radikálům elektron/atom vodíku a tím, tak zabrání výše zmíněné řetězové reakci volných radikálů [52; 55]. Velmi dobrým a bohatým zdrojem přírodních antioxidantů je zelenina nebo ovoce. Mezi základní antioxidanty můžeme řadit vitamin C, E, selen, karotenoidy a další fytonutrienty⁵. Některé si dokáže tělo samo o sobě vytvořit, ale v nedostatečném množství [51]. Jako antioxidant můžeme definovat jakoukoliv látku, která i v nízkých koncentracích při porovnání s koncentracemi substrátu, inhibuje nebo alespoň zpožďuje oxidaci tohoto substrátu [56].

Můžeme je dělit podle mechanismu do dvou kategorií – primární a sekundární antioxidanty. Primární štěpí řetězce. Jsou schopny reagovat s volnými radikály a tím, je přeměnit na neradikální produkty. Hrají tak důležitou roli při oxidaci lipidů, kdy brání jejich dalšímu rozkladu [57]. Sekundární (preventivní) antioxidanty zpomalují nepřímo rychlost oxidace.

⁵ Rostlinné živiny, které mají specifickou biologickou aktivitu. Mají pozitivní vliv na imunitní funkce a mohou poskytovat prevenci nebo léčbu nemocí a fyziologických poruch. Důležité bioaktivní fytonutrienty jsou například polyfenoly, terpenoidy, flavonoidy, karotenoidy, aj. [104]

Antioxidanty, které mohou vykazovat jak sekundární, tak i primární antioxidační vlastnosti nazýváme multifunkčními antioxidanty [57].

Jsou důležitou složkou i při zpracování potravin. Brání rozvoji oxidačnímu žluknutí v tučných jídlech hlavně v masu, mléčných výrobcích a smažených jídlech. V potravinách se můžeme setkat s velmi účinnými syntetickými antioxidanty, jako je např. butylovaný hydroxytoluen známý pod zkratkou BHT, nebo butylovaný hydroxyanisol (BHA). Tyto dvě sloučeniny jsou podezírány z karcinogeneze. Z tohoto důvodu vzrostl zájem o přírodní, zdravé, a hlavně netoxické látky s antioxidačními vlastnostmi, které by nahradily tyto syntetické [58].

1.8.3. Metody stanovení antioxidační kapacity

Existuje mnoho metod stanovení antioxidační kapacity. Mezi dvě velmi rozšířené spektrofotometrické metody, které hodnotí vychytávání volných radikálů, patří metoda využívající 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH) volný radikál a 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonovou kyselinu (ABTS) [59]. Oba testy vykazují schopnost zachycovat antioxidanty, i pokud jsou přítomny ve složitých biologických směsí (rostlinné nebo potravinové extrakty) [60]. Obě tyto metody se mohou modifikovat. Pomocí modifikace získáme např. zjednodušené hodnocení vychytávání volných radikálů neošetřených jedlých olejů a díky tomu se dá stanovit antioxidační profil stejným analytickým postupem [59]. K těmto běžně využívaným metodám patří i metoda ORAC (absorpční kapacita kyslíkových radikálů) a FRAP (schopnost redukovat železité ionty). U všech těchto metod jsou výsledky vyjádřeny pomocí kalibrační závislosti jako ekvivalent Troloxu, což je analog vitamínu E, který je využíván jako referenční standard [61].

1.8.3.1. Metoda využívající DPPH volný radikál v metanolu

Metoda využívající DPPH radikál je považována za základní metodiku pro posouzení antioxidační aktivity sloučeniny, extraktu nebo jiných zdrojů. Jedná se o rychlou, jednoduchou, levnou, ekonomickou a široce používanou metodu [62; 63]. Sloučenina/vzorek je v tomto případě smíchána s roztokem DPPH. Zde dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylypikrylhydrazin) [59; 64]. Po určité době je změřena hodnota absorbance při dané vlnové délce [62]. Pokud dojde k přechodu vodíku a reakci s DPPH radikálem, vznikne redukovaná forma, která se projeví ztrátou fialové barvy [62] (fialový roztok se odbarvuje přes světle fialovou až po žlutou barvu).

Stanovení antioxidační aktivity různých druhů potravin pomocí metody využívající DPPH je srovnatelné s jinými. Roztok DPPH radikálu můžeme nechat reagovat přímo s pevným

vzorkem a tím minimalizujeme ztráty antioxidantů případnou extrakcí do rozpouštědla. Tato metoda se nazývá QUENCHER [65]. Jako velké plus se zároveň považuje použití různých rozpouštědel ke zkoumání hydrofilních a lipofilních antioxidantů. Tím dochází k modifikaci metody [62].

1.8.3.2. Modifikovaná metoda využívající DPPH volný radikál v isooktanu

Radikál DPPH se nejčastěji používá jako metanolický roztok, a tím pádem reaguje pouze s látkami rozpustnými v metanolu. Pro lipofilní látky s antioxidačním účinkem není tato metoda vhodná, a proto byla navržena modifikace. Modifikovaná metoda využívající DPPH volný radikál v isooktanu sleduje změny antioxidantů ale i sloučenin, které zachycují radikály vzniklé oxidací lipidů [64]. Bylo potvrzeno, že celkové polární látky z oxidovaných lipidů reagovali převážně s DPPH v isooktanu, zatímco s DPPH v metanolu nereagovali [64].

1.8.3.3. Metoda využívající ABTS

Metoda využívající ABTS je technicky jednoduchá a široce používaná pro screening a rutinní stanovení. Stanovení je založeno na inhibici produkce radikálového kationtu ABTS. Tento substrát je dobře rozpustný jak ve vodě, tak v organických rozpouštědlech [66] a zároveň vykazuje velkou stabilitu. Pokud je ve vzorku přítomný antioxidant, dochází v určitém čase k inhibici nahromaděného ABTS radikálu. Schopnost antioxidantu zhaset ABTS radikál lze měřit spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm. Díky měření v blízké infračervené oblasti je minimalizováno rušení ostatních absorbujících složek nebo zákalu vzorku [56]. U roztoku ABTS dochází k odbarvení zelenomodrého roztoku vlivem antioxidační kapacity na světle zelený až čirý roztok.

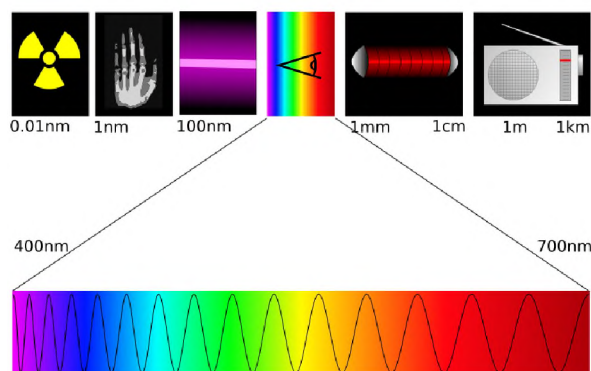
ABTS se nenachází přirozeně, a proto dochází ke kritice, že test není vhodný pro hodnocení biologických funkcí [66].

1.8.3.4. Porovnání metody DPPH a ABTS

Tyto dvě metody jsou založeny na různých mechanismech. Získané výsledky mohou být nepřesné, neboť reaktivita fenolických sloučenin je závislá i na jejich chemických strukturách. Je známo, že metoda DPPH poskytuje nižší hodnoty s Troloxem, protože je na rozdíl od roztoku ABTS stabilnější a tím pádem má nižší reaktivitu. Výhoda ABTS radikálu je vysoká reaktivita, tudíž bychom mohli říct, že tento roztok má pravděpodobně schopnost reagovat se širším spektrem antioxidantů. U DPPH je známo, že reaguje s polyfenoly, ale s ne s fenolickými kyselinami a cukry [67].

1.9. SPEKTROMETRIE V ULTRAFIALOVÉ A VIDITELNÉ OBLASTI

Spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti neboli UV/VIS spektrometrie je využívána převážně jako kvantitativní metoda. Na obrázku 10 vidíme, že absorpce UV záření je v rozmezí cca 100–380 nm. Na ni navazuje již zmíněná oblast mezi 380–700 nm, která je viditelná pouhým okem. Navzdory tomu, že se nazývá UV/VIS, využívá se hlavně rozsah vlnových délek 190–800 nm [68]. Čím více materiál absorbuje světlo při své specifické vlnové délce, tím vyšší je koncentrace zkoumané látky. A proto pomocí spektrofotometru můžeme na základě absorpce/transmittance jednoduše určit množství (koncentraci) známé chemikálie [69].



Obrázek 10 – schéma dělení záření [70]

1.9.1. Lambert-Beerův zákon

Pokud známe intenzitu světla procházející kyvetou, můžeme ji spojit s veličinou zvanou transmittance (T). Transmittance je část světla, která prochází vzorkem a vypočítáme ji na pomoci vztahu (2):

$$T = \frac{I_t}{I_0} \quad (2)$$

kde I_t je intenzita prošlého světla a I_0 intenzita světla, které dopadá na kyvetu, než jí projde. Pomocí jednoduchého matematického přepočtu (3) získáme z transmittance absorbanci (A), která je popisována jako množství absorbovaných fotonů [71].

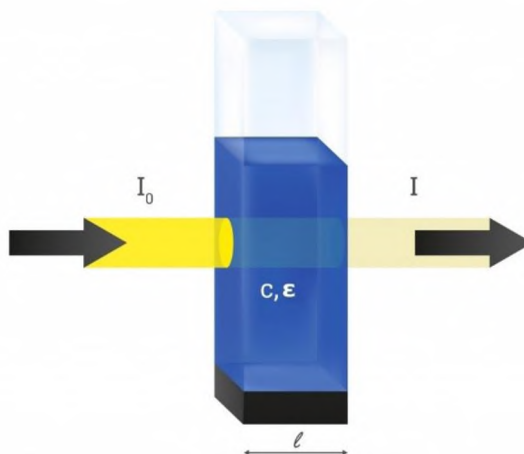
$$A = -\log T = -\log \left(\frac{I_t}{I_0} \right) \quad [71] \quad (3)$$

Lambert-Beerův (L-B) zákon je lineární vztah mezi absorbancí a koncentrací [72]. Jako většina chemických zákonů nejlépe funguje při nižších koncentracích – což je základ pro optické

chemické analýzy [73]. Běžně se využívá pro kvantitativní stanovení látek a lze zapsat matematickým vztahem (4):

$$\ln\left(\frac{I_t}{I_0}\right) = -\varepsilon \cdot c \cdot l \quad (4)$$

kde je I_t intenzita prošlého světla; I_0 intenzita světla dopadajícího na kyvetu; ε molární absorpční koeficient; c koncentrace chromoforů, l tloušťka kyvety [74]. Obrázek 11 nám popisuje jednotlivé části L-B zákona v praxi.



Obrázek 11 – Lambert-Beerův zákon [75]

K absorpci záření ve viditelné oblasti dochází v případě, že molekula obsahuje strukturální prvky, které jsou nositelé barevnosti. Tyto látky se označují jako chromofory [68]. Funkční skupiny v molekulách, které nejsou nositeli barevnosti, absorbují již při 190 nm a jsou schopné absorbovat i ve viditelné oblasti se nazývají auxochromy. Patří sem skupiny jako jsou -OH, -NH₂, -NO₂, halogeny, aj. Pokud je ve vzorku přítomen auxochrom, může to ovlivňovat absorpci chromoforových skupin [68]. V tomto případě dochází k navázání k určitému chromoforu a tím k posunu jeho absorpčního maxima k vyšším vlnovým délkám a zároveň zvyšují intenzitu absorpce [76].

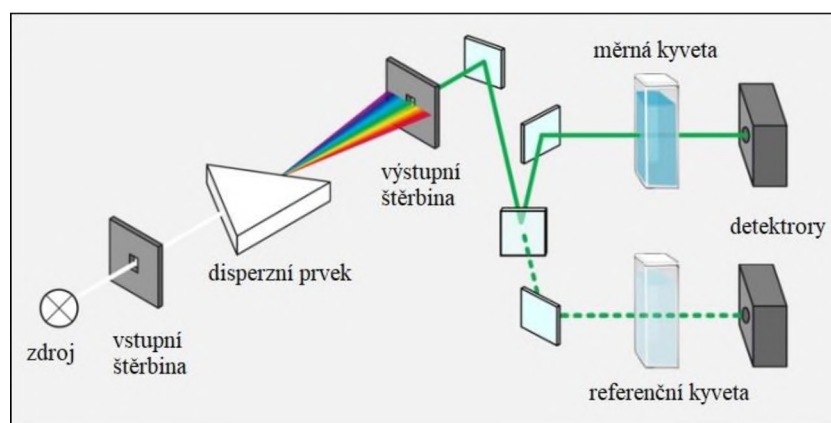
Spektra v UV/VIS oblasti ovlivňují vnitřní i vnější vlivy, kterými jsou například sterické efekty, ovlivnění tautomerní rovnováhou, vliv pH, rozpouštědel nebo teploty [76]. U spekter měřených v UV/VIS oblasti je důležitá koncentrace. Proto u této metody jsou nejvhodnější zředěné roztoky [77].

Výhodou této metody je, nedestruktivita a příznivá pořizovací cena. Je přesná, citlivá a použitelná pro velké množství vzorků. Pomocí kalibračních křivek, kdy změna koncentrace se

projeví na změně absorbance, můžeme stanovovat kvantitu stanovované látky. Velkou nevýhodou je následná interpretace spekter, hlavně pokud se jedná o směs [68].

1.9.2. Instrumentace

V dnešní době je na výběr velké množství fotometrů a spektrofotometrů. Na obrázku 12 můžeme vidět jednu typickou instrumentaci, základní blokové schéma dvoupraskového spektrofotometru pro měření v ultrafialové/viditelné oblasti. Jednodušší, než dvoupraskový přístroj je jednopaprskový.



Obrázek 12 – schéma UV/VIS dvoupraskového spektrofotometru [78]

Jako zdroj pro záření ve viditelné a blízké infračervené oblasti se převážně využívá wolframová nebo wolfram halogenová žárovka [78]. Xenonové zdroje mohou být alternativou pro systémy deuterium-wolfram [78]. Deuteriové a vodíkové lampy poskytují kontinuální spektrum v ultrafialové oblasti. To je vytvářeno elektrickou excitací deuteria anebo vodíku při nízkém tlaku [77]. Světelné diody (LED) nejsou vhodné pro obecné aplikace. Proto mohou být použity pouze pro specializované nebo jako referenční zdroje pro kalibraci ke světelným zdrojům [78].

Paprsek o širokém spektru záření (polychromatické záření) je dělen na různé vlnové délky pomocí disperzního nebo disperzních prvků, které jsou součástí monochromátoru. Jednoduché, monochromatické, záření o určité vlnové délce se z disperzního prvku odráží přes soustavu zrcadel do kyvety se vzorkem, měrné, a referenční [77; 78]. Disperzní prvek může být například reflexní mřížka, hranol anebo kombinace obou prvků.

Kyveta musí být vyrobena z materiálu, kterým prochází záření v požadované spektrální oblasti. Pro měření v ultrafialové i viditelné oblasti jsou vhodné kyvety z křemene nebo

taveného oxidu křemičitého [77]. Paprsek po průchodu kyvetou směřuje do detektoru, kde je detekován signál.

1.10. INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE

Podstatou je infračervené (IČ) spektrometrie je interakce infračerveného záření se studovanou látkou [79]. Energie, který by vytvořila elektronický přechod, je velmi nízká, proto jsou tato spektra charakterizována molekulárními vibracemi a rotacemi [68]. Na výše uvedeném jednoduchém schématu dělení záření (obrázek 10) vidíme, že na viditelnou oblast navazuje právě zmíněná infračervená. Ta je sice v rozmezí vlnových délek 800–0,5 nm, ale v případě IČ je pro usnadnění čtení používaná jednotka vlnočtů, která se dá lehce přepočíst pomocí vztahu $\tilde{\nu}=1/\lambda$ [68]. Tento vztah říká, že IČ oblast spektra je zhruba v rozmezí 12 500–20 cm^{-1} . Tato oblast se dále dělí dle vlnočtů ještě na dalekou, střední a blízkou infračervenou oblast. Vlnočty jednotlivých oblastí se mohou v literatuře lišit. Při určování chemické struktury a identifikaci látky hraje hlavní roli střední infračervená oblast, tj. cca 4000–400 cm^{-1} [77; 79]. Střední IČ oblast se dále dělí ještě dvě části. Oblast charakteristických vibrací (cca 4000–1200 cm^{-1}) a oblast otisku prstu (cca 1200–400 cm^{-1}). V oblasti charakteristických vibrací můžeme pozorovat absorpční pásy, které patří funkčním skupinám molekul vzorku. Oblast otisku prstu bývá velmi důležitou pro danou molekulu, neboť obsahuje strukturní informace. I malé rozdíly ve struktuře a složení molekuly vedou ke změnám vzhledu a absorpčních maxim, která při porovnávání spekter, hrají velkou roli (např. polohy substituentů na benzenovém jádře) [77].

Obecně lze říct, že infračervená spektroskopie se používá ke kvantitativní (stanovení obsahu složky ve směsi) a kvalitativní (částečná identifikace látek, stanovení čistoty) analýze. Při průchodu IČ záření vzorkem vznikají vibrace a rotace atomů ve všech skupenství látek změnou frekvence nebo vlnočtu [80]. Tento pohyb lze přirovnat pohybu pružiny nebo kytarové struně, který bude vibrovat při dané frekvenci [81].

Pomocí infračervené spektroskopie můžeme měřit spektra vzorků ve všech skupenství. Kapalné vzorky, nebo vzorky, které jsou rozpuštěné v roztocích, můžeme měřit pomocí kyvet, které jsou vytvořeny z materiálu propustného pro infračervené záření [77; 81]. Mezi nejlevnější materiál, který se využívá pro výrobu kyvet, patří chlorid sodný (NaCl). Jde ovšem využít i bromid draselný (KBr), fluorid vápenatý (CaF_2) nebo bromid cesný (CsBr) [82]. Důležité u vzorku pro infračervenou spektroskopii je, že vzorek by se měl rozpustit v rozpouštědle, vybrané rozpouštědlo by mělo být co nejvíce nepolární (rozpuštěnost halogenidů alkalických kovů ve vodě) a zároveň by nemělo silně absorbovat IČ záření [82].

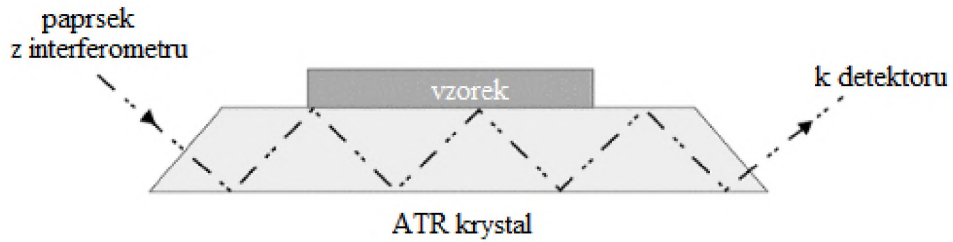
1.10.1. Instrumentace

Jelikož se jedná o optickou metodu, je blokové schéma podobné jako u UV/VIS spektrofotometrie. Jednotlivé metody a následně přístroje se liší použitým zdrojem, detektorem záření, interferometrem nebo dalším vybavením. Mezi základní požadavek na zdroj záření je převážně široký rozsah měření, silná a stabilní intenzita světla ze zdroje při různých vlnových délkách. Tato síla a stabilita by měla zůstat i během delší časové periody [77]. Zdrojem může být například *Nerstova tyčinka*, která je zhotovena ze směsi oxidů vzácných zemin. Tyto oxidy jsou formované do válce, které mají průměr a délku jen pár milimetrů. *Globalar* je tyčinka zhotovená z karbidu křemíku, která je podobně jako Nerstova tyčinka elektricky zahřívána. Tyto dva zdroje jsou srovnatelné [77]. V poslední době velice využívaný zdroj je laser. Sem patří např. laditelný polovodičový infračervený laser nebo diodový laser [83].

Využívané detektory v IČ spektroskopii se dělí do 3 hlavních typů *a) termální* detektory. Odezva těchto detektorů závisí na zahřívacím účinku záření. Patří sem termočlánky, bolometry. Další skupinou jsou specializované *b) pyroelektrické* detektory [77]. Sem patří například detektor obsahující deuterium triglycin sulfát (DTGS) v halogenidovém okně, které je teplotně odolné. Jako citlivější detektor je možné použít telurid rtuti kadmia (MCT) [82]. tyto dva typy detektorů jsou běžně využívány ve fotometrech a disperzních spektrofotometrech [77]. Třetí, poslední skupinou jsou *c) fotovodivé* detektory se selenem olovnatým [82].

1.10.2. Metoda zeslabené celkové reflexe

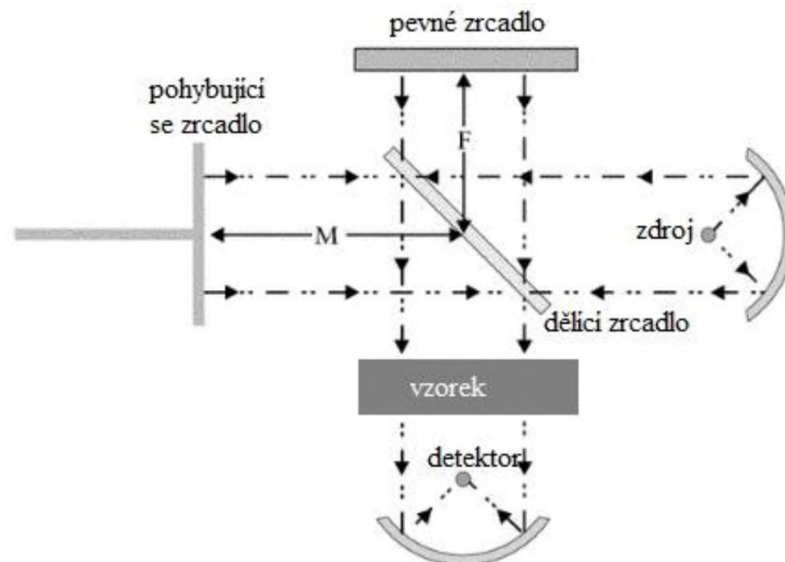
U odrazných technik, kam patří i metoda zeslabené celkové reflexe (ATR – Attenuated total reflection), je důležité, jaký máme vzorek. Zde můžeme měřit spektrum pevných látek, past, nebo prášků, ale i spektra kapaliny. Tato moderní metoda je volena, pokud se zajímáme hlavně o povrch studovaného materiálu. Hlavní charakteristika metody je vnitřní odraz, proto tuto techniku nazýváme jako zeslabenou celkovou reflexi [84]. Využívá se krystal z materiálu o vysokém indexu lomu (např. diamant, selenid zinečnatý, křemík, germanium). Tento krystal je v kontaktu s povrchem vzorku a infračervený paprsek, který prochází tímto ATR krystalem je směřován do rozhraní krystal-vzorek jako je vidět na obrázku 13. Pokud dojde k absorpci IČ záření, je při vlnové délce pozorován odpovídající absorpční pás [81].



Obrázek 13 – princip ATR [81]

1.10.3. Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací

Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) má výhody jako například velká rozlišovací schopnost, přesné a reprodukovatelné stanovení frekvence, rychlost záznamu spektra, aj. [77]. Základem této techniky je Michelsonův interferometr, který je zobrazen na obr. 14. Záření ze zdroje jde na Michelsonův interferometr, kde dopadá na polopropustný dělič paprsku. Jedna polovina paprsku je propuštěna na pohyblivé, měrné, zrcadlo [81; 85]. Rychlost tohoto zrcadla musí být konstantní, stejně jako rovinnost zrcátka [77]. Druhá polovina se odráží k pevnému, referenčnímu, zrcadlu. Paprsky se od obou zrcadel, která jsou na sebe kolmá, odrážejí zpět na dělič paprsků, kde tyto dva paprsky spojí do jednoho. Paprsek prochází vzorkem a následně dopadá na detektor. Tím vytváří signál – interferogram, který je pomocí matematické operace (Fourierovou transformací) převeden na infračervené spektrum [81; 85].



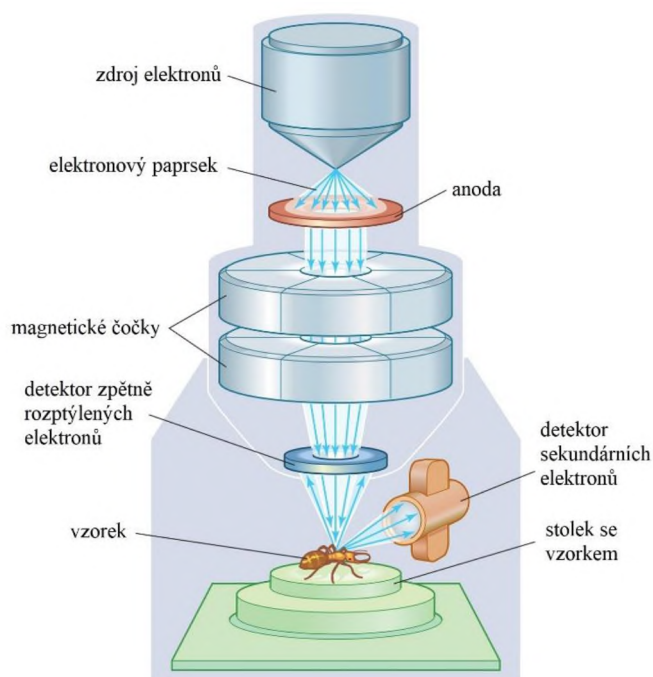
Obrázek 14 – Michelsonův interferometr [81]

1.11. SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

Pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM), zobrazený na obrázku 15, získáme informace o topografii a složení povrchů pevných objektů [86; 87]. Jedná se druh elektronového mikroskopu [87].

Mezi hlavní části elektronového mikroskopu patří zdroj elektronů, které postupují tubusem směrem dolů kombinací elektromagnetických čoček a otvorů. Vzniká zaostřený paprsek elektronů, jehož poloha je řízena skenovacími cívkami umístěny nad objektivem. Uvnitř komory je stůl se vzorkem, na který dopadá elektronový paprsek. Během interakce vzorku s elektrony jsou produkovány sekundární elektrony, zpětně rozptýlené elektrony a charakteristické rentgenové paprsky. Komora SEM je evakuována, úroveň vakua závisí na typu mikroskopu. Výsledkem interakce elektron-vzorek je velké množství signálů, které jsou pak detekovány příslušným detektorem, nebo i více. Vytvořený obraz pak zobrazíme pomocí počítače [86].

Mezi hlavní výhodu patří nekomplikovaná příprava vzorku. Důležité je, aby byl vzorek elektricky vodivý. Pokud vodivý nebude, nedostaneme ostrý obraz. Té ovšem můžeme dosáhnout odpařením kovového filmu na vzorku. Jako kovový film se používá například zlato. V případě, že budeme pozorovat při 1–3 kV energie, můžeme vyšetřovat i nevodivý materiál bez přidání kovového povlaku [87].



Obrázek 15 – skenovací elektronový mikroskop [87]

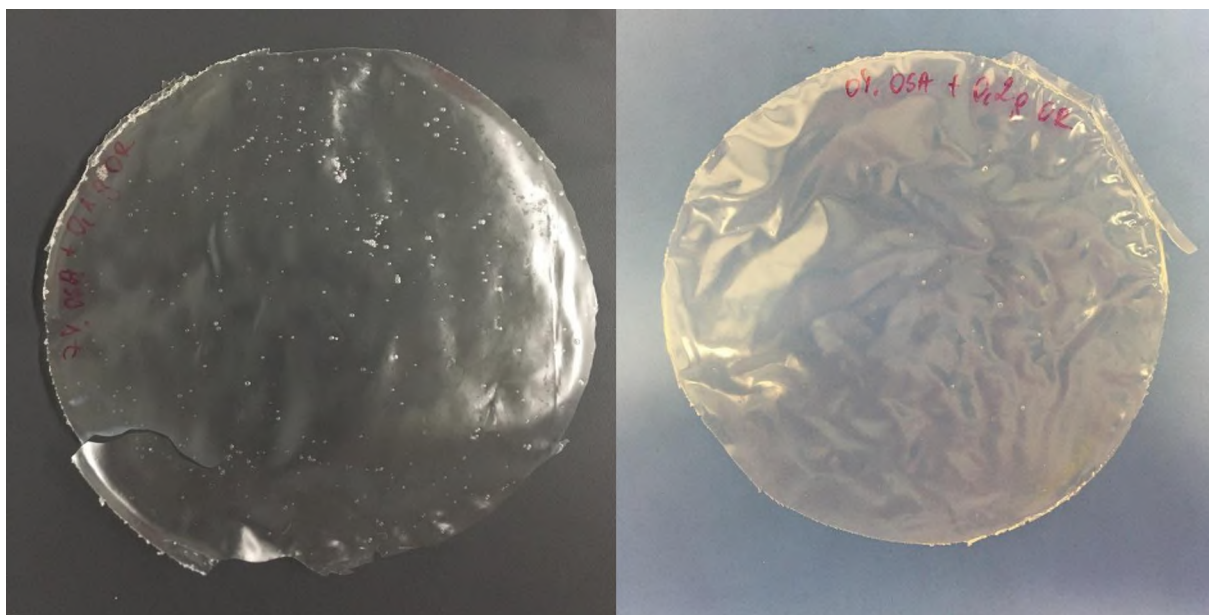
2. MATERIÁL A METODY

2.1. VZORKY

- modifikované škrobové filmy s koncentrací 0; 0,1; 0,2 a 0,3 g rakytníkového oleje na 100 g škrobové pasty
- nemodifikované škrobové filmy s koncentrací 0; 0,1; 0,2 a 0,3 g rakytníkového oleje na 100 g škrobové pasty

2.1.1. Popis škrobových filmů

Škrobové filmy bez ohledu na koncentraci rakytníkového extraktu nebo na modifikaci nejeví rozdíly. Filmy byly bezbarvé, matné a připomínají silnější fólii. Použité škrobové filmy jsou zobrazeny obrázku 16.



Obrázek 16 – biodegradovatelné škrobové filmy (nalevo modifikovaný 7% oktenylsukcinátem o koncentraci 0,1 g rakytníkového oleje na 100 g škrobové pasty; napravo nemodifikovaný film o koncentraci 0,2 g rakytníkového oleje na 100 g škrobové pasty)

2.1.2. Výroba škrobových filmů

Škrobové filmy byly vyrobeny v Polsku (Department of Food Analysis and Evaluation of Food Quality, Faculty of Food Technology, University of Agriculture in Krakow) následujícím způsobem.

5 g rakytníkového oleje bylo třepáno s 295 g 96% etanolu při pokojové teplotě o rychlosti 200 ot/min po dobu 24 h. Extrakt byl filtrován přes filtrační papír Whatman No. 1. Získaný extrakt byl použit pro výrobu filmu, kdy bylo použito 6; 12 a 18 g extraktu. Toto množství je ekvivalentní k 0,1; 0,2; 0,3 g oleje na 100 g škrobového filmu.

Použitý bramborový škrob byl od Wielkopolska Potato Industry Company (Polsko). Příprava modifikovaných škrobových vzorků byla pomocí oktenyl sukcinátu (OS). Syntéza proběhla podle postupu Hui, Qi-he, Ming-liang, Qiong a Guo-ging⁶. Esterifikace byla provedena v 35% (w/w) vodní suspenzi škrobu. Pomocí 3% (w/w) roztoku NaOH bylo pH upraveno a udržováno na hodnotě 8. Následně byl do škrobové suspenze po kapkách přidávána suspenze anhydridu oktenylu sukcinátu (OSA) o koncentraci 7 % (v/v; počítáno na hmotnost suchého škrobu) po dobu 1 hodiny a míchání pokračovalo po dobu 3 h při teplotě (35 ± 2) °C. Poté bylo pomocí 3% (v/v) roztoku HCl upraveno pH suspenze na 6,5. Výsledná směs byla odstředěna, dvakrát promyta vodou a dvakrát 70% (v/v) etanolu. Zbytek byl pokaždé odstředěn. Později byly škrobové vzorky vysušeny, pomlety a prosévány. Pro získání slepého vzorku, který byl nazýván „N-ES“ neesterifikovaný škrob, byl proveden stejný proces bez přidání OSA do suspenze škrobu. Stupeň substituce (DS) oktenylsukcinátových škrobů byl změřen pomocí titrační metody, který byla popsána v postupu Hui a kol. (viz. předchozí odstavec) a odhadovaná pomocí následujícího vzorce (5):

$$DS = \frac{0,162 \cdot (A \cdot M) / W}{1 - [0,210 \cdot (A \cdot M) / W]} \quad (5)$$

kde A je titrační množství roztoku NaOH [ml]; M je molární koncentrace roztoku NaOH; W je hmotnost [g] suchého modifikovaného škrobu.

Škrobové filmy s glycerolem byli připravovány následovně: vodná suspenze škrobu (neesterifikovaného nebo s 7% OS) v koncentraci 3 % sušiny (m/m) byla zahřata ve vodní lázni na 95 °C po dobu 30 minut za stálého míchání o rychlosti 300 ot/min. Po uplynutí této doby byl přidán glycerol jako změkčovadlo (v koncentraci 0,35 g na 1 g suché hmotnosti obsahu škrobu) a suspenze byla míchána po dobu 10 minut. V případě filmů s přidáním extraktem

⁶ HUI, Ruan, Chen QI-HE, Fu MING-LIANG, Xu QIONG a He GUO-GING. Preparation and properties of oktenyl succinic anhydride modified potato starch. *Food chemistry* [online]. 2009, **114**(1), 81-86 [cit. 2019-10-31]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.019>

z rakytníkového oleje, byla škrobová suspenze nejprve připravena se sníženým množstvím vody a následně, po ochlazení na 40 °C, byla škrobová pasta doplněna odpovídajícím množstvím extraktu (výsledné koncentrace 0; 0,1; 0,2 a 0,3 g rakytníkového oleje na 100 g škrobové pasty). Směs byla homogenizována při rychlosti 9500 ot/min, odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut. Po uplynutí této doby byl filmotvorný roztok vlit v množství 55 g do plastových Petriho misek (vnější průměr 15 cm), vysušen při 60 °C a relativní vlhkosti 60 % po dobu 24 h v sušárně Venticell Standard (BMT, Česká republika). Nakonec byly filmy odstraněny z Petriho misek a skladovány v exsikátoru při laboratorní teplotě ((25 ± 1) °C) a (55 ± 2) % relativní vlhkosti pro mikrobiologickou analýzu. Pro ostatní analýzy byl skladován nad čerstvě vyžihaným silikagelem při laboratorní teplotě ((25 ± 1) °C).

2.2. MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA

2.2.1. Přístroje a zařízení

- Sterimat 5104.2 (BMT Medical technology s.r.o.; Česká republika)
- Parní sterilizátor – Sterilab® (BMT Medical technology s.r.o.; Česká republika)
- Laminární box (Trigon-plus s.r.o.; Česká republika)
- Vortex (Heidolph; Německo)
- Denzidometr McFarland – typ DEN-1B (Biosan Ltd.; Lotyšsko)
- Automatické pipety – Eppendorf (Česká & Slovenská republika)
- Termostat Qcell 240/60 INOX (Pol-Lab; Polsko)

2.2.2. Živné půdy, chemikálie a mikroorganismy

Živné půdy:

- Malt Agar (HIMEDIA; Česká republika)
- Mueller Hilton Agar No. 2 (HIMEDIA; Česká republika)

Chemikálie:

- NaCl p.a. (Lach:ner, Česká republika)

Mikroorganismy:

Pro testování antimikrobiálních účinků škrobových filmů byly použity následující kmeny bakterií, kvasinek a plísní:

- *Aspergillus brasiliensis* CCM 8222
- *Bacillus cereus* CCM 2010
- *Candida albicans* CCM 8215
- *Escherichia coli* CCM 3954
- *Staphylococcus aureus* CCM 4223

2.2.3. Příprava živných půd a fyziologického roztoku

Veškeré skleněné zkumavky s víčky byly sterilizované ve sterimatu při teplotě 173 °C po dobu 30 minut. Skleněné Petriho misky s víčky byly sterilizované při 184 °C po dobu 2 h.

Živné půdy byly připraveny v souladu s českou technickou normou ČSN EN ISO 11133. Byly vybrány tak, aby vyhovovaly svými podmínkami a živinami testovanému typu mikroorganismu. Předepsané dehydratované množství půdy se za promíchávání rozpustilo v určitém množství destilované vody. Následně došlo ke sterilizaci a takto připravené suspenze byly nality do skleněných Petriho misek zhruba o průměru 13 cm. Po utuhnutí a vychladnutí byly živné půdy skladovány v chladničce při $(5 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ v zavěšené poloze.

Pro kultivaci kvasinek a plísní byl použit Malt agar. Množství jednotlivých složek pro přípravu je popsáno v tabulce 2. Po rozpuštění, byla takto připravená suspenze sterilizována v autoklávu při $118 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut. Konečné pH při $25 \text{ }^\circ\text{C}$ bylo $5,5 \pm 0,2$.

Tabulka 2 – příprava MALT agaru

| | |
|------------------------------|---------|
| Malt agar – přípravek | 45,0 g |
| Destilovaná voda | 1000 ml |

Pro stanovení bakterií a kvasinky rodu *Candida* byl použit Mueller Hinton agar no. 2, který byl připraven dle tabulky 3. Tato suspenze byla sterilizována v autoklávu při $121 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut.

Tabulka 3 – příprava M-H agaru

| | |
|-------------------------|---------|
| M-H agar | 38,0 g |
| Destilovaná voda | 1000 ml |

Fyziologický roztok byl připraven navážením 8,5 g NaCl do 1000 ml. Následně byl roztok sterilizován v autoklávu při $121 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut. Byl skladován v chladničce.

2.2.4. Příprava kultur

Pomocí sterilní bakteriologické očkovací kličky bylo přeneseno pár kolonií mikroorganismu na předem připravený živný agar, kde byla provedena izolace čárkováním. Takto připravené kultury bakterií byly kultivovány při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu $(24 \pm 2) \text{ h}$. Kultura kvasinek byla kultivována v termostatu při teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu $(48 \pm 2) \text{ h}$. Na šikmý agar byla zočkovaná kultura plísně, která byla ponechána při laboratorní teplotě ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) po dobu 5 dní.

Po uplynutí doby potřebné ke kultivaci MO byly do sterilních skleněných bakteriologických zkumavek napipetovány 3 ml fyziologického roztoku. Sterilní bakteriologickou kličkou bylo

přeneseno několik kolonií kultury, aby ve fyziologickém roztoku vznikl potřebný zákal, v případě bakterií se jedná o hodnotu zákalu okolo 1. stupně zákalové stupnice McFarlanda (McF). U kvasinek mohl zákal dosahovat vyšších hodnot. Přesné hodnoty zákalů, které byly změřeny pomocí denzitometru, jsou zaznamenány v tabulce 4.

Tabulka 4 – zákaly MO použitých pro antimikrobiální testování

| | 0% OSA | 7% OSA |
|--------------------|-----------|-----------|
| MO | zákal McF | zákal McF |
| <i>B. cereus</i> | 1,03 | 1,11 |
| <i>E. coli</i> | 1,01 | 1,08 |
| <i>St. aureus</i> | 1,05 | 1,08 |
| <i>C. albicans</i> | 2,98 | 2,88 |

OSA – oktenyl sukcinát

McF – stupeň Mc Farlanda

Pro plísně byl použit odlišný postup než pro bakterie a kvasinku. Do zkumavky se šikmým agarem, kde narostla plíseň, byl napipetován 1 ml fyziologického roztoku. Zkumavka byla uzavřena, lehce protřepána, aby se spory z plísně dostaly do fyziologického roztoku. Obsah zkumavky byl vylit do sterilní titrační baňky s perlami. Následně byl přidán fyz. roztok (zhruba 4 ml), aby došlo k naředění spor v roztoku. Koncentrace byla ověřena pomocí Bürkerovy komůrky a dle vztahu (6) vypočítána výsledná koncentrace spor.

$$P = p \cdot o \cdot z \cdot 10^3 \quad (6)$$

(p – průměrný počet buněk v 1 políčku; o – převrácená hodnota objemu v mm³; z – hodnota zředění)

Koncentrace pro nemodifikované škrobové film byla rovna $4,75 \cdot 10^3$ spor/cm³ suspenze. U modifikovaných se byla vypočtena hodnota $5,0 \cdot 10^3$ spor/cm³ suspenze.

Takto připravené buněčné suspenze byly ihned inokulovány na Petriho misky a bylo provedeno testování antimikrobiálních účinků škrobových filmů na daný MO.

2.2.5. Příprava vzorků pro stanovená antimikrobiální účinnosti

Filmy byly skladovány v exsikátoru při laboratorní teplotě o relativní vlhkosti (55 ± 2) %. Celé testování probíhalo v předem vysterilizovaném laminárním boxu. Pro antimikrobiální testování byly modifikované filmy nejprve rozstříhané na čtverečky zhruba o velikosti 1x1 cm. Rakytníkový extrakt, který film obsahoval, byl v tomto případě považován za antimikrobiální látku a jeho účinky na bakterie byly pozorovány.

Každá koncentrace škrobového filmu testována dvakrát, tzn. každou čerstvě připravenou buněčnou suspenzí bylo postupně zaočkováno 8 Petriho misek (M-H agar pro bakterie, MALT agar pro plísně). Pro kvasinky byl zaočkován M-H agar i MALT agar. Na inokulované Petriho misky byly pomocí sterilních pinzet přeneseny předem připravené čtverečky filmů.

Petriho misky zaočkované plísní *A. brasiliensis* byly ponechány v boxu při laboratorní teplotě ((25 ± 2) °C) po dobu 5 dní. Bakterie rodu *B. cereus*, *E. coli* a *St. aureus* byly kultivovány při 37 °C po dobu 24 h. Misky, které byly očkované kulturou *C. albicans* byly kultivovány v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 48 h.

Podle stejného postupu byly otestovány i filmy, které nebyly modifikované.

2.2.6. Příprava misek na stanovení aktivity vody

Pro stanovení aktivity vody byly použity misky, které jsou používané pro měření v přístroji AquaLab. Vzhledem k povaze materiálu byly tyto misky předem 3x sterilizovány po dobu 20 minut pomocí UV světla v laminárním boxu. Zde byl následně do každé pipetován M-H agar o objemu 3 ml.

2.2.7. Příprava kultury *B. cereus* na měření změny aktivity vody

Pro měření změny aktivity vody byla připravena kultura *B. cereus*, kdy byl pomocí 24 h staré kultury připraven do fyziologického roztoku zákal buněčné suspenze 1,04 McF.

Ke zjištění změny aktivity vody vlivem bakterie *B. cereus* na škrobový film, byly připraveny následující misky (M) s agarem:

- 4x M s čistým M-H agarem
- 4x M s M-H agarem zaočkovaná bakterií *B. cereus*
- 4x M s čistým M-H agarem s modifikovaným filmem o koncentraci 0,0 g /100 g
- 4x M s čistým M-H agarem s nemodifikovaným filmem o koncentraci 0,0 g /100 g
- 4x M s čistým M-H agarem s modifikovaným filmem o koncentraci 0,3 g /100 g

- 4x M s čistým M-H agarem s nemodifikovaným filmem o koncentraci 0,3 g /100 g
- 4x M se zaočkovaným M-H agarem bakteriální kulturou *B. cereus* s modifikovaným filmem o koncentraci 0,0 g /100 g
- 4x M se zaočkovaným M-H agarem bakteriální kulturou *B. cereus* s nemodifikovaným filmem o koncentraci 0,0 g /100 g
- 4x M se zaočkovaným M-H agarem bakteriální kulturou *B. cereus* s modifikovaným filmem o koncentraci 0,3 g /100 g
- 4x M se zaočkovaným M-H agarem bakteriální kulturou *B. cereus* s nemodifikovaným filmem o koncentraci 0,3 g /100 g

Všechny tyto misky byly dány do termostatu na kultivaci při 30 °C po dobu 24 h. Po této době byl odstraněn nárůst bakterie i škrobový film a misky byly proměřeny pomocí přístroje AquaLab.

2.3. ANALYTICKÁ ANALÝZA

2.3.1. Přístroje, zařízení a pomůcky

- veškeré spektrofotometrické experimenty v UV/VIS oblasti byly provedeny na spektrofotometru SHIMADZU EUROPA GmbH; model: UV- 2600 240V IVDD (Německo)
- extrakce (ať už se samotným rozpouštědlem, tak i s reakčními činidly) byly ponechány po celou dobu extrakce v termostatu BSK ET618 (Lovibond, Německo)
- Skenovací elektronový mikroskop – Tescan Vega 3 SBU (Tescan; Česká republika)
- infračervená spektra byla pořízena pomocí přístroje Nicolet iS50 FT-IR od firmy Thermo Scientific (české zastoupení Nicolet CZ s.r.o.)
- AquaLab TDL (BDL; Česká republika)
- Automatické jednobanňové pipety – Eppendorf (Česká & Slovenská republika)
- Analytické váhy ABT 220-4M (Kern; Česká republika)
- Třepačka rotační – rotátor multimix 230V(VWR; Česká republika)
- Odstředivka – Ministar silverline (VWR; Česká republika)
- Injekční filtry PES (polyethersulfon), 25 mm; 0,45 μm (Labicom s.r.o.; Česká republika)

2.3.2. Standardní látky a chemikálie

- metanol $\geq 99,9\%$ (Honeywell; USA)
- n-Hexan $\geq 97,0\%$ (Honeywell; USA)
- etanol 96% (Lach:ner; Česká republika)
- isooktan – 2,2,4-trimethylpentan (J.T. Baker; USA)
- kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich; Německo)
- DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, volný radikál (Sigma-Aldrich; Německo)
- ABTS – diamonná sůl 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazolin)-6-sulfonové kyseliny – tablety 10 mg (Sigma; Německo)
- peroxidisíran draselný $\geq 99,0\%$ (Sigma-Aldrich; Německo)
- Trolox – 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxilová kyselina $\geq 98,0\%$ (Sigma-Aldrich; Německo)
- 100% Rakytníkový olej; šarže 1250918; datum spotřeby do konce 09. 2020 (ElitPhito Ivano-Frankovsk pro TML a.s.; Ukrajina)

2.3.3. Příprava roztoků a pracovní postupy

2.3.3.1. Extrakce škrobových filmů

Škrobové filmy, modifikované a nemodifikované, o koncentraci 0,3 g oleje/100 g škrobového filmu (navážka 100–110 mg škrobového filmu) byly extrahovány do rozpouštědel (4 ml), které měly odlišné vlastnosti. Jako extrakční rozpouštědlo byl použit n-hexan, metanol, voda a 80% metanol.

U n-hexanu, jako zástupce nepolárního rozpouštědla, byl použit čas extrakce 2, 4 a 24 h při teplotě 25 °C a extrakce po dobu 24 h při 40 °C. V případě polárního rozpouštědla, metanolu, byly nastaveny stejné podmínky jako u n-hexanu.

Voda byla použita, jelikož se jedná o základní velmi polární rozpouštědlo. Zde byla prováděna extrakce po dobu 24 h při teplotách 25 °C i 40 °C. Jako směsné rozpouštědlo byla použita směs voda-metanol (80% metanol). Tato směs byla též extrahována též po dobu 24 h při 25 °C i 40 °C.

Veškerá spektra těchto extraktů byla proměřena pomocí spektrofotometru v rozmezí vlnových délek 800–200 nm.

2.3.3.2. *Extrakce rakytníkového oleje*

Pro porovnání spekter škrobových filmů v různých extrakčních činidlech byla provedena i extrakce samotného rakytníkového oleje. Ta probíhala podobně jako v případě extrakce škrobových filmů, kdy jediný rozdíl byl, že doba extrakce byla ve všech případech 24 h. Byly smíchány 3 kapky rakytníkového oleje (což odpovídalo cca 0,050 g oleje) se 4 ml rozpouštědla. Tato extrakce byla prováděna v n-hexanu, metanolu, vodě a 80% metanolu. Vzorokly byly centrifugovány (6000 ot/min; 5 min), aby došlo k oddělení oleje od extrakčního činidla a extrakt byl následně odebrán. Byly provedeny extrakce při 25 °C i 40°C.

Byla změřena spektra extraktů v rozmezí 800–200 nm.

2.3.3.3. *Extrakce rakytníkové oleje do etanolu v poměru 295:5*

Pro porovnání UV/VIS spekter byl připraven rakytníkový extrakt v koncentraci, v jaké byl připravován pro přípravu škrobových filmů. Do 295 g etanolu bylo přidáno 5 g rakytníkového oleje. Tato směs byla následně extrahována při 25 °C po dobu 24 h. Po uplynutí této doby byl roztok dán do centrifugy (6000 ot/min; 5 min), aby došlo k oddělení etanolu od olejové vrstvy.

2.3.3.4. *Příprava roztoku DPPH volného radikálu v metanolu*

Pro stanovení antioxidačních vlastností byl použit roztok DPPH volný radikál, kdy bylo naváženo 12,5 mg DPPH a rozpuštěno v 500 ml metanolu [88]. Takto připravený roztok byl skladován ve tmě a v lednici při (5 ± 1) °C.

2.3.3.5. *Optimalizace metody DPPH v metanolu*

Byl potřeba optimalizovat čas potřebný k extrakci antioxidantů ze škrobového filmu a jejich následnou schopnost zhasení volných radikálů DPPH.

Na optimalizaci byla v prvním případě využita metoda QUENCHER, tzn. nemodifikovaný škrobový film o koncentraci 0,3 g rakytníkového oleje na 100 g škrobové pasty byl smíchán přímo s roztokem DPPH. Film byl před vlastní analýzou skladován po dobu několika týdnů v exikátoru, který byl naplněn silikagelem. Do plastových centrifugačních zkumavek o objemu 15 ml bylo naváženo zhruba 0,1000 g. Tato navážka byla smíchána se 4 ml roztoku DPPH radikálu v metanolu. Zároveň byl připraven i slepý pokus, kdy do plastové zkumavky byl dán pouze roztok DPPH v metanolu o objemu 4 ml. Takto připravené zkumavky byly dány do rotátoru, kde byly po dobu 0; 2; 4,5; 9; 17; 20 hodin při 25 °C ve tmě.

Jako druhý způsob optimalizace byl připraven extrakt škrobového filmu (0,1 g/100 g). Ke škrobovému filmu (100 mg) byly přidány 4 ml etanolu. Ten byl dán do rotátoru, kde rotoval po dobu 24 h při teplotě 25 °C. Pro samotnou optimalizaci bylo ke 3 ml roztoku DPPH v metanolu přidáno 500 µl čerstvého etanolického extraktu škrobového filmu. Od okamžiku smíchání byla sledována změna absorbance po dobu 60 minut (v 1 min intervalech) při 515 nm.

Při vlnové délce při 515 nm byla v jednotlivých časech proměřena absorbance daných vzorků a zároveň i hodnota slepého vzorku.

2.3.3.6. Příprava roztoku DPPH volného radikálu v isooktanu

DPPH byl rozpuštěn v isooktanu tak, aby výsledná koncentrace byla 0,1 mM. Tento roztok byl skladován v lednici za nepřístupnosti světla při teplotě (5 ± 1) °C [64].

2.3.3.7. Optimalizace metody DPPH volný radikál v isooktanu

Optimalizace byla provedena pouze pomocí metody QUENCHER. Byl použit nemodifikovaný škrobový film o koncentraci 0,2 g rakytníkového oleje na 100 g škrobové pasty. Ten byl před vlastní analýzou skladován po dobu několika týdnů v exikátoru, který byl naplněn silikagelem. Do plastových centrifugačních zkumavek o objemu 15 ml bylo naváženo zhruba 0,1000 g. Tyto navážky byly smíchány se 4 ml roztoku DPPH v isooktanu. Zároveň byl připraven i slepý pokus, kdy do plastové zkumavky byl dán pouze roztok DPPH v isooktanu o objemu 4 ml. Takto připravené zkumavky byly dány do rotátoru, kde byly po dobu 0; 2; 4,5; 9; 17; 20 a 22 hodin. Po celou dobu zkumavky rotovaly. Vzorky i samotný slepý pokus, byly uloženy v termostatu při teplotě 25 °C za nepřítomnosti světla.

Při vlnové délce při 509 nm byla v jednotlivých časech proměřena absorbance daných vzorků a zároveň i hodnota absorbance slepého pokusu.

2.3.3.8. Příprava roztoku ABTS radikál

Na přípravu roztoku ABTS byla do 10 ml odměrné baňky dána 1 tableta obsahující ABTS o hmotnosti 10 mg a rozpuštěna v 5 ml destilované vody. Takto připravený roztok byl míchán do doby, než došlo k úplnému rozpuštění tablety. Mezitím byl do druhé 10 ml odměrné baňky připraven roztok peroxidisíranu draselného, kdy byla navážka rozpuštěna v destilované vodě, aby výsledná koncentrace byla 0,064 mol/l.

K roztoku ABTS ve vodě (5 ml) bylo přidáno 100 µl roztoku peroxidisíranu draselného. Po smíchání byla tato směs ponechána ve tmě po dobu 16 h. Po uplynutí této doby bylo ze směsi odpipetováno 2,5 ml do 100 ml odměrné baňky. Tato baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Výsledný roztok byl použit pro samostatné experimenty.

2.3.3.9. *Optimalizace metody ABTS*

K optimalizaci za použití metody QUENCHER byl použit nemodifikovaný film o koncentraci 0,1 g rakytníkového oleje/ 100 g škrobové pasty. Do plastových zkumavek bylo naváženo v rozmezí 100–110 mg škrobového filmu. Následně byly ke každé navážce přidány 4 ml výsledného roztoku ABTS. Vzorky byly měřeny v časech 0; 2; 6; 17; 20; 22; 24 a 26 h. Absorbance vzorků byla měřena při vlnové délce 734 nm.

Druhý způsob optimalizace bylo pomocí reakce extraktu s reakčním roztokem. Zde byl připraven extrakt škrobového filmu (0,1 g/100 g). Ke škrobovému filmu (100 mg) byly přidány 4 ml metanolu nebo etanolu. Ten byl dán do rotátoru, kde rotoval po dobu 24 h při teplotě 25 °C. Ke 3 ml výsledného roztoku ABTS bylo přidáno 500 µl čerstvého extraktu. Byla sledována změna absorbance při 734 nm pod dobu 60 minut (v pravidelných intervalech 1 minuty).

2.3.3.10. *Kalibrační řada Troloxu*

Pro metodu DPPH v metanolu a ABTS byla použita následující kalibrační řada Troloxu. Do odměrné baňky o objemu 100 ml byla navážena standardní látka Trolox a doplněna metanolem, aby výsledná koncentrace roztoku byla 500 mg/l. Z tohoto objemu byla do 10 ml odměrných baněk vytvořena kalibrační řada v rozmezí 0–60 mg/l. Takto připravené kalibrační roztoky byly pak smíchány s roztokem dané metody (300 µl daného kalibračního roztoku s 3 ml roztoku DPPH v metanolu/ABTS). Vybrané hodnoty koncentrací byly různé dle jednotlivých metod. U metody DPPH v isooktanu nelze takto připravenou kalibrační řadu použít vzhledem k nemísitelnosti isooktanu a metanolu.

2.3.3.11. *Příprava vzorku pro skenovací elektronovou mikroskopii a infračervenou spektroskopii*

Vzorky byly skladovány v exsikátoru naplněným silikagelem při laboratorní teplotě za nepřítomnosti světla. Bez dalších úprav byly použity pro vlastní experiment.

Pro IČ byl použit i nezředěný etanolický extrakt rakytníkového oleje, který byl připraven podle stejného postupu jako v kapitole 2.3.3.3.

Podmínky použity u *infračervené spektroskopie* byly následující. Pozadí bylo skenováno automaticky po 30 minutách. Pokud se objevily nečistoty ve spektru, bylo pozadí skenováno manuálně. Jak v případě skenování pozadí, tak v případě skenování vzorků bylo provedeno dohromady 64 skenů. Výsledná spektra byla ukládána jako závislost transmitance [%] na vlnočtu [cm^{-1}].

U *skenovací elektronové mikroskopie* byl použit detektor sekundárních elektronů (SE detektor). U většiny vzorků bylo použito rozdílné zvětšení (SEM MAG). Pohybovalo se v rozmezí 281 x – 1,58 kx. Urychlovací napětí (SEM HV) primárního elektronového svazku v módu vysokého vakua bylo ve všech případech 8 kV. Pracovní vzdálenost (SEM WD) se pohybovala v rozmezí 12,94–16,64 mm.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1. Testování antimikrobiálních účinků škrobového filmu

Již v některých studiích (konkrétně například ve studii Kaushal Manisha z roku 2011) byly testovány antimikrobiální účinky rakytníkového oleje na vybrané druhy bakterií, konkrétně na *B. subtilis* a *E. coli*. V tomto případě byla zóna inhibice zjištěna pouze u bakterie *E. coli* [69].

U testování antimikrobiálních účinků škrobového filmu, který obsahoval rakytníkový olej jako antimikrobiální látku, difúzní metodou, byly po uplynutí inkubační doby odečteny zóny inhibice. Do tabulek níže byly tyto zóny inhibice u jednotlivých mikroorganismů zaznamenány v závislosti na koncentraci rakytníkového oleje na 100 g škrobové pasty. Naměřené zóny inhibice nemodifikovaných škrobových filmů nalezneme v tabulce 5. V tabulce 6 nalezneme hodnoty, které patří filmům s modifikací.

Tabulka 5 – průměrné zóny inhibice bakterií, kvasinek a plísní pro nemodifikované filmy

| | | Ø inhibiční zóny [mm] | | | |
|--------|---------------------------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|
| | | 0 g / 100 g* | 0,1 g / 100 g* | 0,2 g / 100 g* | 0,3 g / 100 g* |
| 0% OSA | <i>Bacillus cereus</i> | 3,0 ± 2,0** | 6,3 ± 3,5** | 5,0 ± 1,4** | 6,3 ± 3,9** |
| | <i>Escherichia coli</i> | - | - | - | - |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | - | - | - | - |
| | <i>Aspergillus brasiliensis</i> | - | - | - | - |
| | <i>Candida albicans – MALT</i> | - | - | - | - |
| | <i>Candida albicans – M-H</i> | - | - | - | - |

OSA – oktenyl sukcinát

Aritmetický průměr ± směrodatná odchylka

*koncentrace rakytníkového oleje na 100 ml škrobové pasty

**zóna byla zakalená, nevyjasněná

Průměrná zóna inhibice pro každou koncentraci byla odečítána ze dvou Petriho misek

Tabulka 6 – průměrné zóny inhibice bakterií, kvasinek a plísní pro modifikované filmy

| | | Ø inhibiční zóny [mm] | | | |
|--------|---------------------------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|
| | | 0 g / 100 g* | 0,1 g / 100 g* | 0,2 g / 100 g* | 0,3 g / 100 g* |
| 7% OSA | <i>Bacillus cereus</i> | 5,7 ± 3,3** | 4,3 ± 0,6** | 5,5 ± 0,7** | 3,7 ± 1,2** |
| | <i>Escherichia coli</i> | - | - | - | - |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | - | - | - | - |
| | <i>Aspergillus brasiliensis</i> | - | - | - | - |
| | <i>Candida albicans</i> – MALT | - | - | - | - |
| | <i>Candida albicans</i> – M-H | - | - | - | - |

OSA – oktenyl sukcinát

Aritmetický průměr ± směrodatná odchylka

*koncentrace rakytníkového oleje na 100 ml škrobové pasty

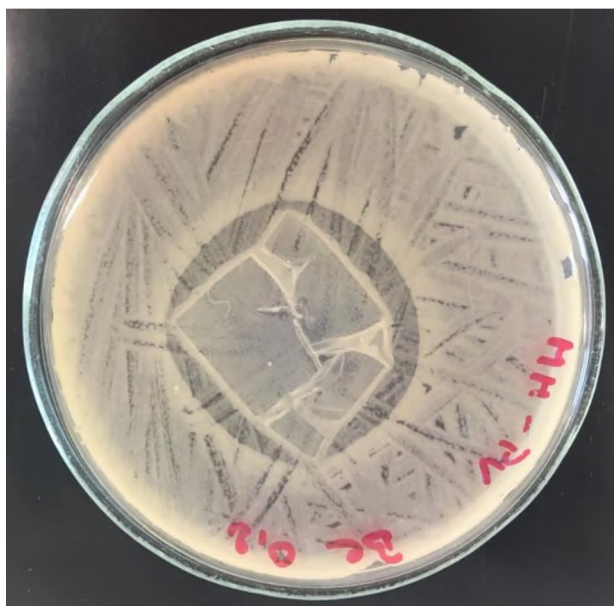
**zóna byla zakalená, nevyjasněná

Průměrná zóna inhibice pro každou koncentraci byla odečítána ze dvou Petriho misek

V minulosti byla testována antimikrobiální aktivita bakterie *St. aureus*, *E. coli*, plísně *A. brasiliensis* a kvasinky *C. albicans*. Jako antimikrobiální látka byla použita směs rakytníkového oleje a oleje z kukuřičných klíčků. Zde bylo zjištěno, že do 14 dnů došlo ke snížení počtu bakterií na 10^2 CFU/ml a zároveň nebylo po této době zaznamenáno žádné zvýšení. Na základě zjištěných výsledků byl vyvozen závěr, že tato směs by měla mít antimikrobiální účinky [89]. V našem případě, bez rozdílu na použitý škrobový film, byly Petriho misky zaočkované kulturou *A. brasiliensis* porostlé včetně povrchu testovaného materiálu. Tudíž zde nebyla viditelná žádná zóna inhibice. Podobně na tom byly živné agary, na které byla inokulována kvasinka *C. albicans* a bakterie *E. coli* a *St. aureus*. Zde byl pozorován nárůst pouze na živném agaru, nikoliv na povrchu filmu. Všechny výše zmíněné mikroorganismy byly hodnoceny jako rezistentní k antimikrobiálním účinkům rakytníkového oleje, který škrobový film obsahoval. Kolem testovaného škrobového filmu nebyla znatelná žádná zóna inhibice stejně jako u testované plísně. Příčinou může být velmi nepatrná koncentrace rakytníkového oleje na 100 g škrobového filmu.

Oproti tomuto zjištění, na živných půdách, které byly naočkovány kulturou *B. cereus*, byla vidět zóna inhibice. Zóna nebyla čirá, byl v ní pozorován slabý nárůst MO, měla jasné ohraničení. Tato zóna je dobře vidět na obrázku 17 a dále také v příloze I. Vzhledem k tomu, že zóna inhibice byla i u škrobového filmu, který neobsahoval žádný podíl rakytníkového oleje, tak můžeme říct, že není způsobena antimikrobiálními účinky rakytníkového oleje. Se zvyšující

se koncentrací oleje obsaženého ve filmu, neměla velikost inhibiční zóny rostoucí trend. Zóna mohla být způsobena částečným rozštěpením škrobu ze škrobového filmu (*Bacillus* produkuje velkou řadu enzymů, díky kterým dokáže hydrolyzovat mj. i škrob [90]) a následně mohlo dojít k uvolnění glycerolu, který se přidává do filmu při výrobě. Uvolnění glycerolu mohlo mít za následek snížení aktivity vody v blízkém okolí testovaného materiálu a následnou částečnou inhibici růstu této bakterie. O snižování aktivity vody vlivem glycerolu pojednává článek Nicolase Nguyen van Longa a spol. z roku 2017⁷. Minimální aktivita vody pro vegetativní růst bakterie *B. cereus* je dle literatury 0,912 [29]. Zda je tato teorie správná, bylo ověřováno pomocí další použité metody – zjišťování změny aktivity vody vlivem bakterie *B. cereus*.



Obrázek 17 – modifikovaný škrobový film (0,2g rakytníkového oleje /100 g škrobové pasty) na živné půdě M-H zaočkovaný kulturou *B. cereus* s viditelnou zakalenou inhibiční zónou

Již v minulosti byla testována antimikrobiální aktivita vegetativních buněk, spor a biofilmu *Bacillus cereus*. Jako potenciálně antimikrobiální látka byla použita mírně kyselá elektrolyzovaná voda. Zde bylo zjištěno, že spory jsou více odolné proti této antimikrobiální látce než vegetativní buňky, neboť dochází k narušení membrány [91]. Je možné, že pokud by byly použity pro náš experiment spory bakterie *B. cereus* místo vegetativních buněk, k žádné zóně inhibice by nejspíš nedošlo. Plášť spor má dvě vrstvy proteinu, která jim poskytuje větší ochranu proti chemickým látkám, vyššímu tlaku i elektrické energii. Odolnost je kromě bílkovinného povlaku zvýšena faktory jako jsou sucho, vysoký obsah kyseliny dipikolinové a

⁷ Modelling the effect of water activity reduction by sodium chloride or glycerol on conidial germination and radial growth of filamentous fungi encountered in dairy foods [105]

dvojmočné kationty v jádře. Peptidoglykanová kůra je důležitá bariéra spor pro malé hydrofilní molekuly. Ty jsou součástí antimikrobiálních složek [32]. Pokud by došlo k poklesu hodnoty pH vlivem antimikrobiální látky, pod hodnotu, která je nezbytná pro minimální růst, mohlo by dojít k potlačení mikrobiálního růstu. Nízké pH zároveň potlačuje klíčení bakteriálních spor [32].

Již několik studií se zaměřovalo na antimikrobiální účinky přírodních extraktů, které by byly schopny inhibovat růst *B. cereus*. Ve studii Fei Peng, Xu Yunfeng a Zhao Shengjuan bylo zjištěno, že vlivem přírodního extraktu došlo ke změně membránového potenciálu. Díky tomu mohlo dojít ke ztrátě určitého množství energie (ATP – adenosintrifosfát) a tím pádem došlo k omezení růstu či smrti bakterie. V podobném případě byla u buňky bakterie *Vibrio cholerae*, která byla vystavena metanolovému extraktu nopálního kaktusu (opuncie), pozorována též depolarizace buněčné membrány [92; 93].

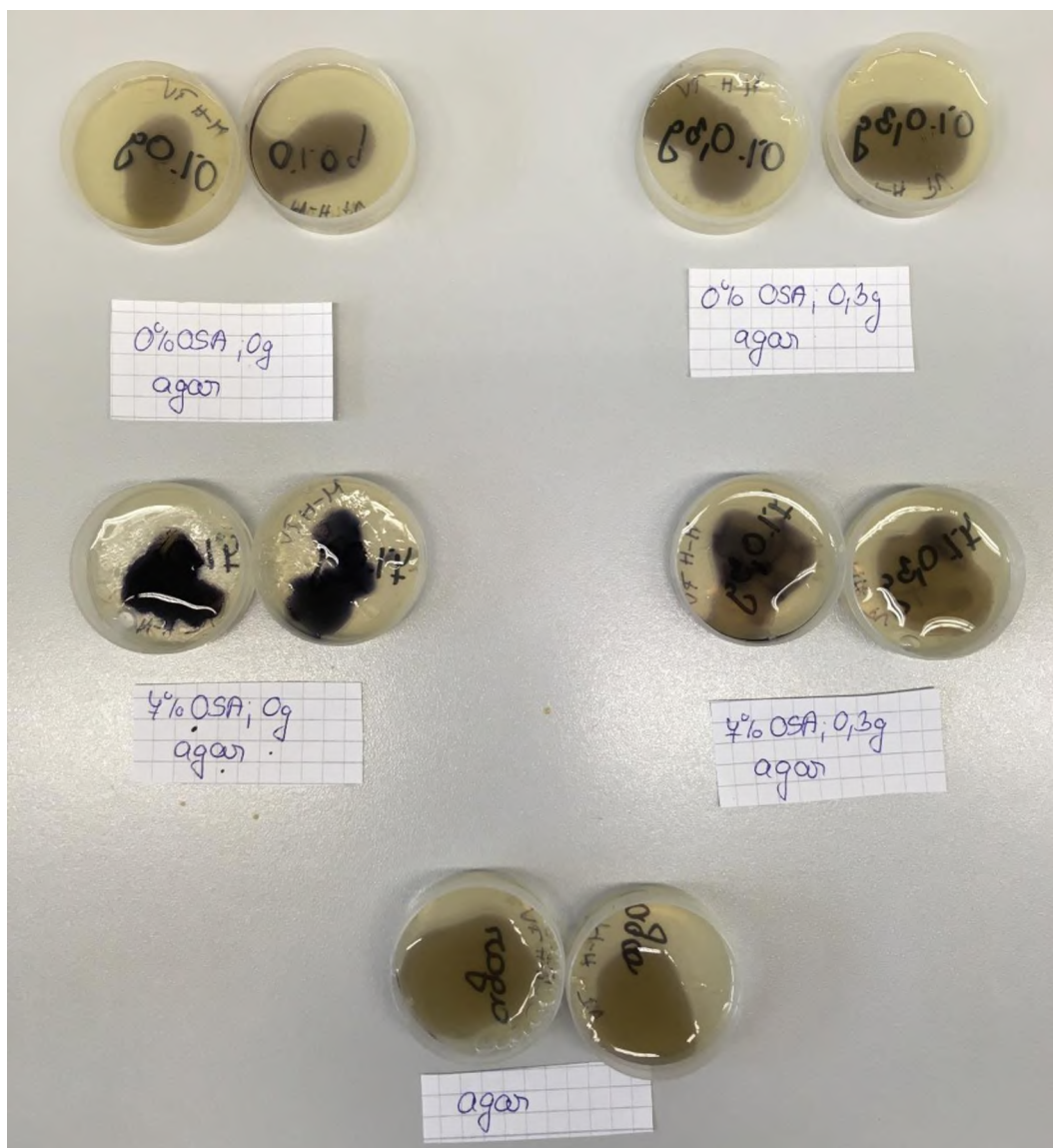
3.2. Zjištění změny aktivity vody vlivem bakterie *B. cereus*

Misky připravené pro měření aktivity vody, která mohla být způsobena vlivem bakterie *B. cereus* na škrobový film, byly po inkubaci (24 h při 30 °C) proměřeny na přístroji AquaLab. Hodnota a_w u všech misek byla rovna 1. Tyto agary byly v porovnání s agary, na kterých bylo provedeno antimikrobiální testování, čerstvé, dalo by se říct méně vysušené. Vzhledem k tomuto zjištění, že snížení aktivity vody může být pouze lokální záležitost, byl proveden biochemický test hydrolýzy škrobu.

Tento test se provádí za použití Lugolova roztoku (roztok jódu a jodidu draselného). Říká nám, že pokud působením mikroorganismů dojde k hydrolýze škrobu na rozkladné produkty, vzniknou kolem nezbarvené zóny. Pokud k hydrolýze nedošlo, škrob se zbarví intenzivně modře. Červené nebo hnědé zbarvení signalizuje, že škrob byl rozložen jen částečně. Výsledky je nutné odečítat ihned, neboť modré zbarvení po chvíli mizí.

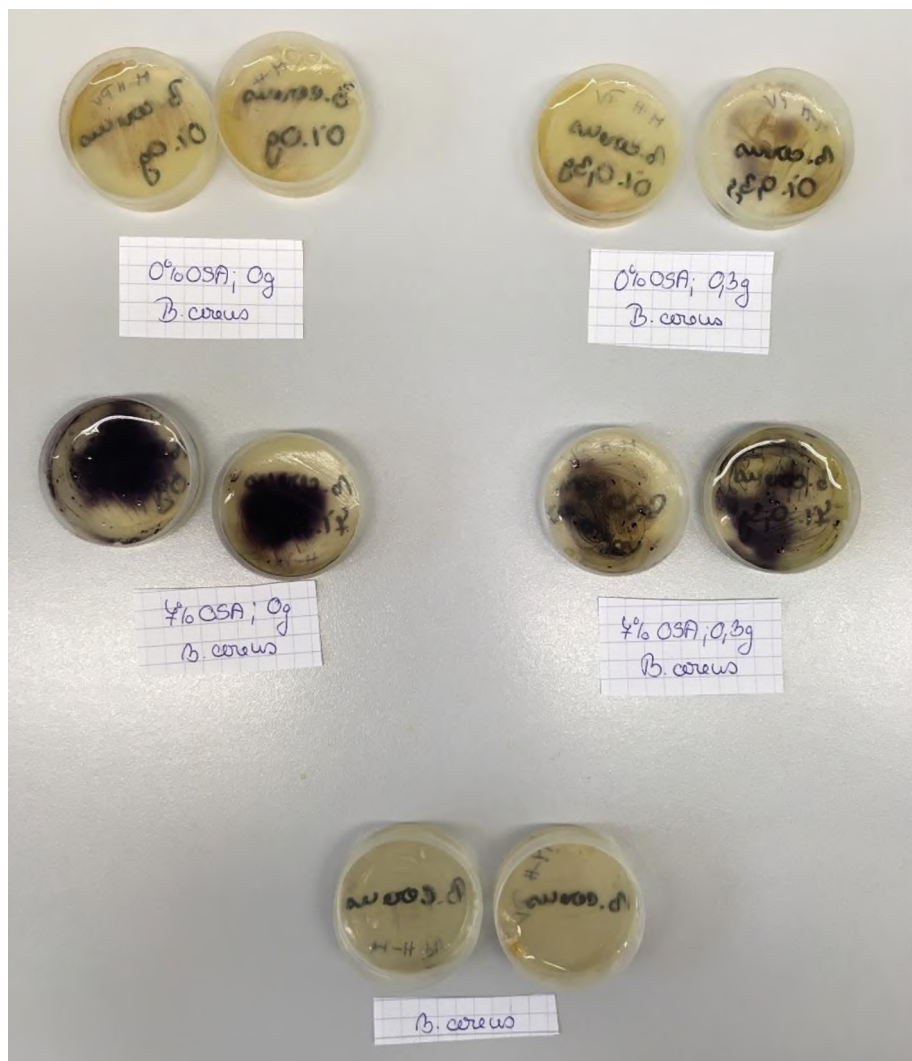
Z náhodně vybraných misek můžeme na obrázku 18 (misky nezaočkované bakterií) vidět u modifikovaných (7% OSA) filmů tmavě modré zbarvení, což nám značí přítomnost škrobu. Po porovnání nemodifikovaných (0% OSA) škrobových filmů s čistým agarem můžeme po okometrickém subjektivním porovnání říct, že se z filmu uvolňuje minimální množství škrobu (Lugolův roztok se zbarvil jen velmi slabě, je skoro porovnatelný s čistým agarem). Už během odstraňování škrobového filmu z misky, bylo viditelné, že nemodifikovaný škrobový film byl celistvý, odstranitelný pinzetou, zatímco škrobový film s modifikací byl nejspíš vlivem

zvýšeného množství vody rozložen na gelovitou suspenzi, která šla odstranit pouze setřením povrchu sterilním tampónem.



Obrázek 18 – nezačkovávané misky s čistým agarem a škrobovými filmy po pokapání Lugolovým roztokem

Na obrázku 19 (misky, které byly začkovávané kulturou *B. cereus*) vidíme též intenzivní tmavě modré zbarvení u modifikovaných (7% OSA) škrobových filmů. U nemodifikovaných (0% OSA) škrobových filmů je vidět pouze lehce modré až hnědé zbarvení, které je velmi podobné čistému agaru. Konzistence filmů byla po inkubaci stejná jako v případě, kdy misky nebyly začkovávané, tzn. modifikované filmy vytvořili na povrchu gelovitou suspenzi.



Obrázek 19 – misky zaočkované bakterií *B. cereus* a se škrobovými filmy po pokapání Lugolovým roztokem

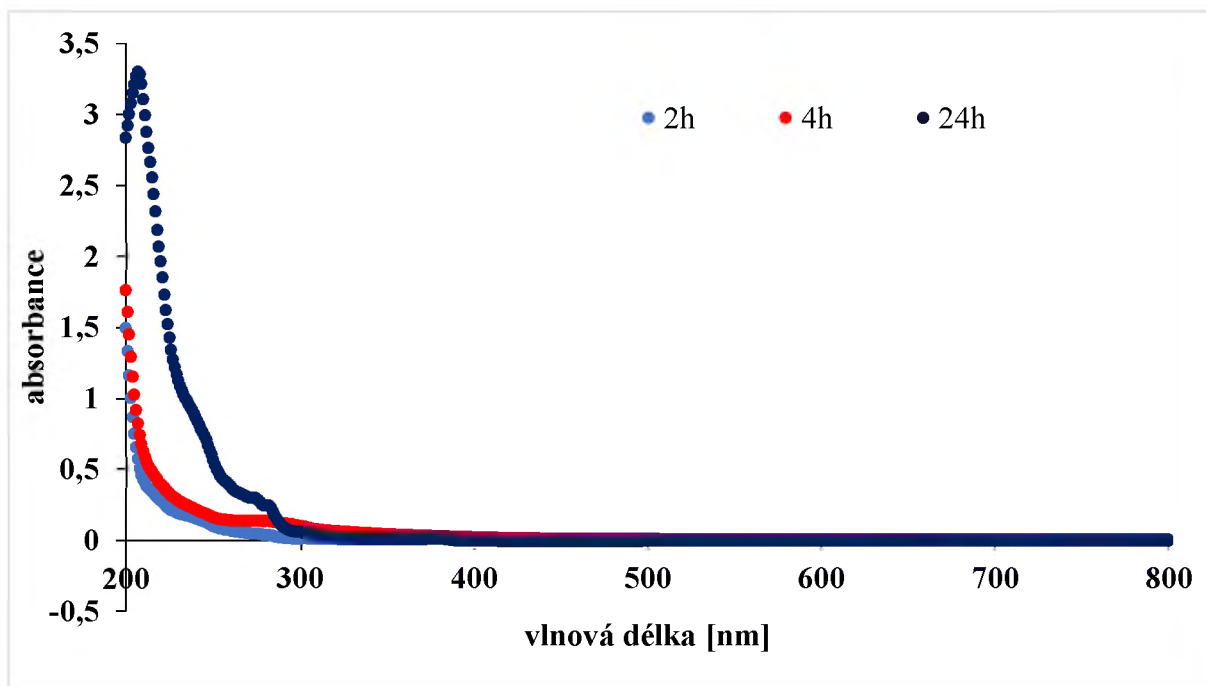
Z obrázku 18 a 19 je patrné, že se z filmů uvolňuje škrob ne vlivem bakterie *B. cereus*, ale vlivem kontaktu materiálu s vodou. V případě nemodifikovaných filmů se uvolní jen velmi nepatrné množství. U modifikovaných filmů se díky rozložení vlivem vody/větší vlhkosti z filmu uvolní větší množství škrobu.

3.3. UV/VIS Spektrometrie extraktů škrobových filmů

Orientační doba potřebná pro extrakci látek ze škrobových filmů byla stanovena pomocí vybraných rozpouštědel – n-hexanu a metanolu. Následně byla spektra proměřena a popsána. Spektra, která jsou níže zmíněna a nejsou součástí této kapitoly, jsou součástí přílohy II.

Spektrofotometrie extraktů škrobových filmů v n-hexanu

Po extrakci škrobových filmů do n-hexanu byla proměřena spektra po 2, 4, 24 h při 25 °C. Spektra modifikovaných i nemodifikovaných filmů si byla velmi podobná až stejná. Na obrázku 20 (modifikované filmy) je s rostoucí dobou extrakce viditelný pík v rozmezí 200–220 nm. Tento pík je viditelný i u nemodifikovaných filmů (obrázek P4) a mohl by odpovídat násobným vazbám mastných kyselin, které rakytníkový olej obsahuje [94; 95]. Pod 300 nm je viditelný drobný pík, který by dle literatury mohl odpovídat tvorbě konjugovaných dienů, trienů, tetraenů [96]. Nad 300 nm již ve spektru není nic významného.

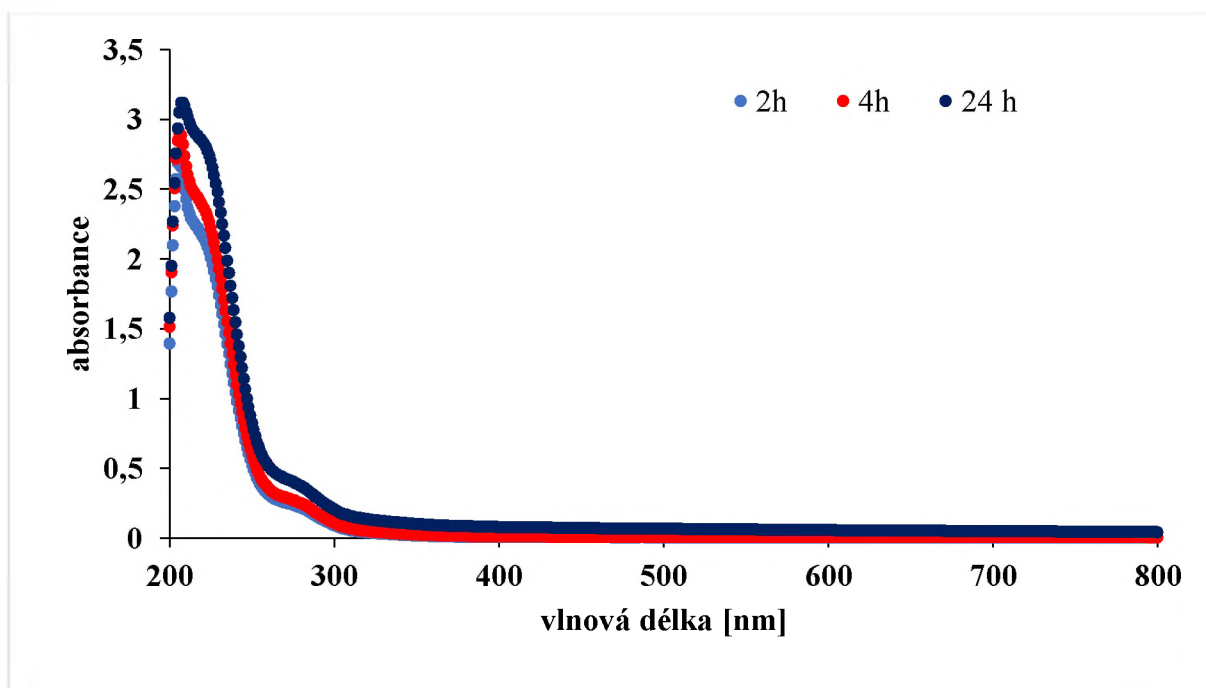


Obrázek 20 – spektra n-hexanových extraktů modifikovaných škrobových filmů v různých časech extrakce

Spektrofotometrie extraktů škrobových filmů v metanolu

V prvním případě byl experimentálně zjišťován čas, který je potřeba k extrakci při 25 °C. I zde byla změřena spektra po 2, 4 a 24 h jako tomu bylo v případě extrakce do n-hexanu. Spektra modifikovaných (obrázek 21) i nemodifikovaných (obrázek P5) filmů byla velmi podobná, ve všech časech byl viděn v rozmezí 200–220 nm pík, jako tomu bylo v případě u extrakce filmů do n-hexanu. Tento pík by též mohl být přisuzován násobným vazbám. Může se zároveň jednat o spojení 2 píků, čemuž by odpovídal tvar píku. Pod 300 nm je viditelné zvlnění, které by mohlo naznačovat pík jako je v tomu v případě extrakce do n-hexanu.

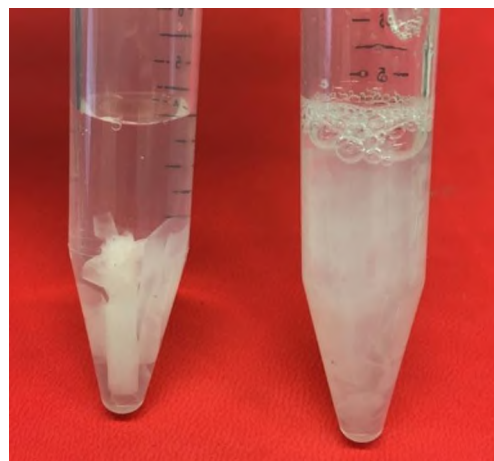
Rozdíl v modifikaci filmu byl pouze v tom, že u nemodifikovaných filmů byla pozorována nižší hodnota absorpance. Tato hodnota u nemodifikovaných filmů dosahovala hodnot okolo 1; 1,5 a 2 (pro extrakci po 2; 4 a 24 h). V porovnání s modifikovanými filmy je to v některých případech skoro 2x menší hodnota absorpance. To znamená, že u nemodifikovaných filmů prošlo vzorkem větší množství záření než u modifikovaných.



Obrázek 21 – spektra metanolových extraktů modifikovaných filmů v různých časech extrakce

Spektrofotometrie extraktů škrobových filmů do vody

U extrakce po dobu 24 h při 25 °C u nemodifikovaných škrobových filmů, lze ve spektru (obrázek P6) vidět pouze malé „zvlnění“, které by mohlo naznačovat pík zhruba mezi 200–250 nm. U modifikovaných filmů nebylo možné změřit UV/VIS spektrum za stejných podmínek, jako tomu bylo v případě filmu bez modifikace. Po extrakci při 25 °C po dobu 24 h vznikla gelovitá suspenze s částicemi filmů, která ani po odstředění na centrifuze a odebráním vodné části neposkytla potřebné minimální množství kapaliny pro změření spektra na spektrofotometru. Rozdílné chování modifikovaného a nemodifikovaného filmu ve vodě po 24 h můžeme vidět vpravo na obrázku 22.



Obrázek 22 – vlevo nemodifikovaný škrobový film; vpravo modifikovaný škrobový film, který po extrakci s vodou vytvořil gelovitou suspenzi

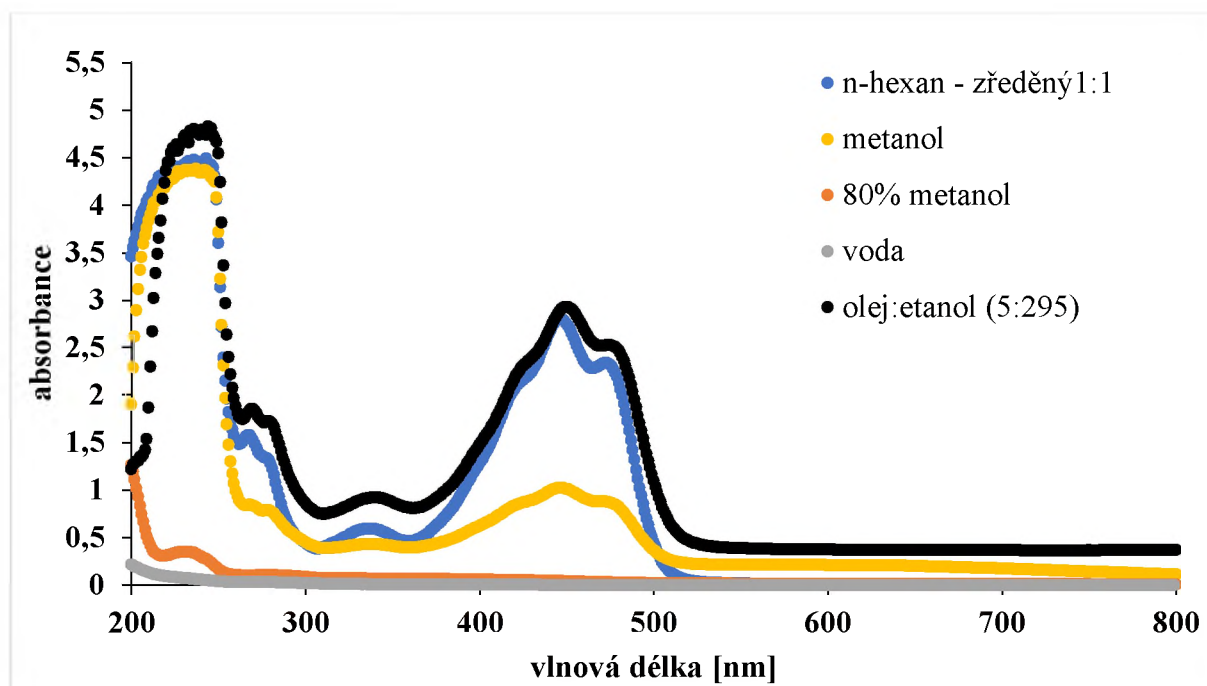
Spektrofotometrie extraktů škrobových filmů do 80% metanolu a čistého etanolu

U 80% metanolu je na spektru (obrázek P7) vidět podobné „zvlnění“, které je pozorovatelné u spektra, kdy jako rozpouštědlo byla použita voda. Naopak u extrakce do etanolu (obrázek P8) můžeme sledovat opět pík v rozmezí 220–230 nm.

Vzhledem k faktu, že rozdíly ve spektrech modifikovaných a nemodifikovaných filmů jsou kromě hodnot absorbance zanedbatelné, pro extrakci filmů při 40 °C byl zvolen pouze nemodifikovaný škrobový film. Zvolená teplota byla použita za účelem zefektivnění extrakce.

N-hexan byl pro tuto metodu nevhodný, neboť při teplotě 40 °C po delší dobu došlo vlivem těkavosti par k vyražení zátky a tím vylití roztoku během rotace. U metanolu, vody a 80% metanolu během extrakce nedošlo k problémům. Ze získaných spekter, která jsou součástí přílohy II, můžeme vyčíst, že zvýšená teplota nepomohla ke zefektivnění extrakce.

Extrakce oleje s rozpouštědly



Obrázek 23 – extrakce oleje do různých rozpouštědel při 25 °C po dobu 24 h

Z obrázku 23 můžeme vidět, že do n-hexanu (původní extrakt byl zředěný v poměru 1:1) a metanolu se z oleje vyextrahovaly pravděpodobně karotenoidní látky (cca 360–500 nm) [97]. U rozpouštědel n-hexan, metanol a 80 % metanol je patrný pík kolem 240 nm. U n-hexanu a metanolu vidíme ještě kolekci píků mezi 250–300 nm. Všechny tyto píky by mohli značit násobné vazby ve vzorku [96].

Zároveň byla provedena extrakce rakytníkového oleje s etanolem ve stejném poměru, který byl následně použit při výrobě škrobových filmů (295:5 etanol: olej).

V původním, nezředěném extraktu, můžeme na obrázku 23 pozorovat v UV-VIS spektru intenzivní, neostrý pík při 240 nm a zhruba při 260–275 nm je vidět kolekce píků. Všechny tyto píky by dle literatury mohli patřit konjugovaným dienům, trienům nebo tetraenům [96]. Velmi intenzivní pás můžeme vidět v rozmezí 340–500 nm, který by mohl svou polohou odpovídat karotenům [97], které se z rakytníkového oleje vyextrahovaly. Dle tvaru píku by se mohlo jednat konkrétně o β -karoten nebo lutein [98].

Na základě spekter extraktů škrobových filmů a oleje v jednotlivých rozpouštědlech, můžeme říct, jaké látky se vyextrahovaly ze škrobových filmů a zda tyto látky jsou součástí rakytníkového oleje.

U extraktu oleje do metanolu i n-hexanu vidíme okolo 360–500 nm pík, který je typický pro karotenoidní látky. Nejspíš vlivem velkého naředění rakytníkového extraktu, jenž byl použit přípravu filmů, tento pík nevidíme u extraktů filmů. Vzhledem k tomu, že byl využit škrobový film o koncentraci 0,3 g rakytníkového oleje na 100 g škrobové suspenze, můžeme tedy říct, že koncentrace karotenoidů ve škrobovém filmu je minimální.

U extrakce 80 % metanolem byl v případě extrakce oleje vidět pík okolo 250 nm, který u extrakce škrobových filmů vidět není. To může být způsobeno též velkým zředěním extraktu.

Pokud se budeme bavit o vodě, jako o rozpouštědle, můžeme o něm říct, že je pro náš experiment nevhodná. Jak vidíme ve spektrech, během 24 h ani z filmů, ani z oleje nedošlo k dostatečné extrakci, aby byl ve spektru viděn jasný pík.

3.4. Metoda využívající DPPH volný radikál v metanolu

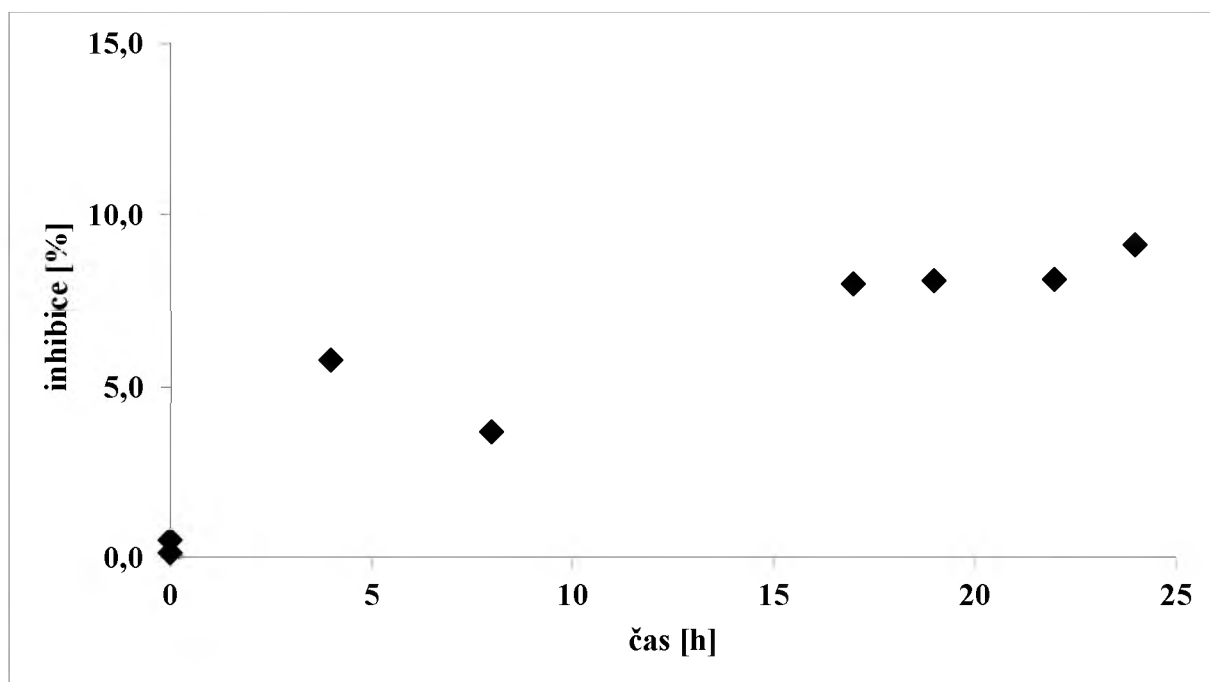
3.4.1. *Optimalizace*

Metoda QUENCHER – přímá extrakce škrobového filmu do roztok DPPH

Proměření absorbance vzorku škrobového filmu v roztoku DPPH na spektrofotometru a samotného roztoku DPPH při vlnové délce 515 nm v různých časech byly získány data, na základě kterých byla podle vztahu (7) vypočítána inhibice roztoku DPPH:

$$\text{Inhibice (\%)} = [(A_{blank} - A_{vzorek}) / A_{blank}] \cdot 100 \quad [99] \quad (7)$$

Závislost inhibice na čase byla vynesena do grafu, který můžeme vidět na obrázku 24. Na jeho základě byl zvolen optimální čas pro extrakci filmu a jeho následnou reakci vyextrahovaných látek s roztokem DPPH na 20 h. V první řadě můžeme vidět, že během prvních 17 hodin dochází k největšímu zvýšení inhibice tzn., že dochází k odbarvování roztoku vlivem antioxidační kapacity škrobového filmu. Z tmavě fialového roztoku se stává lehce světle fialový. Mezi 17. – 25. hodinou je hodnota inhibice téměř neměnná.



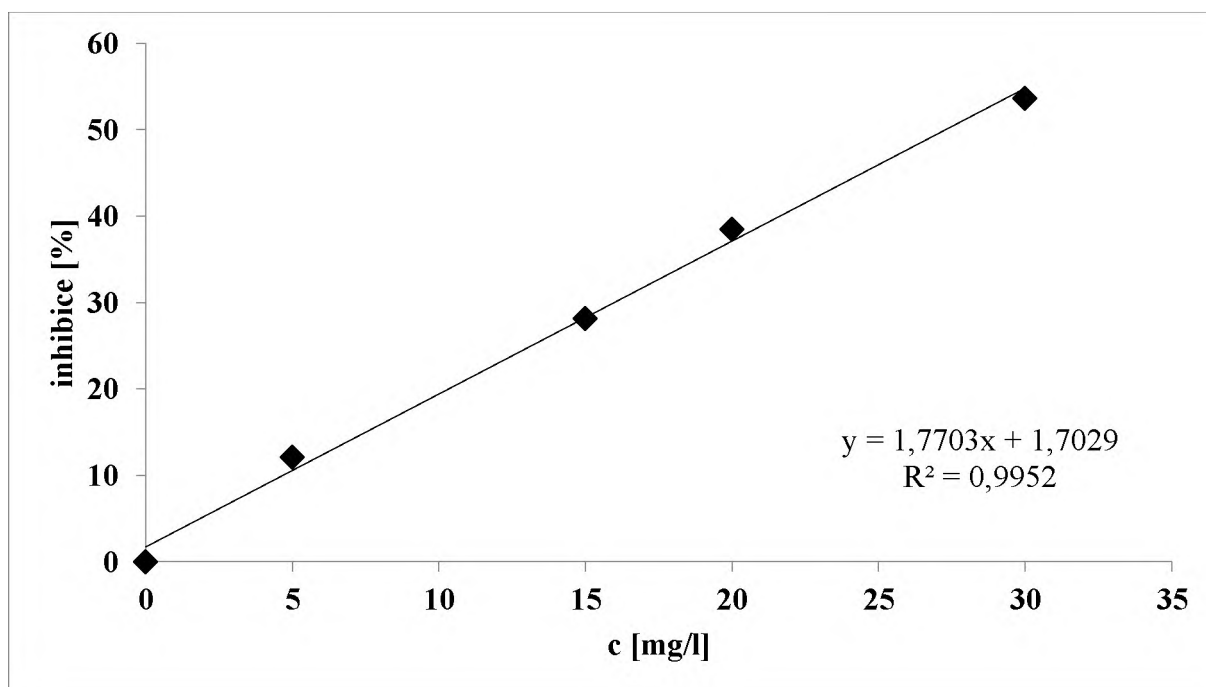
Obrázek 24 – závislost inhibice roztoku DPPH v metanolu na čase extrakce

Etanolický extrakt škrobového filmu a roztok DPPH v metanolu

Druhý experimentální způsob optimalizace metody využívající DPPH v metanolu bylo sledování úbytku absorbance roztoku DPPH vlivem etanolickeho extraktu. Do kyvety byly pipetovány 3 ml roztoku DPPH a bylo přidáno 0,5 ml etanolickeho extraktu filmu. Kinetika této reakce byla bezodkladně měřena při vlnové délce 515 nm po dobu 60 minut. V příloze III (obrázek P11) můžeme vidět nepatrný úbytek absorbance během prvních 40 minut. Mezi 40.–45. minutou můžeme vidět zvýšení absorbance na hodnotu, která zhruba odpovídá původní hodnotě. Tato hodnota absorbance je až do 60. minuty neměnná. Úbytek je zanedbatelný, pokles pouze o dvě setiny absorbančních jednotek, a proto je tento postup pro stanovení metodou DPPH v metanolu nevhodný.

3.4.2. Stanovení antioxidační kapacity vzorků s využitím DPPH v metanolu

Po 40 minutách byla proměřena absorbance připravené kalibrační řady. Do obrázku 25 byla vynesena závislost inhibice na koncentraci Troloxu.



Obrázek 25 – kalibrační závislost inhibice roztoku DPPH v metanolu na koncentraci standardní látky Trolox

Pro vlastní měření byla použita metoda QUENCHER, kdy se škrobový film extrahuje přímo do roztoku DPPH v metanolu. Nedochází tak k naředění a ztrátám látek, které mají schopnost zhášet volný radikál. Během 20 h došlo k odbarvení tmavě fialového roztoku na světle fialový. Bez ohledu na modifikaci nebo koncentraci rakytníkového extraktu použitého pro přípravu filmů byl v jednotlivých zkumavkách vidět lehký zákal roztoku, který mohl být způsoben drobnými úlomky filmu během rotace. Během rotace zároveň roztok ztratil nepatrnou část své barvy a z tmavě fialového roztoku se stal světle fialový. Tento roztok byl nejprve přefiltrován přes injekční filtry PES, aby došlo k odstranění nežádoucích úlomků/zákalu, a následně proměřen pomocí spektrofotometru při vlnové délce 515 nm. Dle výše zmíněného vztahu (7) (uvedený v kapitole 3.4.1.) byla vypočítána hodnota inhibice na základě naměřených hodnot absorbancí vzorků a roztoku DPPH.

Na základě rovnice regrese (obrázek 25) a vypočtených inhibic roztoku se vzorkem byla vypočtena koncentrace, která je ekvivalentní koncentraci Troloxu. Tato koncentrace Troloxu je u obou druhů vzorků vyjádřena na 1 g škrobového filmu a zanesena do tabulky 7.

Tabulka 7 – ekvivalentní koncentrace Troloxu na 1 g škrobového filmu nemodifikovaných (0% OSA) a modifikovaných (7% OSA) filmů získané metodou QUENCHER

| | c [g/100 g] * | Ø c mg TE/ 1 g filmu |
|--------|---------------|--------------------------|
| 0% OSA | 0 | 2,4 ± 0 ** a |
| | 0,1 | 16,9 ± 5,6 ^b |
| | 0,2 | 41,9 ± 12,5 ^c |
| | 0,3 | 58,2 ± 26,1 ^c |
| 7% OSA | 0 | 4,8 ± 2,3 *** a |
| | 0,1 | 21,8 ± 5,2 ^b |
| | 0,2 | 95,3 ± 13,5 ^d |
| | 0,3 | 116,0 ± 4,8 ^d |

OSA – oktenyl sukcinát

TE – Trolox equivalent

Výsledky získané metodou QUENCHER

Aritmetický průměr ± směrodatná odchylka; n=3; různá písmena značí statisticky rozdílné hodnoty (P <0,05)

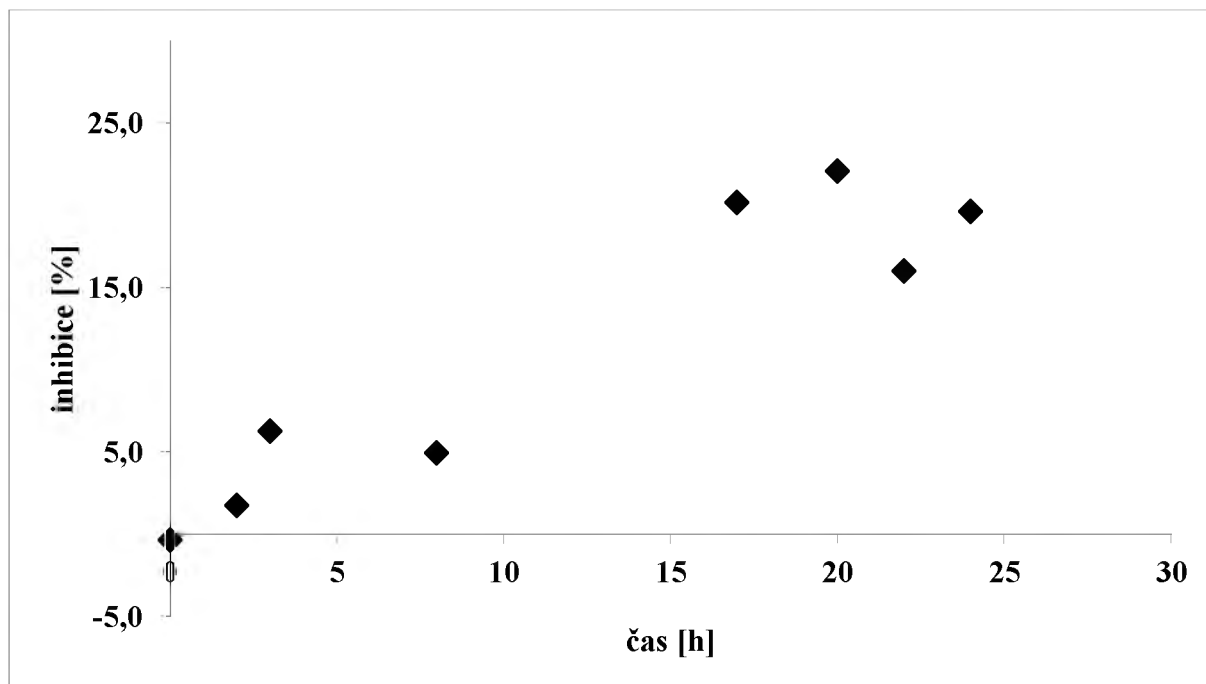
* koncentrace rakytníkového oleje ve 100 g škrobové pasty

** pro tuto koncentraci rakytníkového oleje v nemodifikovaném škrobovém filmu byla vybrána pouze 1 hodnota, neboť zbylé dvě hodnoty inhibice byly naprosto minimální a výsledná koncentrace zanedbatelná

*** pro tuto koncentraci rakytníkového oleje v modifikovaném škrobovém filmu byly vybrány pouze 2 hodnoty, neboť zbylá hodnota inhibice byly naprosto minimální a výsledná koncentrace zanedbatelná

3.5. Metoda využívající DPPH volný radikál v isooktanu

Čas potřebný k extrakci látek pomocí metody QUENCHER, tj. extrakci ze škrobového filmu a jejich následnou reakci s DPPH v isooktanu, byl získán proměřením absorbance vzorků v jednotlivých časech a slepého pokusu. Po proměření došlo k vypočtení % inhibice dle vztahu (7) zmíněným v kapitole 3.4.1. Tyto hodnoty byly vyneseny v závislosti na čase.



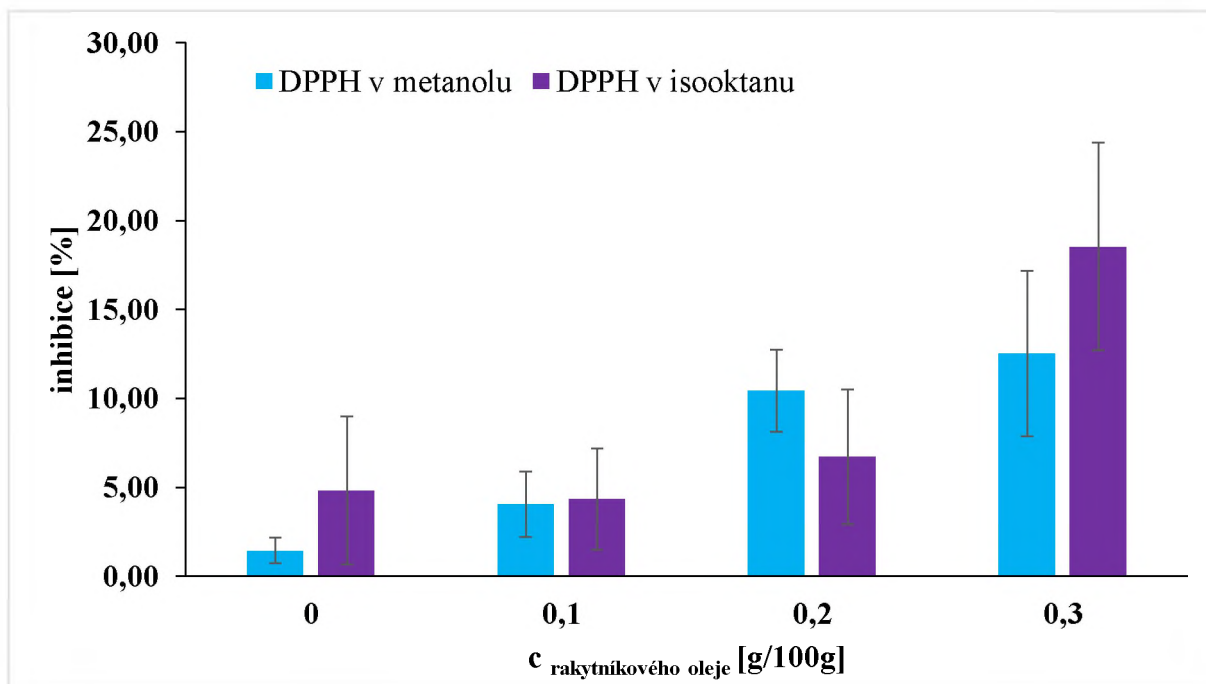
Obrázek 26 – optimalizace roztoku DPPH v isooktanu

Na obrázku 26 vidíme, že během prvních 20 hodin dochází ke zvyšování % inhibice roztoku. Po 20. hodině vidíme již nepatrný pokles inhibice roztoku a do 24. hodiny již nedochází k větším nárůstům. Proto jako optimální čas pro tuto metodu bylo zvoleno 24 h.

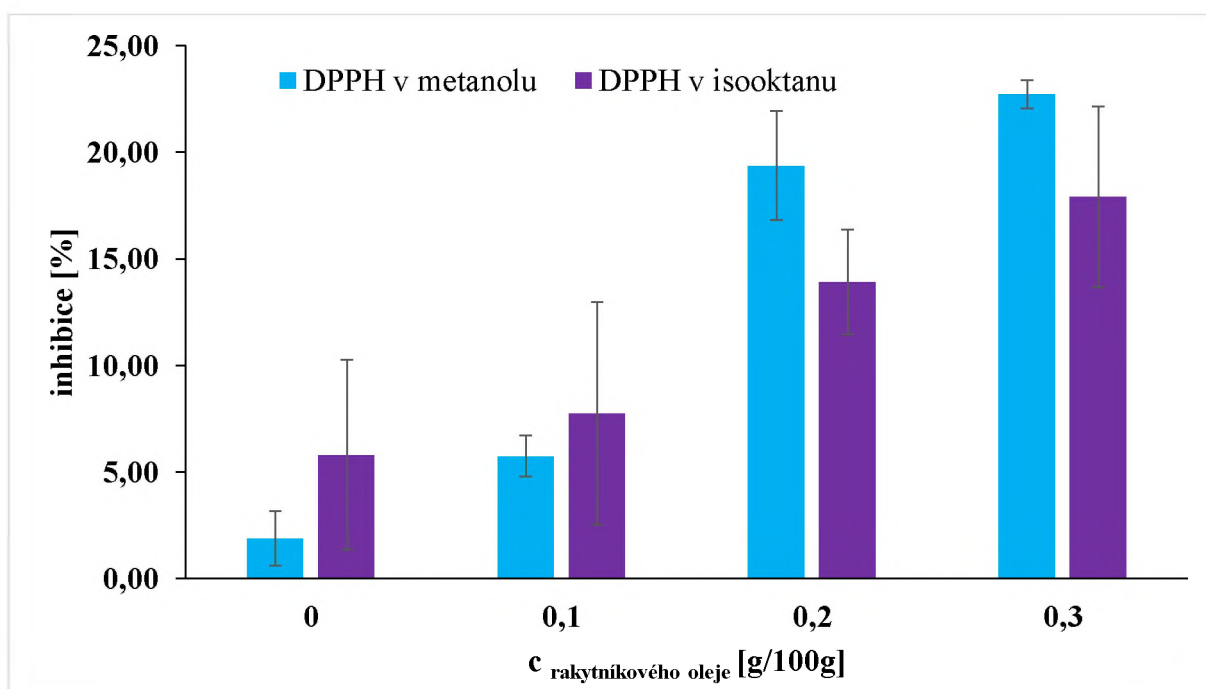
3.5.1. Stanovení antioxidační kapacity vzorků s využitím DPPH v isooktanu

U připravených vzorků metodou QUENCHER, došlo po uplynutí doby stanovené optimalizací k proměření na spektrofotometru při 509 nm a následnému výpočtu procent inhibice.

Vzhledem k tomu, že nelze tuto metodu standardizovat na látku Trolox, byla tato metoda pouze porovnána s metodou využívající DPPH v metanolu. Nutno podotknout, že koncentrace DPPH volného radikálu v rozpouštědlech byly odlišné.



Obrázek 27 – porovnání metod využívající DPPH volný radikál u nemodifikovaných škrobových filmů



Obrázek 28 – porovnání metod využívající DPPH volný radikál u modifikovaných škrobových filmů

Na základě obrázků 27 a 28 můžeme vidět, že u obou metod je převážně rostoucí trend procent inhibice v závislosti zvyšující se koncentrace oleje ve vzoru. Velký význam chyby může být nehomogenita vzorku, díky kterému není metoda využívající DPPH volný radikál vhodná.

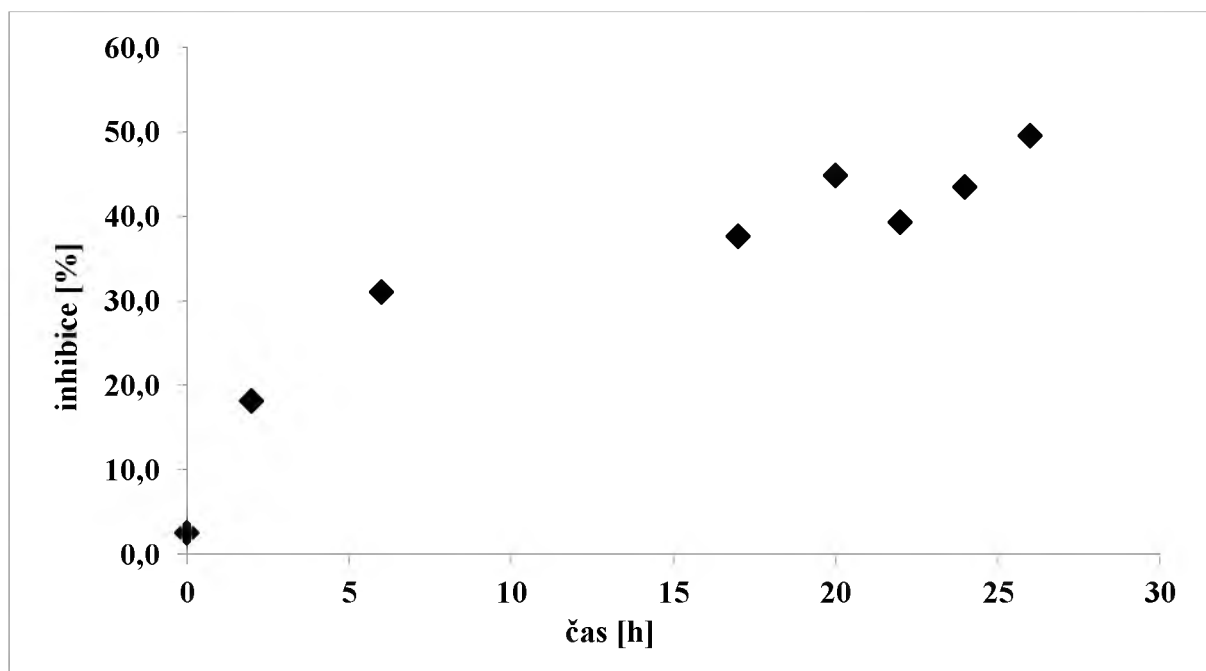
3.6. Metoda využívající ABTS volný radikál

3.6.1. Optimalizace metody

Metoda QUENCHER – přímá extrakce škrobových filmů do roztoku ABTS

U přímé extrakce škrobových filmů do roztoku ABTS byly při vlnové délce 734 nm proměřeny hodnoty absorbancí jednotlivých filmů v roztoku a samotného roztoku ABTS v předem daných časech. Na základě těchto výsledků byla podle výše zmíněného vztahu (7) vypočítána inhibice roztoku.

Závislost hodnoty inhibice na čase byla vynesena do grafu, který můžeme vidět na obrázku 29. Z grafu můžeme vidět, že největší úbytek nastává mezi 0.–20. hodinou. Od 20. do 26. hodiny můžeme pozorovat již nepatrnou inhibici roztoku, a proto byla zvolena doba potřebná k extrakci látek do rozpouštědla a jejich následnou reakci s činidlem na 22 hodin.



Obrázek 29 – závislost inhibice roztoku ABTS se škrobovým filmem na čase

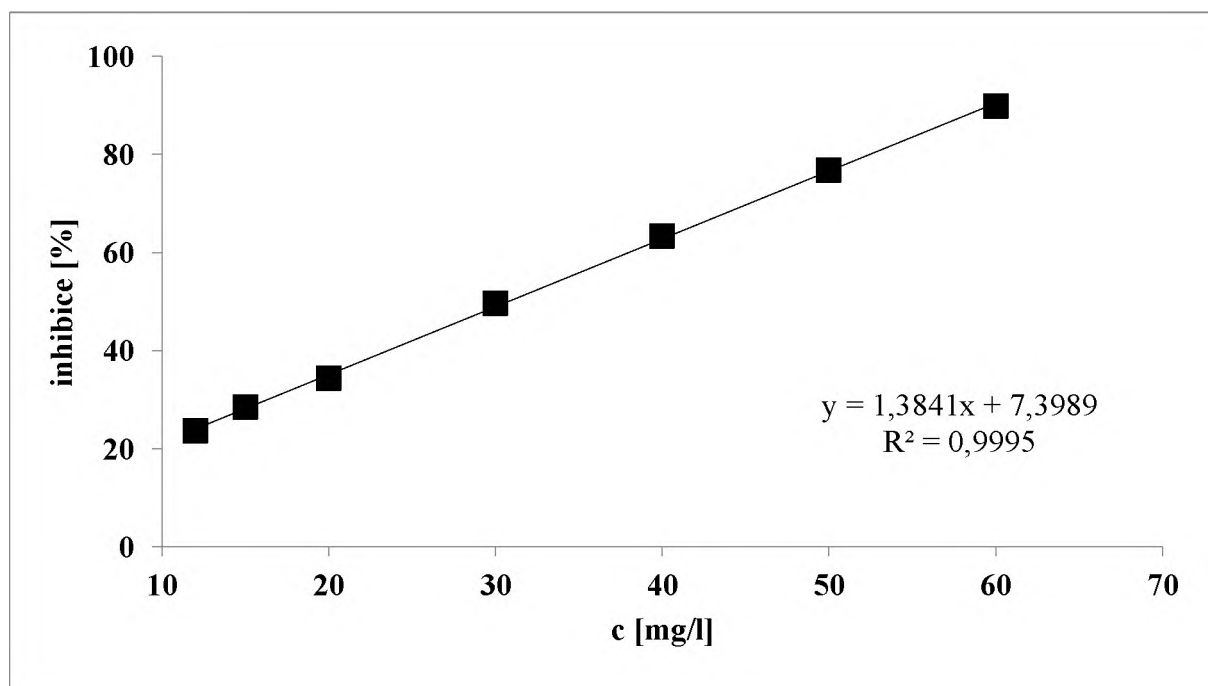
Metanolický a etanolický extrakt s roztokem ABTS

Jako druhý způsob byla sledována změna absorbance roztoku ABTS vlivem metanolickeho nebo etanolickeho extraktu škrobového filmu (bylo smícháno 0,1 g filmu se 4 ml extrakčního činidla; takto připravena extrakční směs byla ponechána v rotátoru při 25 °C po dobu 20 h). Ke 3 ml roztoku ABTS bylo přidáno 0,5 ml extraktu. V příloze III (obrázek P12) je znázorněna změna absorbance obou extraktů, která byla sledována a zaznamenávána v pravidelných intervalech 1 minuty po celkovou dobu 60 minut.

Rozdílná počáteční absorbance je pravděpodobně způsobena různým stářím roztoku ABTS. Během 60 minut došlo v obou případech k velmi nepatrnému poklesu absorbance roztoku. Příčinou toho může být, že extrakcí škrobového filmu dochází k velkému naředění antioxidantů, a tím je způsobeno, že extrakt nemá dostatečné antioxidační vlastnosti. Díky tomu je použití extraktu nevhodné a pro stanovení byl použit postup, kdy se škrobový film extrahoval přímo do roztoku ABTS.

3.6.2. Stanovení antioxidační kapacity vzorků metodou ABTS

Po 40 minutách byla proměřena absorbance připravené kalibrační řady. Do obrázku 30 byla vynesena závislost inhibice na koncentraci Troloxu.



Obrázek 30 – kalibrační graf – inhibice roztoku ABTS v závislosti na koncentraci standardní látky Trolox

Pro stanovení antioxidační kapacity byl použit postup, kdy k pevnému vzorku byl přidán roztok ABTS, zkumavky rotovaly po celou dobu extrakce, metoda QUENCHER. Po uplynutí 22 hodin, byly vzorky proměřeny na spektrofotometru při vlnové délce 734 nm. Vzorky nemodifikovaných škrobových filmů odbarvily roztok ABTS z lehce modrozeleného a světlejší zelenou. Následně byl odebrán čistý roztok ABTS a změřena absorbance na spektrofotometru. U modifikovaných škrobových filmů bylo měření absorbance složitější, neboť po uplynutí 22 h se ve zkumavkách objevil místo čirého roztoku, jak tomu bylo u nemodifikovaných, gelovitý roztok.

U různých koncentrací jsme mohli pozorovat různé složení vzniklého gelu. Zatímco u zkumavek, které obsahovali nějakou koncentraci rakytníkového oleje, byly v tomto gelu vidět kousky škrobových filmů společně s drobnými hrudkami. Kousky škrobových filmů byly s klesající koncentrací rakytníkové oleje menší, což ale může být pouze subjektivní hodnocení. U zkumavek bez podílu rakytníkové oleje byly vidět pouze gelovité hrudky. Po odstředění na minicentrifuze (6000 ot/min; 5 minut) byla viditelná odstředěná vrstva gelu a nad ní čirý roztok. Tento roztok byl opatrně odebrán, a následně proměřen na spektrofotometru pomocí jednorázových kyvet od firmy BRAND GMBH + CO KG kvůli menšímu objemu.

Na základě kalibračního grafu ABTS s Troloxem (obrázek 30) byla získána rovnice regrese. Ta pak posloužila k výpočtu koncentrace Troloxu, která byla ekvivalentní procentům inhibice vzorku. Tato koncentrace byla přepočtena na 1 g látky a výsledek do tabulky 8 tak byl udáván jako ekvivalent průměrné koncentrace Troloxu v 1 g škrobového filmu.

Tabulka 8 – koncentrace Troloxu ekvivalentní na 1 g nemodifikovaných (0%OSA) i modifikovaných (7% OSA) škrobových filmů získané pomocí metody QUENCHER

| 0% OSA | c [g/100 g] * | Ø c mg TE/ 1 g filmu |
|--------|---------------|---------------------------|
| | | 0 |
| | 0,1 | 280,9 ± 10,7 ^c |
| | 0,2 | 320,4 ± 8,3 ^{cd} |
| | 0,3 | 355,7 ± 3,8 ^e |
| 7% OSA | 0 | 165,4 ± 4,7 ^a |
| | 0,1 | 220,6 ± 17,6 ^b |
| | 0,2 | 267,1 ± 6,7 ^c |
| | 0,3 | 322,1 ± 8,1 ^d |

OSA – oktenyl sukcinát

TE – Trolox equivalent

Výsledky získané metodou QUENCHER

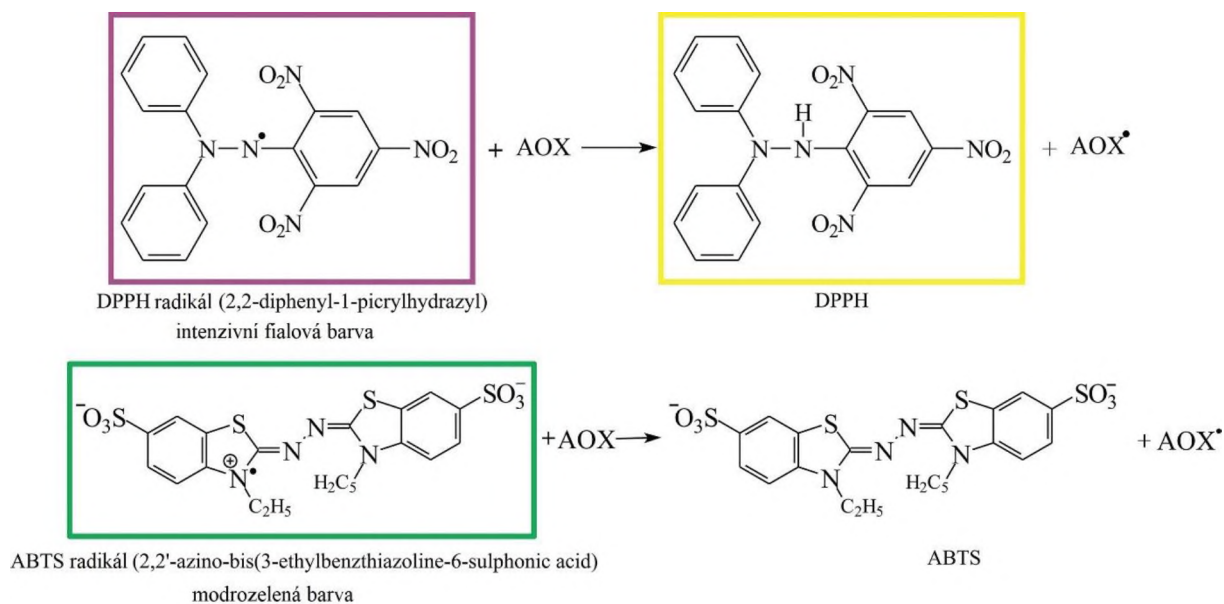
Aritmetický průměr ± směrodatná odchylka; n=3; různá písmena značí statisticky rozdílné hodnoty (P <0,05)

* koncentrace rakytníkového oleje ve 100 g škrobové pasty

3.7. Porovnání metod využívající DPPH v metanolu a ABTS

Vzhledem k menší stabilitě roztoku ABTS, a hlavně díky sférické zábraně molekuly DPPH, kdy reakční centrum je více schované uvnitř molekuly a tím je znemožněna reakce s příliš rozvětvenými molekulami, reaguje ABTS pravděpodobně se širším spektrem antioxidantů (reakce jednotlivých metod jsou znázorněny na obrázku 31). Hodnoty antioxidační kapacity ve vzorcích jsou vyšší u metody využívající ABTS než hodnoty zjištěné metodou, která využívá DPPH. Zároveň to může být způsobeno tím, že ve vzorku je menším množství fenolických látek, které reagují s DPPH volným radikálem. Důležité je si povšimnout i faktu, že u metody ABTS jsou hodnoty antioxidační kapacity vyšší pro filmy, které nebyly modifikované. U metody DPPH pomohla nejspíš modifikace filmu, u modifikovaných škrobových filmů byla získána vyšší koncentrace než u nemodifikovaných.

Již v minulosti výsledky studií prokázaly, že olej rakytníku, který je získán ze semen, obsahoval nenasycené mastné kyseliny, tokoferoly a karotenoidy, které jsou známé svým antioxidačním účinkem [100].



Obrázek 31 – schéma chemické reakce DPPH a ABTS [55]

Výsledky obou metod (DPPH v metanolu a ABTS) byly za použití dvou výběrového testu (tzv. studentova testu/ t-testu) statisticky vyhodnoceny. Rovnost rozptylu byla ($P = 0,05$). Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí operačního systému Microsoft Excel od firmy Microsoft.

3.8. Infračervená spektroskopie

Škrobové filmy ve vysušeném stavu byly proměřeny pomocí infračervené spektroskopie s ATR/FTIR. Zde byla sledována změna ve struktuře filmu, která mohla být způsobena modifikací škrobového filmu, nebo vlivem koncentrace rakytníkového extraktu. Z tohoto důvodu byl sledován vlnčet a hodnota transmitance.

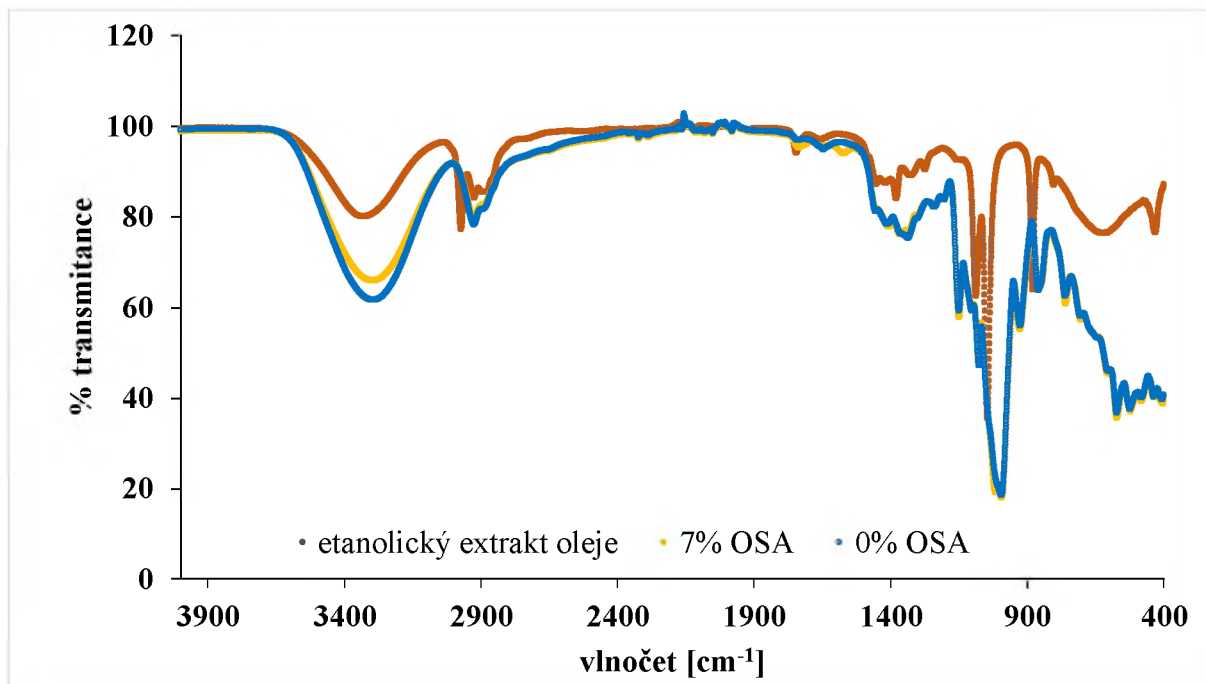
Zároveň se škrobovými filmy byl proměřen i původní, nezředěný etanolický extrakt rakytníkového oleje.

Po porovnání spekter škrobových filmů, která jsou součástí přílohy IV, můžeme vidět, že se spektra od sebe liší naprosto minimálně, jsou až identická. Tato spektra byla popsána pomocí tabulek II.1 (*Přehled vlnčetů některých charakteristických absorpčních pásů v infračerveném spektru*), která jsou popsána v knize *Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů* od pana prof. Ing. Pavla Jandery, DrSc⁸ na straně 257-263. Tyto tabulky byly podpořeny další literaturou⁹. Množství rakytníkového oleje ve škrobovém filmu zde nehraje roli ve struktuře. Na obrázku 32 můžeme vidět porovnání spekter škrobových obou škrobových filmů o koncentraci 0,3 g oleje/100 g škrobové pasty a etanolického extraktu rakytníkového oleje předtím, než došlo ke smíchání se škrobovou pastou. Zároveň můžeme pozorovat, že spektrum škrobového filmu, který byl modifikovaný, se od spektra nemodifikovaného filmu liší minimálně. Jediný znatelný rozdíl je v oblasti 1800–1500 cm⁻¹, jinak jsou spektra téměř identická. Kolem 3300 cm⁻¹ vidíme ve všech případech pás valenčních vibrací v(OH), které mohou být připisovány -OH skupinám, kterou obsahuje jak škrob, tak glycerol i etanol [11]. Spektra se zde liší v % transmitance¹⁰. Transmitance mohla být snížena vlivem glycerolu ve škrobových filmech [11]. Mezi 2960-2800 cm⁻¹ vidíme ve všech případech alifatickou sérii, kdy v případě etanolického extraktu je jasně viditelný pás kolem 2960 cm⁻¹ valenčních vibrací v(CH₃). Široký pás v rozmezí 1200-900 cm⁻¹ můžeme přiřazovat valenčním vibracím v(C-O) a deformačním vibracím δ(C-O) [76; 101]. V případě škrobových filmů můžeme pozorovat širší pás, který může být způsoben škrobovou pastou, do které byl dán rakytníkový extrakt. Zároveň zde dochází k poklesu transmitance na rozdíl od etanolického extraktu.

⁸ JANDERA, Pavel. *Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů: Díl B – Molekulová spektroskopie v organické analýze*. Vyd. 3. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2011. ISBN 978-80-7395-392-8.

⁹ IR Spectrum Table & Chart. *Merck KGaA* [online]. Německo [cit. 2020-05-06]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/ir-spectrum-table.html#ir-spectrum-table-by-range>

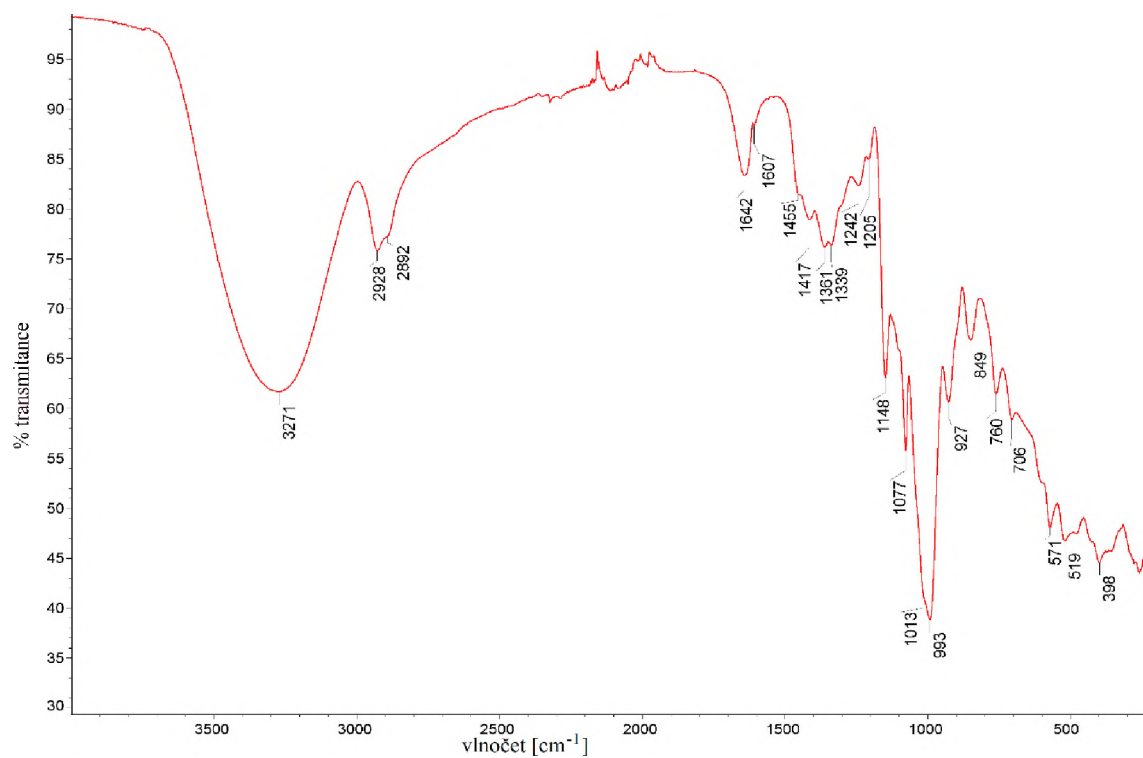
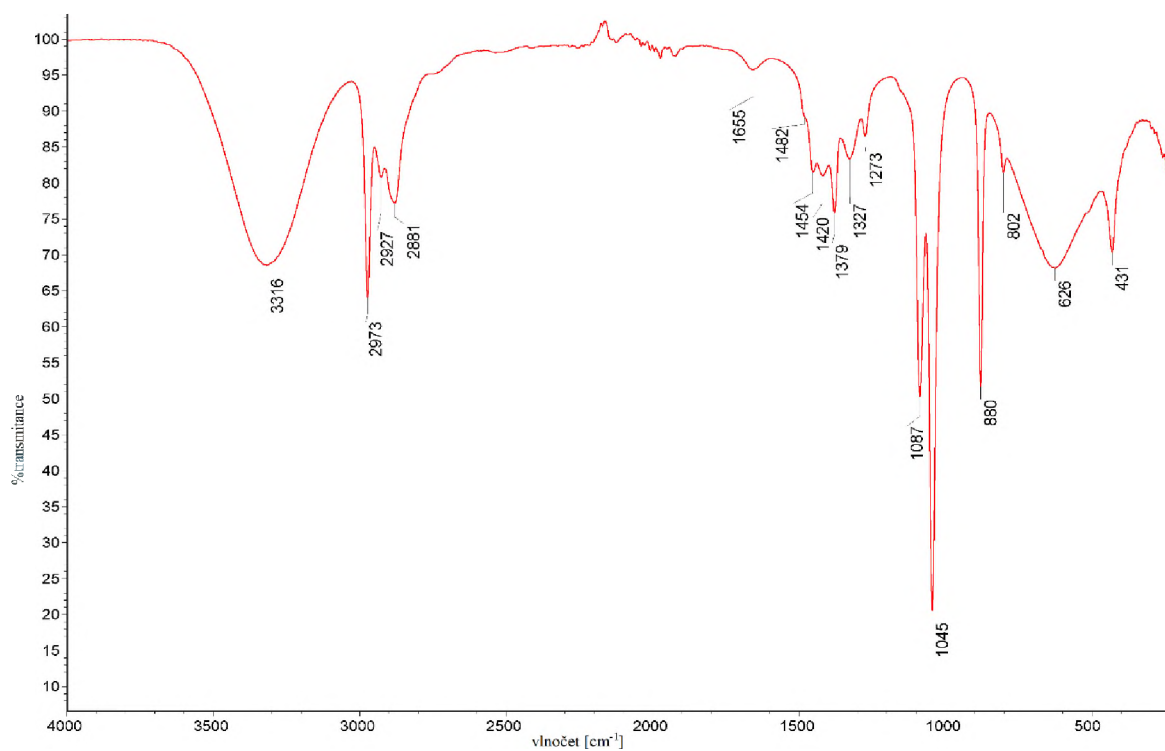
¹⁰ množství světla, které prošlo vzorkem při určité vlnové délce



Obrázek 32 – porovnání IČ spekter etanolického extraktu oleje, modifikovaného a nemodifikovaného filmu

Pokud bychom porovnali obrázky 32 (spektra škrobových filmů a etanolického extraktu) a 33 (IČ spektra nahoře etanolu a pod ním škrobu) můžeme říct, že u etanolického extraktu rakytníkového oleje můžeme vidět hlavně spektrum etanolu a jeho charakteristické absorpční pásy. Rozdíl je pouze v hodnotě transmittance, což může způsobovat, že v experimentu bylo nepatrné množství rakytníkového oleje, který ale neměl vliv na absorpční pásy. V případě porovnání spekter škrobového filmu se spektrem škrobu vidíme, že jsou tato spektra taktéž identická.

Vzhledem k tomu, jaké je složení jednotlivých směsí (ať už etanolického extraktu nebo škrobového filmu), můžeme ve spektrech vidět jejich dominantní část, tj. infračervené spektrum etanolu, popřípadě škrobu. Po porovnání s literaturou bylo usouzeno, že i v našem případě jsou spektra škrobových filmů s různou koncentrací rakytníkového extraktu, součást přílohy, jsou identická nejspíš vlivem vysokého obsahu škrobu na povrchu filmu [11].



Obrázek 33 – IČ spektrum nahoře etanolu [102] dole škrobu [103]

3.9.Skenovací elektronová mikroskopie

Škrobové filmy byly skenovány při různém zvětšení pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Mezi filmy, zobrazenými na obrázku P22–24 v příloze V, nejsou vidět žádné znatelné rozdíly ve struktuře povrchu. U některých filmů je pozorovatelná nehomogenita škrobového filmu. Pokud byl škrobový film zlomen ve vysušeném stavu, došlo ke kompaktnímu zlomu. Zlom, který je vidět na obrázku P24 je čistý a celistvý. Nejsou vidět vlákna, což může znamenat, že tento materiál je velmi pevný.

4. ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena hlavně na antioxidační a antimikrobiální vlastnosti škrobových filmů s přidavkem rakytníkového oleje. Tyto filmy jsou vyrobeny z bramborového škrobu s použitím glycerolu jako změkčovadla.

Bylo experimentálně zjištěno, že rakytníkový olej, který je obsažen ve zkoumaném škrobovém filmu, nemá žádné antimikrobiální účinky na bakterie *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ani na plíseň *Aspergillus brasiliensis*. Kvasinka *Candida albicans*, jejíž antimikrobiální účinky byly testovány na M-H i na MALT agaru, byla též rezistentní k účinkům rakytníkového oleje. U bakterie *Bacillus cereus* byla pozorována lehce zakalená zóna inhibice, která s rostoucí koncentrací rakytníkového oleje neměla rostoucí trend. Pozorovatelná byla i u škrobového filmu bez přidání oleje jako antimikrobiální látky, z čehož lze usuzovat, že rakytníkový olej zde nemá antimikrobiální účinky.

Zda došlo k této zóně inhibice vlivem snížení aktivity vody bylo zjišťováno pomocí metody, kde se měřilo snížení aktivity vody vlivem bakterie *Bacillus cereus*. Pomocí této metody bylo zjištěno, že pokud dochází ke snížení vody, bude to nejspíš pouze lokální záležitost v blízkém okolí filmu. Pomocí Lugolova roztoku bylo zároveň zjištěno, že za sebemenšího kontaktu s vodou nebo vlhkostí se z nemodifikovaných filmů uvolňuje nepatrné množství škrobu. Modifikované škrobové filmy se za přítomnosti vody mění na gelovitou suspenzi a tím dochází k uvolnění velkého množství škrobu ze vzorku. Přítomnost bakterie na agaru neměla vliv na škrobový film.

Pomocí UV/VIS spekter škrobových filmů a oleje, získaných extrakcí s různými rozpouštědly, a jejich následným porovnáním, bylo zjištěno, se ve spektrech škrobových filmů neobjevují karotenoidní látky. Ty byly prokázány ve spektrech extrakcí z oleje do n-hexanu, metanolu a etanolu. U n-hexanu a metanolu byly prokázány pouze píky v oblasti 200–300 nm, kde se objevují hlavně píky násobných vazeb. Voda a 80% metanol je pro extrakci filmů nevhodný. U extrakce modifikovaných filmů s vodou po 24 h vznikla gelovitá suspenze. O změně modifikovaného škrobového filmu po kontaktu s vodou jsme se přesvědčili u sledování změny aktivity vody. To nám říká, že použití modifikovaného škrobového filmu není vhodné, pokud by mohlo dojít ke kontaktu s vodou.

Porovnání antioxidačních vlastností u metod využívající zhášení radikálu DPPH v metanolu a ABTS bylo zjištěno, že metoda využívající DPPH poskytuje nižší hodnoty inhibice tudíž i menší hodnoty koncentrace Troloxu na 1 g škrobového filmu. Z výsledků měření můžeme říct,

že i přes velmi nepatrnou koncentraci rakytníkového oleje ve škrobovém filmu, má film jisté antioxidační účinky.

Stanovování antioxidační kapacity modifikovanou metodou využívající rozpuštěný DPPH radikál v isooktanu a následným porovnáním s metodou využívající DPPH v metanolu bylo zjištěno, že použití modifikované metody není významné.

Problém u metod, které využívají zhášení volného radikálu a reagují přímo se vzorkem, je v našem případě nehomogenita vzorku. Ta byla prokázána i pod skenovacím elektronovým mikroskopem. Pod elektronovým mikroskopem zároveň nebyly pozorovány změny ve struktuře povrchu vlivem různé koncentrace nebo modifikace filmu. Zlom filmu naznačuje, že by škrobový materiál mohl být pevný.

V infračerveném spektru vidíme převážně matrice, které ve vzorku převažují, tzn. výsledné IČ spektrum je spíše spektrum etanolu (v případě etanolického extraktu oleje) a škrobu (u škrobových filmů).

5. REFERENCE

- [1] BENEŠOVÁ, Luisa. *Potravinářství 91*. Praha: Středisko potravinářských informací, 1991. ISBN 80-85210-26-7.
- [2] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2009. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-051-4.
- [3] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-7080-509-9.
- [4] TREGUBOV, Nikolaj. *Technológia škrobu a výrobkov zo škrobu*. 1. vyd. Přeložil Július STUDNICKÝ, přeložil Peter ZAJAC. Bratislava: Alfa, 1986.
- [5] KODET, Josef. *Plnící, zahušňovací, gelotvorné a stabilizační látky pro potraviny: (Potravinářské hydrokoloidy)*. 1. vyd. Praha: Středisko potravinářských informací, 1993. ISBN 80-85120-32-1.
- [6] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [7] RAJ, Baldev, Udaya K. a SIDDARAMAIAH. Low density polyethylene/starch blend films for food packaging applications. *Advances in Polymer Technology* [online]. 2004, **23**(1), 32-45 [cit. 2020-01-23]. DOI: 10.1002/adv.10068. ISSN 0730-6679. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adv.10068>
- [8] SHAH, Umar, Adil GANI, Bilal ASHWAR et al. *A review of the recent advances in starch as active and nanocomposite packaging films* [online]. 2015, **1**(1) [cit. 2020-01-23]. DOI: 10.1080/23311932.2015.1115640. ISSN 2331-1932. Dostupné z: <https://www.cogentoa.com/article/10.1080/23311932.2015.1115640>
- [9] Mash: Chemistry 101. *Distiller* [online]. [cit. 2020-02-13].
- [10] *Dictionary of food science and technology* [online]. 2nd ed. IFIS: Wiley-Blackwell, 2009, s. 282 [cit. 2019-10-31]. ISBN 1405187409.

- [11] NORDIN, Norhazirah, Siti OTHMAN, Suraya RASHID a Roseliza BASHA. Effects of glycerol and thymol on physical, mechanical, and thermal properties of corn starch films. *Food Hydrocolloids* [online]. 2020, **106** [cit. 2020-06-10]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2020.105884. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X19328322>
- [12] AVELLA, Maurizio. Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. *Food chemistry* [online]. 2005, **93**(3), 467–474 [cit. 2019-11-14]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.024>
- [13] KOSKOVAC, Marijana, Snezana CUPARA, Mihailo KIPIC, Ana BARJAKTAREVIC, Olivera MILOVANOVIC, Ksenija KOJICIC a Marija MARKOVIC. Sea Buckthorn Oil—A Valuable Source for Cosmeceuticals. *Cosmetics* [online]. 2017, **4**(4) [cit. 2020-01-26]. DOI: 10.3390/cosmetics4040040. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2079-9284/4/4/40>
- [14] ZIELIŃSKA, Aleksandra a Izabela NOWAK. Abundance of active ingredients in sea-buckthorn oil. *Lipids in Health and Disease* [online]. 2017, **16**(1) [cit. 2020-01-26]. DOI: 10.1186/s12944-017-0469-7. ISSN 1476-511X. Dostupné z: <http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-017-0469-7>
- [15] YUE, Xuan-Feng, Xiao SHANG, Zhi-Juan ZHANG a Yan-Ni ZHANG. Phytochemical composition and antibacterial activity of the essential oils from different parts of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. 2017, **25**(2), 327-332 [cit. 2020-06-08]. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.10.010. ISSN 10219498. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949816301594>
- [16] Processing of Sea Buckthorn – Extracting the Oil for Human Use. *Sea Buckthorn Insider* [online]. 2016 [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: <http://www.seabuckthorninsider.com/education/processing-and-extracting/>
- [17] SOLÁ MARSINIACH, Marta a Aleix CUENCA. The impact of sea buckthorn oil fatty acids on human health. *Lipids in Health and Disease* [online]. 2019, **18**(1) [cit. 2020-01-27]. DOI: 10.1186/s12944-019-1065-9. ISSN 1476-511X. Dostupné z: <https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-019-1065-9>

- [18] BAYOT, Marlon a Bradley BRAGG. Antimicrobial Susceptibility Testing. *NCBI* [online]. [cit. 2020-01-22]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539714/>
- [19] CLSI, . *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* [online]. 11th ed. CLSI standard M07. USA: Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018 [cit. 2020-01-22]. ISBN 1-56238-837-1. Dostupné z: https://clsi.org/media/1928/m07ed11_sample.pdf
- [20] BARROS-VELÁZQUEZ, Jorge. *Antimicrobial food packaging: 9.2 Susceptibility Testing Methodology* [online]. Amsterdam: Academic Press, 2016 [cit. 2020-06-17]. ISBN 0128007230. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt010WNJI5/antimicrobial-food-packaging/susceptibility-testing>
- [21] NAWRAT, Allie. Combining antibiotics with immune response to treat antibiotic resistant bacteria. *Clinical trials arena* [online]. [cit. 2020-04-22]. Dostupné z: <https://www.clinicaltrialsarena.com/news/immune-response-antibiotic-resistant-bacteria/>
- [22] JORGENSEN, James H. a Mary Jane FERRARO. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2009, **49**(11), 1749-1755 [cit. 2020-04-22]. DOI: 10.1086/647952. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/647952>
- [23] MATUSCHEK, E., D.F.J. BROWN a G. KAHLMETER. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2014, **20**(4), 255-266 [cit. 2020-01-22]. DOI: 10.1111/1469-0691.12373. ISSN 1198743X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14602986>
- [24] *Textilie - Zjišťování antibakteriálního účinku textilních výrobků.*

- [25] FORSYTHE, S., P. HAYES a P. HAYES. *Food hygiene, microbiology, and HACCP*. 3rd ed. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers, 1998. ISBN 07-514-0450-0.
- [26] GÖRNER, Fridrich a Ľubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami*. Bratislava: Malé centrum, 2004. ISBN 80-967-0649-7.
- [27] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [28] BRATCHER, Denise. Bacillus Species (Anthrax). *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* [online]. Elsevier, 2018, 770-773.e2 [cit. 2020-04-24]. DOI: 10.1016/B978-0-323-40181-4.00129-8. ISBN 9780323401814. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323401814001298>
- [29] EGLEZOS, S. a G.A. DYKES. MICROBIOLOGICAL SAFETY OF MEAT | Bacillus cereus. *Encyclopedia of Meat Sciences* [online]. Elsevier, 2014, s. 324-329 [cit. 2020-05-04]. DOI: 10.1016/B978-0-12-384731-7.00042-8. ISBN 9780123847348. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123847317000428>
- [30] ADAMS, M. a M. MOOS. *Food microbiology*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1995. ISBN 0-85404-509-0.
- [31] HRUBÝ, Stanislav a Bohumil TUREK. *Mikrobiologická problematika ve výživě*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1996. ISBN 80-701-3232-2.
- [32] CHO, Won-Il a Myong-Soo CHUNG. Antimicrobial effect of a combination of herb extract and organic acid against Bacillus subtilis spores. *Food Science and Biotechnology* [online]. 2017, **26**(5), 1423-1428 [cit. 2020-06-17]. DOI: 10.1007/s10068-017-0164-5. ISSN 1226-7708. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10068-017-0164-5>

- [33] SHU, Qin, Yongwu NIU, Wenjun ZHAO a Qihe CHEN. Antibacterial activity and mannosylerythritol lipids against vegetative cells and spores of *Bacillus cereus*. *Food Control* [online]. 2019, **106** [cit. 2020-06-08]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.106711. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713519302920>
- [34] *Bacillus cereus*. *Department of Veterinary Disease Biology* [online]. [cit. 2019-12-30]. Dostupné z: http://atlas.sund.ku.dk/microatlas/food/bacteria/Bacillus_cereus/pop6.html
- [35] Baird Parker Agar- principle, preparation and uses. *Microbe online* [online]. [cit. 2020-02-09].
- [36] E. Coli under the Microscope. *Microscope Master* [online]. [cit. 2020-02-10].
- [37] *Candida albicans* yeast, TEM. *Science Photo Library* [online]. [cit. 2020-02-09].
- [38] *Aspergillus conidiophore* head morphology. *Wikimedia Commons* [online]. [cit. 2020-02-09].
- [39] HINTON-SHELEY, Phoebe. What is *Aspergillus niger*?. *News-Medical.net* [online]. 2000 [cit. 2020-02-09].
- [40] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Procesy a zařízení potravinářských a biotechnologických výroby: [technologie potravin]*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2012. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-086-6.
- [41] PRIOR, B. Measurement of Water Activity in Foods: A Review. *Journal of Food Protection* [online]. 1979, **42**(8), 668-674 [cit. 2020-02-25]. DOI: 10.4315/0362-028X-42.8.668. ISSN 0362-028X. Dostupné z: <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/42/8/668/188332/Measurement-of-Water-Activity-in-Foods-A-Review>
- [42] Water Activity (aw) in Foods. *Food and drug administration* [online]. [cit. 2020-02-25].

- [43] *Laboratorní technika: Extrakce* [online]. [cit. 2019-11-15]. Dostupné z: <http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech/pages/extrakce.html>
- [44] ŠNITA, Dalimil. *Chemické inženýrství I: Extrakce* [online]. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2005 [cit. 2019-11-27]. ISBN 80-708-0589-7. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-589-7/pages-img/188.html
- [45] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-03-00569-8.
- [46] Liquid-Liquid Extraction. *Chemistry LibreTexts* [online]. USA [cit. 2019-11-26]. Dostupné z: https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Ancillary_Materials/Demos%2C_Techniques%2C_and_Experiments/General_Lab_Techniques/Liquid-Liquid_Extraction
- [47] Extrakce vzorku kapalinou: Izolační a separační metody. *Vysoká škola chemickotechnologická v Praze* [online]. 2018 [cit. 2020-02-27].
- [48] Extrakce silic kmínu pomocí superkritické fluidní extrakce (SFE). *Mendelova univerzita v Brně* [online]. 2014 [cit. 2020-02-27].
- [49] BENGTSSON, G.B. a S.F. HAGEN. Storage and handling of fruit and vegetables for optimum health-related quality. *Improving the Health-Promoting Properties of Fruit and Vegetable Products* [online]. Elsevier, 2008, s. 412-430 [cit. 2020-03-05]. DOI: 10.1533/9781845694289.4.412. ISBN 9781845691844. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781845691844500161>
- [50] PRADAS-BAENA, I., J.M. MORENO-ROJAS a M.D. LUQUE DE CASTRO. Effect of Processing on Active Compounds in Fresh-Cut Vegetables. *Processing and Impact on Active Components in Food* [online]. Elsevier, 2015, s. 3-10 [cit. 2020-03-05]. DOI: 10.1016/B978-0-12-404699-3.00001-9. ISBN 9780124046993. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124046993000019>
- [51] Antioxidants: In Depth. *National Center for Complementary and Integrative Health (NCCIH)* [online]. [cit. 2020-02-27].

- [52] SZALAY, Jessie. What Are Free Radicals?. *Live Science* [online]. [cit. 2020-03-02].
- [53] VALKO, Marian, Dieter LEIBFRITZ, Jan MONCOL, Mark CRONIN, Milan MAZUR a Joshua TELSER. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. 2007, **39**(1), 44-84 [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001. ISSN 13572725. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272506002196>
- [54] HALLIWELL, Barry,. Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. *Nutrition Review* [online]. 1994, **52**(8), 253-265 [cit. 2020-02-27]. ISSN 1753-4887.
- [55] BECKER, Magda, Gilvanda NUNES, Danilo RIBEIRO, Francisco SILVA, Gaëlle CATANANTE a Jean-Louis MARTY. Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [online]. 2019 [cit. 2020-06-19]. DOI: 10.21577/0103-5053.20190003. ISSN 01035053. Dostupné z: http://jbc.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=5501&nomeArquivo=2018-0415SR.pdf
- [56] ANTOLOVICH, Michael, Paul PRENZLER, Emilios PATSALIDES, Suzanne MCDONALD a Kevin ROBARDS. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst* [online]. **127**(1), 183-198 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1039/b009171p. ISSN 00032654. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b009171p>
- [57] HERMUND, Ditte. Antioxidant Properties of Seaweed-Derived Substances. *Bioactive Seaweeds for Food Applications* [online]. Elsevier, 2018, s. 201-221 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1016/B978-0-12-813312-5.00010-8. ISBN 9780128133125. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128133125000108>
- [58] POLITEO, O., M. JUKIC a M. MILOS. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chemistry* [online]. 2007, **101**(1), 379-385 [cit. 2020-02-27]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.01.045. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814606001051>

- [59] CHRISTODOULEAS, Dionysios, Charalambos FOTAKIS, Aspasia NIKOKAVOURA, Kyriakos PAPADOPOULOS a Antony CALOKERINOS. Modified DPPH and ABTS Assays to Assess the Antioxidant Profile of Untreated Oils. *Food Analytical Methods* [online]. 2015, **8**(5), 1294-1302 [cit. 2020-02-14]. DOI: 10.1007/s12161-014-0005-6. ISSN 1936-9751. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12161-014-0005-6>
- [60] SUJARWO, Wawan a Ary KEIM. Spondias pinnata (L. f.) Kurz. (Anacardiaceae): Profiles and Applications to Diabetes. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes* [online]. Elsevier, 2019, s. 395-405 [cit. 2020-03-03]. DOI: 10.1016/B978-0-12-813822-9.00027-8. ISBN 9780128138229. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128138229000278>
- [61] MAKOVICS-ZSOHÁR, N., A. HEGEDŰS, É. STEFANOVITS-BÁNYAI, R. RÉDEI a N. PAPP. The antioxidant capacity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries depends on the genotype and harvest time. *International Journal of Horticultural Science* [online]. 2014, **20**(3-4) [cit. 2020-02-27]. DOI: 10.31421/IJHS/20/3-4/1129. ISSN 1585-0404. Dostupné z: <https://ojs.lib.unideb.hu/IJHS/article/view/1129>
- [62] KEDARE, Sagar a R. SINGH. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2011, **48**(4), 412-422 [cit. 2020-02-14]. DOI: 10.1007/s13197-011-0251-1. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-011-0251-1>
- [63] GARCIA, Eugenio, Tatiane OLDONI, Severino ALENCAR, Alessandra REIS, Alessandro LOGUERCIO a Rosa GRANDE. Antioxidant activity by DPPH assay of potential solutions to be applied on bleached teeth. *Brazilian Dental Journal* [online]. 2012, **23**(1), 22-27 [cit. 2020-02-14]. DOI: 10.1590/S0103-64402012000100004. ISSN 0103-6440. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-64402012000100004&lng=en&tlng=en

- [64] CHOI, HyungSeok, Mi-Ja KIM a JaeHwan LEE. Effect of Polar and Non-Polar Compounds from Oxidized Oils on Oxidative Stability in Corn Oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2018, **120**(3) [cit. 2020-02-14]. DOI: 10.1002/ejlt.201700312. ISSN 14387697. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201700312>
- [65] CÖMERT, Ezgi a Vural GÖKMEN. Antioxidants Bound to an Insoluble Food Matrix: Their Analysis, Regeneration Behavior, and Physiological Importance. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2017, **16**(3), 382-399 [cit. 2020-05-25]. DOI: 10.1111/1541-4337.12263. ISSN 15414337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12263>
- [66] OPITZ, Sebastian, Samo SMRKE, Bernard GOODMAN a Chahan YERETZIAN. Methodology for the Measurement of Antioxidant Capacity of Coffee. *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages* [online]. Elsevier, 2014, s. 253-264 [cit. 2020-03-03]. DOI: 10.1016/B978-0-12-404738-9.00026-X. ISBN 9780124047389. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012404738900026X>
- [67] MAREČEK, Vít, Alexandr MIKYŠKA, David HAMPEL, Pavel ČEJKA, Jana NEUWIRTHOVÁ, Alexandra MALACHOVÁ a Radim CERKAL. ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of Cereal Science* [online]. 2017, **73**, 40-45 [cit. 2020-05-24]. DOI: 10.1016/j.jcs.2016.11.004. ISSN 07335210. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521016301886>
- [68] PATIENCE, Gregory. *Experimental methods and instrumentation for chemical engineers: 8.5.4 Spectroscopy UV/Visible* [online]. 1st ed. Waltham MA: Elsevier, 2013 [cit. 2020-03-06]. ISBN 978-0-444-53804-8. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00BYF8G2/experimental-methods/spectroscopy-uv-visible>
- [69] UV-Vis Spectroscopy. *Edinburgh Instruments* [online]. [cit. 2020-02-24].
- [70] Elektromagnetické vlny. *FYZIKA pro netechnické obory: Mgr. Michal Musilek* [online]. [cit. 2020-02-24]. Dostupné z: <http://www.musilek.eu/fyzika/52.html?menu=vlny>

- [71] Spectrophotometry. *LibreTexts* [online]. [cit. 2020-04-15]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry)
- [72] WYPYCH, George. PHOTOPHYSICS. *Handbook of Material Weathering* [online]. Elsevier, 2018, s. 1-26 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1016/B978-1-927885-31-4.50003-0. ISBN 9781927885314. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781927885314500030>
- [73] BIGMAN, Joel a Karen REINHARDT. Monitoring of Chemicals and Water. *Handbook of Silicon Wafer Cleaning Technology* [online]. Elsevier, 2018, s. 619-657 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1016/B978-0-323-51084-4.00011-3. ISBN 9780323510844. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323510844000113>
- [74] WYPYCH, George. Principles of stabilization. *PVC Degradation and Stabilization* [online]. Elsevier, 2015, s. 287-412 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1016/B978-1-895198-85-0.50013-3. ISBN 9781895198850. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781895198850500133>
- [75] PATEL, Piyush. What Is Beer's Law?. *Science ABC* [online]. [cit. 2020-04-15]. Dostupné z: <https://www.scienceabc.com/pure-sciences/what-is-beers-law.html>
- [76] JANDERA, Pavel. *Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů: Díl B - Molekulová spektroskopie v organické analýze*. Vyd. 3. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2011. ISBN 978-80-7395-392-8.
- [77] SKOOG, Douglas a James LEARY. *Principles of instrumental analysis*. 4th ed. Fort Worth: Saunders College Pub., 1992. ISBN 0-03-023343-7.
- [78] UV-VIS Spectrophotometry: A Brief Background to Spectrophotometry. *Biochrom, Ltd* [online]. 2015 [cit. 2020-03-10]. Dostupné z: https://biochromspectros.com/media/wysiwyg/support_page/UV-Visible_Spectrophotometry.pdf

- [79] KANIA, Patrik. Infračervená spektroskopie. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. [cit. 2020-02-27].
- [80] STIRLING, Diane. Infra-red Spectroscopy. STIRLING, Diane. *The Sulfur Problem: Cleaning up* [online]. Royal Society of Chemistry, 2000 [cit. 2020-05-06]. ISBN 0-85404-541-4.
- [81] HIGSON, Séamus. *Analytical chemistry: 12: Infrared techniques* [online]. New York: Oxford University Press, 2003 [cit. 2020-06-17]. ISBN 978-0-19-850289-0. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt008IJZIB/analytical-chemistry/interferometers>
- [82] *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2000 [cit. 2020-05-15]. ISBN 0471238961. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/0471238961.0914061810151405.a01.pub2>
- [83] CURL, R. a F. TITTEL. Tunable infrared laser spectroscopy. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. C: Phys. Chem* [online]. 2002, **98**, 219-272 [cit. 2020-05-26]. DOI: 10.1039/B111194A. ISSN 0260-1826. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B111194A>
- [84] CHALMERS, John a Robert MEIER. *Molecular characterization and analysis of polymers: 13.2.2.2 IR-ATR Spectra* [online]. 1st ed. Boston: Elsevier, 2008 [cit. 2020-06-17]. Comprehensive analytical chemistry, v. 53. ISBN 978-0-444-53056-1. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt009WZZL3/comprehensive-analytical/ir-atr-spectra>
- [85] FAIX, O. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. LIN, Stephen Y. a Carlton W. DENCE, ed., Stephen LIN, Carlton DENCE. *Methods in Lignin Chemistry* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1992, s. 83-109 [cit. 2020-03-05]. Springer Series in Wood Science. DOI: 10.1007/978-3-642-74065-7_7. ISBN 978-3-642-74067-1. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-74065-7_7
- [86] Scanning Electron Microscopy. *Nanoscience Instruments* [online]. [cit. 2020-01-27]. Dostupné z: <https://www.nanoscience.com/techniques/scanning-electron-microscopy/>

- [87] JOY, David, Brian FORD a Savile BRADBURY. Scanning electron microscope. *Encyclopædia Britannica, inc.* [online]. Encyclopædia Britannica, inc., 2019 [cit. 2020-01-27]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/technology/scanning-electron-microscope>
- [88] RAJURKAR, NilimaS a SM HANDE. Estimation of phytochemical content and antioxidant activity of some selected traditional Indian medicinal plants. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2011, **73**(2) [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.4103/0250-474X.91574. ISSN 0250-474X. Dostupné z: <http://www.ijpsonline.com/text.asp?2011/73/2/146/91574>
- [89] POPESCU, Carmen. Antimicrobial efficacy of the organic greasy oils combination - Sea buckthorn oil and maize germs oil. *FARMACIA* [online]. **62**(4), 743-752 [cit. 2020-06-18]. ISSN 0014-8237.
- [90] Bacillus spp.: General Characteristics. BLACKBURN, Clive a Peter MCCLURE. *Foodborne Pathogens - Hazards, Risk Analysis and Control* [online]. Woodhead Publishing Ltd a CRC Press LLC, 2002, s. 426 [cit. 2020-05-05]. ISBN 0-8493-1213-2.
- [91] HUSSAIN, Mohammad, Charles TANGO a Deog OH. Inactivation kinetics of slightly acidic electrolyzed water combined with benzalkonium chloride and mild heat treatment on vegetative cells, spores, and biofilms of Bacillus cereus. *Food Research International* [online]. 2019, **116**, 157-167 [cit. 2020-06-10]. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.08.003. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996918306094>
- [92] FEI, Peng, Yunfeng XU, Shengjuan ZHAO, Shaoying GONG a Ling GUO. Olive oil polyphenol extract inhibits vegetative cells of Bacillus cereus isolated from raw milk. *Journal of Dairy Science* [online]. 2019, **102**(5), 3894-3902 [cit. 2020-06-10]. DOI: 10.3168/jds.2018-15184. ISSN 00220302. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030219302127>

- [93] SÁNCHEZ, Eduardo, Santos GARCÍA a Norma HEREDIA. Extracts of Edible and Medicinal Plants Damage Membranes of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2010, **76**(20), 6888-6894 [cit. 2020-06-11]. DOI: 10.1128/AEM.03052-09. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://AEM.asm.org/content/76/20/6888>
- [94] TARAJ, Krenaida, Ilirjan MALOLLARI, Fatos YLLI, Ramiz MALIQATI, Adelaida ANDONI a Jonilda LLUPA. Spectroscopic study on chemical composition of essential oil and crude extract from Albanian *Pinus halepensis* Mill. *Journal of Agricultural Informatics* [online]. 2018, **9**(1) [cit. 2020-02-25]. DOI: 10.17700/jai.2018.9.1.440. ISSN 2061862X. Dostupné z: <http://journal.magisz.org/index.php/jai/article/view/440>
- [95] ZIELIŃSKA, Aleksandra a Izabela NOWAK. Abundance of active ingredients in sea-buckthorn oil. *Lipids in Health and Disease* [online]. 2017, **16**(1) [cit. 2020-02-25]. DOI: 10.1186/s12944-017-0469-7. ISSN 1476-511X. Dostupné z: <http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-017-0469-7>
- [96] CONCEIÇÃO, José, Bruno MARANGONI, Flávio MICHELS, Ivan OLIVEIRA, Wilson PASSOS, Magno TRINDADE, Samuel OLIVEIRA a Anderson CAIRES. Evaluation of molecular spectroscopy for predicting oxidative degradation of biodiesel and vegetable oil: Correlation analysis between acid value and UV–Vis absorbance and fluorescence. *Fuel Processing Technology* [online]. 2019, **183**, 1-7 [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1016/j.fuproc.2018.10.022. ISSN 03783820. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378382018315418>
- [97] DE FARIA, A., V. DE ROSSO a A. MERCADANTE. Carotenoid Composition of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*), Determined by HPLC-PDA-MS/MS. *Plant Foods for Human Nutrition* [online]. 2009, **64**(2), 108-115 [cit. 2020-02-10]. DOI: 10.1007/s11130-009-0111-6. ISSN 0921-9668. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11130-009-0111-6>

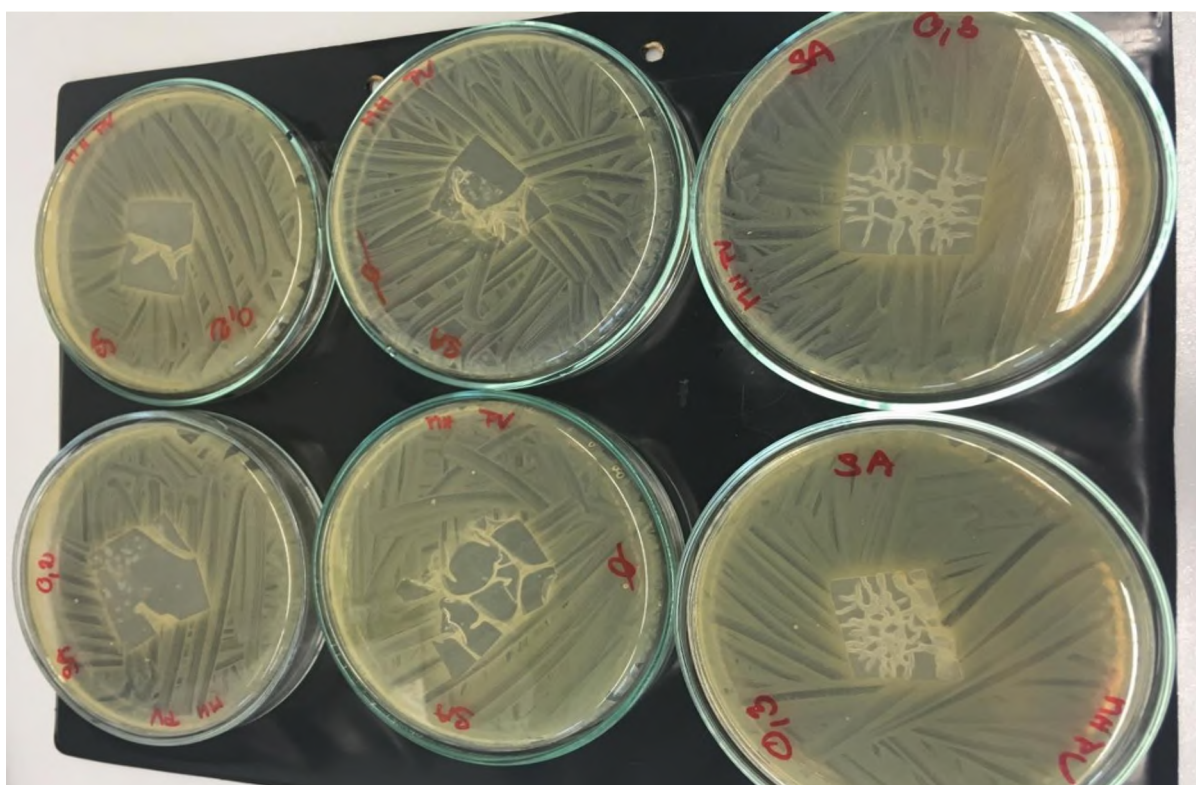
- [98] DOMENICI, Valentina, Donatella ANCORA, Mario CIFELLI, Andrea SERANI, Carlo VERACINI a Maurizio ZANDOMENEGHI. Extraction of Pigment Information from Near-UV Vis Absorption Spectra of Extra Virgin Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2014, **62**(38), 9317-9325 [cit. 2020-02-10]. DOI: 10.1021/jf503818k. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf503818k>
- [99] TAGHIZADEH, Seyedeh, Ramin REZAEI, Gholamhossein DAVARYNEJAD, Gholamreza KARIMI, Seyed NEMATI a Javad ASILI. Phenolic profile and antioxidant activity of Pistacia vera var. Sarakhs hull and kernel extracts: the influence of different solvents. *Journal of Food Measurement and Characterization* [online]. 2018, **12**(3), 2138-2144 [cit. 2020-02-14]. DOI: 10.1007/s11694-018-9829-x. ISSN 2193-4126. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11694-018-9829-x>
- [100] TING, Hung-Chih, Yu-Wen HSU, Chia-Fang TSAI, Fung-Jou LU, Ming-Chih CHOU a Wen-Kang CHEN. The in vitro and in vivo antioxidant properties of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil. *Food Chemistry* [online]. 2011, **125**(2), 652-659 [cit. 2020-06-17]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.09.057. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610011544>
- [101] IR Spectrum Table & Chart. *Merck KGaA* [online]. Německo [cit. 2020-05-06].
- [102] Ethanol: ATR-FT-IR spectrum of Ethanol (4000 – 225 cm⁻¹). *Database of ATR-FT-IR spectra of various materials* [online]. [cit. 2020-05-15]. Dostupné z: http://lisa.chem.ut.ee/IR_spectra/conservation_materials/ethanol/
- [103] Starch: ATR-FT-IR spectrum of Starch (4000 – 225 cm⁻¹). *Database of ATR-FT-IR spectra of various materials* · [online]. [cit. 2020-05-15]. Dostupné z: http://lisa.chem.ut.ee/IR_spectra/paint/binders/starch/
- [104] GUPTA, Charu a Dhan PRAKASH. Phytonutrients as therapeutic agents. *Journal of Complementary and Integrative Medicine* [online]. 2014, **11**(3) [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1515/jcim-2013-0021. ISSN 2194-6329. Dostupné z: <https://www.degruyter.com/view/j/jcim.2014.11.issue-3/jcim-2013-0021/jcim-2013-0021.xml>

- [105] NGUYEN VAN LONG, Nicolas, Karim RIGALMA, Louis COROLLER, Robin DADURE, Stella DEBAETS, Jérôme MOUNIER a Valérie VASSEUR. Modelling the effect of water activity reduction by sodium chloride or glycerol on conidial germination and radial growth of filamentous fungi encountered in dairy foods. *Food Microbiology* [online]. 2017, **68**, 7-15 [cit. 2020-05-26]. DOI: 10.1016/j.fm.2017.06.014. ISSN 07400020. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002017302903>

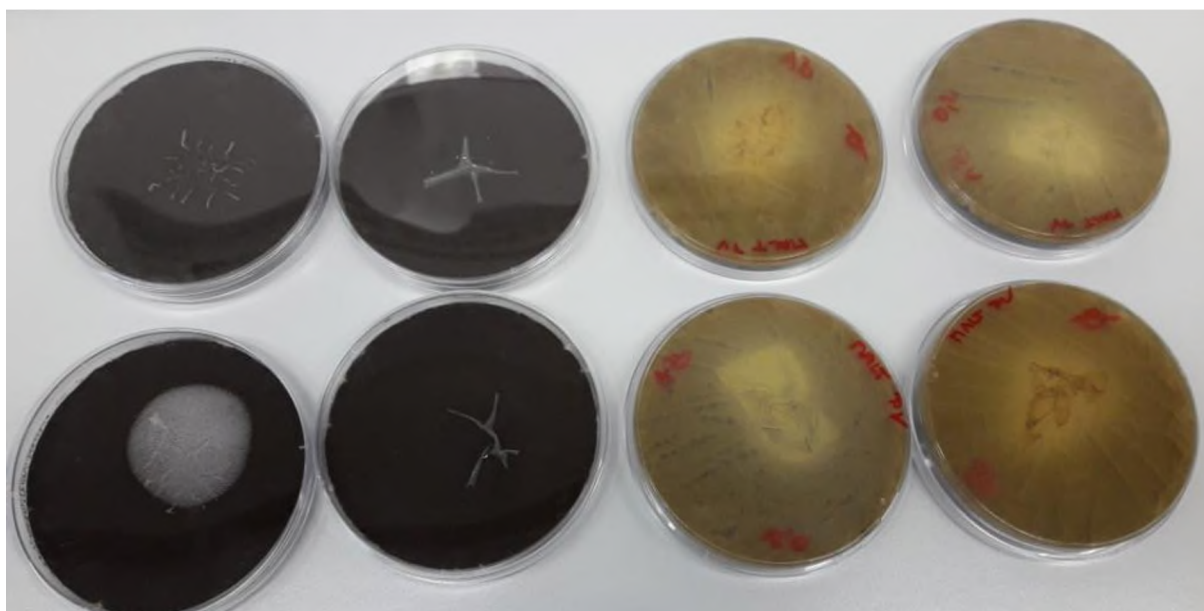
6. SEZNAM PŘÍLOH

| | |
|--|-----|
| Příloha I: škrobové film na Petriho miskách – vybrané..... | 103 |
| Příloha II: UV-VIS spektra | 105 |
| Příloha III: optimalizace metod DPPH a ABTS pomocí extraktů | 109 |
| Příloha IV: IČ spektra škrobových filmů a rakytníkového extraktu..... | 110 |
| Příloha V: skenovací elektronová mikroskopie..... | 115 |

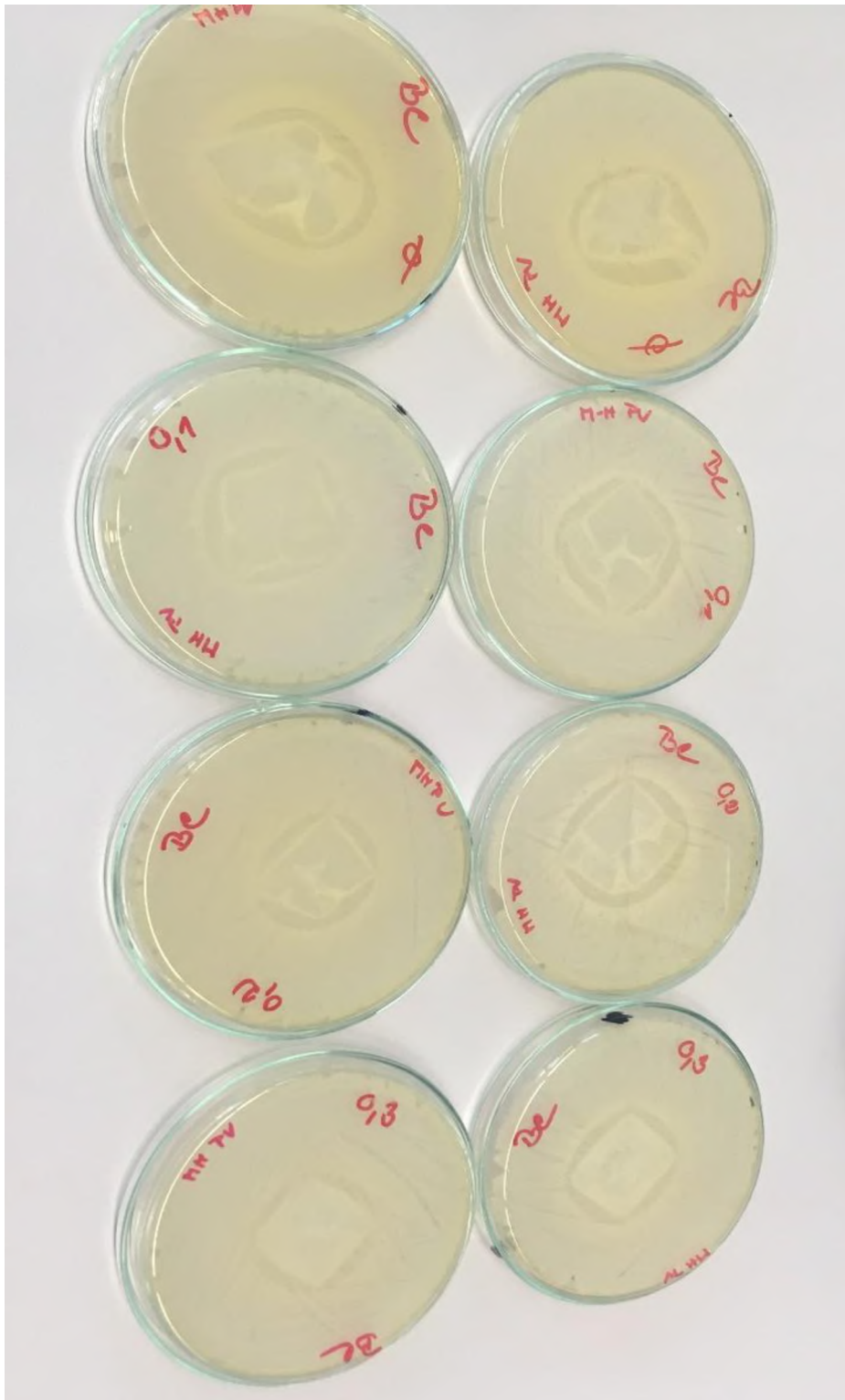
Příloha I: škrobové film na Petriho miskách – vybrané



Obrázek P 1 – modifikované škrobový film na živné půdě M-H zaočkovaný kulturou *St. aureus*, bez viditelné inhibiční zóny

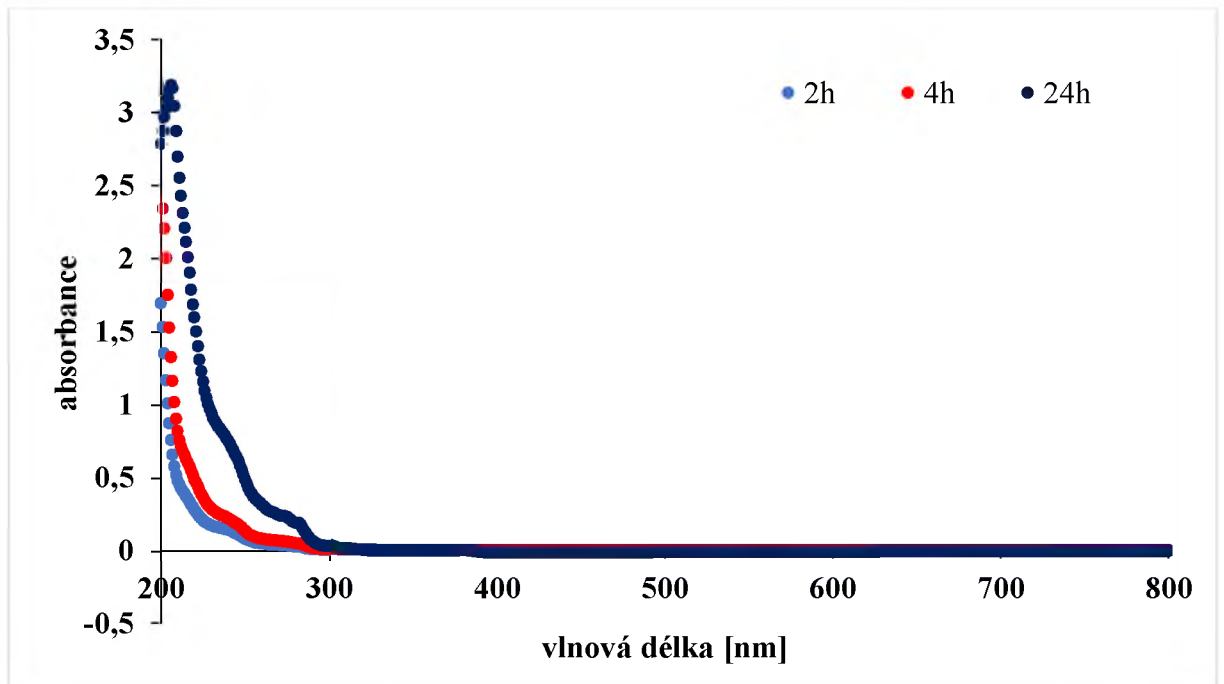


Obrázek P 2 – modifikované škrobové filmy s eukalyptovým olejem v koncentraci 0; 0,1; 0,2 a 0,3 g/100 g škrobové pasty zaočkované kulturou *A. brasiliensis*

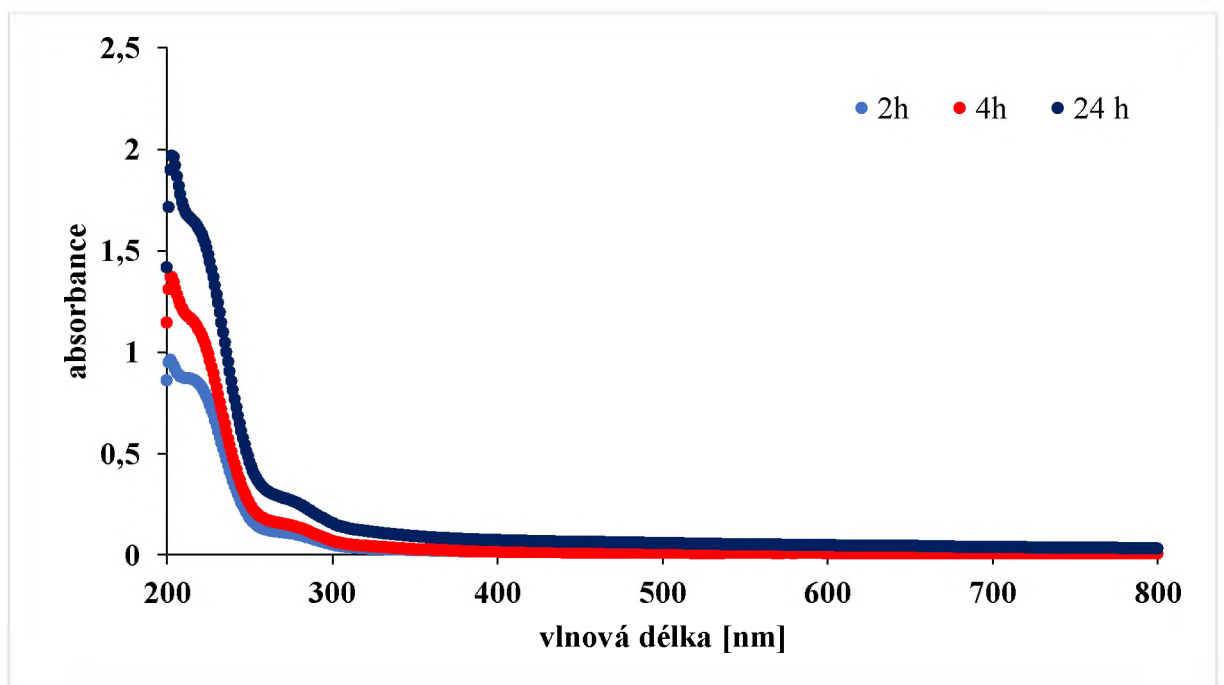


Obrázek P 3 – modifikované škrobové filmy v koncentraci oleje 0; 0,1; 0,2 a 0,3 g/100 g škrobové pasty zaočkované kulturou *B. cereus* s viditeľnou zakalenou zónou inhibície

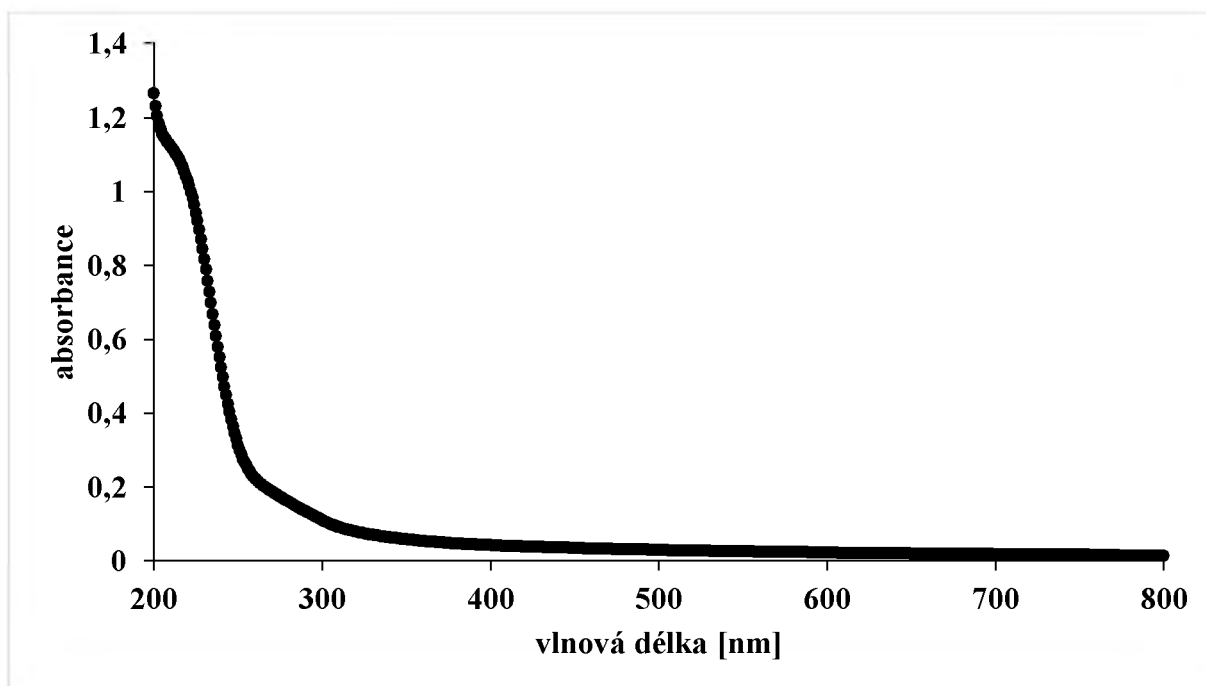
Příloha II: UV-VIS spektra



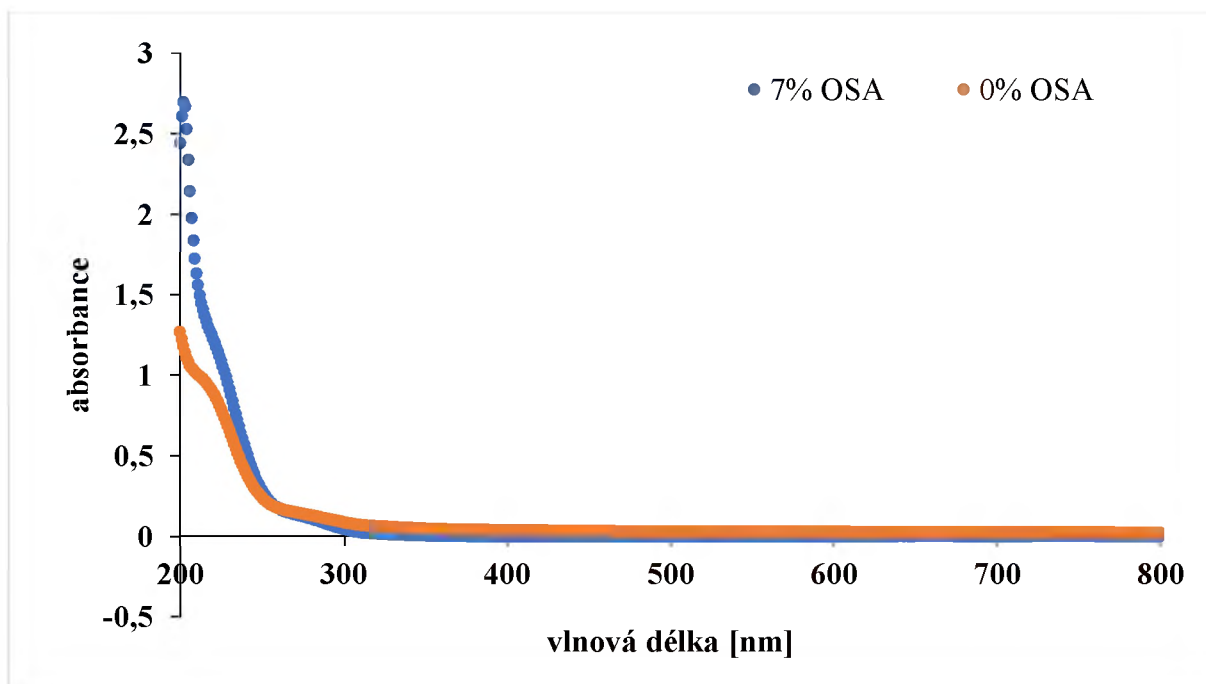
Obrázek P 4 – spektrum n-hexanových extraktů nemodifikovaných filmů v různých časech při 25 °C



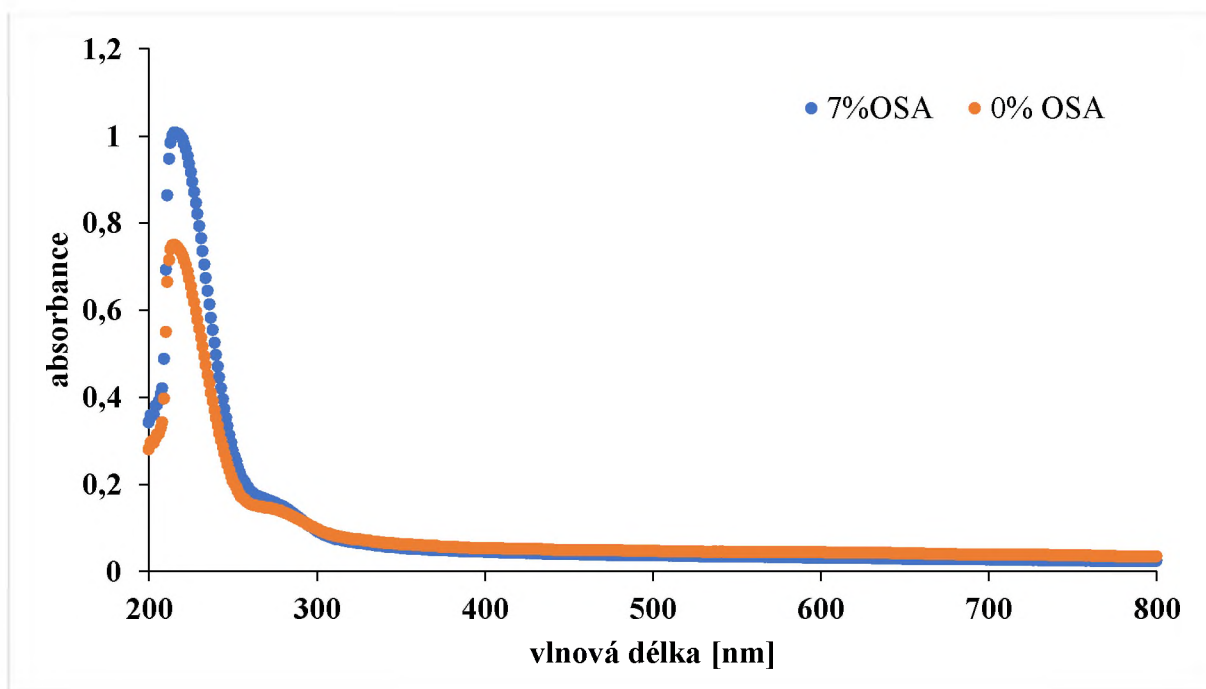
Obrázek P 5 – spektrum metanolových extraktů nemodifikovaných filmů v různých časech při 25 °C



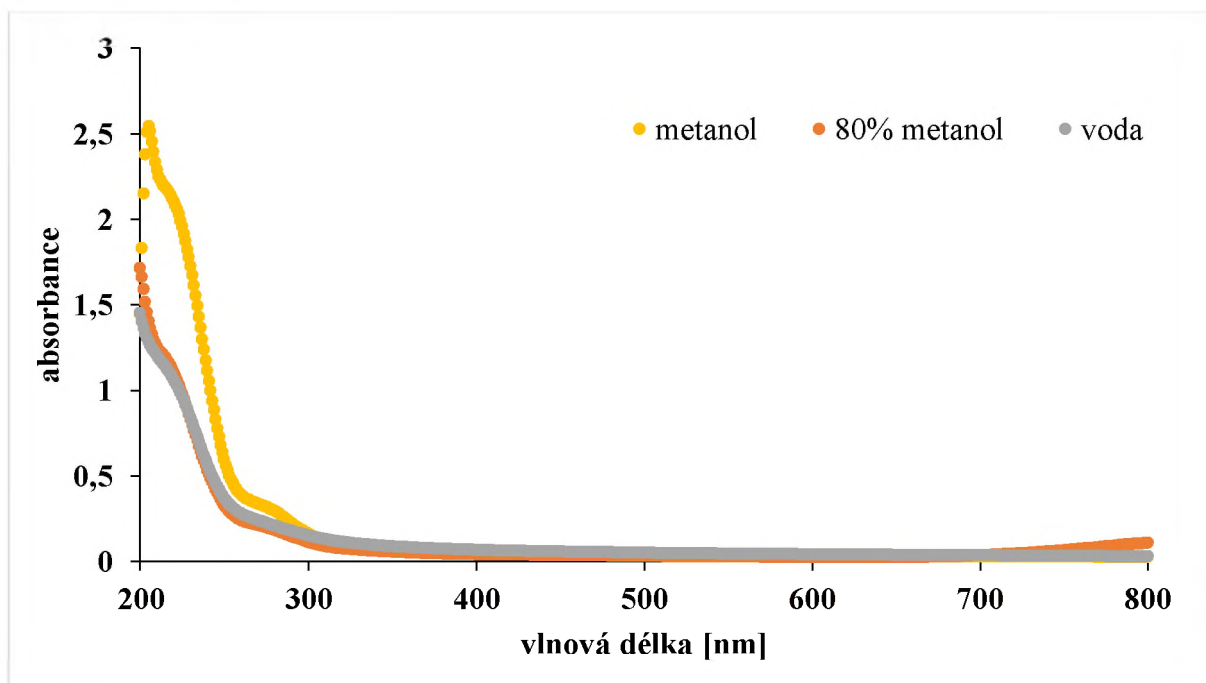
Obrázek P 6 – vodný extrakt nemodifikovaného škrobového filmu po dobu 24 h při teplotě 25 °C



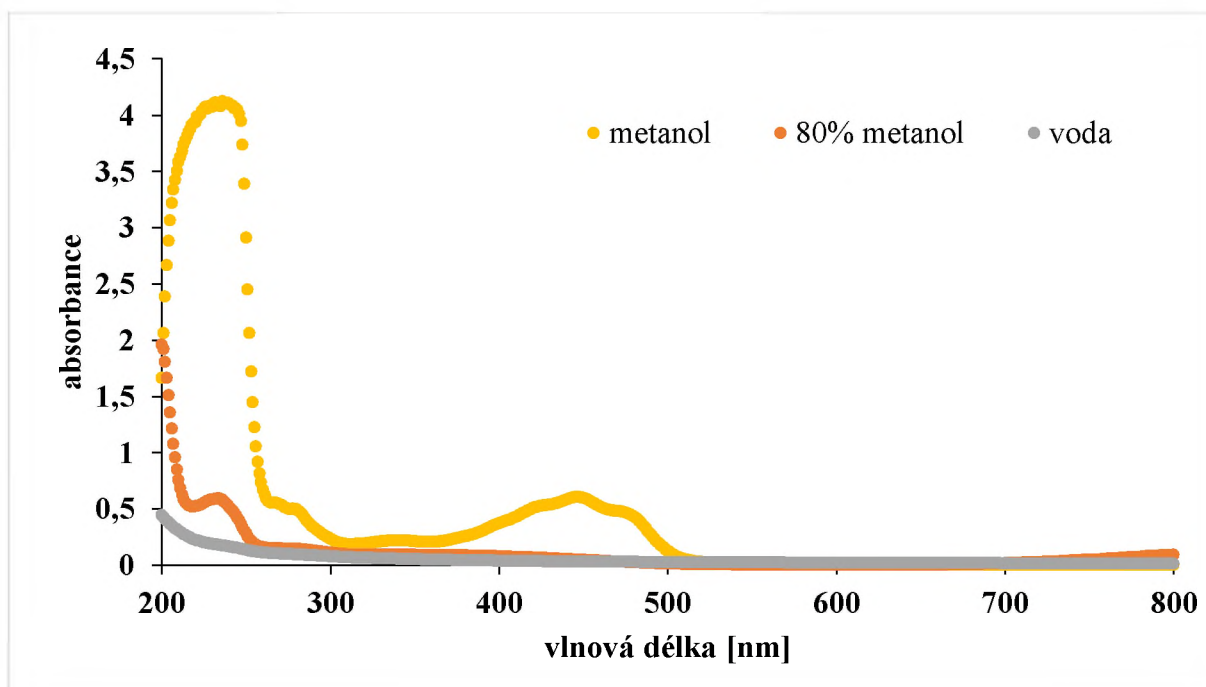
Obrázek P 7 – extrakt škrobových filmů v 80% metanolu po dobu 24 h při 25 °C



Obrázek P 8 – etanolický extrakt škrobových filmů po dobu 24 h při teplotě 25 °C

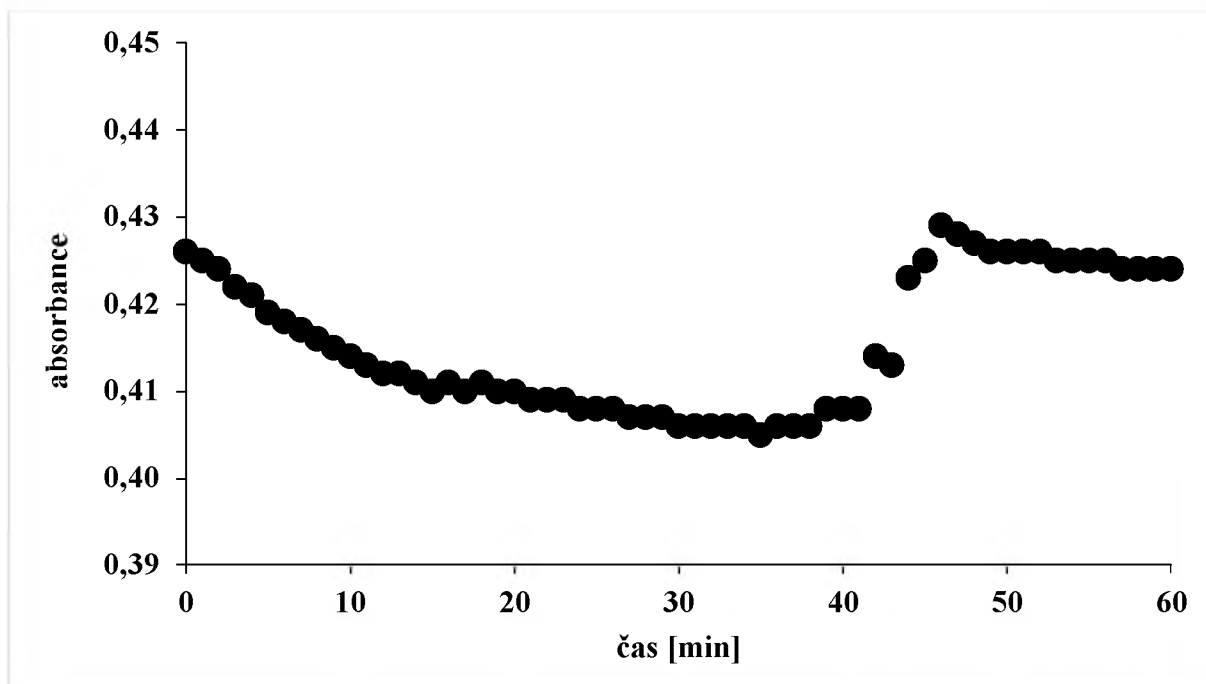


Obrázek P 9 – extrakce nemodifikovaných filmů do metanolu, 80% metanolu a vody při 40 °C po dobu 24 h

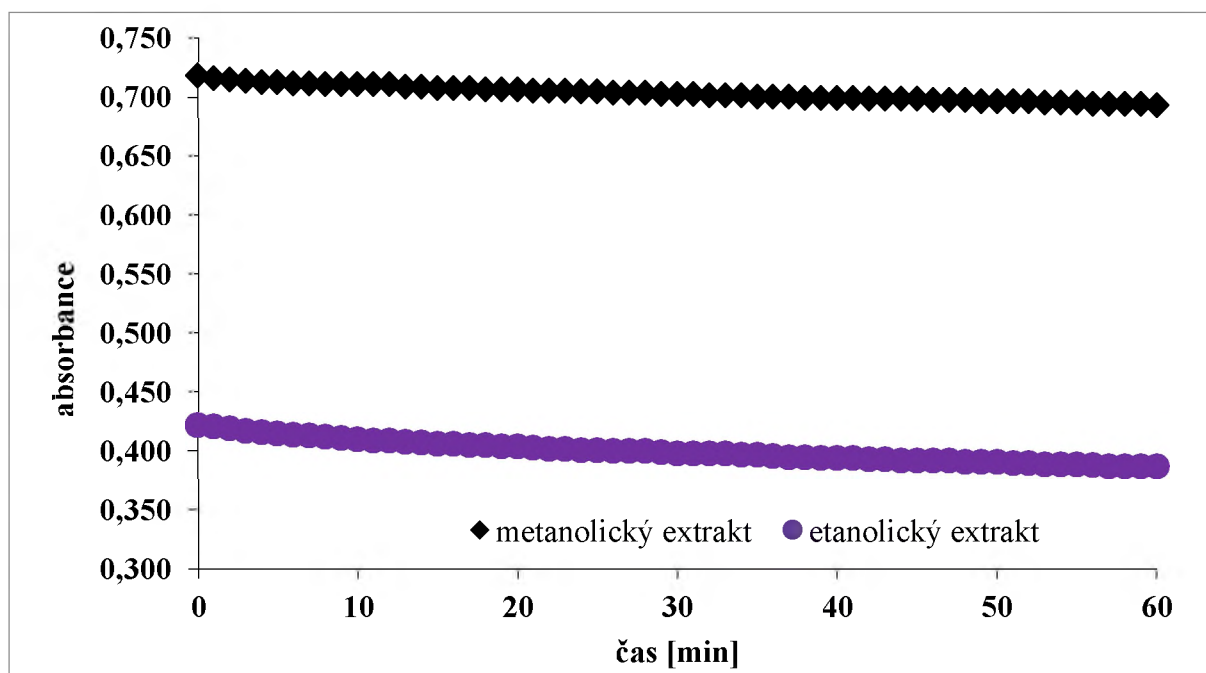


Obrázek P 10 – extrakce oleje do metanolu, 80% metanolu a vody při teplotě 40 °C po dobu 24 h

Příloha III: optimalizace metod DPPH a ABTS pomocí extraktů

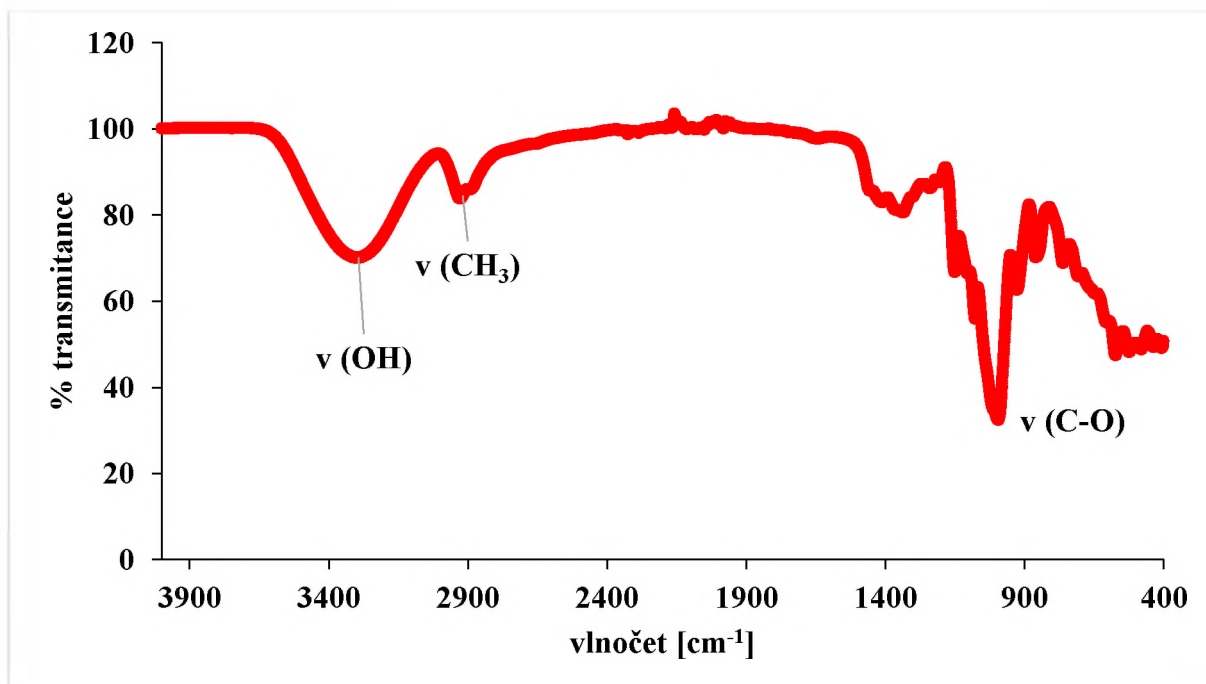


Obrázek P 11 - změna absorbance roztoku DPPH vlivem etanolického extraktu škrobového filmu

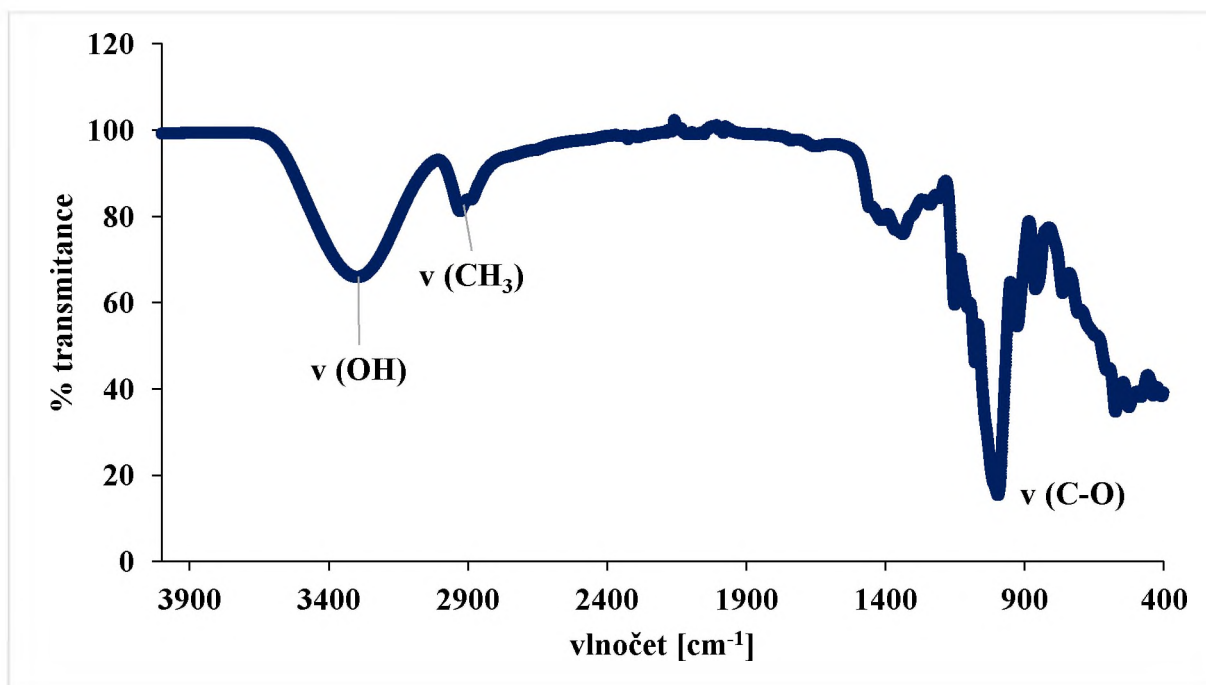


Obrázek P 12 – změna absorbance roztoku ABTS vlivem metanolického/etanolického extraktu škrobového filmu

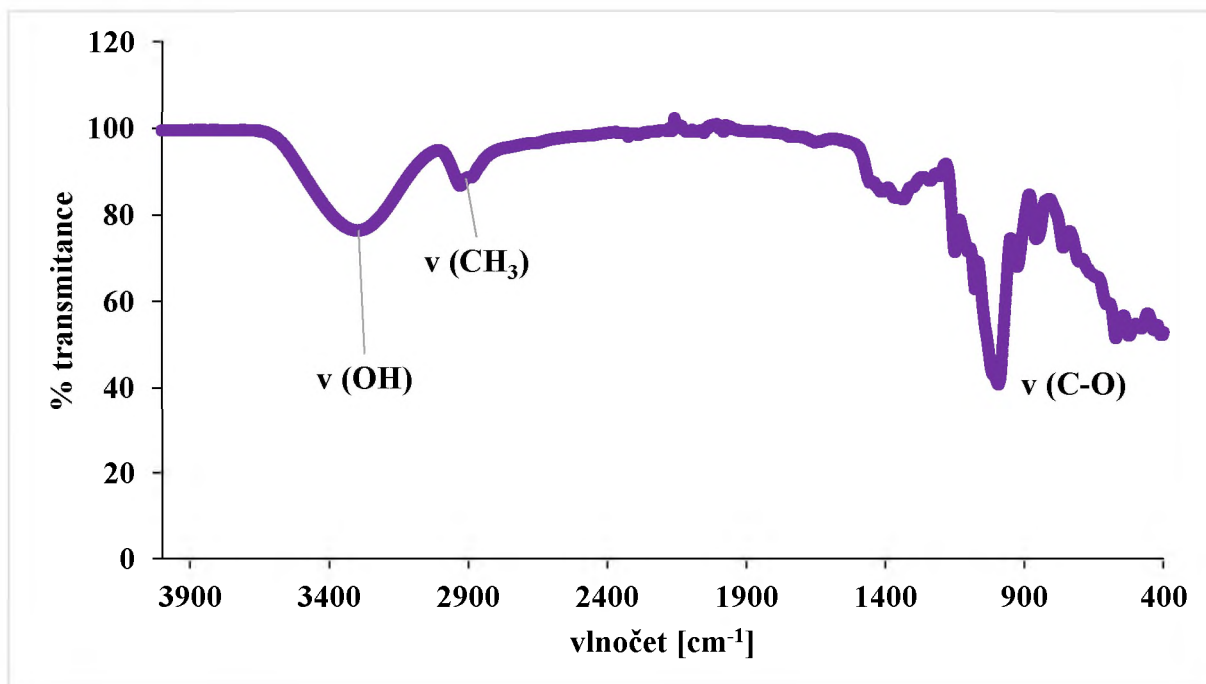
Příloha IV: IČ spektra škrobových filmů a rakytníkového extraktu



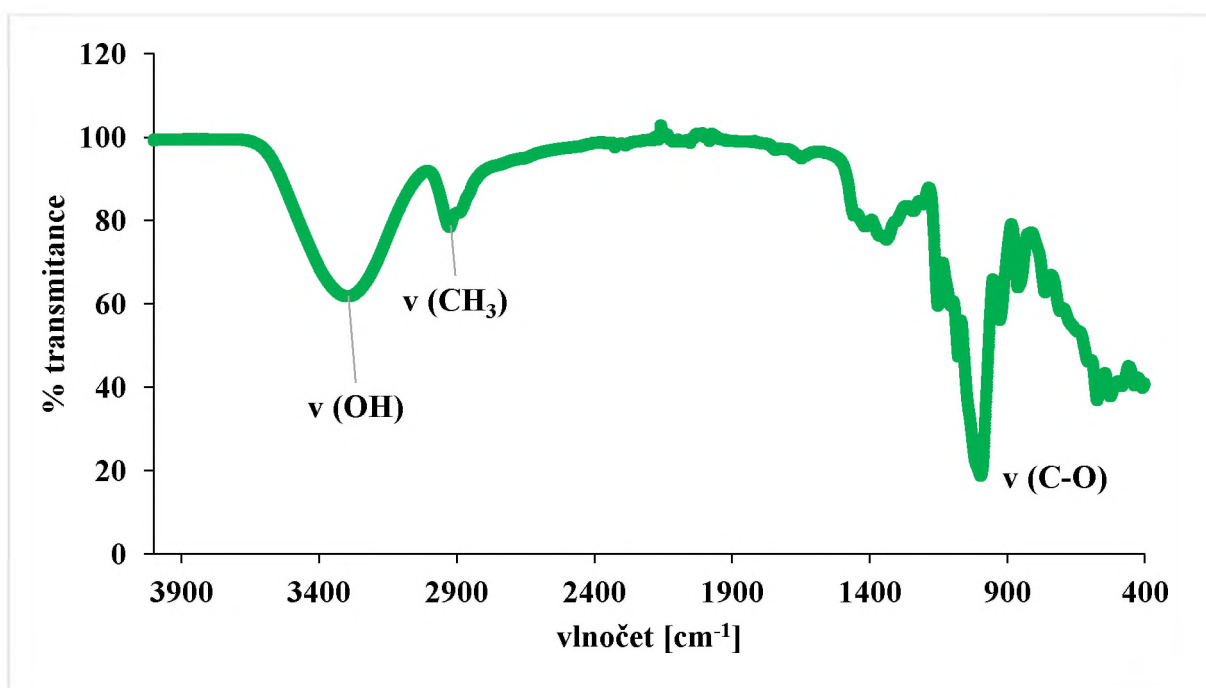
Obrázek P 13 – nemodifikovaný škrobový film o koncentraci 0,0 g oleje /100 g škrobového filmu



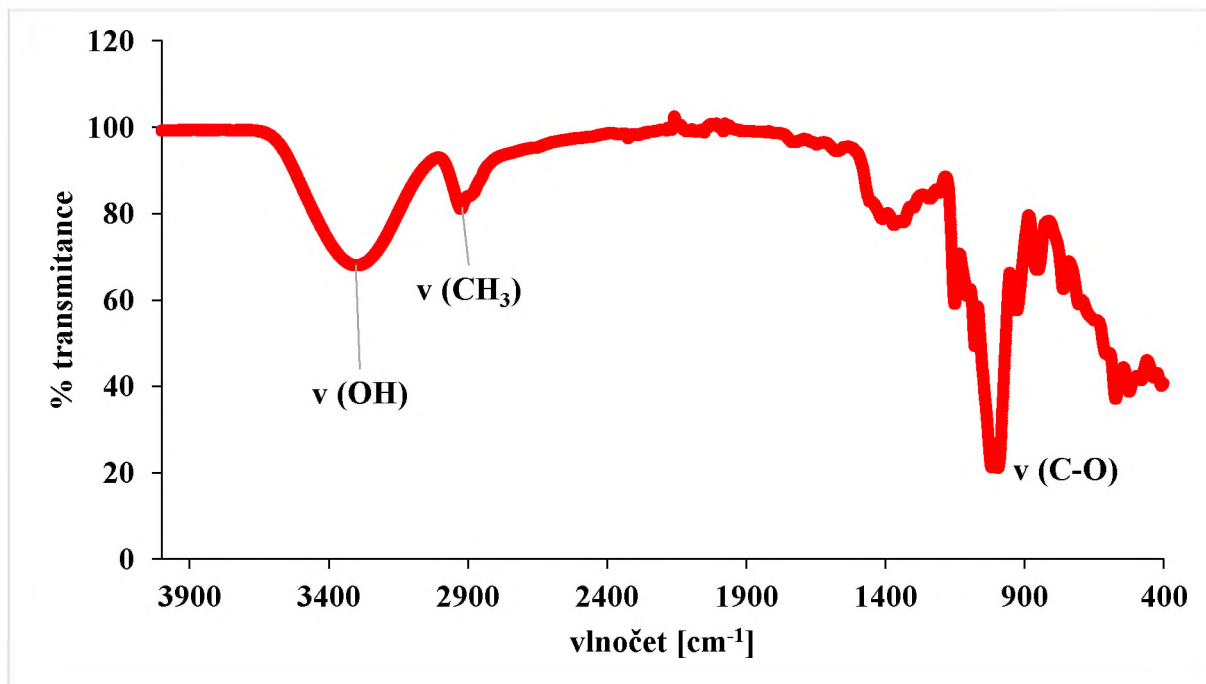
Obrázek P 14 – nemodifikovaný škrobový film o koncentraci 0,1 g oleje /100 g škrobového filmu



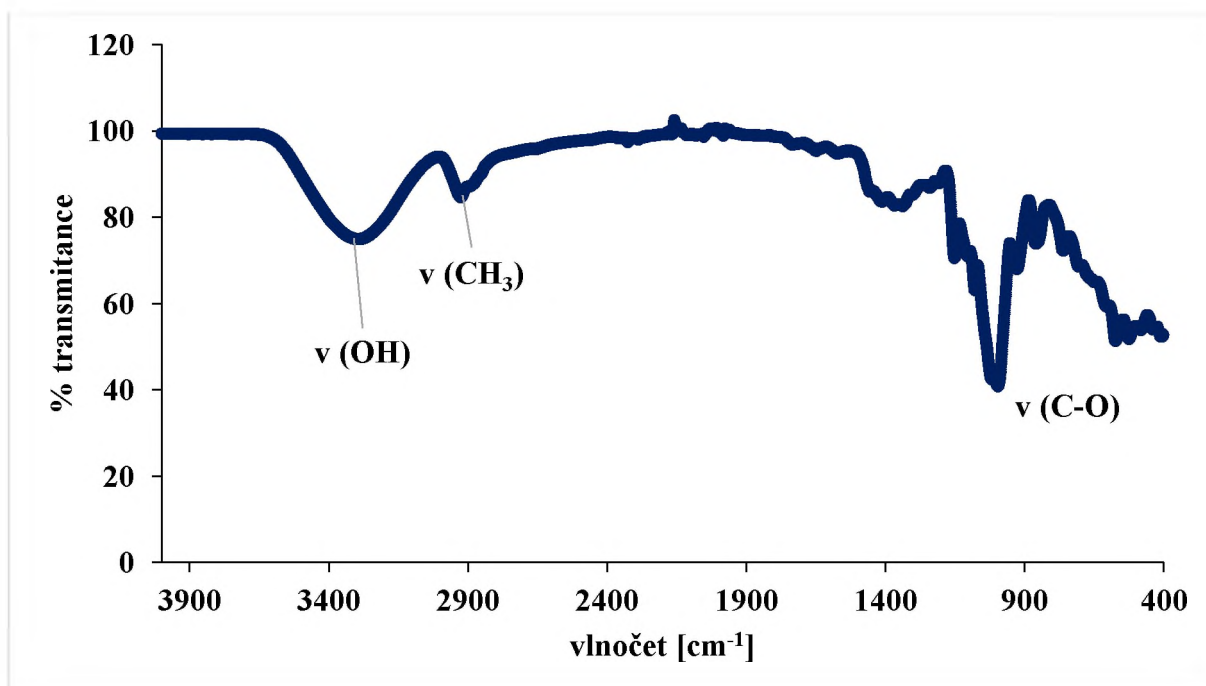
Obrázek P 15 – nemodifikovaný škrobový film o koncentraci 0,2 g oleje /100 g škrobového filmu



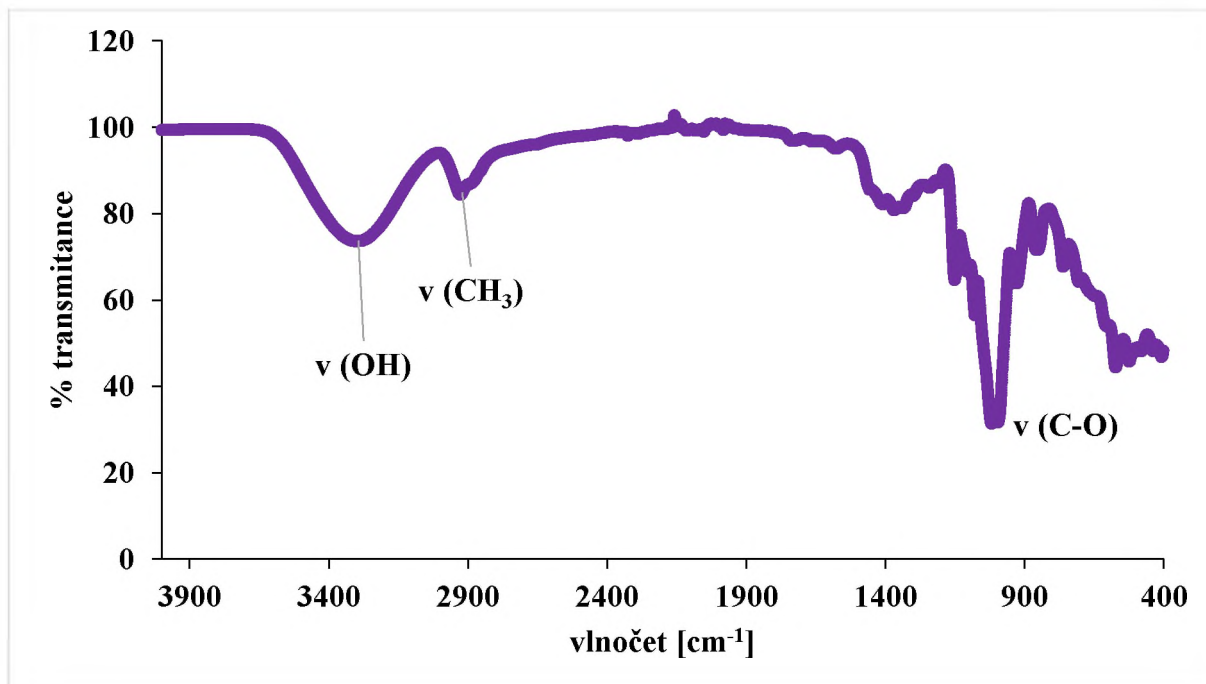
Obrázek P 16 – nemodifikovaný škrobový film o koncentraci 0,3 g oleje /100 g škrobového filmu



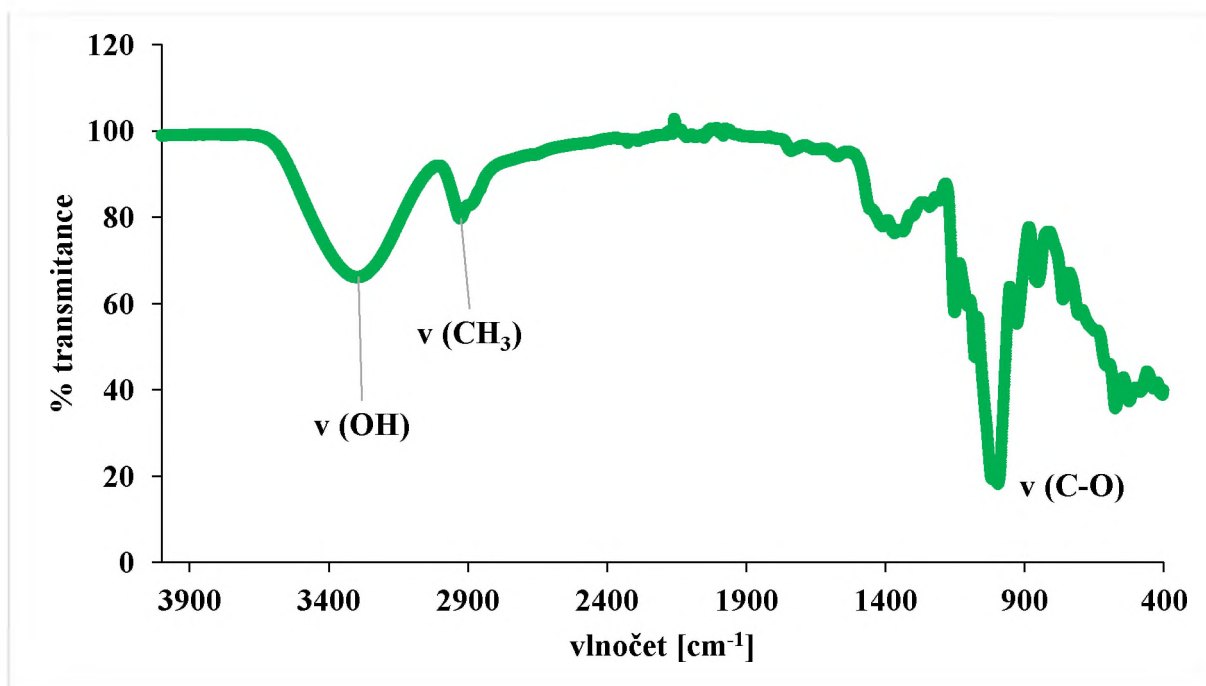
Obrázek P 17 – modifikovaný škrobový film o koncentraci 0,0 g oleje /100 g škrobového filmu



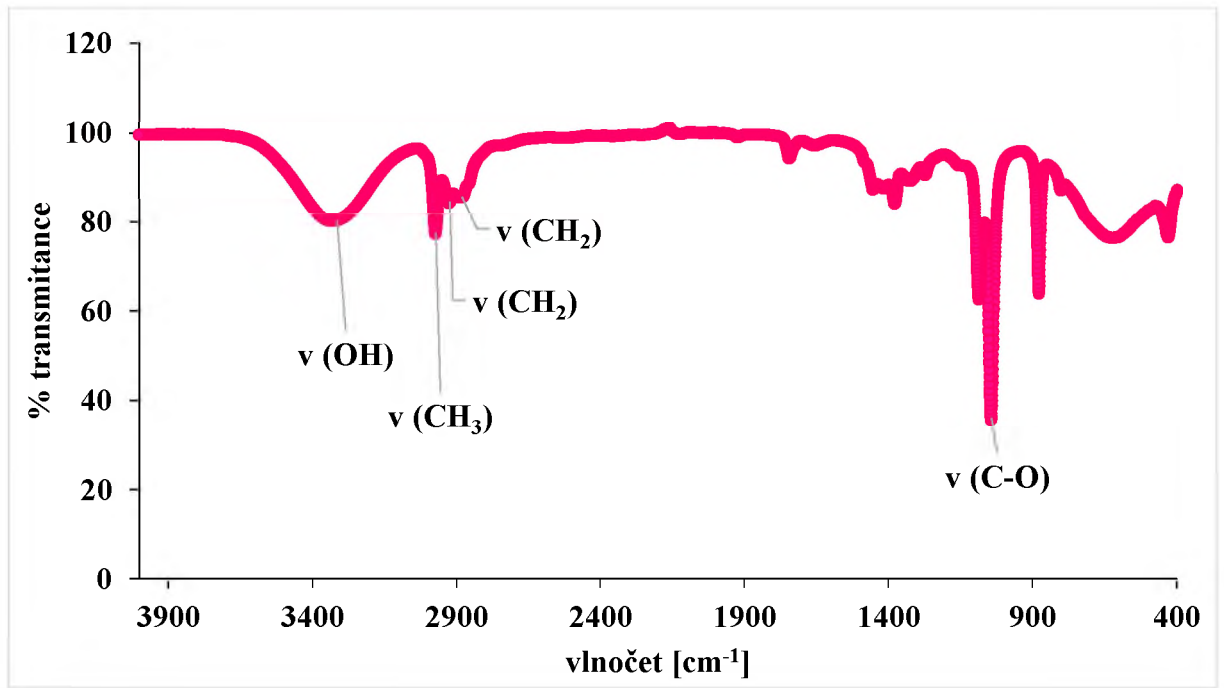
Obrázek P 18 – modifikovaný škrobový film o koncentraci 0,1 g oleje /100 g škrobového filmu



Obrázek P 19 – modifikovaný škrobový film o koncentraci 0,2 g oleje /100 g škrobového filmu

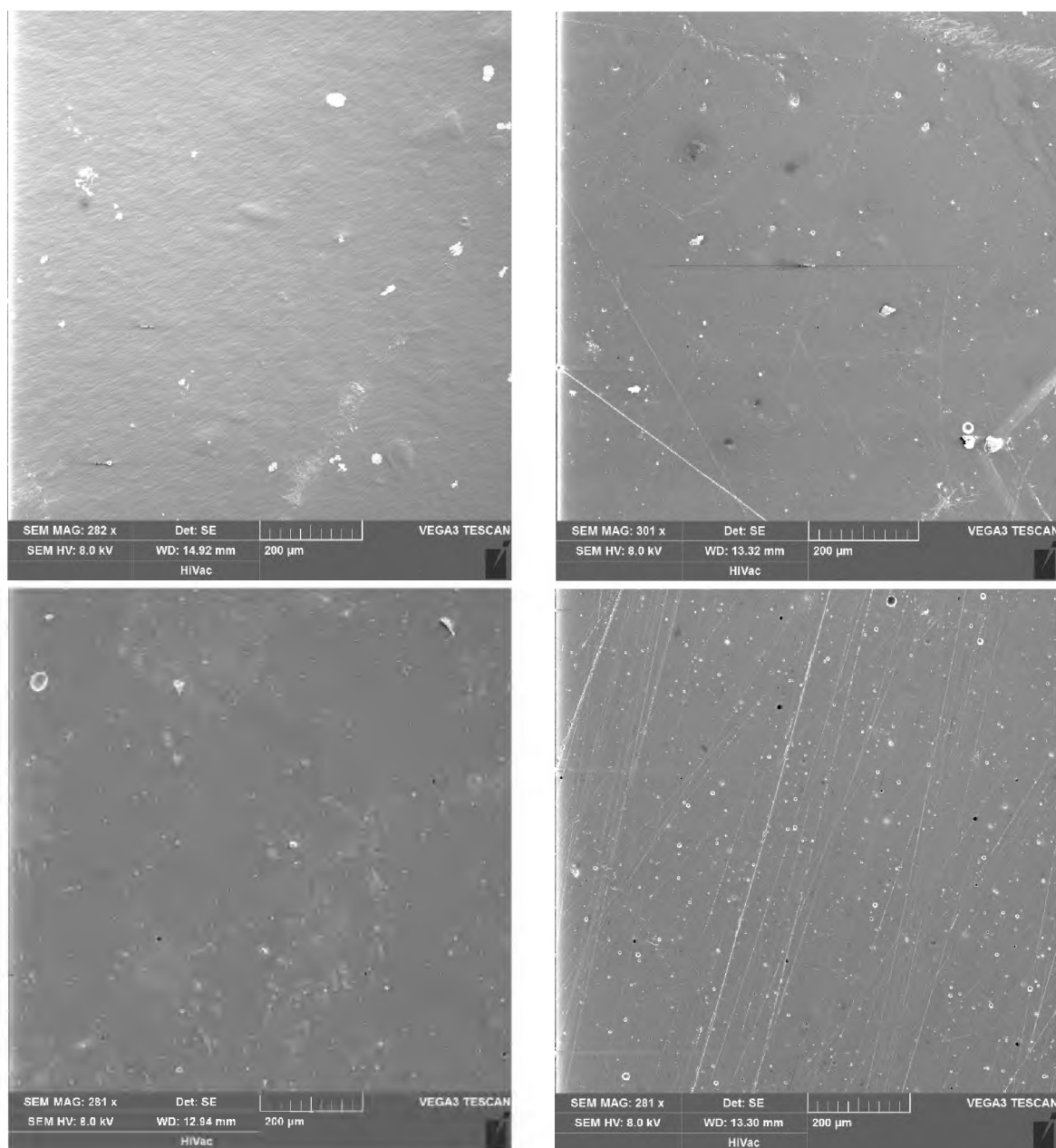


Obrázek P 20 – modifikovaný škrobový film o koncentraci 0,3 g oleje /100 g škrobového filmu

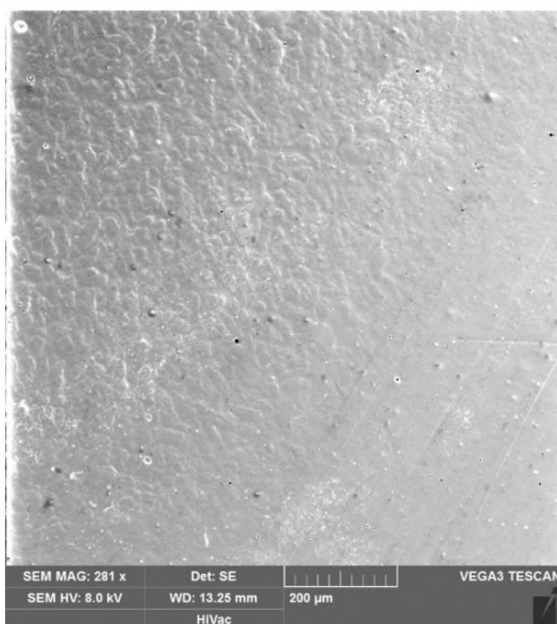
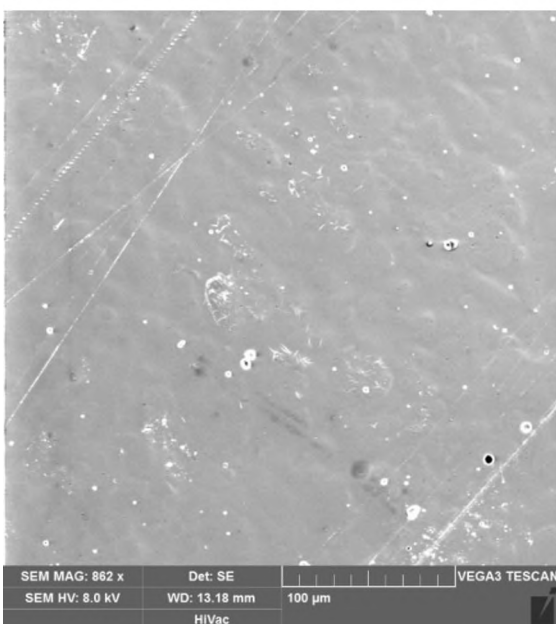
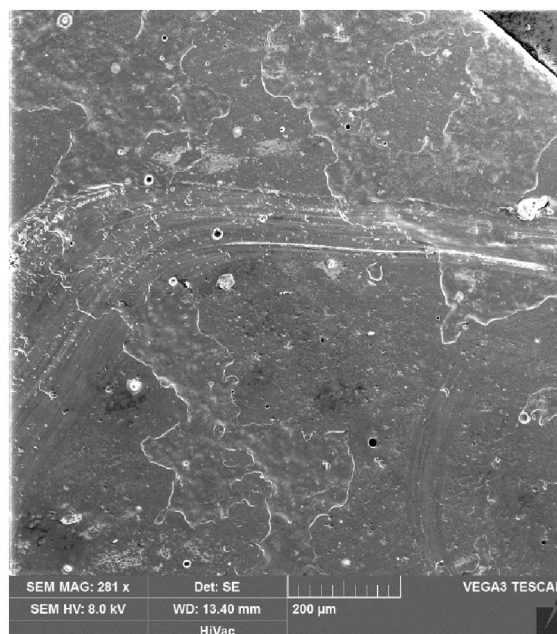
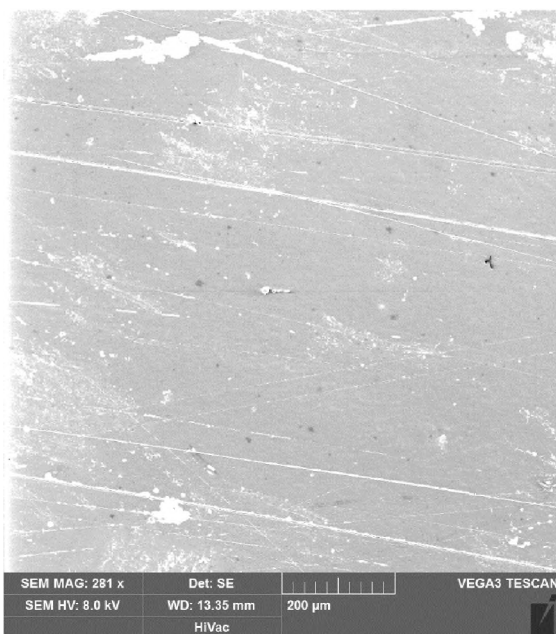


Obrázek P 21 – etanolický extrakt rakytníkového oleje

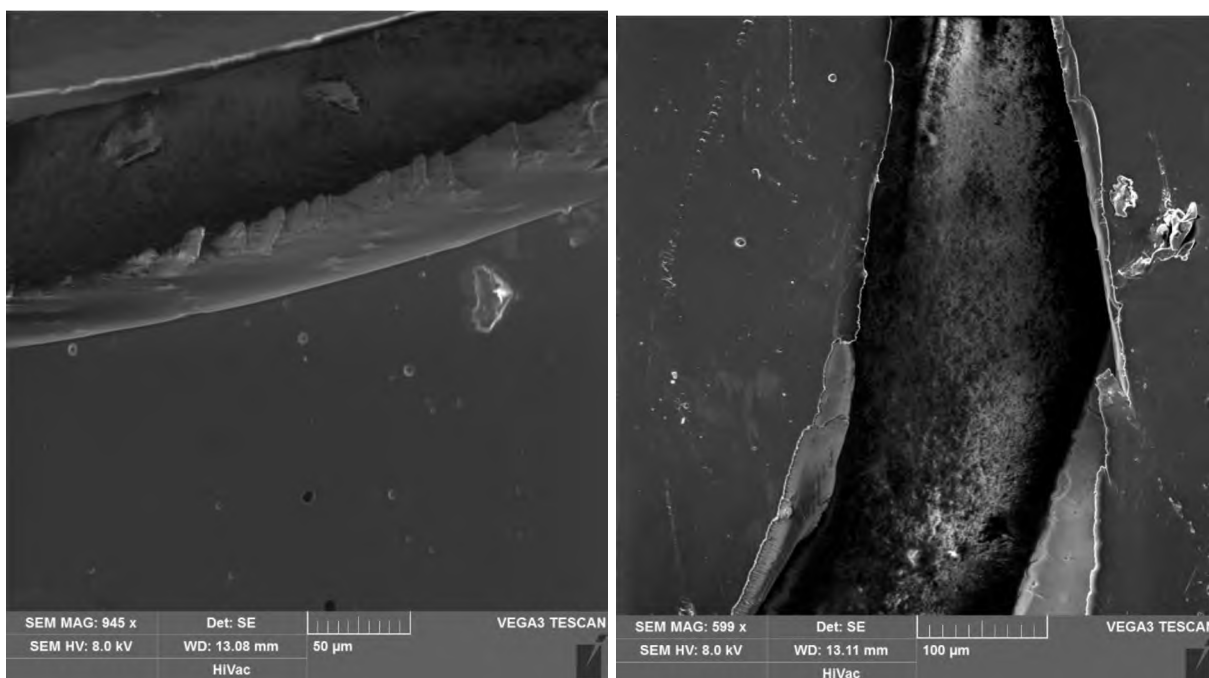
Příloha V: skenovací elektronová mikroskopie



Obrázek P 22 – nemodifikovaný film; nahoře vlevo o koncentraci 0,0 g rakytníkové oleje/100 g škrobové pasty, při zvětšení 282x můžeme vidět lehké zvrásnění povrchu; nahoře vpravo o koncentraci 0,1 g rakytníkového oleje/ 100 g škrobové pasty skenovaný při zvětšení 301x, pozorovatelný hladký povrch s drobnými částičky nečistot a drobnými rýhami způsobené nejspíše pinzetou během manipulace s filmem; dole vlevo o koncentraci 0,2 g rakytníkového oleje/100 g škrobové pasty, při zvětšení 281x je vidět lehká nehomogenita filmu; dole je škrobový film o koncentraci 0,3 g rakytníkového oleje/100 g škrobové pasty, při stejném zvětšení jako u filmu vlevo (281x) můžeme vidět rýhy, které byly způsobené nejspíše pinzetou během manipulace; oba povrchy jsou hladké



Obrázek P 23 – modifikovaný škrobový film; nahoře vlevo film o koncentraci 0,0 g rakytníkového oleje na 100 g škrobové pasty, při zvětšení 281x zde můžeme pozorovat hladký povrch s rýhy způsobené během manipulace s filmem; nahoře vpravo film o koncentraci 0,1 g rakytníkového extraktu na 100 g škrobové pasty, při zvětšení 281x zde jsou vidět mapy, které se nejspíše vytvořily během chlazení filmu; dole vlevo film o koncentraci 0,2 g rakytníkového oleje na 100 g škrobové pasty při zvětšení 862x je pozorovatelný hladký povrch filmu s drobnými rýhy způsobenými nejspíše během manipulace; dole film o koncentraci 0,3 g rakytníkového oleje na 100 g škrobové pasty, při zvětšení 281x můžeme pozorovat místy lehce zvrásněný povrch, který plynule přechází do hladkého povrchu, to může opět poukazovat na nehomogenitu škrobového filmu



Obrázek P 24 – zlomy (lámáno ve vysušeném stavu) vlevo nemodifikovaný film (0,2 g/100 g) při zvětšení 945x; vpravo modifikovaný film (0,2 g/100 g) při zvětšení 599x; v obou případech můžeme pozorovat, že zlom není tvořen z vláken a je kompaktní