

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

Mikrobiologická kvalita raw tyčinek

AUTOR: Bc. Jakub Rydval

VEDOUCÍ PRÁCE: Ing. Iveta Brožková, Ph.D.

KONZULTANT PRÁCE: doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D

2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Jakub Rydval**
Osobní číslo: **C22338**
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Mikrobiologická kvalita raw tyčinek**
Téma práce anglicky: **Microbiological quality of raw sticks**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

Teoretická část: Zpracujte literární rešerši cílenou na problematiku raw stravy. Zaměřte se na suroviny a biopotraviny využívané v experimentální části.

Experimentální část:

1. Zjistěte mikrobiální čistotu surovin použitých při výrobě zdravých raw tyčinek.
2. Připravte v laboratorních podmínkách raw tyčinky.
3. Zjistěte jejich mikrobiální a analytickou kvalitu.
4. Zjistěte vliv přidaných mikroorganismů na kvalitu raw tyčinek
5. Zaměřte se na kmeny *B. cereus* produkující cereové toxiny.
6. Připravte hydrodestilací olej z rýmovníku a využijte ho pro výrobu raw tyčinek. Zjistěte jeho vliv na produkci cereového toxinu u *B. cereus*.
7. Ze získaných výsledků vyvoďte závěry a porovnejte je s dostupnou vědeckou literaturou.

Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 7/2019 ve znění dodatku č. 2 "Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací".

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí práce

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Iveta Brožková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

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

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2024**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2024

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji:

Práci s názvem „Mikrobiologická kvalita raw tyčinek“ 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 dne

Bc. Jakub Rydval

PODĚKOVÁNÍ

Zde bych chtěl poděkovat vedoucímu mé práce, Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D., za její trpělivost, vedení a pomoc při tvorbě této práce, doc. Ing. Liboru Červenkoví, Ph.D. za pomoc s analytickou částí práce, a hlavně své rodině a přítelkyni za jejich klíčovou emoční podporu během mého studia.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá mikrobiologickou kvalitou raw tyčinek. Teoretická část práce se věnuje raw stravování, tyčinkám, jejich technologii a mikrobiologii. Dále obsahuje seznámení s bakterií *Bacillus cereus* jako původcem enterotoxikózy. Část je také věnována esenciálním olejům. Nakonec jsou popsány analytické metody a přístroje použité v závěru experimentální části. Experimentální část práce popisuje přípravu tyčinkové směsi, její následné mikrobiologické testování s různými množstvími přidaného esenciálního oleje a její chemickou analýzu. Přídavkem rýmovníkového oleje došlo ke snížení počtu bakterie *B. cereus* a zvýšila se antioxidační aktivita.

KLÍČOVÁ SLOVA

Raw tyčinky, *Bacillus cereus*, rýmovníkový olej, mikrobiologický rozbor, antioxidanty

TITLE

Microbiological quality of raw food bars.

ANNOTATION

This master thesis deals with microbiological quality of raw food bars. The theoretical part talks about the raw diet, raw food bars and their technology and mikrobiology. It also contains an introduction to the bacteria *Bacillus cereus* as a food contaminant and cause of enterotoxiosis. Essential oils are also explained. The last part of theory describes the analytical methods and machines used in the end of the experimental part. The experimental part of the thesis describes the preparation of the raw food bar dough, its microbiological testing with various amounts of added essential oil and finally its chemical analysis. By adding the essential oil, the amount of *B. cereus* in the bars was lowered and the antioxidant activity was increased.

KEYWORDS

Raw food bars, *Bacillus cereus*, *Plectranthus amboinicus* oil, microbiological testing, antioxidants

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	11
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	12
ÚVOD	14
1. TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1. Raw stravování	15
1.2. Raw tyčinky	15
1.2.1. Technologie přípravy raw tyčinek	16
1.2.2. Mikrobiologie raw tyčinek	16
1.3. <i>Bacillus cereus</i>	17
1.3.1. Kontaminace potravin.....	18
1.3.2. Produkované toxiny	18
1.3.3. Metody záchytu a detekce <i>Bacillus cereus</i>	19
1.4. Esenciální oleje.....	20
1.4.1. Benefity a rizika spojené s užitím olejů.....	20
1.4.2. Získávání esenciálních olejů.....	21
1.4.3. Využití esenciálních olejů.....	22
1.4.4. Esenciální olej z rýmovníku	23
1.5. Chemická a nutriční kompozice raw stravy	24
1.6. Aktivita voda	24
1.7. Obsah sušiny.....	25
1.8. Celkový obsah polyfenolických látek.....	26
1.8.1. Metoda dle Folin-Ciocalteu	26
1.8.2. Metoda HPLC.....	26
1.9. Antioxidační kapacita	27
1.9.1. Metoda DPPH.....	28

1.9.2.	Metoda ABTS	28
1.10.	Spektrofotometrie ve viditelné oblasti.....	28
1.10.1.	Typy spektrofotometrů	29
1.10.2.	Využití spektrofotometrie pro stanovení kvantity	29
2.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
2.1.	Pomůcky pro mikrobiologickou část.....	31
2.2.	Přístroje pro mikrobiologickou část	31
2.3.	Kultivační média a jejich příprava.....	32
2.4.	Chemikálie a roztoky pro mikrobiologickou část.....	38
2.5.	Komerčně dodávané soupravy a testy	38
2.6.	Použité suroviny	38
2.7.	Pravidla mikrobiologické analýzy	39
2.8.	Mikrobiologický rozbor surovin.....	39
2.8.1.	Stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů kultivační metodou.....	40
2.8.2.	Stanovení celkového počtu plísní a kvasinek	41
2.8.3.	Stanovení osmofilních plísní a kvasinek	41
2.8.4.	Stanovení koliformních mikroorganismů	41
2.8.5.	Stanovení čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	42
2.8.6.	Stanovení koaguláza pozitivních stafylokoků	42
2.8.7.	Stanovení počtu presumptivních bakterií <i>Bacillus cereus</i>	43
2.8.8.	Stanovení počtu bakterií <i>Clostridium perfringens</i>	43
2.9.	Mikrobiologická analýza raw tyčinek	43
2.9.1.	Výroba raw tyčinek	43
2.9.2.	Uchování těsta na raw tyčinky.....	44
2.9.3.	Výběr vhodné kultury <i>Bacillus cereus</i>	45
2.9.4.	Testování vlivu rýmovníkového oleje na mikrobiologickou kvalitu raw tyčinek	46

2.10.	Pomůcky pro analytickou část.....	48
2.11.	Přístroje pro analytickou část	48
2.12.	Chemikálie a roztoky pro analytickou část.....	48
2.13.	Destilace rýmovníkového oleje	49
2.14.	Stanovení aktivity vody raw tyčinek	49
2.15.	Stanovení obsahu sušiny u raw tyčinek.....	49
2.16.	Příprava vzorků k analýze polyfenolů a antioxidační kapacity	50
2.17.	Stanovení celkového obsahu polyfenolických látek.....	51
2.18.	Stanovení antioxidační kapacity tyčinek	52
3.	VÝSLEDKY A DISKUSE	53
3.1.	Výsledky mikrobiologických rozborů surovin	53
3.2.	Výsledek mikrobiologického rozboru po přípravě těsta.....	54
3.3.	Výsledek BCET-RPLA testu pro výběr kultury <i>Bacillus cereus</i>	55
3.4.	Účinky rýmovníkového esenciálního oleje na nárůst <i>B. cereus</i> v raw tyčinkách.....	55
3.5.	Výsledky analýzy aktivity vody v tyčinkovém těstě	57
3.6.	Výsledky analýzy obsahu sušiny v tyčinkovém těstě.....	58
3.7.	Výsledky analýzy celkového obsahu polyfenolických látek v tyčinkovém těstě.....	58
3.8.	Výsledky analýzy antioxidační kapacity tyčinkového těsta	61
4.	ZÁVĚR.....	62
5.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	63
6.	PŘÍLOHA.....	77

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 - graf kalibrační závislosti stanovení celkových polyfenolů metodou dle Folin-Ciocalteu	59
Obrázek 2 - graf optimalizace času reakce pro metodu dle Folin-Ciocalteua, 765 nm	77
Obrázek 3 - graf optimalizace času reakce pro metodu DPPH, 517 nm	77
Obrázek 4 - mikrobiologický rozbor surovin (foto autor)	78
Obrázek 5 - destilační aparatura pro destilaci rýmovníkového oleje (foto autor)	78
Obrázek 6 - detail na jímání predestilovaného oleje (foto autor)	79
Obrázek 7 - připravené a vytvarované raw tyčinky s různými přísadami oleje (foto autor)	80
Obrázek 8 - mikrobiologické rozborů jednotlivých raw tyčinek (foto autor)	80
Tabulka 1 - přehled surovin použitých na výrobu raw tyčinek	39
Tabulka 2 - podmínky pro rozbor jednotlivých surovin	40
Tabulka 3 - přísady rýmovníkového oleje do podílů těsta	47
Tabulka 4 - přehled navážek tyčinkových směsí pro extrakci	50
Tabulka 5- příprava kalibračních roztoků pro stanovení obsahu polyfenolických látek	51
Tabulka 6 - výsledné hodnoty kolonie tvořících jednotek (CFU)/g rozborů jednotlivých surovin pro výrobu tyčinek	53
Tabulka 7 - výsledné hodnoty kolonie tvořících jednotek (CFU) /g rozboru těsta pro kontrolu kontaminace	54
Tabulka 8 - průměrné hodnoty kolonie tvořících jednotek (CFU)/g těsta zaočkovaného <i>B. cereus</i> s přísadou oleje	55
Tabulka 9 – výsledky procentuálního snížení nárůstu <i>B. cereus</i> v tyčinkách s různým obsahem oleje	57
Tabulka 10 - navážky a stanovené obsahy sušiny tyčinek s rýmovníkovým olejem	58
Tabulka 11 - vypočtené obsahy celkových polyfenolických látek ve vzorcích raw tyčinek (ekvivalent kyseliny gallové GAE)	60
Tabulka 12 - vypočtené % inhibice DPPH radikálu v analyzovaných extraktech	61

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ABS	absorbance
ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
B-P	Baird-Parker agar
CFU	colony forming units (kolonie tvořící jednotky)
DG18	dichloran-glycerol agar
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DRBC	dichloran-rose bengal-chloramphenicol agar
FDA	Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
GAE	gallic acid equivalent (ekvivalent kyseliny gallové)
GTK	glukóza-trypton-kvasničný extrakt agar
HPLC	high performance liquid chromatography
KA	krevní agar
M-H	Mueller-Hinton agar
MS	mass spektrometry (hmotnostní spektrometrie)
MYP	mannitol-yolk-polymixine agar
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
RPLA	reverse passive latex agglutination
TSC	tryptose-sulfite-cycloserine agar
UV	Ultraviolet (ultrafialové)

VČŽG	violet'-červeně-žluč-glukóza agar
VČŽL	violet'-červeně-žluč-laktóza agar
VIS	visible (viditelná oblast)

ÚVOD

Raw tyčinky jsou v posledních letech oblíbenou svačinou mnoha lidí. Jsou vyráběné z přírodních surovin, jsou vegetariánské, bezlepkové a často i veganské. Díky svému ovocnému (nejčastěji datlovému) základu jsou skvělým zdrojem energie bez přílišného zatížení organismu a našly velký úspěch ve světě moderního raw stravování.

Podstatou výroby tyčinek je nulová tepelná úprava. Díky tomu si tyčinky nejlépe zachovávají své živiny a nutriční hodnotu. Zároveň však tento styl přípravy nepřináší téměř žádnou ochranu proti mikrobům. Tepelná úprava, která vede k usmrcení většiny mikrobiologických kontaminantů, zde chybí. V důsledku toho jsou raw tyčinky náchylné k mikrobiální kontaminaci a kažení. Jejich trvanlivost je tak poměrně krátká.

Cílem mojí práce je otestovat mikrobiologickou kvalitu vlastnoručně připravených raw tyčinek a následně zkoumat možnosti jejich antimikrobiální ochrany. Toto zkoumání spočívá v přidavku malého množství esenciálního oleje, který by díky vysokému obsahu těkavých aromatických látek mohl působit antimikrobiálně a vylepšit tak trvanlivost tyčinek a jejich mikrobiální kvalitu. Zároveň také provedu analýzu tyčinek z chemického hlediska stanovením obsahu polyfenolických látek a jejich antioxidační kapacity.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Raw stravování

Jedním z moderních trendů v oblasti stravování je rostoucí zájem veřejnosti o přijímání zdravé stravy v souvislosti s péčí o své fyzické a duševní zdraví. Přísnější požadavky konzumentů na zdravou, přirozenou, přírodní a zdraví prospěšnou stravu daly vzniknout novému typu stravování, tzv. „raw food diet“. Ta zahrnuje pouze minimálně zpracované suroviny, zejména ovoce, zeleninu, oříšky, semínka, obiloviny, luštěniny. Tyto nezpracované suroviny by měly být nejpřirozenějším zdrojem živin pro organismus, které by tak měly být lehce zpracovatelné a nepřinášet tělu žádné negativní účinky. Zároveň by měly být dobrým zdrojem zdraví prospěšných látek, např. vitamínů či antioxidantů. Takový způsob stravy by rovněž měl pomáhat v prevenci chronických onemocnění, v některých případech i rakovinotvorných (Tantamango-Bartley *et al.*, (2013); Brožková *et al.*, (2016)). Avšak ani tento způsob není bezchybný. Konzumenti této diety, kteří často rovněž dodržují přísnou veganskou stravu, často mají potíže s nedostatkem vitamínů, např. B12, který je obsažen z velké části v živočišných produktech, ale v rostlinných chybí (Pawlak *et al.*, (2014); Raba *et al.*, (2019)). Je proto důležité, aby lidé praktikující raw stravování byli dobře informovaní o složení a obsahu živin. Příjem esenciálních látek je pak často nutné podporovat různými potravinovými doplňky.

1.2. Raw tyčinky

Raw tyčinky představují poměrně nový typ potraviny. Slouží jako jednoduchý a rychlý zdroj přirozené energie a nutričních látek. Jsou vyráběny bez umělých přísad cukru či jiných sladidel a konzervantů. Jejich složení je převážně veganské a tyčinky jsou tak vhodným a zdravým zdrojem živin pro velmi širokou část populace. Jedním z hlavních problémů raw tyčinek je krátká trvanlivost, která vyplývá z jejich složení a absence potravinových aditiv. Kvůli tomu jsou náchylné k mikrobiální kontaminaci a kažení. Tento fakt se výrobci snaží eliminovat např. přidáním nejrůznějších potravin s přirozenými antimikrobiálními vlastnostmi, které by trvanlivost prodloužily. Nejpoužívanějšími potravinami jsou skořice a jiné výtažky (z ovoce či jiného koření) obsahující velké množství aromatických látek, které mají prokazatelný antimikrobiální účinek (Clemente *et al.*, (2016); Suriyaprom *et al.*, (2022)).

1.2.1. Technologie přípravy raw tyčinek

Tyčinky jsou vyráběny jako směs sušeného ovoce, oříšků, obilovin, jiných přirozených sladidel a dalších přísad majících příznivý vliv na organoleptické vlastnosti. Neexistuje jednotné složení, suroviny je možné spolu různě kombinovat a existuje velké množství různých receptur.

Mezi nepoužívanější druhy sušeného ovoce patří datle, meruňky, fíky, rozinky, banán či mango. Sušené ovoce používané pro výrobu tyčinek je sušeno pouze při nižších teplotách do 50 °C (Bourdoux *et al.*, 2016), aby se co nejvíce zamezilo ztrátě živin a organoleptickým změnám (Jayaraman a Gupta, 2020). Z oříšků je nutné zmínit hlavně mandle, kešu ořechy a arašídů. Přírodních sladidel je mnoho, už samotné sušené ovoce je často velmi sladké, ale lze použít med, či některý ze sladkých sirupů (kokosový, datlový, čekankový, javorový atd.). Některé další přísady, většinou používané pro ochucení, jsou např. kokos, skořice, karamel, kakao.

Všechny použité suroviny jsou zhomogenizovány do jednotné hmoty, ze které jsou následně tvarovány tyčinky. Ty dále neprochází žádnou tepelnou či chemickou úpravou (někdy k usnadnění balení zahrnut krok kratšího sušení při nízké teplotě maximálně do 43 °C pro zachování enzymů) (Bavcon Kralj *et al.*, 2017), jsou baleny do většinou plastových obalů a tím jsou připraveny k prodeji.

1.2.2. Mikrobiologie raw tyčinek

Jedním z nejběžnějších rizik při výrobě raw tyčinek je mikrobiální kontaminace. Ani suroviny, ani hotový produkt nejsou tepelně zpracovány. Opravdu přírodní a veganské tyčinky by navíc neměly obsahovat žádná aditiva. Jakýkoliv mikroorganismus, který se během výrobního procesu dostane do těsta, může být potenciálním kontaminantem. Je tedy důležité, aby prostory, kde výroba probíhá, byly pravidelně a důkladně čištěny a desinfikovány. Použité suroviny je rovněž třeba kontrolovat co do jejich mikrobiologické čistoty, mohou totiž obsahovat mikroby či jejich spory (Alp a Bulantekin, 2021).

1.2.2.1. Kontaminace výrobního procesu

Nejběžnější kontaminující bakterie výrobních prostředí zahrnují rody *Listeria*, *Pseudomonas* nebo *Micrococcus*, schopné tvořit biofilm na různých površích, zejména na těch drsnějších, ale i na hladkých, či uvnitř potrubí, pomocí vrstvy kyselých

mukopolysacharidů (Mazaheri *et al.*, 2021). Mezi další kontaminanty patří např. rody *Bacillus* a *Staphylococcus*, koliformní bakterie nebo spory mnoha druhů plísní, díky svému běžnému výskytu v ovzduší (Le Gentil *et al.*, 2010).

1.2.2.2. Kontaminace surovin

Kontaminace ovocných surovin není natolik problematická, jelikož ovoce nepředstavuje ideální prostředí pro růst bakterií. Snížené pH vlivem obsahu organických kyselin (kyselina jablečná, citronová atd.), a obsah dalších mikrobicidních látek, např. kyselina benzoová (brusinky) nebo různé éterické oleje (citrusy) brání většině bakterií v přežití. Sušení ovoce tento fakt ještě posiluje snížením aktivity vody a tím její dostupnosti pro mikroorganismy. Mezi běžné kontaminanty tak patří především kvasinky a plísně, které bez potíží přežívají v nehostinných podmínkách. Nejčastěji přítomné rody plísní jsou *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor* či *Rhizopus* a kvasinek např. *Saccharomyces* či *Rhodotorula* (Hernández *et al.*, (2018); Abbas *et al.*, (2019)).

Přídavné složky jako např. med a sirupy, obsahující velké množství sacharidů, mohou být kontaminovány různými druhy osmofilních kvasinek či plísní. Ty jsou adaptované na prostředí s vysokým osmotickým tlakem a jsou schopné v něm přežít. Mezi zástupce patří např. rody *Zygosaccharomyces* nebo *Eurotium*. Je také možné v těchto surovinách nalézt spory bakterií *Bacillus* či *Clostridium*, přežívající nevhodné podmínky (Vázquez-Quiñones *et al.*, 2018).

Ořechy jsou dalším potenciálním kontaminantem. Při jejich sběru a balení je důležité dbát na správné sušení. V nedostatečně vysušených plodech se často rozrůstají plísně. Za nejnebezpečnější jsou považovány mykotoxiny tvořící rody *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium* (Bui-Klimke *et al.*, 2014). Aflatoxiny, produkované rodem *Aspergillus*, se vyznačují svou karcinogenitou a teratogenitou, jejich konzumace může vést až k odumření plodu (da Silva *et al.*, 2021). Kontroly při sušení tak musí být velmi striktní.

1.3. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus je grampozitivní, fakultativně anaerobní bakterie tyčinkovitého tvaru. Vyskytuje se běžně téměř po celém světě. Je schopná přežít v mnoha různých prostředích, nalézáme ji tedy ve vzduchu, ve vodě, v půdě. Často je přítomna např. na kůži živočichů a jako součást stravy proniká dovnitř do organismu, kde je součástí střevní mikroflóry (Mohammadi *et al.*, (2022); Ehling-Schulz *et al.*, (2019)).

Jedna z typických vlastností této bakterie je schopnost tvořit odolné spory jako součást svého životního cyklu. Uvnitř spory mikroorganismus přežívá i v prostředí se špatnými životními podmínkami (vysoká nebo naopak nízká teplota, nedostatečná dostupnost vody v prostředí, nepříznivé pH atd.) (Setlow, (2014); Carlin, (2011); Mathot *et al.*, (2021)). Po zlepšení okolních podmínek spora praskne a mikroorganismus je schopný dalšího života. Sporulace je hlavní příčinou velmi rozšířeného výskytu bakterie.

1.3.1. Kontaminace potravin

Bacillus cereus je díky svému širokému výskytu označován jako jeden z nejběžnějších potravinových kontaminantů. Je zodpovědný za až 12 % všech otrav z potravy na světě (Grutsch *et al.*, 2018). Kvůli tvorbě spor a výskytu ve vzduchu je prakticky nemožné ho z potravy kompletně odstranit tepelnou úpravou (Stenfors Arnesen *et al.*, (2008); Carlin, (2011)). Obecně platí, že v každé stravě nějaké množství mikrobů přijmeme. Problém spočívá v množení bakterií ve stravě po tepelné úpravě. V takové je např. *Bacillus cereus* schopný množit se při teplotách 5 – 60 °C vysokou rychlostí a již za několik hodin může způsobovat potíže (Jessberger *et al.*, (2020); Ehling-Schulz *et al.*, (2019)).

V případě, že počet CFU (kolonie tvořících jednotek) *Bacillus cereus* ve stravě překročí hodnotu 10⁶ CFU v 1 gramu (FDA, (2012); Ehling-Schulz *et al.*, (2019)), vzroste množství vyprodukovaných toxinů na úroveň, která značí riziko enterotoxikózy pro člověka. Účinnou prevencí množení bakterií je rychlé zchlazení tepelně upravených potravin a pokrmů na teplotu 5 °C. Vhodné je také potraviny následně před podáváním důkladně prohřát (alespoň 70 °C) (FDA, (2012); Mohammadi *et al.*, (2022)).

1.3.2. Produkované toxiny

Bacillus cereus produkuje dva toxiny významné jako kontaminanty potravin. Tyto toxiny většinou nemají velmi závažné účinky a enterotoxikóza tak má pouze mírný průběh. Starší lidé, kojenci nebo lidé s oslabeným imunitním systémem však mohou zažít závažnější průběh.

Prvním toxinem je emetický toxin cereulid. Je produkován přímo živými buňkami *Bacillus cereus* v potravině (Ehling-Schulz *et al.*, (2019); Marxen *et al.*, (2015)). Působí toxicky na játra. Příznaky otravy zahrnují nevolnost, zvracení a malátnost. Inkubační doba je pouze pár hodin. Tento toxin je velmi odolný jak proti vysokým i nízkým teplotám, tak i proti vysokému či nízkému pH (Messelhäusser *et al.*, 2014). Je produkován zejména

v potravinách s vysokým obsahem škrobu (rýže, obiloviny, těstoviny). Příznaky trvají obvykle několik hodin až 1 den (Marxen *et al.*, (2015); Jovanovic *et al.*, (2021); Dietrich *et al.*, (2021)).

Druhý enterotoxin (přesněji směs enterotoxinů hemolysin BL, nehemolytický enterotoxin a cytotoxin K) jsou produkovány v tenkém střevě po konzumaci kontaminované potraviny obsahující buňky bakterie. Způsobují vodnaté průjmy, bolesti břicha a nevolnost. Inkubační doba enterotoxikózy je obvykle 12 – 24 h. Příznaky trvají několik dní. Tato směs toxinů je velmi málo odolná proti vyšším teplotám, je inaktivována již po 3 minutách při teplotě 70 °C (Grutsch *et al.*, (2018); Mohammadi *et al.*, (2022); Jovanovic *et al.*, (2021); Dietrich *et al.*, (2021); Kavanaugh *et al.*, (2022)).

1.3.3. Metody záchytu a detekce *Bacillus cereus*

Pro posouzení, zda daná potravina/pokrm jsou nebo nejsou kontaminované je nutné bakterie z nich zachytit a izolovat, případně určit míru jejich kontaminace. Různé bakterie mají rozdílné, většinou pro daný kmen či pro daný typ potraviny specifické metody, které jsou uvedené v příslušných normách či vyhláškách (všechno součástí Zákona č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích).

Nejběžnější metodou odhalení kontaminace *Bacillus cereus* je provedení mikrobiologického rozboru, kdy se určité množství správně odebraného vzorku potraviny (obvykle 10 g) zhomogenizuje v 9x větším množství ředícího roztoku (zvoleného dle typu potraviny). Takto připravený homogenát je následně naředěn na příslušnou (zhruba očekávanou) koncentraci a z tohoto roztoku je sterilní pomůckou proveden roztěr na povrch zvoleného selektivního média. Na tomto médiu (dané normou, pro *Bacillus cereus* MYP agar) je díky jeho složení možné identifikovat sledovanou bakterii podle její specifické interakce s médiem (barevné změny, precipitační zóny). Jelikož *Bacillus cereus* je bakterie, která se stává toxinogenní a nebezpečnou pouze při vyšších koncentracích v potravine, je dále nutné řádově spočítat počet kolonie tvořících jednotek (CFU) v 1 g potraviny. Tato koncentrace je srovnána s maximální doporučenou hodnotou CFU/g a potravina může být označena označena za zdravotně závadnou (Erkmen, 2021).

Mezi další používané metody záchytu a určení koncentrace patří např. imunochemické metody, založené na interakci antigenů s protilátkami. *Bacillus cereus* je z roztoku po homogenizaci zachycen imunoafinitním mechanismem („sandwich“ uspořádání metody)

a jeho koncentrace určena většinou pomocí barevné reakce (růst/úbytek absorbance záření, nutnost vytvoření kalibrační závislosti) (Wang *et al.*, (2009); Zhu *et al.*, (2016); Dixit *et al.*, (2011)).

Další, poměrně moderní metodou je detekce pomocí metody PCR, která je schopná velmi přesně a spolehlivě určit rod a druh bakterií pomocí izolace jejich DNA. Tato metoda však není vhodná pro kvantifikaci bakterií, slouží tak primárně k určení původce kontaminace (Liang *et al.*, 2022).

Zvláštní vlastností bakterie *Bacillus cereus* je skutečnost, že ji nelze určit jako izolovaný druh. Existuje totiž velké množství druhů, které mají natolik podobné vlastnosti, že pomocí běžných laboratorních konfirmačních testů nemohou být odlišeny. Stanovují se proto souhrnně jako presumptivní *Bacillus cereus*. Tyto druhy (*B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* a *B. weihenstephaniensis*) jsou si velmi blízce příbuzné, ale méně často se vyskytují (Carroll *et al.*, (2022); Liang *et al.*, (2022)).

1.4. Esenciální oleje

Esenciální či éterické oleje jsou koncentrované olejovité kapaliny obsahující velké množství různých těkavých sloučenin rostlinného původu. Všechny složky mají většinou původ v jediné rostlině, proto se oleje často nazývají podle rostliny, ze které byly získány (levandulový, eukalyptový, pomerančový atd.). Esenciální oleje jsou hydrofobní a nemísitelné s vodou. Pro jejich ředění se většinou používají organická rozpouštědla jako ethanol (Linskens a Jackson, (2012); Vora *et al.*, (2024)).

Název esenciální je odvozen od slova esence. Znamená, že olej obsahuje esenci (vůni či aroma) určité rostliny. Nejedná se o stejný význam jako u esenciálních mastných kyselin či aminokyselin (zde esenciální = nepostradatelné).

1.4.1. Benefity a rizika spojené s užitím olejů

Oleje jsou často dobrým zdrojem antioxidantů (Vora *et al.*, (2024); Suriyaprom *et al.*, (2022)), jejich užívání napomáhá v boji proti oxidačnímu stresu a v odbourávání volných kyslíkových radikálů, vznikajících v lidském těle při látkové výměně a okysličování krve. Některé oleje jsou používány ke zmírnění příznaků nemocí (např. lokální anestetické účinky ke zmírnění kašle, aplikace některých olejů na pokožku pro podporu léčby akné) (Linskens a Jackson, 2012).

Použití esenciálních olejů s sebou však nese i rizika, jednotlivé druhy mohou totiž mít velmi rozdílné složení a účinky na organismus. Přímý kontakt s kůží či s oční sliznicí může způsobit vážné podráždění (Vigan, 2010). Mezi potenciálně nejnebezpečnější oleje se řadí eukalyptový, čajovníkový (Tea Tree oil) a levandulový, s nimiž jsou evidovány případy vážného podráždění pokožky, otrav, a dokonce potenciální neurotoxicity u dětí, kojenců a těhotných žen při přílišné expozici (jako divoce rostoucích rostlin či při aromaterapii). (Wojtunik-Kulesza, 2022; Belghiti *et al.*, (2023)). Dalším studovaným rizikem je estrogenita a antiandrogenita čajovníkového a levandulového oleje. Konzumace těchto olejů může prokazatelně vést ke gynekomastii (nezhoubný růst mléčných žláz u jedinců mužského pohlaví) (Diaz *et al.*, (2016); Henley *et al.*, (2007)). Je proto doporučováno, aby oleje byly vždy využívány opatrně a pouze pro vhodné účely. Často také oleje bývají ředěny organickými rozpouštědly či jinými oleji, aby jejich účinky byly zmírněny a byla zvýšena bezpečnost jejich použití.

1.4.2. Získávání esenciálních olejů

Nejběžnější metodou získávání esenciálních olejů je destilace s vodní parou (Aziz Zarith *et al.*, (2018); Hanif *et al.*, (2019)). Tento druh destilace využívá vysoké těkavosti aromatických sloučenin v rostlině, které destilací přechází z destilační směsi a jsou jímány jako esenciální olej. Rostlina či její části jsou naporcovány na menší kousky, které jsou vloženy do destilační baňky. K rostlinnému materiálu je přilita destilovaná voda, je připojena destilační aparatura a směs přivedena k varu. Vznikající vodní pára prochází rostlinným materiálem, kde způsobuje odpařování těkavých složek a ty nese s sebou do chladiče. Tam jsou po ochlazení těkavé sloučeniny opět zkapalněny a jímány. Oproti běžné destilaci jsou získané produkty vysoké čistoty (Masango, 2005). Rekondenzovaná voda použitá v procesu destilace bývá někdy také jímána a prodávána jako samostatný produkt, neboť si zachovává slabé aromatické vlastnosti (např. růžová voda) (Chakravarty *et al.*, 2023).

Další používanou metodou je extrakce organickým rozpouštědlem (Chakravarty *et al.*, 2023). Některé rostliny obsahují sloučeniny málo tepelně odolné, které by při destilaci denaturovaly. Teplotně šetrnější metoda je tedy použití např. hexanu či nadkritického CO₂ pro extrakci (Yousefi *et al.*, 2019). Takový extrakt však obsahuje kromě aromatických látek i velké množství nearomatických a netěkavých organických sloučenin. Ty působí jako nečistoty a často je třeba takové extrakty několikanásobně přečistit (Yousefi *et al.*, 2019).

Méně používanou metodou, která je však velmi vhodná pro určité rostliny, je extrakce lisováním za studena (Mahato *et al.*, 2019). Taková metoda není vhodná pro většinu rostlin, jelikož neobsahují dostatek těkavých látek na to, aby mohly být z rostlinného materiálu vylisovány (Schmidt, 2020). U rostlin, které obsahují takových látek velké množství (hlavně citrusy), je však tato metoda relativně rychlou a levnou alternativou. V důsledku toho jsou také citrusové oleje často podstatně levnější než jiné esenciální oleje (Mahato *et al.*, 2019).

1.4.3. Využití esenciálních olejů

Esenciální oleje jsou nejčastěji používány v aromaterapii (Ali *et al.*, 2015). Aromaterapie je jednou z metod alternativní medicíny, která využívá pro léčbu vonných látek obsažených v olejích. Pár kapek esenciálního oleje je zahříváno nad zdrojem tepla (často např. svíčka) nebo pomocí difuze napuštěno do dřevěných tyčinek, následně dochází k vypařování těkavých látek z oleje do ovzduší. Vdechování těchto vonných látek zároveň s některou formou meditace je využíváno k navození relaxačních a uklidňujících stavů (Lee *et al.*, 2017). Bohužel tento způsob léčby není prokazatelně schopen zbavit se nemoci (Lee *et al.*, (2017); Vora *et al.*, (2024)). Může však sloužit k vylepšení psychického stavu jedince, což může mít pozitivní dopad na průběh léčby (Lee *et al.*, (2017); Ali *et al.*, (2015); Vora *et al.*, (2024)).

Další využití esenciálních olejů vychází z jejich přirozených pesticidních účinků. Některé oleje obsahují látky, které negativně působí na hmyz a některé členovce. Tyto negativní účinky mohou zahrnovat jednoduché odpuzování, inhibici jejich růstu a vývoje, poškození jejich schopnosti reprodukce až smrt organismu (Debboun *et al.*, 2014). Velkou výhodou je, že tyto látky obsažené v olejích neúčinkují na savce (Nerio *et al.*, 2010). Oleje proto mají velký potenciál v tzv. „green“ pesticidech. Ty se vyznačují používáním zpravidla přírodních látek a nulovým negativním účinkem vůči jiným zvířatům či přírodě (Koul *et al.*, (2008); Ayari *et al.*, (2020)). Ačkoliv pesticidy na bázi esenciálních olejů nejsou dokonalou náhradou těch syntetických, jejich užívání je čím dál rozšířenější pro jejich výhody, mezi které patří např. bezproblémová aplikace v obydlených oblastech či drasticky méně škodlivá rezidua v půdě a vodě (Menary, 2008). S rostoucí velkoobjemovou výrobou esenciálních olejů je také nutno vzít v úvahu potenciální lepší cenovou dostupnost. Mezi oleji testovanými na pesticidní účinky byly např. eukalyptový, mentholový, tymiánový, levandulový či bazalkový (Koul *et al.*, (2008); Kang *et al.*, (2018); Ayari *et al.*, (2020)).

Za zmínku stojí také využívání esenciálních olejů a látek přítomných v nich v potravinářství, přesněji jako potravinových konzervantů. Pro tyto účely jsou esenciální oleje využívány po celou historii civilizace. Přidávání různých kořenících směsí, jako např. skořice, nové koření, bergamot, kardamom, zázvor, kmín, fenykl atd. spolu s různými citrusovými oleji (citron, pomeranč, grapefruit aj.) bylo odjakživa žádoucí pro zlepšení organoleptických vlastností potravy. Zároveň tím byly potraviny (často nevědomky) lépe uchovávány. Navzdory této historii byly však esenciální oleje americkou FDA schváleny jako přísada do potravin až ve 20. století (Preedy, 2015).

Použití esenciálních olejů, které je zkoumáno v této práci, spočívá v jejich přidávání do potravin za účelem zlepšení jejich mikrobiální kvality a ochranou proti mikrobiální kontaminaci. Tím je zároveň vylepšena trvanlivost potravin a sníženo riziko enterotoxikózy. Pro tyto účely bylo testováno mnoho olejů a jejich antimikrobiální účinky byly potvrzeny (Rao *et al.*, 2019). Praktických aplikací však nevidíme mnoho, jelikož matrice skutečné potraviny se může výrazně lišit od živné půdy. Pro dosažení stejných účinků v reálné potravine tak může být vyžadováno mnohem větší množství oleje, což může negativně ovlivnit její chuťové a aromatické vlastnosti (Calo *et al.*, 2015).

1.4.4. Esenciální olej z rýmovníku

V této práci je použit rýmovníkový olej neboli esenciální olej získávaný z rostliny *Plectranthus amboinicus*, česky Rýmovník citronový. Jedná se o aromatickou rostlinu z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*). Rýmovník je u nás často pěstován jako pokojová rostlina, nenáročná na výživu. Nevyrůstá do velkých výšek, celá rostlina je pokryta světlými chloupky. Charakteristická je svými masivními listy a typickým aromatem (Arumugam *et al.*, (2016); Akuegbe *et al.*, (2021)). To je nejvíce zřetelné po odtrhnutí listu a rozemnutí mezi prsty. Pochází z tropických oblastí Afriky. Listy jsou jedlé, jejich chuť připomíná směs oregana a máty (Bhave a Dasgupta, 2018). Kromě gastronomického využití se rostlina v tradiční medicíně často používá při kožních (zklidňuje pokožku) a dýchacích obtížích, nejčastěji přímá inhalace těkavých látek z rozlomeného lístku nebo příprava čajového nálevu. Funguje též jako účinné diuretikum pro detoxikaci organismu (Lukhoba *et al.*, 2006).

Esenciální olej, získaný z čerstvých částí rostliny, obsahuje bohatou směs nejméně 26 látek. Mezi nejvýznamnější látky tvořící až 99 % oleje patří Carvacrol, Thymol, p-Cymene, Undecanal, α -Humulene, γ -Terpinene, β -Caryophyllene a další (Senthilkumar a Venkatesalu, (2010); Akuegbe *et al.*, (2021); Arumugam *et al.*, (2016)). Tato směs látek má kromě

protizánětlivých či antioxidačních účinků (Bhave a Dasgupta, 2018) také antimikrobiální účinky, zejména pak Carvacrol a Thymol (Rúa *et al.*, (2019); Sivaranjani *et al.*, (2019); Aguiar *et al.*, (2015)), které představují hlavní složky rýmovníkového oleje. Olej se prodává jako 100% čistý, doporučená dávka pro pozitivní účinek je tak většinou pouze několik kapek.

1.5. Chemická a nutriční kompozice raw stravy

Jelikož raw strava a raw způsob výživy zahrnují pouze určité skupiny potravin, je důležité sledovat nutriční aspekty konzumované stravy. Převážně rostlinná strava je velmi chudá na vitamíny B12 a D, nenasycené mastné kyseliny, bílkoviny a různé esenciální aminokyseliny či důležité stopové prvky jako jód a selen. Tyto látky pochází většinou z potravin živočišného původu. Lidem provozujícím veganský a raw způsob výživy je tak často doporučováno tyto nezbytné látky doplňovat prostřednictvím supplementů. To je obzvláště důležité u dětí a těhotných žen, které potřebují velmi pestrou a vyváženou stravu pro správný vývoj. Dalším z rizikových faktorů raw stravy je také zvýšený příjem různých látek (např. kyselina šťavelová) způsobujících snížení využitelnosti železa a vápníku (Raba *et al.*, (2019); Craig, (2009); Piskin *et al.*, (2022); Górska-Warsewicz *et al.*, (2018)).

Naopak výhodou této stravy je vysoký příjem sacharidů, vlákniny, vitamínů A, C, antioxidantů či karotenoidů. Další zdravotní benefity jsou způsobeny snížením příjmu nasycených mastných kyselin či cholesterolu. Celkový kalorický příjem je rovněž nižší. Uživatelé raw stravy tak mají snížené riziko výskytu kardiovaskulárních onemocnění a obezity (Raba *et al.*, (2019); Craig, (2009); Koebnick *et al.*, (2005)). Často je také uváděno snížené riziko rakovinotvorných onemocnění, to však nebylo uspokojivě prokázáno (Craig, 2009).

1.6. Aktivita voda

Aktivita vody (a_w ; hodnoty mezi 0 - 1) je fyzikálně-chemický pojem, který označuje veškerou volnou vodu v potravíně. Je vyjádřena jako poměr parciálního tlaku vodních par ve vzorku ku tlaku vodních par čisté vody (Troller, 2012). Volná (nevázaná) voda je dostupná pro mikroorganismy, které ji následně mohou využívat. Klesá s rostoucím osmotickým tlakem. Potraviny s příliš nízkou aktivitou vody představují nevhodné prostředí pro přežití mikroorganismů (pro bakterie jsou ideální hodnoty mezi 0,9 až 1) (Stevenson *et al.*, 2015). Aktivita vody rovněž slouží jako ukazatel rychlosti enzymatických a hydrolytických reakcí

probíhajících v potravíně (rychlost kažení). Sušené potraviny s nízkou aktivitou vody jsou tak mnohem trvanlivější než potraviny čerstvé s vysokou aktivitou (Troller, 2012).

Aktivitu je možné stanovit např. pomocí měření teploty rosného bodu (Subbiah *et al.*, 2020). Ten souvisí s obsahem volné vody ve vzorku. Analyzovaný vzorek je uzavřen do měřicí komory, kde je vytvořena rovnováha obsahu vodní páry. Následně je hledána taková teplota, při které je vzduch plně nasycen vodní parou, ale zároveň nedochází ke kondenzaci. Z této teploty je možné zpětně určit obsah volné vody ve vzorku a tím jeho vodní aktivitu. Pro tato stanovení jsou vyráběny komerčně dostupné analyzátoři, které jsou schopné provést analýzu rosného bodu v řádu několika minut. Dalším způsobem stanovení aktivity vody je přímé měření tlaku vodních par ve vzorku (Subbiah *et al.*, 2020).

1.7. Obsah sušiny

Obsah sušiny v analyzovaném vzorku představuje procentuální zastoupení pevných složek v celkové hmotě. Lze ho definovat i naopak, jako obsah vody v celkové hmotnosti vzorku. Jeho hodnota je získána pomocí stanovení obsahu vody. Nejpoužívanější metody stanovení obsahu vody jsou např. chemické titrační stanovení podle Karl Fischera nebo gravimetrické stanovení pomocí měření úbytku hmotnosti při sušení (Kowalska *et al.* (2018); Nielsen, 2010)). Karl Fischerova titrace je založena na jodometrické titraci rozpuštěného vzorku Karl Fischerovým roztokem obsahujícím jód. Ten oxiduje přítomný oxid siřičitý, avšak pouze v přítomnosti a za spotřeby vody. Titrace probíhá do prvního přebytku jódu (Rivera-Quintero *et al.*, 2024).

Gravimetrické stanovení je principově i přístrojově jednodušší a méně finančně náročné. Vzorek o známé hmotnosti je umístěn do sušícího prostředí a sušen, obvykle do konstantní hmotnosti (3 po sobě následující vážení neodhalí změnu hmotnosti). Následně je vzorek zvážen a jednoduchým výpočtem určen obsah sušiny v něm (poměr hmotnosti po a před sušením). Tento proces je automatizován pomocí moderních analyzátorů vlhkosti (Zambrano *et al.* (2019); Kowalska *et al.* (2018)). Nevýhodou tohoto způsobu stanovení je časová náročnost. Pro dostatečnou přesnost trvá sušení běžně alespoň několik hodin. Oproti tomu titrační stanovení je možné provést automaticky a během několika minut (Rivera-Quintero *et al.*, 2024).

1.8. Celkový obsah polyfenolických látek

Polyfenolické látky jsou chemické sloučeniny obsahující jednu či více hydroxylových skupin na aromatickém jádře. Jedná se o poměrně širokou a různorodou skupinu sloučenin, od fenolových kyselin (např. kyselina hydroxybenzoová, gallová) a flavonoidů (katechin, anthokyany) až po lignany. Všechny tyto polyfenoly nacházíme bohatě zastoupeny v různých částech rostlin (semínka, květy, plody). Polyfenolické látky se vyznačují antioxidačními vlastnostmi, čímž jsou pro člověka zdraví prospěšné (Bärlocher a Graça, 2020).

Stanovení obsahu polyfenolických látek je možné provést několika metodami. Tyto metody jsou většinou spektrofotometrické, založené na kvantitativním stanovení pomocí připravené kalibrační závislosti. Je měřen nárůst nebo úbytek absorbance testovaných roztoků. Použití těchto metod předchází extrakce polyfenolických látek ze vzorku do organického rozpouštědla a filtrace. Protože různé polyfenolické látky mají různě silné vlastnosti a účinky, jsou stanovovány dohromady jako celková směs a výsledný obsah všech polyfenolických látek je pro standardizaci výsledků přepočítán na ekvivalentní obsah kyseliny gallové. Ta zároveň slouží jako standard pro přípravu kalibračních závislostí (Faller a Fialho (2021); Pavun *et al.* (2018)).

1.8.1. Metoda dle Folin-Ciocalteu

Metoda využívá pro stanovení barevnou reakci polyfenolického extraktu s činidlem dle Folin-Ciocalteua. Toto žlutě zbarvené činidlo je směsí fosfomolybdenanu a fosfowolframanu. Tyto sloučeniny podléhají redukci, čímž dojde ke změně zbarvení roztoku ze žluté na modrou barvu. U analyzovaných roztoků je měřena jejich absorbance při vlnové délce 765 nm. Hodnota absorbance je přímo úměrná obsahu polyfenolických látek ve vzorku. Protože Folin-Ciocalteuovo činidlo je redukováno nejen polyfenolickými látkami, ale i dalšími redukujícími látkami (např. redukujícími cukry) (Everette *et al.*, 2010). Proto je kalibrační závislost pro tuto metodu vytvořena pomocí standardu – kyseliny gallové a výsledky získané analýzou vzorků přepočítány na ekvivalent kyseliny gallové (Pavun *et al.* (2018); Faller a Fialho (2021))

1.8.2. Metoda HPLC

Nejrozšířenější a nejvhodnější metodou stanovení polyfenolických látek v současnosti je použití HPLC na reverzních fázích. Extrakt ze vzorku je dávkován přímo do HPLC systému.

Použitím HPLC je možné nejen stanovit jednotlivé polyfenolické látky, ale zároveň je možné tyto látky separovat. Není tak třeba přepočítávat výsledky a je získána detailnější informace o obsahu polyfenolů. Je možné použít několik různých detektorů, např. MS či UV-VIS (absorbce UV záření aromatických jader), u některých látek i fluorimetrický či detektor diodového pole (Giusti *et al.*, 2018). Hmotnostní analyzátor je klíčový k identifikaci jednotlivých sloučenin. Metoda HPLC nachází velké využití v analýze raw stravy a mnoha dalších potravin, kdy je velmi výhodná separace látek a jednoduchá příprava vzorků k analýze. Vzorky tekutých potravin (vína, ovocné šťávy) je možné po naředění dávkovat přímo, pevné vzorky (ovoce, tyčinky aj.) stačí podrobit jednoduché extrakci do organického rozpouštědla. Kromě celkového obsahu polyfenolických látek nás zde často zajímá i konkrétní látkové složení a poměr těchto látek (Šeruga *et al.* (2011); Faller a Fialho (2021); Amidžić Klarić *et al.* (2022); Giusti *et al.* (2018); Rababah *et al.* (2011)).

1.9. Antioxidační kapacita

Antioxidační kapacita vyjadřuje schopnost antioxidačních látek, přítomných ve vzorku, zhaset volné radikály vznikající v organismu. Tyto radikály vznikají primárně jako vedlejší produkt látkových výměn a jsou způsobeny hlavně kyslíkem (Phaniendra *et al.*, (2015); Halliwell a Gutteridge, (2015)). Volné radikály v těle velmi rychle reagují s dalšími látkami a přeměňují je rovněž na radikály. To je nebezpečné zejména kvůli reakci s makromolekulami (sacharidy, proteiny, nukleové kyseliny), jejichž přeměna narušuje rovnováhu organismu. Volné radikály vznikají v těle přirozeně, jsou však přirozeně zhaseny přirozeně se tvořícími enzymy a antioxidanty (glutathion peroxidáza, superoxid dismutáza, kataláza) (Krishnamurthy a Wadhvani, 2012). Problematické jsou zejména radikály vznikající jako reakce na vnější podněty, protože na ty tělo nereaguje tvorbou antioxidantů. Negativní podněty způsobující vznik radikálů jsou např. cigaretový kouř, alkohol, pesticidy, přízemní ozón (Halliwell a Gutteridge, (2015); Phaniendra *et al.*, (2015)). Mezi nejznámější antioxidanty přijímané v potravě řadíme vitamíny A, C, E a různá přírodní barviva fenolické povahy, např. flavonoidy (Wolf, 2005).

Metody stanovení antioxidační kapacity jsou rovněž založené hlavně na spektrofotometrii. Z použitého standardu je připravena kalibrační řada a z ní vytvořena kalibrační závislost. Ze vzorku jsou antioxidanty získány extrakcí do organického rozpouštědla a následnou filtrací. Antioxidační kapacita je pro standardizaci výsledků také přepočítána na ekvivalentní kapacitu standardní látky Trolox. Pro potřeby této práce však stačí použít zjednodušené

vyjádření kapacity, kde je zapotřebí pouze porovnat extrakty vzorků co do jejich % inhibice volných radikálů. V tom případě není zapotřebí kalibrační řada (Munteanu a Apetrei, 2021).

1.9.1. Metoda DPPH

Tato metoda stanovení antioxidační kapacity je založena na reakci s čerstvě připraveným methanolickým roztokem radikálu DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl). Roztok DPPH má v radikálové formě tmavě fialové zbarvení a je stabilní. V případě přítomnosti látek s antioxidačními účinky v extraktu začnou tyto látky volný radikál DPPH zhaset, čímž dochází k úbytku absorbance reakční směsi při 517 nm. Při použití této metody je standardním postupem příprava kalibrační závislosti pomocí standardní látky Trolox (syntetický a ve vodě rozpustný ekvivalent vitamínu E) (Lúcio *et al.*, (2009); Munteanu a Apetrei, (2021)). Následně jsou analýzou získané výsledky přepočítány na ekvivalentní antioxidační kapacitu látky Trolox. Pro zjednodušení je rovněž možné vynechat kalibrační závislost a pouze porovnat vzorky proti slepému vzorku pomocí % úbytku absorbance roztoků (Zhong a Shadidi (2015); Moharram a Youssef (2014)).

1.9.2. Metoda ABTS

Principem této metody je reakce extraktu s kation-radikálem ABTS⁺ (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). Ten je vytvářen přímo v roztoku oxidací ABTS. Pro jeho oxidaci je běžně používán peroxid vodíku v kombinaci s peroxidázou. Další možností oxidace je např. pomocí peroxodisíranu draselného. Antioxidanty v extraktu po přidání do roztoku zhasí přítomný radikál, čímž dochází k úbytku absorbance reakční směsi. Ta je měřena při vlnové délce 734 nm. U této metody je standardním postupem použití látky Trolox na kalibrační závislost a následné vyjádření výsledků (Zhong a Shadidi (2015); Moharram a Youssef (2014)).

1.10. Spektrofotometrie ve viditelné oblasti

Při stanovení celkového obsahu polyfenolických látek a antioxidační kapacity u vzorků raw tyčinek bylo využíváno principu spektrofotometrie ve viditelné oblasti. Spektrofotometrie je analytická metoda používaná k měření vlastností vzorků spojených s absorpcí světelného záření různých vlnových délek. Jedná-li se konkrétně o viditelnou oblast, pak jsou proměřovány vlnové délky v rozsahu 390 – 760 nm. Mezi nejčastější využití spektrofotometrie patří zkoumání absorpčního spektra látky či roztoku, kdy je proměřována absorpce záření všech vlnových délek, určování absorpčních maxim látek, určování

isosbestických bodů indikátorových roztoků, ale zejména kvantitativní stanovení obsahu určité látky v roztoku (Yoon (2016); Morris (2015)).

Spektrofotometrie je metodou referenční, absorpce záření analyzovaného vzorku je srovnávána s absorpcí tzv. slepého vzorku, který má identické složení, neobsahuje však stanovovanou látku. Tímto postupem je zkoumán případný vliv matrice roztoku na míru absorpce záření. Tento požadavek je vyřešen jinak u různých typů konstrukcí spektrofotometrů.

1.10.1. Typy spektrofotometrů

Nejjednodušším typem konstrukce je jednopaprskový spektrofotometr. Záření vycházející ze zdroje prochází pouze jednou optickou rovinou. Absorbanci slepého vzorku je tak nutné změřit zvlášť a její hodnotou upravit všechny dále měřené vzorky. Toto řešení je zdaleka nejlevnější.

Výhodnějším stylem konstrukce je spektrofotometr dvoupaprskový. Záření je pomocí systému zrcadel děleno na 2 rovnoběžné paprsky. Je tak možné zároveň měřit absorbanci slepého vzorku i analyzovaného vzorku zároveň. Software přístroje často také umožňuje měřené hodnoty automaticky upravovat o hodnoty slepého vzorku

Dalším typem stojícím za zmínku jsou spektrofotometry s diodovým polem. Ty jsou konstruovány tak, že na rozdíl od předchozích modelů neměří absorbanci při jednotlivých vlnových délkách postupně, ale jsou schopny proměřit celý rozsah vlnových délek najednou. Tím dojde k významnému zkrácení doby analýzy, což se nejvíc projevuje u zkoumání absorpčních spekter. Diodové spektrofotometry jsou však výrazně dražší (Räty *et al.*, 2004).

1.10.2. Využití spektrofotometrie pro stanovení kvantity

Toto využití je možné na základě platnosti tzv. Lambert-Beerova zákona. Ten říká, že absorpce světelného záření roztoku je přímo úměrná koncentraci látky v roztoku, která tuto absorpci způsobuje. Lambert-Beerův zákon lze také vyjádřit pomocí vztahu:

$$ABS = \varepsilon * l * c \quad (1)$$

kde ABS je absorbance roztoku, ε je molární absorpční koeficient (specifický pro každou látku), l je délka optického prostředí a c je koncentrace dané látky v roztoku (Hardesty a Attili, 2010).

Pomocí této znalosti dokážeme určit neznámou koncentraci látky v roztoku měřením jeho absorbance a následným porovnáním hodnot s absorbancí roztoku obsahujícím známé množství stanovované látky. Pro tyto účely využíváme principu kalibrační závislosti. Je zapotřebí standardní roztok obsahující přesně dané množství látky. Z takového roztoku je připravena kalibrační řada různě zředěných roztoků. U těchto roztoků je proměřena jejich absorbance při konkrétní vlnové délce (ideálně při absorpčním maximu látky). Z naměřených hodnot je sestavena lineární závislost absorbance na koncentraci látky v roztoku a nalezena její rovnice (rovnice přímky). Následně je proměřena absorbance roztoku s neznámou koncentrací při stejné vlnové délce a koncentrace látky je stanovena výpočtem z jeho absorbance pomocí rovnice závislosti (Burgess, 2007).

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Pomůcky pro mikrobiologickou část

Homogenizační sáčky

Homogenizační sáčky s membránou

Kahan

Kovové a plastové pomůcky

Krycí sklička

Laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce)

Latexové rukavice

L-hokejky (plastové)

Mikropipety automatické Discovery Comfort (BiotTech, Česká republika)

Mikropipety automatické Finnpipete (Thermo Scientific, USA)

Mikrotitrační destičky

Očkovací jehla

Očkovací kličky

Petriho misky (skleněné, plastové)

Pipety jednorázové plastové 1 ml, 10 ml

Podložní skla

Pomůcky k navažování

Silikonová podložka

Stojan na zkumavky

Špičky plastové

Třecí miska s tloučkem

Zkumavky + víčka

2.2. Přístroje pro mikrobiologickou část

Anaerostat Oxoid AnaeroJar 2,5 l (UK)

Analytické váhy KERN 442-43 (Německo)

Autokláv PS 20A, BMT Medical Technology s.r.o. (Česká republika)

Autokláv Sterilab, BMT Medical Technology s.r.o. (Česká republika)

Čidlo na sledování teploty a vlhkosti LOG32, TFA Dostmann (Německo)

Dekontaminační autokláv SYSTEC VX40, BioTech (Česká republika)

Denzitometr McFarland DEN-1, BIOSAN (Lotyšsko)
Homogenizátor Masticator IUL Basic (Španělsko)
Horkovzdušný sterilizátor STERIMAT 51042, BMT Medical Technology s.r.o. (Česká republika)
Chladnička Liebherr (Německo)
Laboratorní mikroskop BX 41, OLYMPUS (Japonsko)
Mixér Eta TWIXER ETA601190000 (Česká republika)
Mraznička Whirloop (USA)
Termostat LOVIBOND, Thermo Scientific (USA)
Termostat ST1/B/40 Basic, POL-EKO-APARATURA (Polsko)
Vodní lázeň CERTOMAT WR, B. BRAUN (Německo)
Vortex Bio Vortex V1, BIOSAN (Lotyšsko)

2.3. Kultivační média a jejich příprava

B-P: Bair Parker Agar Base (HiMedia, Indie)

Složení:	gramů/litr
enzymatický hydrolyzát kaseinu	10,00
hovězí extrakt	5,00
kvasničný extrakt	1,00
glycin	12,00
pyrohroznán sodný	10,00
chlorid lithný	5,00
agar	20,00
Konečné pH (při 25 °C)	6,8±0,2

Příprava:

Navážit 63,00 g přípravku do 950 ml destilované vody. Sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Ochladit na teplotu 45-50 °C a asepticky přidat 50 ml žloutkové emulze s teluricitanem draselným (Egg Yolk Tellurite Emulsion, FD 046, HiMedia, Indie).

DG 18: Dichloran Glycerol Medium Base (HiMedia, Indie)

Složení:	gramů/litr
masový pepton	5,00
glukóza	10,00
dihydrogenfosforečnan draselný	1,00
síran hořečnatý	0,50
chloramfenikol	0,10
dichloran	0,002
agar	15,00

Konečné pH (při 25 °C) 5,6±0,2

Příprava:

Navážit 15,80 g přípravku do 500 ml destilované vody. Asepticky přidat 110 g glycerolu (Sigma-Aldrich, USA). Sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

DRBC: Dichloran Medium Base with Rose Bengal (Oxoid, UK)

Složení:	gramů/litr
masový pepton	5,00
D-glukóza	10,00
dihydrogenfosforečnan draselný	1,00
síran hořečnatý	0,50
bengálská červeň	0,025
dichloran	0,002
agar	15,00

Konečné pH (při 25 °C) 5,6±0,2

Příprava:

Navážit 15,75 g přípravku do 500 ml destilované vody. Sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po ochlazení na 50 °C asepticky přidat rozpuštěný obsah lahvičky Chloramphenicol Selective Supplement (FD 033, HiMedia, Indie).

Fyziologický roztok

Složení:	gramů/litr
chlorid sodný (Merck, Německo)	8,50

Příprava:

Navážít 8,50 g NaCl do 1000 ml destilované vody, sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Fyziologický roztok s peptonem

Složení:	gramů/litr
chlorid sodný (Merck, Německo)	8,50
pepton (HiMedia, Indie)	1,00

Příprava:

Navážít 8,50 g NaCl a 1,00 g peptonu do 1000 ml destilované vody. Sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

GTK: Tryptone Glucose Extract Agar (HiMedia, Indie)

Složení:	gramů/litr
kaseinový hydrolyzát	5,00
kvasničný extrakt	2,50
glukóza	1,00
agar	15,00

Konečné pH (při 25 °C) 7,0±0,2

Příprava:

Navážít 23,50 g směsi do 1000 ml destilované vody, sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

KA: Blood Agar Base No. 2 (HiMedia, Indie)

Složení:	gramů/litr
proteosový pepton	15,00
játrový extrakt	2,50
kvasničný extrakt	5,00
chlorid sodný	5,00
agar	15,00

Konečné pH (při 25 °C) 7,4±0,2

Příprava:

Navážit 21,25 g směsi do 500 ml destilované vody. Sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Ochladit na 40-50 °C a asepticky přidat 7 % sterilní defibrilované krve.

M-H: Mueller Hinton Agar (HiMedia, Indie)

Složení:	gramů/litr
hovězí masová infuze	9,00
kaseinový hydrolyzát	17,50
škrob	1,50
agar	17,00

Konečné pH (při 25 °C) 7,3±0,1

Příprava:

Navážit 45,00 g směsi do 1000 ml destilované vody. Sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

MYP: Modified MYP Agar Base (HiMedia, Indie)

Složení:	gramů/litr
pepton	10,00
masový extrakt	1,00
D-mannitol	10,00
chlorid sodný	10,00
fenolová červeň	0,025
agar	15,00

Konečné pH (při 25 °C) 7,2±0,2

Příprava:

Navážit 23,00 g směsi do 450 ml destilované vody, sterilizovat v autoklávu při 121 °C 15 minut. Ochladit na 55 °C a sterilně přidat lahvičku Polymyxin B Sulphate (FD 003, HiMedia, Indie) a 50 ml žloutkové emulze (Egg Yolk Emulsion, FD 045, HiMedia, Indie).

Peptonová voda

Složení:	gramů/litr
chlorid sodný (Merck, Německo)	5,00
pepton (HiMedia, Indie)	10,00

Příprava:

Navážit 5,00 g NaCl a 10,00 g peptonu do 1000 ml destilované vody. Sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

TSC: Tryptose Soy Citrate Agar (MiMedia, Indie)

Složení:	gramů/litr
tryptosa	15,00
sojový pepton	5,00
kvasničný extrakt	5,00
pyrosiřičitan sodný	1,00
citran železito-amonný	1,00
agar	15,00

Konečné pH (při 25 °C) 7,6±0,2

Příprava:

Navážit 21,00 g směsi do 500 ml destilované vody, sterilizovat v autoklávu při 121 °C 15 minut. Ochladit na 50 °C a sterilně přidat lahvičku T.S.C. Supplement (FD 014, HiMedia, Indie).

VČŽL: Violet Red Bile Agar (HiMedia, Indie)

Složení:	gramů/litr
masový pepton	7,00
kvasničný extrakt	3,00
žlučové soli, směs	1,50
laktosa	10,00
chlorid sodný	5,00
neutrální červeně	0,03
krystalová violet	0,002
agar	15,00

Konečné pH (při 25 °C) 7,4±0,2

Příprava:

Navážit 41,53 g směsi do 1000 ml destilované vody. Neautoklávovat. Sterilizovat ve vodní lázni (99 °C, 30 minut).

VČŽG: Violet Red Bile Glucose Agar (HiMedia, Indie)

Složení:	gramů/litr
masový pepton	7,00
kvasničný extrakt	3,00
žlučové soli, směs	1,50
laktosa	10,00
chlorid sodný	5,00
neutrální červeně	0,03
krystalová violet'	0,002
agar	12,00

Konečné pH (při 25 °C) 7,4±0,2

Příprava:

Navážit 38,50 g směsi do 1000 ml destilované vody. Neautoklávovat. Sterilizovat ve vodní lázni (99 °C, 30 minut).

2.4. Chemikálie a roztoky pro mikrobiologickou část

Anaerogen Oxoid (UK)

ethanol, >98 % (PENTA Chemicals, ČR)

glycerol, >98 % (Sigma-Aldrich, USA)

imersní olej pro mikroskopování

krystalová violet', Lugolův roztok, karbolfuchsin

parafínový olej

peroxid vodíku 3%

2.5. Komerčně dodávané soupravy a testy

BCET-RPLA kit na detekci enterotoxinu produkovaného *Bacillus cereus* (Oxoid, UK)

2.6. Použité suroviny

Suroviny použité na výrobu raw tyčinek byly v bio kvalitě od společností Kaufland, Lidl a od soukromých výrobců. Následující tabulka (tab. 1) uvádí informace o produktech, jako jsou šarže, datum minimální trvanlivosti, hmotnost, země původu a výrobce.

Tabulka 1 - přehled surovin použitých na výrobu raw tyčinek

Surovina	Výrobce	Země původu	Šarže	Hmotnost	Min. trvanlivost
Datle sušené	MB industry s.r.o.	Írán	230517/101	3 x 200 g	30. 04. 2024
Meruňky sušené	California Direct	Turecko	L4525	2 x 200 g	09. 08. 2024
Ovesné vločky	Crownfield	Německo	V2311874	500 g	23. 08. 2024
Mandle pražené	K-Classic	Německo	L2321066	2 x 200 g	02. 05. 2024
Med květový	Andrea Seidlová	Česká republika	---	950 g	---
Skořice mletá	Pěkný- Unimex s.r.o.	Česká republika	L1380452	25 g	09. 2025

2.7. Pravidla mikrobiologické analýzy

Všechna mikrobiologická stanovení byla provedena vždy v dubletu. Při stanovení byly dodržovány zásady aseptické práce jako je sterilizace materiálů a pomůcek, dezinfekce prostředí a likvidace kontaminovaného odpadu.

2.8. Mikrobiologický rozbor surovin

Byl proveden rozbor zakoupených surovin na výrobu tyčinek. Z každé suroviny byl odebrán reprezentativní vzorek. Ten byl, spolu s příslušným ředícím roztokem, umístěn do peristaltického homogenizátoru či do Erlenmeyerovy baňky se skleněnými perlami (mandle). Homogenát byl následně naředěn desítkovým ředěním (1 ml homogenátu + 9 ml ředícího roztoku) a použit pro rozbor suroviny. Všechny suroviny byly testovány na několik skupin mikroorganismů pomocí vhodných pomnožovacích či selektivních půd v souladu s příslušnými ČSN normami. Jelikož naším cílem bylo (až na výjimky) získat pouze kvalitativní údaj o potenciální kontaminaci a u žádné ze surovin jsme nepředpokládali vysokou kontaminaci, byly pro tyto rozborů použity pouze první dvě ředění.

Následující tabulka (tab. 2) obsahuje seznam použitých surovin, jejich odebíraných množství pro rozbor, ředících roztoků použitých při jejich rozboru a objemů použitých ředících roztoků. Všechny suroviny byly před odběrem řádně promíchány pro snadné odebrání reprezentativních vzorků.

Tabulka 2 - podmínky pro rozbor jednotlivých surovin

Surovina	Množství potřebné pro rozbor [g]	Použitý ředící roztok	Objem ředícího roztoku [ml]
Datle	10	Peptonová voda	90
Meruňky	10	Peptonová voda	90
Med	10	Peptonová voda	90
Mandle	10	Fyziologický roztok s peptonem	90
Ovesné vločky	10	Fyziologický roztok s peptonem	90
Skořice	2	Fyziologický roztok s peptonem	98

2.8.1. Stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů kultivační metodou

Stanovení je prováděno dle normy (ČSN EN ISO 4833) a používá se pro odhad celkové kontaminace suroviny/potravin. Homogenát příslušného zředění je inokulován metodou rozčtu na povrch neselektivní půdy GTK. Po inkubaci je spočítán počet CFU na miskách a vypočítána celková koncentrace CFU v 1 g suroviny. Výpočet je prováděn pro všechny rozborů a půdy vždy stejně, pomocí rovnice 2:

$$N = \frac{\Sigma C}{V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d} \text{ [CFU/g]} \quad (2)$$

kde, ΣC je součet kolonií spočítaných na vybraných miskách, n_1 je počet misek z prvního použitého ředění, n_2 je počet misek z následného použitého ředění, V je objem použitého homogenátu (obvykle 1 nebo 0,1 ml) a d je faktor nejmenšího použitého ředění pro výpočet.

Postup:

Po řádném promíchání bylo odebráno příslušné množství suroviny (viz tab. 2). Odebraný reprezentativní vzorek byl smíchán s příslušným množstvím ředícího roztoku (tab. 2). Po 2 minutách homogenizace v peristaltickém homogenizátoru/v baňce se skleněnými perlami byl ze sáčku/baňky odpipetován homogenát. Ten byl dále naředěn desítkovým ředěním. Obě ředění byly plastovou L-hokejkou rozetřeny po povrchu půdy GTK. Misky s půdami byly vloženy do termostatu – inkubace při 30 °C po dobu 24-48 h. Po inkubaci byly spočítány kolonie na miskách a pomocí rovnice 2 vypočítán celkový počet CFU v 1 g suroviny (norma ČSN EN ISO 4833).

2.8.2. Stanovení celkového počtu plísní a kvasinek

Po řádném promíchání bylo odebráno příslušné množství suroviny (viz tab. 2). Odebraný reprezentativní vzorek byl smíchán s příslušným množstvím ředícího roztoku (tab. 2). Po 2 minutách homogenizace v peristaltickém homogenizátoru/v baňce se skleněnými perlami byl ze sáčku/baňky odpipetován homogenát. Ten byl dále naředěn desítkovým ředěním. Obě ředění byly plastovou L-hokejkou rozetřeny po povrchu půdy DRBC. Misky s půdami byly vloženy do termostatu – inkubace při 25 °C po dobu 5-7 dní. Po inkubaci byly spočítány počty kolonií na miskách a pomocí rovnice 2 vypočítán celkový počet CFU v 1 g suroviny (norma ČSN ISO 21527-1).

2.8.3. Stanovení osmofilních plísní a kvasinek

Po řádném promíchání bylo odebráno příslušné množství suroviny (viz tab. 2). Odebraný reprezentativní vzorek byl smíchán s příslušným množstvím ředícího roztoku (tab. 2). Po 2 minutách homogenizace v peristaltickém homogenizátoru/v baňce se skleněnými perlami byl ze sáčku/baňky odpipetován homogenát. Ten byl dále naředěn desítkovým ředěním. Obě ředění byly plastovou L-hokejkou rozetřeny po povrchu půdy DG18. Misky s půdami byly vloženy do termostatu – inkubace při 25 °C po dobu 7-14 dní. Po inkubaci byly spočítány počty kolonií na miskách a pomocí rovnice 2 vypočítán celkový počet CFU v 1 g suroviny (norma ČSN ISO 21527-2).

2.8.4. Stanovení koliformních mikroorganismů

Po řádném promíchání bylo odebráno příslušné množství suroviny (viz tab. 2). Odebraný reprezentativní vzorek byl smíchán s příslušným množstvím ředícího roztoku (tab. 2). Po 2

minutách homogenizace v peristaltickém homogenizátoru/v baňce se skleněnými perlami byl ze sáčku/baňky homogenát. Ten byl dále naředěn desítkovým ředěním. Obě ředění byly plastovou L-hokejkou rozetřeny po povrchu půdy VČŽL. Zároveň bylo provedeno druhé stanovení metodou zálivu. 1 ml obou koncentrací byl napipetován do Petriho misek, kde byl následně proveden jejich záliv roztavenou půdou VČŽL. Po promíchání krouživým pohybem a utužení půdy byly misky ještě jednou přelity velmi slabou vrstvou téže půdy (pro zajištění fakultativně anaerobních podmínek). Misky s půdami byly vloženy do termostatu – inkubace při 37 °C po dobu 24-48 h. Po inkubaci byly spočítány počty kolonií na miskách a pomocí rovnice 2 vypočítán celkový počet CFU v 1 g suroviny (norma ČSN ISO 4832).

2.8.5. Stanovení čeledi *Enterobacteriaceae*

Po řádném promíchání bylo odebráno příslušné množství suroviny (viz tab. 2). Odebraný reprezentativní vzorek byl smíchán s příslušným množstvím ředícího roztoku (tab. 2). Po 2 minutách homogenizace v peristaltickém homogenizátoru/v baňce se skleněnými perlami byl ze sáčku/baňky odpipetován homogenát. Ten byl dále naředěn desítkovým ředěním. Obě ředění byly plastovou L-hokejkou rozetřeny po povrchu půdy VČŽG. Zároveň bylo provedeno druhé stanovení metodou zálivu. 1 ml obou ředění byl napipetován do Petriho misek, kde byl následně proveden jejich záliv roztavenou půdou VČŽG. Po promíchání krouživým pohybem a utužení půdy byly misky ještě jednou přelity velmi slabou vrstvou téže půdy (pro zajištění fakultativně anaerobních podmínek). Misky s půdami byly vloženy do termostatu – inkubace při 37 °C po dobu 24-48 h. Po inkubaci byly spočítány počty kolonií na miskách a pomocí rovnice 2 vypočítán celkový počet CFU v 1 g suroviny (norma ČSN EN ISO 21528).

2.8.6. Stanovení koaguláza pozitivních stafylokoků

Po řádném promíchání bylo odebráno příslušné množství suroviny (viz tab. 2). Odebraný reprezentativní vzorek byl smíchán s příslušným množstvím ředícího roztoku (tab. 2). Po 2 minutách homogenizace v peristaltickém homogenizátoru/v baňce se skleněnými perlami byl ze sáčku/baňky odpipetován homogenát. Ten byl dále naředěn desítkovým ředěním. Obě ředění byly plastovou L-hokejkou rozetřeny po povrchu půdy B-P. Misky s půdami byly vloženy do termostatu – inkubace při 37 °C po dobu 24-48 h. Po inkubaci byly spočítány počty kolonií na miskách a pomocí rovnice 2 vypočítán celkový počet CFU v 1 g suroviny (norma ČSN EN ISO 6888-1).

2.8.7. Stanovení počtu presumptivních bakterií *Bacillus cereus*

Po řádném promíchání bylo odebráno příslušné množství suroviny (viz tab. 2). Odebraný reprezentativní vzorek byl smíchán s příslušným množstvím ředícího roztoku (tab. 2). Po 2 minutách homogenizace v peristaltickém homogenizátoru/v baňce se skleněnými perlami byl ze sáčku/baňky odpipetován homogenát. Ten byl dále naředěn desítkovým ředěním. Obě ředění byly plastovou L-hokejkou rozetřeny po povrchu půdy MYP. Misky s půdami byly vloženy do termostatu – inkubace při 30 °C po dobu 24-48 h. Po inkubaci byly spočítány počty kolonií na miskách a pomocí rovnice 2 vypočítán celkový počet CFU v 1 g suroviny (norma ČSN EN ISO 7932).

2.8.8. Stanovení počtu bakterií *Clostridium perfringens*

Po řádném promíchání bylo odebráno příslušné množství suroviny (viz tab. 2). Odebraný reprezentativní vzorek byl smíchán s příslušným množstvím ředícího roztoku (tab. 2). Po 2 minutách homogenizace v peristaltickém homogenizátoru/v baňce se skleněnými perlami byl ze sáčku/baňky odpipetován homogenát. Ten byl dále naředěn desítkovým ředěním. Obě ředění byly plastovou L-hokejkou rozetřeny po povrchu půdy TSC. Misky s půdami byly vloženy do anaerostatu spolu s chemickým činidlem vytvářejícím anaerobní prostředí. Celý anaerostat byl umístěn do termostatu – inkubace při 37 °C po dobu 24-48 h. Po inkubaci byly spočítány počty kolonií na miskách a pomocí rovnice 2 vypočítán celkový počet CFU v 1 g suroviny (norma ČSN EN ISO 7937).

2.9. Mikrobiologická analýza raw tyčinek

2.9.1. Výroba raw tyčinek

Jelikož analyzované suroviny nebyly kontaminované, bylo možné je použít k výrobě tyčinek. Tyčinky byly připraveny podle vybraného receptu, nalezeného na internetu. Při výrobě byly dodrženy specifikovaná množství surovin a postup výroby.

Recept:	gramů
sušené datle	200
sušené meruňky	100
ovesné vločky	110
mandle pražené	200
med	100
skořice	5

Postup:

Sušené datle a sušené meruňky namočit na 1 h do vody (použita sterilní voda). Poté slít přebytečnou vodu, přesunout ovoce do mixéru. Přidat vločky, mandle, med a skořici a vše rozmixovat do homogenní směsi. Z takto připravené směsi tvarovat tyčinky. Ty jsou po utužení připraveny ke konzumaci. Po přípravě těsta byl proveden jeho mikrobiologický rozbor pro ujištění, že těsto bylo připraveno asepticky a nebylo během procesu kontaminováno.

Z připraveného těsta bylo odebráno 10 g reprezentativního vzorku. Ten byl smíchán v homogenizačním sáčku s 90 ml peptonové vody a podroben 2 min homogenizace v peristaltickém homogenizátoru. Z homogenátu byly připraveny ředění 10^{-1} a 10^{-2} . Tato ředění byla metodou roztěru inokulována na neselektivní půdu GTK (ČSN EN ISO 4833), selektivní půdu MYP pro *Bacillus cereus* (ČSN EN ISO 7932) a selektivní půdu DRBC pro kvasinky a plísně (ČSN ISO 21527-1). Misky byly umístěny do termostátů a inkubovány při podmínkách daných příslušnými normami. Po inkubaci byly odečteny počty kolonií na miskách a pomocí rovnice 2 vypočítány koncentrace CFU/g těsta.

2.9.2. Uchování těsta na raw tyčinky

Těsto na tyčinky bylo připraveno ve velkém objemu. Následně bylo rozděleno na několik dílů po zhruba 200 g. Tyto díly byly vakuově uzavřeny a uchovávány v mrazničce při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Díly těsta byly během jednotlivých částí laboratorní analýzy postupně rozmrazovány a používány. Tím byla zaručena jeho dostatečná trvanlivost pro provedení všech analýz a měření. Zároveň díky tomu nebylo nutné připravovat nové těsto z nových surovin, nebylo tedy nutné provádět nové mikrobiologické rozborů.

2.9.3. Výběr vhodné kultury *Bacillus cereus*

Při výběru kultury vhodné pro tuto práci byla důležitá pouze dvě hlediska. Použitá kultura musela vykazovat spolehlivý růst, a hlavně vysokou produkci toxinů. Ta byla důležitá pro následné srovnání tyčinek s různým obsahem přidávaného rýmovníkového oleje.

Pro srovnání byly k dispozici dvě kultury a to kultura *Bacillus cereus* ATCC 7064 a kultura *Bacillus cereus* CCM 2010. Obě kultury byly inkubovány v ideálních podmínkách, při teplotě 37 °C v prostředí bujonu. Byly použity dva druhy bujonů a to M-H bujon a BHI bujon, opět pro srovnání a nalezení nejlepšího prostředí pro maximální produkci enterotoxinu v kultuře. Pro srovnání produkce toxinů různých kultur v různých bujonech byl použit BCET-RPLA kit pro detekci produkovaného enterotoxinu.

2.9.3.1. BCET-RPLA test

Tato komerčně dodávaná testovací souprava, dodávaná firmou Oxoid, je využívána pro detekci přítomnosti enterotoxinu, který produkuje *Bacillus cereus*. Pro tuto detekci využívá imunochemického principu reversní pasivní latexové aglutinace (RPLA). Protilátky, navázané na latexových částicích, vytváří spojení s enterotoxinem rozpuštěným v roztoku. V důsledku toho dochází ke shlukování latexových částic – aglutinaci. Ta je pozitivním důkazem přítomnosti enterotoxinu.

Tento kit slouží pouze pro detekci toxinu (citlivost 2 ng/ml) a není schopen určit jeho přesnou koncentraci v roztoku. Protože však roztoky jsou v rámci testu několikrát ředěny, je možné sledovat, při kterém zředění již není koncentrace toxinu dostatečná pro vyvolání aglutinace. Touto cestou je možné roztoky různých kultur mezi sebou porovnat a získat tak alespoň semikvantitativní informaci o množství toxinu.

Obsah testovací sady:

TD951 – Senzitivizovaný latex se specifickými protilátkami proti *B. cereus* (králičí IgG)

TD952 – Kontrolní latex s nespecifickými králičími IgG (negativní kontrola)

TD953 – Kontrolní enterotoxin *B. cereus* (lyofilizovaný)

TD954 – Ředící roztok – fosfátový pufr obsahující hovězí sérový albumin

Postup:

Roztoky pro použití v testu byly odebrány přímo ze zkumavek s inkubovanými kulturami *B. cereus* v M-H nebo BHI bujonu. Odebraný podíl byl nejprve centrifugován (20 min, 4 °C, 900g). Supernatanty byly převedeny do čistých zkumavek.

Pro každý testovaný roztok byly na mikrotitrační destičce vyhrazeny 2 řádky po 8 jamkách + 2 řádky pro kontrolní enterotoxin. Do všech jamek kromě první v každém řádku bylo napipetováno 25 µl ředícího roztoku. Poté bylo do prvních dvou jamek v každém řádku pipetováno 25 µl příslušného testovaného roztoku. Následně bylo pomocí pipety v každém řádku provedeno dvojkové ředění (poslední jamka ponechána pouze s ředícím roztokem). Nakonec bylo do všech lichých řádků přidáno 25 µl senzitivizovaného latexu a do všech sudých řádků 25 µl kontrolního latexu. Test byl ponechán při laboratorní teplotě po dobu 24 h. Poté byly odečteny výsledky proti černému pozadí.

Odečet výsledků:

Všechny sudé řádky musí být negativní (kontrolní latex). V řádku s enterotoxinovou kontrolou musí být všechny jamky pozitivní (pozitivní kontrola). Všechny poslední jamky (pouze ředící roztok) musí být rovněž negativní. V případě, že tyto podmínky nejsou splněny, test nefunguje správně a výsledky nelze považovat za spolehlivé. V případě splnění podmínek pozorujeme aglutinaci v lichých řádcích a odečítáme, při kterém zředění aglutinace mizí.

2.9.4. Testování vlivu rýmovníkového oleje na mikrobiologickou kvalitu raw tyčinek

Pro každé opakování analýzy byl rozmražen nový díl těsta. Raw tyčinky používané při analýze jejich mikrobiologické kvality byly uměle zaočkovávány kulturou *Bacillus cereus* ATCC 7064. Jako nejspolehlivější metoda se ukázala přímá inokulace klíčkou do těsta. Kultura byla inkubována v BHI bujonu a z něj vždy připravena 24 h kultura roztěrem na M-H agar. Cílem bylo zaočkování na koncentraci alespoň 10^6 CFU/g. Těsto bylo po inokulaci důkladně promícháno a rozděleno na 4 části.

Do takto připravených porcí těsta bylo následně přidáno různé množství esenciálního oleje z rýmovníku (viz tab. 3). Postup získání rýmovníkového oleje je uveden v kapitole analytické části práce (kapitola 2.13). Těsto bylo opět důkladně promícháno a vytvarováno

do tyčinek. Poté z nich byl proveden okamžitý mikrobiologický rozbor podle níže uvedeného postupu.

Z každé tyčinky bylo odebráno 10 g reprezentativního vzorku. Po smíchání s 90 ml peptonové vody a 2 min homogenizace v peristaltickém homogenizátoru byly odpipetovány jednotlivé homogenáty. Ty byly naředěny desítkovým ředěním na ředění 10^{-2} a 10^{-3} . Tato ředění byla metodou roztěru inokulována na selektivní půdu MYP pro *Bacillus cereus*. Misky byly ponechány v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 24-48 h (norma ČSN EN ISO 7932). Po inkubaci byly odečteny počty kolonií na miskách a pomocí rovnice 2 vypočítány koncentrace *Bacillus cereus* v 1 g jednotlivých tyčinek.

Tabulka 3 - přídavky rýmovníkového oleje do podílů těsta

Podíl těsta	Přidaný objem rýmovníkového oleje [μl]
1.	0
2.	20
3.	40
4.	80

Po 24 h inkubace tyčinek (30 °C) zaočkovaných kulturou a rýmovníkovým olejem byly srovnány počty CFU/g *Bacillus cereus* v tyčinkách pomocí dalších mikrobiologických rozborů. Ty byly provedeny dle níže uvedeného postupu.

Z každé tyčinky bylo odebráno 10 g reprezentativního vzorku. Po smíchání s 90 ml peptonové vody a 2 min homogenizace v peristaltickém homogenizátoru byly odpipetovány jednotlivé homogenáty. Ty byly naředěny desítkovým ředěním na ředění 10^{-3} a 10^{-4} . Tato ředění byla metodou roztěru inokulována na selektivní půdu MYP pro *Bacillus cereus*. Misky byly ponechány v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 24-48 h (opět dle normy ČSN EN ISO 7932). Po inkubaci byly odečteny počty kolonií na miskách a pomocí rovnice 2 vypočítány koncentrace *Bacillus cereus* v 1 g jednotlivých tyčinek.

Pomocí srovnání počtů CFU/g v tyčinkách s různým obsahem rýmovníkového oleje byly sledovány potenciální antimikrobiální účinky tohoto oleje a tím potenciální vylepšení mikrobiologické kvality raw tyčinek.

Byl také proveden pokus o srovnání antimikrobiálního účinku různých koncentrací oleje pomocí BCET-RPLA testu na detekci enterotoxinu produkovaného *B. cereus*. Z tyčinek s různým obsahem oleje byly získány extrakty, které byly po centrifugaci a přefiltrování podrobeny stejnému testu, jako při testování kultur *B. cereus* pro použití v experimentu (stejně podmínky testu i centrifugace jako kapitola 2.9.3.1)

2.10. Pomůcky pro analytickou část

Automatické pipety

Hliníkové misky

Kádinky 50, 100 ml

Odměrné baňky 25, 100, 500 ml

Odměrné válce 10, 25 ml

Plasová víčka

Plastové a skleněné zkumavky

Plastové misky Aqualab

Špičky na pipety

2.11. Přístroje pro analytickou část

Analytické váhy KERN 442-43 (Německo)

Centrifuga Sorvall ST4R Plus Series (USA)

Dvoupaprskový UV-VIS spektrofotometr Shimadzu UV-2600 (Japonsko)

Přístroj pro měření vodní aktivity Aqualab TDL (USA)

Přístroj pro stanovení sušiny KERN MLB 50-3C (Německo)

Software pro spektrofotometr UV-Probe 2.70 (Shimadzu, Japonsko)

Ultrazvuková lázeň Bandelin SONOREX RK 31 (Německo)

2.12. Chemikálie a roztoky pro analytickou část

DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl), volný radikál, >98 % (Sigma-Aldrich, USA)

Folin-Ciocalteu činidlo, 2M, >98 % (Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina gallová, >98 % (TCI, Japonsko)

Methanol CHROMASOLV™, 99,9 % (Honeywell, USA)

Uhličitan sodný, >99 % (Lach-Ner, Česká republika)

2.13. Destilace rýmovníkového oleje

Rýmovníkový esenciální olej byl získán destilací s vodní parou přímo z čerstvého rostlinného materiálu. Čerstvé listy rýmovníku byly rozlámány na menší kousky a vloženy do destilační baňky spolu s objemem destilované vody dostatečným pro ponoření všech listů (cca 1200 ml). Baňka byla připojená k destilační aparatuře (její konfigurace je viditelná v příloze – obrázek č. 5). Po ohřátí topným hnízdem na dostatečnou teplotu začala z baňky destilovat vodní pára, která s sebou nesla i malé množství těkavých látek z rýmovníku. Tato směs par po průchodu skleněnou trubicí kondenzovala na chladiči, který byl součástí aparatury. Kondenzát z chladiče překapal do dalšího systému skleněných trubiček, kterým se přebytečná kondenzovaná voda vracela zpátky do destilační baňky. Kondenzovaný olej se díky své nižší hustotě držel na hladině tohoto systému a byl tak akumulován v trubičce. Destilace probíhala 4 h. Po ukončení destilace byla ze systému vypuštěna přebytečná voda a následně i vydestilovaný olej.

Z důvodu nedostatečného objemu destilační baňky a velkého množství rostlinného materiálu potřebného pro získání dostatku oleje byla celá destilace provedena čtyřikrát, vždy s čerstvými listy. Celkem bylo zpracováno 676,88 g rostlinného materiálu a získáno 1,142 g esenciálního oleje. Ten byl uzavřen do skleněné vialky a víčko obaleno parafilmem pro utěsnění. Vialka byla umístěna do plastové zkušavky a ta do chladničky. Cílem tohoto uskladnění bylo minimalizovat ztráty způsobené evaporací oleje.

2.14. Stanovení aktivity vody raw tyčinek

Pro stanovení vodní aktivity v tyčinkách či tyčinkovém těstě byl použit automatický analyzátor od firmy Aqualab. K přístroji dodané plastové misky byly vždy naplněny tyčinkovou směsí tak, aby bylo pokryto jejich dno. Následně byly misky po jedné vkládány do analyzátoru. Přístroj pomocí speciálně nastaveného laseru určil hodnotu aktivity vody při 25 °C. Každá analýza trvala přibližně 15 – 20 min. Všechna měření byla pro přesnost několikrát opakována a výsledky zprůměrovány.

2.15. Stanovení obsahu sušiny u raw tyčinek

Stanovení obsahu sušiny/vlhkosti v tyčinkové směsi bylo provedeno gravimetricky. Byl použit automatický analyzátor od firmy KERN. Do přístroje bylo na hliníkové misce vloženo množství směsi o přesně známé hmotnosti. Směs byla jemně rozetřena po co největším povrchu misky pro urychlení stanovení. Po spuštění analýzy byla směs uvnitř přístroje

sušena ohřevem při 105 °C. Přístroj automaticky každých 20 sekund odečítal hmotnost směsi a celá analýza probíhala do konstantní hmotnosti (3 po sobě jdoucí měření hmotnosti nezaznamenaly rozdíl). Po ukončení přístroj automaticky porovnal počáteční a koncovou hmotnost směsi a pomocí nich určil procentuální hodnotu obsahu sušiny. Měření bylo opět prováděno několikrát a výsledky průměrovány.

2.16. Příprava vzorků k analýze polyfenolů a antioxidační kapacity

Vzorky tyčinkového těsta použité k analýze byly rozmělněny v třecí misce. Z každého vzorku bylo odebráno dvakrát 5 g materiálu (s analytickou přesností, viz tabulka 4). Odebrané navážky byly následně ve zkumavkách smíchány s 20 ml 80% vodného roztoku methanolu. Všechny navážky byly extrahovány v ultrazvukové lázni po dobu 30 min. Po extrakci byly obsahy zkumavek umístěny do centrifugy a roztoky byly stočeny (5000 RPM, 10 min). Po centrifugaci byla z každé zkumavky pomocí pipety odebrána vrchní, čirá vrstva roztoku (cca 5 ml) do čisté zkumavky. Takto připravené extrakty byly následně rozděleny do 2 podílů (a, b) pro větší počet opakovaných měření téhož extraktu a uchovány při – 25 °C pro další analýzu.

Tabulka 4 - přehled navážek tyčinkových směsí pro extrakci

Složení těsta	Odebrané navážky pro extrakci [g]
0 µl oleje	4,9797
	5,1130
20 µl oleje	5,5441
	5,0899
40 µl oleje	4,9501
	5,2027
80 µl oleje	5,2236
	5,2764

2.17. Stanovení celkového obsahu polyfenolických látek

Stanovení bylo provedeno metodou dle Folin-Ciocalteua. Pro tyto účely byl připraven zásobní roztok standardní látky – kyseliny gallové. Z tohoto roztoku byla ředěním do 10 ml odměrných baněk připravena kalibrační řada. Přehled informací o přípravě kalibračních roztoků je uveden v tabulce 5.

Připravená koncentrace zásobního roztoku kyseliny gallové byla 510 $\mu\text{g/ml}$ (navážka 0,0255 g)

Tabulka 5- příprava kalibračních roztoků pro stanovení obsahu polyfenolických látek

Roztok	Pipetovaný objem zásobního roztoku [ml]	Koncentrace kyseliny gallové v roztoku [$\mu\text{g/ml}$]
Kal. roztok 1	0,5	25,5
Kal. roztok 2	1	51
Kal. roztok 3	1,5	76,5
Kal. roztok 4	2	102
Kal. roztok 5	3	153
Kal. roztok 6	4	204
Kal. roztok 7	6	306
Kal. roztok 8	8	408

Dále byly připraveny reakční směsi. Ve zkumavce bylo smícháno vždy 5 ml destilované vody, 0,5 ml F-C činidla naředěného v poměru 1:3 a 300 μl analyzovaného extraktu/kalibračního roztoku/80 % methanolu (slepý vzorek). Reakční směs byla protřepána a ponechána 5 min v temnu. Po 5 minutách byl do reakčních směsí přidán 1 ml 5% vodného roztoku uhličitanu sodného. Reakční směsi byly opět promíchány a vráceny do temna pro proběhnutí reakce na dobu 30 min. Tato reakční doba byla experimentálně stanovena jako optimální sledováním kinetiky reakce pomocí spektrofotometru. Graf optimalizace je uveden v příloze (obrázek č. 2). Po uběhnutí reakční doby byly roztoky naplněny do kyvety a spektrofotometrem byla změřena jejich absorbance při 765 nm proti 80% methanolu.

Z absorbancí kalibračních roztoků byla vytvořena kalibrační závislost. Do její rovnice byly následně dosazeny hodnoty absorbancí extraktů (upravené o hodnotu absorbance slepého vzorku) a tím vypočten celkový obsah polyfenolických látek v nich, vyjádřený jako ekvivalentní koncentrace kyseliny gallové (GAE). Tento obsah byl dále přepočítán na množství v 1 g sušiny analyzovaného vzorku.

2.18. Stanovení antioxidační kapacity tyčinek

Toto stanovení bylo provedeno metodou DPPH. Nebyla připravena žádná kalibrační řada, výsledky jsou pro účely porovnání uváděny zjednodušeně jako % inhibice volného radikálu.

Reakční směs byla připravena smícháním 5 ml čerstvě připraveného methanického roztoku DPPH radikálu s 300 μ l analyzovaného extraktu/80% methanolu (slepý vzorek). Reakční směs byla vložena do temna na 30 min. Tato reakční doba byla rovněž experimentálně stanovena jako optimální sledováním kinetiky reakce pomocí spektrofotometru při 517 nm. Graf optimalizace je uveden v příloze (obrázek č. 3). Po uběhnutí reakční doby byly roztoky naplněny do kyvety a spektrofotometrem byla změřena jejich absorbance při 517 nm proti 80% methanolu.

Naměřené hodnoty absorbancí byly porovnány s hodnotou absorbance slepého vzorku (kde předpokládáme nulové zhášení radikálu) a byla vypočtena % inhibice volného radikálu podle vztahu 3:

$$I (\%) = \frac{A_0 - A_{vz}}{A_0} * 100 \quad (3)$$

kde A_0 je absorbance slepého vzorku a A_{vz} je absorbance analyzovaného vzorku.

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1. Výsledky mikrobiologických rozborů surovin

Tabulka 6 - výsledné hodnoty kolonie tvořících jednotek (CFU)/g rozborů jednotlivých surovin pro výrobu tyčinek

Suroviny Stanovené mikroorganismy	Mandle	Datle	Meruňky	Skořice	Ovesné vločky	Med
<i>B. cereus</i> (CFU/g)	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²
Celkové počty mikroorganismů (CFU/g)	< 10	345	< 10	2,8 x 10 ³	< 10	< 10
Koaguláza-pozitivní stafylokoky (CFU/g)	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²
Koliformní bakterie (CFU/g)	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Čeď <i>Enterobacteriaceae</i> (CFU/g)	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>Clostridium perfringens</i> (CFU/g)	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²
Kvasinky (CFU/g)	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²
Plísňe (CFU/g)	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²
Osmofilní mikroorganismy (CFU/g)	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²

Z výsledků mikrobiologických rozborů surovin je vidět, že v převážné většině případů byly suroviny výborné mikrobiologické čistoty. U žádné z testovaných potravin nebyl nalezen žádný výskyt převážné většiny skupin mikrobiologických kontaminantů. Berthold-Pluta *et al.* (2021) a Sajad Shah *et al.* (2022) ve svých pracích uvádí podobné výsledky rozborů sušeného ovoce a ořechů. Jejich antimikrobiální ochrana procesem sušení zabraňuje množení bakterií a plísní. Sereia *et al.* (2017) píše ve své publikaci o slabé mikrobiální kontaminaci medů, která běžně nepřesahuje 10^2 CFU/g. Jedinou výjimkou byl rozbor na všeobecnou kontaminaci pomocí půdy GTK. Na té byl nalezen malý nárůst bakterií u sušených datlí a ve skořici. Větší koncentrace CFU/g ve skořici je nejspíš důsledkem přítomnosti spor, které jsou poměrně běžným a častým kontaminantem koření, jak uvádí např. Mathot *et al.* (2021) či Carlin (2011). Další kolonie byly v malém počtu nalezeny i na půdách MYP. Z obou těchto půd byly kolonie izolovány na krevní agar pro identifikaci. Na základě identifikace z půd GTK a MYP byly tyto kolonie označeny jako příslušníci rodu *Bacillus*. To bylo následně potvrzeno pomocí Gramova barvení (grampozitivní tyčinky). Protože se nejednalo o druh *B. cereus*, byla tato kontaminace zanedbatelná. Všechny suroviny byly dále použity pro výrobu raw tyčinek a další experimenty.

3.2. Výsledek mikrobiologického rozboru po přípravě těsta

Tabulka 7 - výsledné hodnoty kolonie tvořících jednotek (CFU) na gram těsta z rozboru těsta pro kontrolu kontaminace

Stanovený mikroorganismus	<i>B. cereus</i>	Celkové počty mikroorganismů	Plísně	Kvasinky
Výsledné CFU/g	< 10^2	< 10^2	< 10^2	< 10^2

Rozbor těsta po jeho přípravě neukázal žádnou významnou kontaminaci. Na půdách GTK a MYP byl pozorovatelný malý výskyt kolonií rodu *Bacillus*, pravděpodobně v důsledku použití slabě kontaminovaných datlí a skořice. Tentokrát však byl výskyt kolonií na miskách příliš malý (< 10 kolonií), aby bylo misky možné počítat a použít ve výpočtu. Proto byla koncentrace CFU/g dle normy ČSN EN ISO 7932 určena jako pod minimální počítatelnou hodnotou. Kontaminace rodem *Bacillus* pro účely experimentu není závadná a oproti samotným surovinám je výrazně menší, těsto bylo tedy připraveno asepticky a bylo tak možné přejít k jeho uskladnění.

3.3. Výsledek BCET-RPLA testu pro výběr kultury *Bacillus cereus*

Při mém použití testu byla aglutinace u kultury *Bacillus cereus* ATCC 7064 z BHI bujONU pozorovatelná při všech ředěních. Aglutinace u žádné z dalších kombinací nebyla pozorovatelná až do nejvyššího zředění. Z výsledku je tedy patrné, že ideální kulturou a prostředím pro mé potřeby je kultura *Bacillus cereus* ATCC 7064 inkubovaná v BHI bujONU. Pro experimenty byla tedy použita tato kultura.

3.4. Účinky rýmovníkového esenciálního oleje na nárůst *B. cereus* v raw tyčinkách

Tabulka 8 - průměrné hodnoty kolonie tvořících jednotek (CFU) na gram těsta zaočkovaného *B. cereus* s přidavky oleje

Množství oleje a čas odběru vzorku	Vypočítané CFU [$\cdot 10^6$]/g
0 μ l oleje; okamžité	5,2 \pm 2,5
20 μ l oleje; okamžité	2,8 \pm 1,4
40 μ l oleje; okamžité	2,2 \pm 0,9
80 μ l oleje; okamžité	1,3 \pm 0,5
0 μ l oleje; po 24 h	2,7 \pm 1,4
20 μ l oleje; po 24 h	1,5 \pm 0,7
40 μ l oleje; po 24 h	1,2 \pm 0,6
80 μ l oleje; po 24 h	0,72 \pm 0,35

Na první pohled je jasné, že přídavek rýmovníkového oleje má zásadní vliv na množství mikrobiální kontaminace *B. cereus*. Jelikož rozbory byly provedeny ihned po přípravě tyčinek, vyplývá z výsledků také, že přidaný olej má okamžité antimikrobiální účinky. Pro pozorování jeho působení tak není třeba čekat na proběhnutí sušení. Dle studií Aguiar *et al.* (2015); Akuegbe *et al.* (2021); Arumugam *et al.* (2016) a Sivaranjani *et al.* (2019) je antimikrobiální působení způsobeno přítomností známých antimikrobiálních sloučenin jako carvacrol, thymol, γ -terpinen, (E)- α -bergamoten atd. v rýmovníkovém oleji, které narušují buněčné membrány bakterií a tím dojde k jejich usmrcení (Ashaari *et al.*, 2021). V každé studii je také uveden rozdílný poměr zastoupení těchto složek, který je vysvětlen různou oblastí a dobou růstu rostliny. S rostoucím množstvím oleje v tyčince roste i jeho

antimikrobiální účinek a klesá tak koncentrace *Bacillus cereus*. Ten je očividně na přítomnost a působení sloučenin v oleji citlivý, což bylo úspěšně prokázáno i ve studiích Erny Sabrina *et al.* (2014); Manjamaalai *et al.* (2012); Musila *et al.* (2017).

Zajímavým jevem je klesnutí koncentrací *B. cereus* ve všech tyčinkách po 24 h inkubace při 30 °C, kdy by byl očekávatelný spíše nárůst koncentrací. První potenciální příčinou bylo působení rýmovníkového oleje. Ta byla však vyloučena, jelikož k poklesu CFU/g došlo i u tyčinky bez přidaného oleje. Druhou potenciální příčinou byla nedostatečná aktivita vody v důsledku složení tyčinek. Ta byla testována analýzou aktivity vody v tyčinkách. Opakovaným měřením byla získána hodnota $a_w = 0,786$. Tato hodnota aktivity není považována za optimální pro růst a přežití bakterií (Stevenson *et al.* (2015); Subbiah *et al.* (2020)) a mohla by vysvětlovat pokles koncentrace *B. cereus* v tyčinkách. Je nutné také vzít v potaz potenciální obsah antimikrobiálních sloučenin a konzervantů v použitých surovinách (např. oxid siřičitý).

Ve druhém provedení experimentu byla koncentrace *B. cereus* zaočkovaná do těsta zhruba dvakrát větší. To bylo pravděpodobně způsobeno pouze větším množstvím buněk odebraným z Petriho misek. Výsledek experimentu potvrdil závěry z prvního opakování. Po přidavku esenciálního oleje byly v okamžitém rozboru pozorovány výrazné antimikrobiální účinky. S rostoucím množstvím oleje v tyčinkách opět klesla koncentrace *B. cereus*. Významný rozdíl bylo možné pozorovat již u tyčinky s nejmenším množstvím oleje. Ostatní přídavky způsobily úměrně silnější inhibici nárůstu.

Také výsledek rozboru po 24 h sušení z druhého experimentu byl srovnatelný s výsledkem prvního opakování. Koncentrace *B. cereus* v tyčinkách opět poklesla o necelou polovinu. Tento rozdíl byl opět přisouzen poklesu aktivity vody v tyčinkovém těstě, která nebyla dostačující pro optimální přežití bakterií (0,786).

Celkově byly oba experimenty shledány úspěšnými. V obou opakováních se podařilo prokázat a kvantifikovat antimikrobiální účinek rýmovníkového esenciálního oleje. Z vypočtených hodnot CFU/g v jednotlivých tyčinkách byla sestavena tabulka procentuálního snížení nárůstu *B. cereus* vlivem přídavku rýmovníkového oleje (viz tabulka 9).

Tabulka 9 – výsledky procentuálního snížení nárůstu *B. cereus* v tyčinkách s různým obsahem oleje

Tyčinka	% inhibice počtu CFU/g
20 μ l oleje	45,50 \pm 1,30
40 μ l oleje	57,43 \pm 1,49
80 μ l oleje	73,68 \pm 1,26

S rostoucím množstvím rýmovníkového oleje v tyčince rostla i míra inhibice nárůstu *B. cereus*. U tyčinek s 20 μ l byla vypočítána průměrná hodnota inhibice růstu kolonií jako 45,50 %, u tyčinek se 40 μ l jako 57,43 % a u tyčinek s 80 μ l jako 73,68 %. Výrazný rozdíl je možné pozorovat již při přidavku 20 μ l, antimikrobiální účinky oleje jsou poměrně silné. Na získané výsledky nebyly aplikovány statistické testy z důvodu nedostatečného množství dat (2 opakování). Rozdíly v nárůstech jsou však patrné. Ve studii Musila *et al.* (2017) bylo dosaženo podobných inhibičních výsledků u bakterií *Staphylococcus aureus* a *Bacillus cereus* s použitím koncentrací rýmovníkového oleje 25 a 40 mg/ml. Studie od Sivaranjani *et al.* (2019) prokázala inhibici růstu *B. cereus* při koncentracích rýmovníkového oleje 50 a 100 mg/ml. Ve studiích Ayari *et al.* (2020) nebo Kang *et al.* (2018) byly testovány a potvrzeny antimikrobiální účinky jiných esenciálních olejů (tymiánový, bazalkový, skořicový, mentholový atd.) v podobných koncentracích na různé bakterie, mezi nimi i *B. cereus*. Ve studii Yang *et al.* (2023) byly prokázány antimikrobiální účinky par esenciálních olejů z oregána, citronové trávy či tymiánu na *B. cereus*.

Porovnání antimikrobiálních účinků rýmovníkového oleje mělo být provedeno také pomocí komerčního BCET-RPLA testu na srovnání množství vyprodukovaného enterotoxinu. Výsledky tohoto testu však neprokázaly žádný rozdíl mezi jednotlivými tyčinkami. Test byl nejspíš proveden nesprávně.

3.5. Výsledky analýzy aktivity vody v tyčinkovém těstě

Opakovaným měřením aktivity vody pomocí přístroje Aqualab byla v těstě před zamražením nalezena hodnota aktivity $0,899 \pm 0,018$. Taková aktivita je na spodní hranici optimálního rozmezí aktivit pro přežití bakterií (0,9 – 1) (Stevenson *et al.*, 2015). Těsto tedy ještě bylo vhodným prostředím pro jejich růst a množení.

Po zamražení na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a opětovném rozmražení těsta po několika týdnech byla jeho aktivita vody testována znovu, jelikož těsto použité v experimentu prošlo tímto procesem. V tomto případě byla u těsta naměřena hodnota aktivity $0,786 \pm 0,013$. Tato hodnota je již poměrně vzdálená od rozmezí $0,9 - 1$ a rozmražené těsto tak již není ideálním prostředím pro bakterie. Tento fakt nejspíš vysvětluje, proč počty *B. cereus* uvnitř tyčinek klesly po 24 h inkubace. Pomocí dvouvýběrového t-testu byly hodnoty aktivit srovnány a označeny jako statisticky významně rozdílné ($p < 0,05$).

3.6. Výsledky analýzy obsahu sušiny v tyčinkovém těstě

Tabulka 10 - navážky a stanovené obsahy sušiny tyčinek s rýmovníkovým olejem, různá písmenka v horním indexu značí statisticky významně rozdílné hodnoty (ANOVA) ($p > 0,05$)

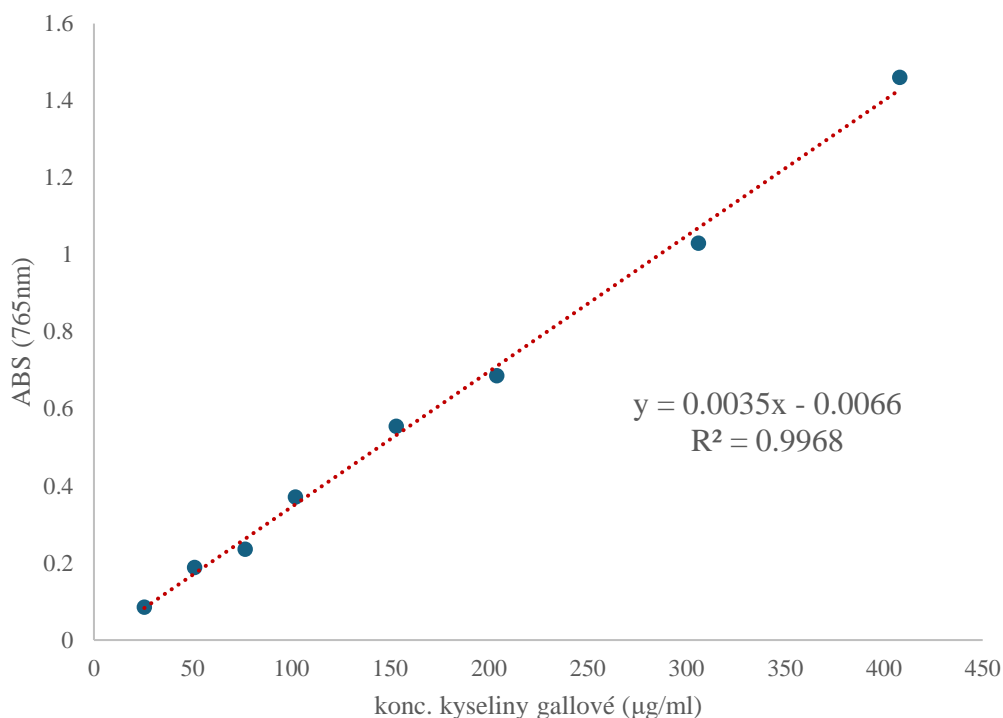
Složení tyčinky	Navážená množství [g]	Přístrojem stanovený obsah sušiny [%]
Bez oleje	4,857; 3,614	$79,56 \pm 0,13^a$
20 μl oleje	3,237; 3,611	$80,62 \pm 0,18^a$
40 μl oleje	3,134; 2,881	$80,01 \pm 0,01^a$
80 μl oleje	3,433; 3,519	$80,67 \pm 0,50^a$

Sušina tyčinkového těsta je relativně velkým podílem jeho celkové hmotnosti. To je vzhledem ke složení těsta očekávatelné. Většina surovin (ovesné vločky, mandle, skořice) byla v momentu jejich použití ve výrobě v sušeném stavu. Jediné suroviny s obsahem vody byly meruňky a datle, které byly sice zakoupeny v sušeném stavu, ale před použitím byly hodinu ponořeny ve vodě, a med. Z výsledků analýzy také vidíme, že přídavek esenciálního oleje neměl na obsah sušiny žádný vliv (výsledek ANOVA, vliv parametru množství přídavku oleje statisticky nevýznamný). Všechny tyčinky měly přibližně stejný obsah sušiny, zhruba 80 %. Tento fakt je očekávatelný z důvodu vysoké těkavosti oleje, který se během záhřevu při analýze pravděpodobně odpařil. Přesné hodnoty obsahu sušiny byly použity při vyjádření celkového obsahu polyfenolických látek.

3.7. Výsledky analýzy celkového obsahu polyfenolických látek v tyčinkovém těstě

Proměřením absorbancí kalibračních roztoků byla získána kalibrační závislost, která je uvedena na obrázku 1.

Kalibrační závislost



Obrázek 1 - graf kalibrační závislosti stanovení celkových polyfenolů metodou dle Folin-Ciocalteu

Z grafu kalibrační závislosti vidíme, že kalibrační závislost je lineární v celém zkoumaném rozsahu koncentrací. Kalibrace je tedy přesná a vhodná k použití pro kvantifikaci neznámé koncentrace polyfenolických látek ve vzorcích.

Naměřené hodnoty absorbance analyzovaných extraktů vzorků byly dosazeny do rovnice získané z kalibračního grafu (viz obrázek 1). Tím byly vypočteny koncentrace celkových polyfenolických látek jako ekvivalent kyseliny gallové (GAE) v 1 ml extraktu. Tyto hodnoty byly dále upraveny dle příslušných reakčních podmínek (extrakce do 20 ml, přepočet na 1 g vzorku podle navážky, přepočet na 1 g sušiny podle obsahu sušiny). Tyto podmínky a finální výsledky jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11 - vypočtené obsahy celkových polyfenolických látek ve vzorcích raw tyčinek (ekvivalent kyseliny gallové GAE), různá písmenka v horním indexu značí statisticky významné rozdíly (párové t-testy, $p < 0,05$)

Analyzovaný extrakt	Celkový obsah polyfenolů z rovnice [mg GAE/20 ml extraktu]	Finální celkový obsah polyfenolů [mg GAE/g sušiny]
0 μl oleje	4,54 \pm 0,17 ^a	1,13 \pm 0,05 ^a
20 μl oleje	5,19 \pm 0,26 ^b	1,21 \pm 0,04 ^b
40 μl oleje	5,44 \pm 0,17 ^c	1,34 \pm 0,03 ^c
80 μl oleje	5,78 \pm 0,30 ^c	1,37 \pm 0,07 ^c

Výsledky ukazují, že celkový obsah polyfenolických látek v tyčinkách vzrostl s přidáním rýmovníkového oleje. Stanovený obsah roste spolu s rostoucím množstvím oleje a u tyčinek s největším přidáním je nejvyšší. Rozdíl v obsahu polyfenolů u tyčinek s přidáním 40 a 80 μ l oleje však již je statisticky nevýznamný. Rýmovníkový olej obsahuje směs nejrozličnějších sloučenin, mezi nimi např. thymol, p-kumarová kyselina či 3-methoxygenkwanin (El-hawary *et al.* (2012); Akuegbe *et al.* (2021); Ali *et al.* (2012); Arumugam *et al.* (2016)). Tyto sloučeniny jsou fenolické povahy a vysvětlují pozorovaný růst jejich obsahu.

Zároveň je také jasně vidět, že všechny tyčinky včetně té bez přidaného esenciálního oleje mají nenulový obsah polyfenolických látek. Ten je dokonce výraznější než obsah těchto látek v přidání oleje. Průměrný obsah polyfenolů v tyčince bez oleje je 1,13 mg GAE a v tyčince s 80 μ l oleje 1,37 mg GAE. Ostatní přídávky (20 a 40 μ l) mají celkové obsahy polyfenolických látek 1,21 a 1,34 mg GAE ve stejném pořadí. Rýmovníkový olej tak rozhodně není jediným zdrojem těchto látek ve směsi. Polyfenolické látky jsou obsaženy v mnoha surovinách použitých na přípravu tyčinek, např. rutin, kvercetin či katechin v medu a ve skořici (Ayoub *et al.* (2023); Rao a Gan, 2014), nebo různé fenolkarboxylové kyseliny v datlích (gallová, hydroxybenzoová, vanilová či p-kumarová) (Eid *et al.*, 2014).

3.8. Výsledky analýzy antioxidační kapacity tyčinkového těsta

Z hodnot absorbancí reakčních směsí analyzovaných extraktů byly vypočteny % inhibice volného radikálu pomocí hodnoty absorbance slepého vzorku s předpokládanou nulovou inhibicí. Z měření bylo odstraněno několik odlehlých bodů, které zkreslovaly výsledky. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12 - vypočtené % inhibice DPPH radikálu v analyzovaných extraktech, různá písmenka v horním indexu značí statisticky významně rozdílné hodnoty (párové t-testy, $p < 0,05$)

Analyzovaný extrakt	Vypočtená % inhibice
0 μ l oleje	55,00 \pm 0,70 ^a
20 μ l oleje	64,03 \pm 1,81 ^b
40 μ l oleje	71,82 \pm 1,02 ^c
80 μ l oleje	79,01 \pm 1,29 ^d

Výsledky ukazují velmi výrazný růst antioxidační kapacity u tyčinek s přidaným esenciálním olejem navzdory pouze malým objemům přídavku. Tyčinky s největším množstvím oleje – 80 μ l – mají velmi dobrou schopnost zhaset volné radikály, jejich inhibice dosahuje průměrně 79,01 %. To je výrazné zlepšení inhibiční schopnosti oproti tyčince bez esenciálního oleje (průměrně 55,00 %). Další přídavky, 20 a 40 μ l, způsobují téměř lineární růst schopnosti inhibice radikálů (64,03 a 71,82 %).

Zlepšení antioxidační kapacity tyčinek je vysvětleno složením rýmovníkového oleje. Ten obsahuje látky jako např. thymol či carvacrol (Senthilkumar a Venkatesalu (2010); Akuegbe *et al.*, 2021). Obě tyto sloučeniny mají výrazný antioxidační účinek a jsou v oleji obsaženy ve vysokých koncentracích (Ali *et al.*, 2012).

Zároveň je patrné, že i tyčinka bez přidaného rýmovníkového oleje vykazuje významnou antioxidační kapacitu (55,0 %). Ta je dána surovinami použitými pro přípravu tyčinek. Mezi významné zdroje antioxidantů řadíme z použitých surovin med, skořici či sušené ovoce, což jsou potraviny s obsahem polyfenolických látek, které mají antioxidační účinky. Dalším dobrým zdrojem antioxidantů jsou i mandle, obsahující poměrně velké množství vitamínu E (Chen *et al.*, 2006).

4. ZÁVĚR

V teoretické části práce byly popsány všechny okruhy informací podstatné pro vypracování a provedení experimentu. Byl přiblížen raw způsob stravování, který se zasloužil o vznik potravin, jako jsou raw tyčinky. Byla popsána technologie raw tyčinek, jejich mikrobiologická kvalita a nedostatky. Vypracována byla rovněž část o bakterii *Bacillus cereus*, která byla následně použita v experimentu, stejně jako esenciální olej z rostliny Rýmovníku citronového. Nakonec byly popsány všechny v experimentu použité analytické metody.

Praktická část se zabývala raw tyčinkami a jejich analýzou. Byly nakoupeny a mikrobiologicky rozebrány potřebné suroviny. Ty byly následně prokázány jako nekontaminované nebo s kontaminací, která nepřekážela provedení experimentu. Ze surovin bylo připraveno tyčinkové těsto. Toto těsto bylo v několika opakováních experimentu uměle zaočkováno vhodnou kulturou *Bacillus cereus* a určitým množstvím vlastnoručně vyrobeného rýmovníkového oleje. U takto připravených tyčinek byla sledována jejich mikrobiologická kvalita a její potenciální vylepšení díky přidanému oleji. Bylo zjištěno, že esenciální olej má za následek okamžité a výrazné snížení počtu kolonií tvořících jednotek v těchto tyčinkách.

Dále byly tyčinky testovány analyticky za účelem zjištění, zda přidaný rýmovníkový olej dokáže významně ovlivnit další vlastnosti raw tyčinek, jako obsah polyfenolických látek v nich či jejich antioxidační kapacitu. Metodou dle Folin-Ciocalteu byly stanoveny hodnoty celkového obsahu polyfenolických látek, ze kterých bylo patrné výrazné navýšení jejich obsahu v tyčinkách s přidaným olejem. Také metoda DPPH pro stanovení antioxidační kapacity ukázala, že přídavek oleje měl za následek růst antioxidačních účinků tyčinek. Polyfenolické i antioxidační látky byly v tyčinkách obsaženy i bez oleje, ten však jejich obsah a účinky významně zlepšil.

Na základě těchto zjištění jsem došel k závěru, že přídavek rýmovníkového esenciálního oleje se zasloužil o zlepšení mikrobiologické kvality raw tyčinek a současně i o zlepšení dalších jejich vlastností.

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abbas, M., Naz, S. A., Shafique, M., Jabeen, N., Abbas, S. 2019. *Fungal contamination in dried fruits and nuts: A possible source of mycosis and mycotoxicosis.* Pak. J. Bot : vyd. 4, 1523-1529, 2019. doi: [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2019-4\(31\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2019-4(31)).

Agata, N., Ohta, M., Mori, M., Isobe, M. 1995. *A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of Bacillus cereus.* FEMS Microbiol. Lett. : vyd. 129, 17-19, 1995. doi: [10.1016/0378-1097\(95\)00119-p](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00119-p).

Aguiar, J. J., Sousa, C. P., Araruna, M. K., Silva, M. K., Portelo, A. C., et al. 2015. *Antibacterial and modifying-antibiotic activities of the essential oils of Ocimum gratissimum L. and Plectranthus amboinicus L.* European Journal of Integrative Medicine. : vyd. 2, 151-156, 2015. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2014.10.005>.

Akuegbe, E. D., Oyemitan, I. A., Ogunlowo, I. I., Miya, G. M., Oyedeji, O. O., Oyedeji, A. O. 2021. *Behavioural activities and chemical composition of fresh leaf essential oil of Plectranthus aegyptiacus from Southwest Nigeria in mice.* GSC Biological and Pharmaceutical Sciences : vyd. 2, 64-76, 2021. doi: <https://doi.org/10.30574/gscbps.2021.14.2.0030>.

Ali, B., Al-Wabel, N.A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S.A., Anwar, F., 2015. *Essential oils used in aromatherapy: A systemic review.* Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine : vyd. 8, 601-611, 2015. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.007>.

Ali, N.A.A., Wurster, M., Denkert, A., et al. 2012. *Chemical Composition, Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activity of Essential Oils of Plectranthus cylindraceus and Meriandra benghalensis from Yemen.* Natural Product Communications : vyd. 8, 2012. doi: [10.1177/1934578X1200700834](https://doi.org/10.1177/1934578X1200700834).

Alp, D., Bulantekin, Ö. 2021. *The microbiological quality of various foods dried by applying different drying methods: a review.* Eur Food Res Technol : č. 247, 1333-1343, 2021. doi: <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03731-z>.

Amidžić Klarić, D., Mornar, A., Kovačić, J., Jeličić, M., Brusač, E., Brletić, I., Klarić, I. 2022. *Polyphenol content and antioxidant activity of phytoestrogen containing food and*

dietary supplements: DPPH free radical scavenging activity by HPLC. Acta Pharmaceutica : vyd. 3, 375-388, 2022. doi: <https://doi.org/10.2478/acph-2022-0031>.

Arumugam, G., Swamy, M.K., Sinniah, U.R. 2016. *Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng: Botanical, Phytochemical, Pharmacological and Nutritional Significance.* Molecules : vyd. 4, 369, 2016. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules21040369>.

Ashaari, N.S., Mohamad, N.E., Afzinizam, A.H., Ab. Rahim, M.-H., Lai, K.S., Ong Abdullah, J. 2021. *Chemical Composition of Hexane-Extracted Plectranthus amboinicus Leaf Essential Oil: Maximizing Contents on Harvested Plant Materials.* Appl. Sci : vyd. 22, č. 10838, 2021. doi: <https://doi.org/10.3390/app112210838>.

Ayari, S., Shankar, S., Follett, P., Hossain, F., Lacroix, M. 2020. *Potential synergistic antimicrobial efficiency of binary combinations of essential oils against Bacillus cereus and Paenibacillus amylolyticus-Part A.* Microbial Pathogenesis : č. 104008, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104008>.

Ayoub, W.S., Zahoor, I., Dar, A.H. et al. 2023. *Exploiting the polyphenolic potential of honey in the prevention of chronic diseases.* Food Chemistry Advances : vyd. 1, č. 3, 2023. doi: <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100373>.

Aziz Zarith, A.A., et al. 2018. *Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review.* Current Drug Metabolism : vyd. 13, 1100-1110, 2018. doi: <https://doi.org/10.2174/1389200219666180723144850>.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. *Biological effects of essential oils – A review.* Food and Chemical Toxicology : vyd. 2, 446-475, 2008. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106..>

Bärlocher, F., Graça, M.A.S. 2020. *Total Phenolics.* Methods to Study Litter Decomposition : vyd. 1, 157-161, 2020. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-30515-4_18.

Bavcon Kralj, M., Podražka, M., Krawczyk, B., Mikuš, R.P., Jarni, K., Trebse, P. 2017. *“Raw food” diet: The effect of maximal temperature (46 ± 1 °C) on aflatoxin B1 and oxalate contents in food.* Journal of Food and Nutrition Research : vyd. 3, 277-282, 2017. ISSN 1336-8672.

Belghiti, A.A., Yafout, M., Alaoui, A.M., Soulaymani, R., Chebat, A., Said, A.A.H., 2023. *Retrospective study of cases of poisoning by Essential oils in Morocco.* Toxicologie Analytique et Clinique : vyd. 2, 133-137, 2023. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxac.2022.11.001>.

Berthold-Pluta, A., Garbowska, M., Stefańska, I., Stasiak-Róžańska, L., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Pluta, A. 2021. *Microbiological Quality of Nuts, Dried and Candied Fruits, Including the Prevalence of Cronobacter spp.* Pathogens : vyd. 7, č. 900, 2021. doi: <https://doi.org/10.3390/pathogens10070900>.

Bhave, A., Dasgupta, S. 2018. *Effect of cooking on total phenol, total flavonoids and DPPH free radical scavenging potential of Plectranthus amboinicus.* Journal of Medicinal Plants Studies : vyd. 3, 82-84, 2018. ISSN: 2320-3862.

Bourdoux, S., Li, D., Rajkovic, A., Devlieghere, F., Uyttendaele, M. 2016. *Performance of Drying Technologies to Ensure Microbial Safety of Dried Fruits and Vegetables.* COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY : vyd. 15, 1056-1066, 2016. doi: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12224>.

Brožková, I., Cervenka, L., Dvořáková, V., Michálková, K., Velichová, H. 2016. *The effect of processing temperature on microbial safety and antioxidant activity of minimally processed "raw food".* Journal of Food and Nutrition Research : vyd. 4, 352-360, 2016. ISSN 1336-8672.

Bui-Klimke, T. R., Guclu, H., Kensler, T. W., Yuan, J. M., Wu, F. 2014. *Aflatoxin regulations and global pistachio trade: insights from social network analysis.* PloS one : vyd. 9,, 2014. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092149>.

Burgess, C. 2007. *Chapter 1 The basics of spectrophotometric measurement.* Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry : str. 1-19, 2007. doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-9244\(07\)80003-5](https://doi.org/10.1016/S0167-9244(07)80003-5).

Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Ricke, S.C. 2015. *Essential oils as antimicrobials in food systems – A review.* Food Control : vyd. 1, 111-119, 2015. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>..

Carlin, F. 2011. *Origin of bacterial spores contaminating foods.* Food Microbiol. : vyd. 28, 177-182, 2011. doi: 10.1016/j.fm.2010.07.008.

Carroll, L. M., Cheng, R. A., Wiedmann, M., Kovac, J. 2022. *Keeping up with the Bacillus cereus group: taxonomy through the genomics era and beyond.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition : vyd. 28, 7677-7702, 2022. doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1916735>.

Clemente, I., Aznar, M., Silva, F., Nerín, C. 2016. *Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria.* Innovative Food Science & Emerging Technologies : vyd. 1, 26-33, 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.05.013>.

Craig, W.J. 2009. *Health effects of vegan diets.* The American Journal of Clinical Nutrition : vyd. 5, 1627-1633, 2009. doi: <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.26736N>.

da Silva, J.V.B., de Oliveira, C.A.F., Ramalho, L.N.Z. 2021. *Effects of Prenatal Exposure to Aflatoxin B1: A Review.* Molecules : vyd. 23, č. 7312, 2021. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26237312>.

Debboun, M., Frances, S., Strickman, D. 2014. *Insect Repellents Handbook.* CRC Press : vyd. 2, 362, 2014. ISBN: 978-1-4665-5355-2.

Diaz, A., Luque, L., Badar, Z., Kornic, S., Danon, M. 2016. *Prepubertal gynecomastia and chronic lavender exposure: report of three cases.* Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism : vyd. 1, 103-107, 2016. doi: <https://doi.org/10.1515/jpem-2015-0248>.

Dietrich, R., Jessberger, N., Ehling-Schulz, M., Märtlbauer, E., Granum, P.E. 2021. *The Food Poisoning Toxins of Bacillus cereus.* Toxins : vyd. 2, č. 98, 2021. doi: <https://doi.org/10.3390/toxins13020098>.

Dixit, C., Vashist, S., MacCraith, B. et al. 2011. *Multisubstrate-compatible ELISA procedures for rapid and high-sensitivity immunoassays.* Nat Protoc : vyd. 6, 439-445, 2011. doi: <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.304>.

Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., Koehler, T.M. 2019. *The Bacillus cereus Group: Bacillus Species with Pathogenic Potential*. Microbiology spectrum : vyd. 3, 10-1128, 2019. doi: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018>.

Eid, N., Enani, S., Walton, G., Corona, G., Costabile, A., Gibson, G., Rowland, I., Spencer, J.P. 2014. *The impact of date palm fruits and their component polyphenols, on gut microbial ecology, bacterial metabolites and colon cancer cell proliferation*. J Nutr Sci : vyd. 1, e46, 2014. doi: 10.1017/jns.2014.16.

El-hawary, S.S., El-sofany, R.H., Abdel-Monem, A.R., Ashour, R.S., Sleem, A.A. 2012. *Polyphenolics content and biological activity of Plectranthus amboinicus (Lour.) spreng growing in Egypt (Lamiaceae)*. Pharmacognosy Journal : vyd. 32, 45-54, 2012. doi: <https://doi.org/10.5530/pj.2012.32.9>.

Erkmen, O. 2021. *Microbiological analysis of foods and food processing environments*. Academic Press : autor neznámý, 2021. ISBN: 978-0-323-91651-6.

Erny Sabrina, M.N., Razali, M., Mirfat, A.H.S., Mohd Shukri, M.A. 2014. *Antimicrobial activity and bioactive evaluation of Plectranthus amboinicus essential oil*. American Journal of Research Communication : vyd. 12, 121-127, 2014. ISSN: 2325-4076.

Everette, J.D., Bryant, Q.M., Green, A.M., Abbey, Y.A., et al. 2010. *Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin–Ciocalteu Reagent*. Journal of Agricultural and Food Chemistry : vyd. 14, 8139-8144, 2010. doi: 10.1021/jf1005935.

Faller, A.L.K., Fialho, E. 2021. *Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods*. Journal of Food Composition and Analysis : vyd. 6, 561-568, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.01.003>.

FDA, F. and D. A. 2012. *Bacillus cereus and other Bacillus species*. Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins : vyd. 2, 92-95, 2012. <https://www.fda.gov/media/83271/download>.

Giusti, F., Caprioli, G., Ricciutelli, M., Torregiani, E., Vittori, S., Sagratini, G. 2018. *Analysis of 17 polyphenolic compounds in organic and conventional legumes by high-performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and evaluation of*

their antioxidant activity. International Journal of Food Sciences and Nutrition : vyd. 5, 557-565, 2018. doi: <https://doi.org/10.1080/09637486.2017.1399258>.

Górska-Warsewicz, H., Laskowski, W., Kulykovets, O., Kudlińska-Chylak, A., Czeczotko, M., Rejman, K. 2018. *Food Products as Sources of Protein and Amino Acids—The Case of Poland*. Nutrients : vyd. 12, č. 1977, 2018. doi: <https://doi.org/10.3390/nu10121977>.

Grutsch, A.A., Nimmer, P.S., Pittsley, R.H., Kornilow, K.G., McKillip, J.L. 2018. *Molecular pathogenesis of Bacillus spp., with emphasis on the dairy industry*. Fine Focus : Fine Focus, vyd. 4, 203-222, vyd. 4, 203-222, 2018. doi: [10.33043/FF.4.2.203-222](https://doi.org/10.33043/FF.4.2.203-222).

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. 2015. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press : vyd. 5, 2015. ISBN 978-0-19-871747-8.

Hanif, M.A., Nisar, S., Khan, G.S., Mushtaq, Z., Zubair, M. 2019. *Essential Oils*. Essential Oil Research : vyd. 1, 3-17, 2019. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-16546-8_1.

Hardesty, J. H., Attili, B. 2010. *Spectrophotometry and the Beer-Lambert Law: An important analytical technique in chemistry*. Collin College, Department of Chemistry : ONLINE, str. 1-6, 2010. dostupné z: <http://vfsilesieux.free.fr/1Seuro/BeerLaw.pdf>.

Henley, D.V., Lipson, N., Korach, K.S., Bloch, C.A. 2007. *Prepubertal Gynecomastia Linked to Lavender and Tea Tree Oils*. N Engl J Med : vyd. 5, 479-485, 2007. doi: [10.1056/NEJMoa064725](https://doi.org/10.1056/NEJMoa064725).

Hernández, A., Pérez-Nevaldo, F., Ruiz-Moyano, S., Serradilla, M.J., Villalobos, M.C., Martín, A., Córdoba, M.G. 2018. *Spoilage yeasts: What are the sources of contamination of foods and beverages?* International Journal of Food Microbiology : č. 286, 98-110, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.031>.

Chakravarty, I., Parmar, V.M., Mandavgane, S.A. 2023. *Current trends in essential oil (EO) production*. Biomass Conv. Bioref. : vyd. 1, 15311-15334, 2023. doi: <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01963-3>.

Chen, C.-Y., Lapsley, K., Blumberg, J. 2006. *A nutrition and health perspective on almonds.* J. Sci. Food Agric. : vyd. 1, 2245-2250, 2006. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2659>.

Jayaraman, K. S., Gupta, D. D. 2020. *Drying of fruits and vegetables.* Handbook of industrial drying : 643-690, 2020.

Jessberger, N., Dietrich, R., Granum, P.E., Märtlbauer, E. 2020. *The Bacillus cereus food infection as multifactorial process.* Toxins : vyd. 12, 701, 2020. doi: [10.3390/toxins12110701](https://doi.org/10.3390/toxins12110701).

Jovanovic, J., Ornelis, V.F.M., Madder, A., Rajkovic, A. 2021. *Bacillus cereus food intoxication and toxicoinfection.* Compr Rev Food Sci Food Saf : č. 20, 3719-3761, 2021. doi: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12785>.

Kang, J., Liu, L., Wu, X. et al. 2018. *Effect of thyme essential oil against Bacillus cereus planktonic growth and biofilm formation.* Appl Microbiol Biotechnol : č. 102, 10209-10218, 2018. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9401-y>.

Kavanaugh, D.W., Glasset, B., Dervyn, R., Guérin, C., Plancade, S. et al. 2022. *New genetic biomarkers to differentiate non-pathogenic from clinically relevant Bacillus cereus strains.* Clinical Microbiology and Infection : vyd. 1, 131-137, 2022. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.05.035>.

Koebnick, C., Garcia, A.L., Dagnelie, P.C., Strassner, C., Lindemans, J., Katz, N., Leitzmann, C., Hoffmann, I. 2005. *Long-Term Consumption of a Raw Food Diet Is Associated with Favorable Serum LDL Cholesterol and Triglycerides but Also with Elevated Plasma Homocysteine and Low Serum HDL Cholesterol in Humans.* The Journal of Nutrition : vyd. 10, 2372-2378, 2005. doi: <https://doi.org/10.1093/jn/135.10.2372>.

Koul, O. et al. 2008. *Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints.* Biopesticides International : vyd. 1, 63-84, 2008.

Kowalska, M., Janas, S. Woźniak, M. 2018. *Innovative application of the moisture analyzer for determination of dry mass content of processed cheese.* Heat Mass Transfer : č. 54, 3071-3080, 2018. doi: <https://doi.org/10.1007/s00231-018-2358-7>.

- Krishnamurthy, P., Wadhvani, A. 2012.** *Antioxidant enzymes and human health.* Antioxidant enzyme : vyd. 1, 3-18, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/48109>.
- Le Gentil, C., Sylla, Y., Faille, C. 2010.** *Bacterial re-contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place procedures.* Journal of Food Engineering : vyd. 1, 37-42, 2010. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.06.040>..
- Lee, M., Lim, S., Song, J.-A., Kim, M.-E., Hur, M.-H. 2017.** *The effects of aromatherapy essential oil inhalation on stress, sleep quality and immunity in healthy adults: Randomized controlled trial.* European Journal of Integrative Medicine : č. 12, 79-86, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2017.04.009>.
- Liang, L., Wang, P., Qu, T., Zhao, X., Ge, Y., Chen, Y. 2022.** *Detection and quantification of Bacillus cereus and its spores in raw milk by qPCR, and distinguish Bacillus cereus from other bacteria of the genus Bacillus.* Food Quality and Safety : č. 6, 2022. doi: <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyab035>.
- Linskens, H.F., Jackson, J.F. 2012.** *Essential Oils and Waxes.* Molecular Methods of Plant Analysis : Springer Science & Business Media, 2012. ISBN: 9783642840234.
- Lúcio, M., Nunes, C., Gaspar, D. et al. 2009.** *Antioxidant Activity of Vitamin E and Trolox: Understanding of the Factors that Govern Lipid Peroxidation Studies In Vitro.* Food Biophysics : vyd. 4, 312-320, 2009. doi: <https://doi.org/10.1007/s11483-009-9129-4>.
- Lukhoba, C.W., Simmonds, M.S.J., Paton, A.J. 2006.** *Plectranthus: A review of ethnobotanical uses.* Journal of Ethnopharmacology : vyd. 1, 1-24, 2006. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.011>.
- Mahato, N., Sharma, K., Koteswararao, R., Sinha, M., Baral, E., Cho, M. H. 2019.** *Citrus essential oils: Extraction, authentication and application in food preservation.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition : vyd. 4, 611-625, 2019. doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1384716>.
- Manjamalai, A., Alexander, T., Grace, V. B. 2012.** *Bioactive evaluation of the essential oil of Plectranthus amboinicus by GC-MS analysis and its role as a drug for microbial infections and inflammation.* Int J Pharm Pharm Sci : vyd. 3, 205-211, 2012. ISSN 0975-1491.

Marxen, S., Stark, T.D., Frenzel, E. et al. 2015. *Chemodiversity of cereulide, the emetic toxin of Bacillus cereus.* Anal Bioanal Chem : č. 407, 2439-2453, 2015. doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8511-y>.

Masango, P. 2005. *Cleaner production of essential oils by steam distillation.* Journal of Cleaner Production : vyd. 8, 833-839, 2005. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2004.02.039>.

Mathot, A.G., Postollec, F., Leguerinel, I. 2021. *Bacterial spores in spices and dried herbs: the risks for processed food.* Compr Rev Food Sci Food Saf : č. 20, 840-862, 2021. doi: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12690>.

Mazaheri, T., Cervantes-Huamán, BRH., Bermúdez-Capdevila, M., Ripolles-Avila, C., Rodríguez-Jerez, JJ. 2021. *Listeria monocytogenes Biofilms in the Food Industry: Is the Current Hygiene Program Sufficient to Combat the Persistence of the Pathogen?* Microorganisms : vyd. 1, str 181, 2021. doi: [10.3390/microorganisms9010181](https://doi.org/10.3390/microorganisms9010181).

Menary, R. C. 2008. *Minimising pesticide residues in essential oils.* Rural Industries Research and Development Corporation : [ONLINE], 2008. ISBN: 978-1-74151-709-5.

Messelhäusser, U., Frenzel, E., Blöching, C., Zucker, R., Kämpf, P., Ehling-Schulz, M. 2014. *Emetic Bacillus cereus are more volatile than thought: Recent foodborne outbreaks and prevalence studies in bavaria (2007–2013).* BioMed Res. Int. : vyd. r. 2014, 1-9, 2014. doi: [10.1155/2014/465603](https://doi.org/10.1155/2014/465603).

Mohammadi, B., Gorkina, N., Smith, S.A. 2022. *Pathogenicity, toxin production, control and detection of Bacillus cereus.* Foodborne Pathogens – Recent Advances in Control and Detection : 1-21, 2022. doi: [10.5772/intechopen.104228](https://doi.org/10.5772/intechopen.104228).

Moharram, H. A., Youssef, M. M. 2014. *Methods for determining the antioxidant activity: a review.* Alexandria Journal of Food Science and Technology : vyd. 1, 31-42, 2014.

Morris, R. 2015. *Spectrophotometry.* Current Protocols Essential Laboratory Techniques : vyd. 1., 2015. doi: <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0201s11>.

Munteanu, I.G., Apetrei, C. 2021. *Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review.* International Journal of Molecular Sciences : vyd. 7, č. 3380, 2021. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>.

Musila, F.M., et al. 2017. *Antibacterial and antifungal activities of 10 Kenyan Plectranthus species in the Coleus clade.* Journal of Pharmacy Research : vyd. 8, 1003-1014, 2017.

Nerio, L.S., Olivero-Verbel, J., Stashenko, E. 2010. *Repellent activity of essential oils: A review.* Bioresource Technology : vyd. 1, 372-378, 2010. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.048>..

Nielsen, S.S. 2010. *Determination of Moisture Content.* Food Analysis Laboratory Manual : vyd. 1, 17-27, 2010. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1463-7_3.

Pavun, L., Đurđević, P., Jelikić-Stankov, M., Đikanović, D., Uskoković-Marković, S. 2018. *Determination of flavonoids and total polyphenol contents in commercial apple juices.* Czech J. Food Sci. : vyd. 3, 233-238, 2018. doi: 10.17221/211/2017-CJFS.

Pawlak, R., Lester, S. & Babatunde, T. 2014. *The prevalence of cobalamin deficiency among vegetarians assessed by serum vitamin B12: a review of literature.* Eur J Clin Nutr : vyd. 68, 541-548, 2014. doi: <https://doi.org/10.1038/ejcn.2014.46>.

Phaniendra, A., Jestadi, D.B. Periyasamy, L. 2015. *Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases.* Ind J Clin Biochem : č. 30, 11-26, 2015. doi: <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>.

Piskin, E., Cianciosi, D., Gulec, S., Tomas, M., Capanoglu, E. 2022. *Iron Absorption: Factors, Limitations, and Improvement Methods.* ACS Omega : vyd. 24, 20441–20456, 2022. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c01833>.

Preedy, V.R. 2015. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety.* Academic Press : [ONLINE], přístup 19.4.2024, 2015. dostupné z: <https://search.worldcat.org/cs/title/922581414>.

Raba, D. N., Iancu, T., Bordean, D. M., Adamov, T., Popa, V. M., Pîrvulescu, L. C. 2019. *Pros and cons of raw vegan diet.* Advanced Research in Life Sciences : vyd. 1, 46-51, 2019. doi: 10.2478/arls-2019-0010.

Rababah, T. M., Ereifej, K. I., Esoh, R. B., Al-u'datt, M. H., Alrababah, M. A., Yang, W. 2011. *Antioxidant activities, total phenolics and HPLC analyses of the phenolic compounds of extracts from common Mediterranean plants.* Natural Product Research : vyd. 6, 596-605, 2011. doi: <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.488232>.

Rao, J., Chen, B., McClements, D.J. 2019. *Improving the Efficacy of Essential Oils as Antimicrobials in Foods: Mechanisms of Action.* Annual Review of Food, Science and Technology : vyd. 10, 365-387, 2019. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121727>.

Rao, P.V., Gan, S.H. 2014. *Cinnamon: a multifaceted medicinal plant.* Evid Based Complement Alternat Med. : [online], 2014. doi: [10.1155/2014/642942](https://doi.org/10.1155/2014/642942).

Räty, J., Peiponen, K.E., Asakura, T. 2004. *Exploring the Insides of a Spectrophotometer.* UV-Visible Reflection Spectroscopy of Liquids : str. 99-144, 2004. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-540-45093-1_9.

Rivera-Quintero, P., Patience, G.S., Patience, N.A., Boffito, D.C., Banquy, X., Schieppati, D. 2024. *Experimental methods in chemical engineering: Karl Fischer titration.* Can. J. Chem. Eng. : č. 1, 1-18, 2024. doi: <https://doi.org/10.1002/cjce.25295>.

Rúa, J., Del Valle, P., de Arriaga, D., Fernández-Álvarez, L., García-Armesto, M.R. 2019. *Combination of Carvacrol and Thymol: Antimicrobial Activity Against Staphylococcus aureus and Antioxidant Activity.* Foodborne Pathog Dis. : vyd. 9, 622-629, 2019. doi: [10.1089/fpd.2018.2594](https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2594).

Sajad Shah, A., Bhat, S. V., Muzaffar, K., Ibrahim, S. A., Dar, B. N. 2022. *Processing Technology, Chemical Composition, Microbial Quality and Health Benefits of Dried Fruits.* Current Research in Nutrition & Food Science : vyd. 1, 71-84, 2022. ISSN: 2347-467X.

Senthilkumar, A., Venkatesalu, V. 2010. *Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng against Anopheles stephensi: a malarial vector mosquito.* Parasitology research : vyd. 1, 1275-1278, 2010. doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1996-6>.

Sereia, M. J., Perdoncini, M. R. G., Março, P. H., Parpinelli, R. S., Lima, E. G. D., Anjo, F. A. 2017. *Techniques for the evaluation of microbiological quality in honey.* Honey Analysis : str. 193-214, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/67086>.

Setlow, P. 2014. *Spore resistance properties.* Microbiol. Spectr. : vyd. 2, 201-215, 2014. doi: [10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012).

Schmidt, E. 2020. *Production of essential oils.* Handbook of essential oils : vyd. 3, 125-160, 2020. ISBN: 9781351246460.

Sivaranjani, D., Saranraj, P., Manigandan, M., Amala, K. 2019. *Antimicrobial activity of Plectranthus amboinicus solvent extracts against Human Pathogenic Bacteria and Fungi.* Journal of Drug Delivery and Therapeutics : vyd. 3, 36-39, 2019. doi: <https://doi.org/10.22270/jddt.v9i3.2604>.

Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund A., Granum P.E. 2008. *From soil to gut: Bacillus cereus and its food poisoning toxins.* FEMS Microbiol. Rev. : vyd. 32, 579–606, 2008. doi: [10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x).

Stevenson, A., Cray, J.A. et al. 2015. *Is there a common water-activity limit for the three domains of life?* The ISME Journal : vyd. 6, 1333-1351, 2015. doi: <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.219>.

Subbiah, B., Blank, U.K.M., Morison, K.R. 2020. *A review, analysis and extension of water activity data of sugars and model honey solutions.* Food Chemistry : č. 126981, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126981>.

Suriyaprom, S., Mosoni, P., Leroy, S., Kaewkod, T., Desvaux, M., Tragoolpua, Y. 2022. *Antioxidants of Fruit Extracts as Antimicrobial Agents against Pathogenic Bacteria.* Antioxidants : vyd. 3, 602, 2022. doi: <https://doi.org/10.3390/antiox11030602>.

Šeruga, M., Novak, I., Jakobek, L. 2011. *Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods.* Food Chemistry : vyd. 3, 1208-1216, 2011. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.047>.

Tantamango-Bartley, Y., Jaceldo-Siegl, K., Fan, J., Fraser, G. 2013. *Vegetarian Diets and the Incidence of Cancer in a Low-risk Population.* *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1 : vyd. 22, 286-294, 2013. doi: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-1060>.

Troller, J. 2012. *Water activity and food.* Elsevier : kniha, 2012. ISBN: 0-12-700650-8.

Vázquez-Quiñones, C.R., Moreno-Terrazas, R., Natividad-Bonifacio, I., Quiñones-Ramírez, E.I., Vázquez-Salinas, C. 2018. *Microbiological assessment of honey in México.* *Revista Argentina de Microbiología* : vyd. 1, 75-80, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.005>.

Vigan, M. 2010. *Essential oils: renewal of interest and toxicity.* *Eur J Dermatol* : vyd. 6, 685-692, 2010. doi: 10.1684/ejd.2010.1066..

Vora, L.K., Gholap, A.D., Hatvate, N.T., Naren, P., Khan, S., Chavda, V.P., Balar, P.C., Gandhi, J., Khatri, D.K. 2024. *Essential oils for clinical aromatherapy: A comprehensive review.* *Journal of Ethnopharmacology* : č. 118180, 2024. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118180>.

Wang, D.B., Yang, R., Zhang, Z.P., Bi, L.J., You, X.Y., Wei, H.P., et al. 2009. *Detection of B. anthracis Spores and Vegetative Cells with the Same Monoclonal Antibodies.* *PLoS ONE* : vyd. 4, 2009. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007810>.

Wojtunik-Kulesza, K.A. 2022. *Toxicity of Selected Monoterpenes and Essential Oils Rich in These Compounds.* *Molecules* : vyd. 5, č. 1716, 2022. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27051716>.

Wolf, G. 2005. *The Discovery of the Antioxidant Function of Vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill.* *The Journal of Nutrition* : vyd. 3, 363-366, 2005. doi: <https://doi.org/10.1093/jn/135.3.363>.

Yang, H., Yeom, W., Oh, J., Kim, H., Beuchat, L.R., Ryu, J-H. 2023. *Antimicrobial effects of essential oil vapors on Bacillus cereus on nutrient agar and iceberg lettuce.* *Food Bioscience* : č. 102580, 2023. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102580>.

Yoon, JY. 2016. *Spectrophotometry.* *Introduction to Biosensors* : str. 127-152, 2016. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-27413-3_8.

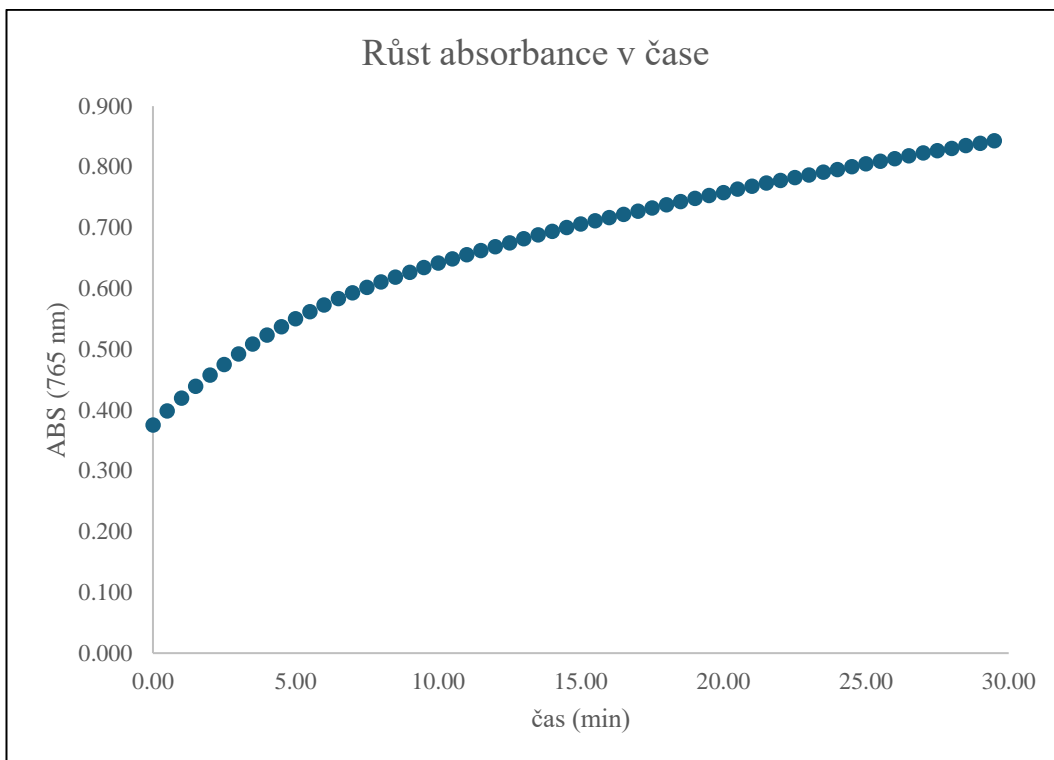
Yousefi, M., Rahimi-Nasrabadi, M., Pourmortazavi, S.M., Wysokowski, M., Jesionowski, T., Ehrlich, H., Mirsadeghi, S. 2019. *Supercritical fluid extraction of essential oils*. TrAC Trends in Analytical Chemistry : vyd. 1, 182-193, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.038>.

Zambrano, M.V., Dutta, B., Mercer, D.G., MacLean, H.L., Touchie, M.F. 2019. *Assessment of moisture content measurement methods of dried food products in small-scale operations in developing countries: A review*. Trends in Food Science & Technology : č. 98, 484-496, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.006>.

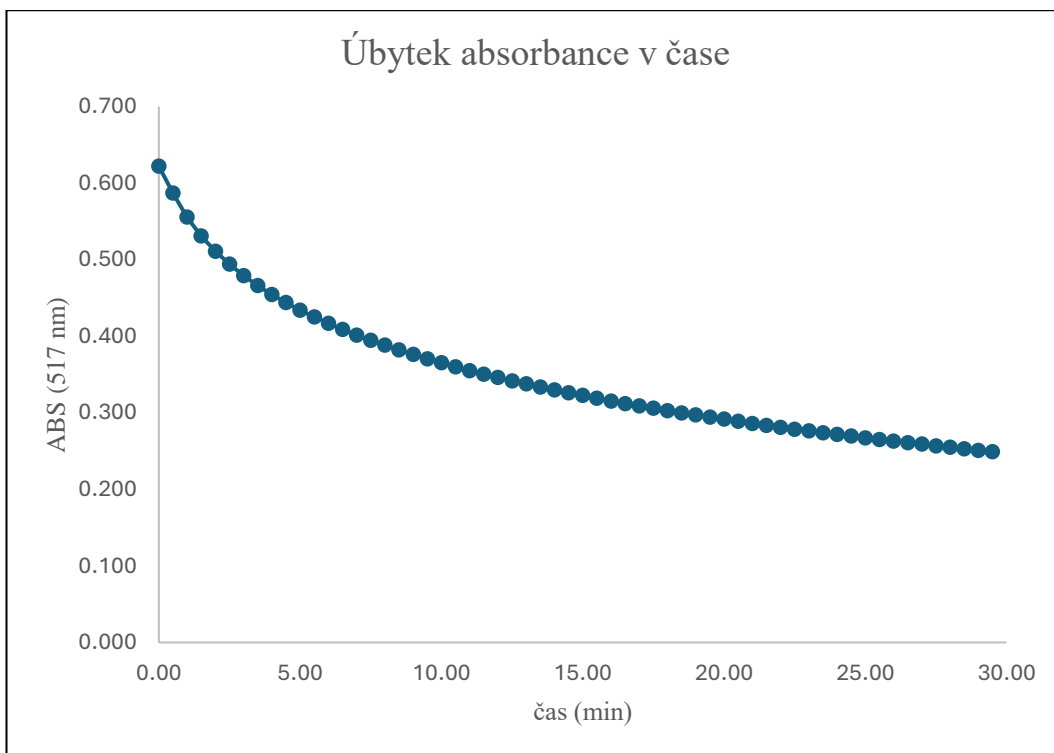
Zhong, Y., Shahidi, F. 2015. *Methods for the assessment of antioxidant activity in foods*. Handbook of Antioxidants for Food Preservation : 287-333, 2015. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-089-7.00012-9>.

Zhu, L., He, J., Cao, X. et al. 2016. *Development of a double-antibody sandwich ELISA for rapid detection of Bacillus Cereus in food*. Sci Rep : vyd. 6, čl. 16092, 2016. doi: [10.1038/srep16092](https://doi.org/10.1038/srep16092).

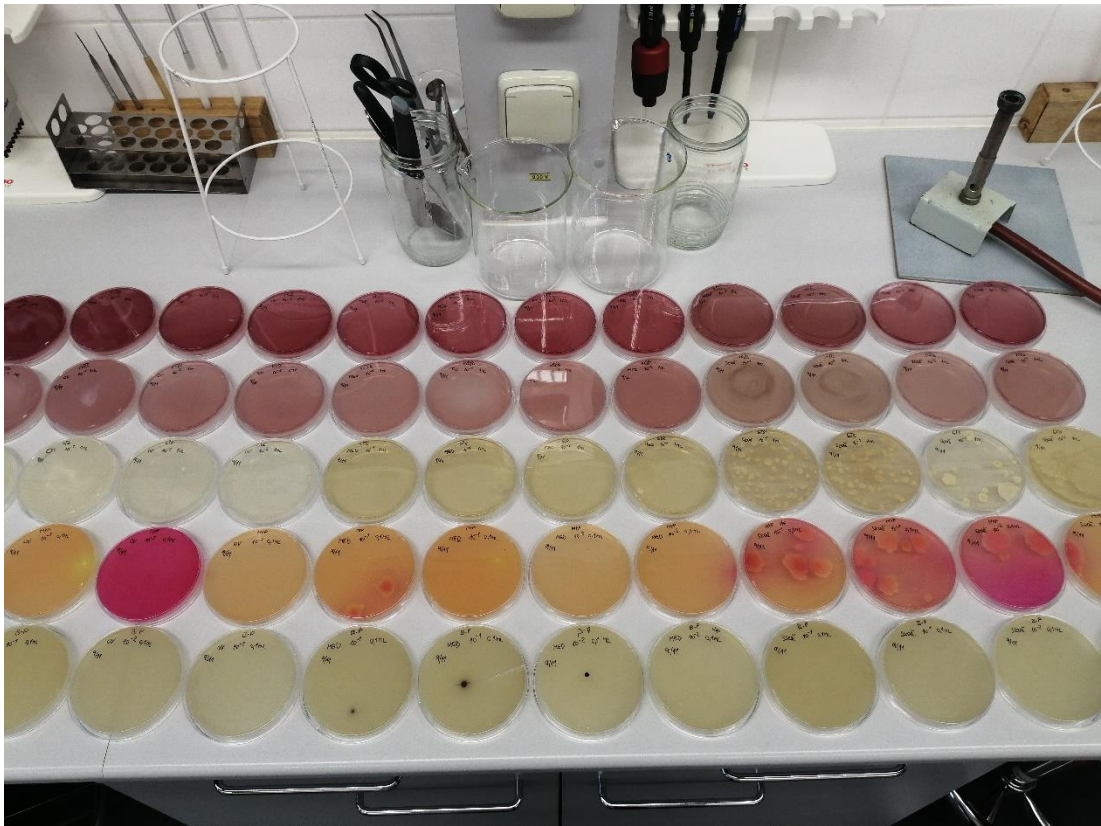
6. PŘÍLOHA



Obrázek 2 - graf optimalizace času reakce pro metodu dle Folin-Ciocalteu, 765 nm



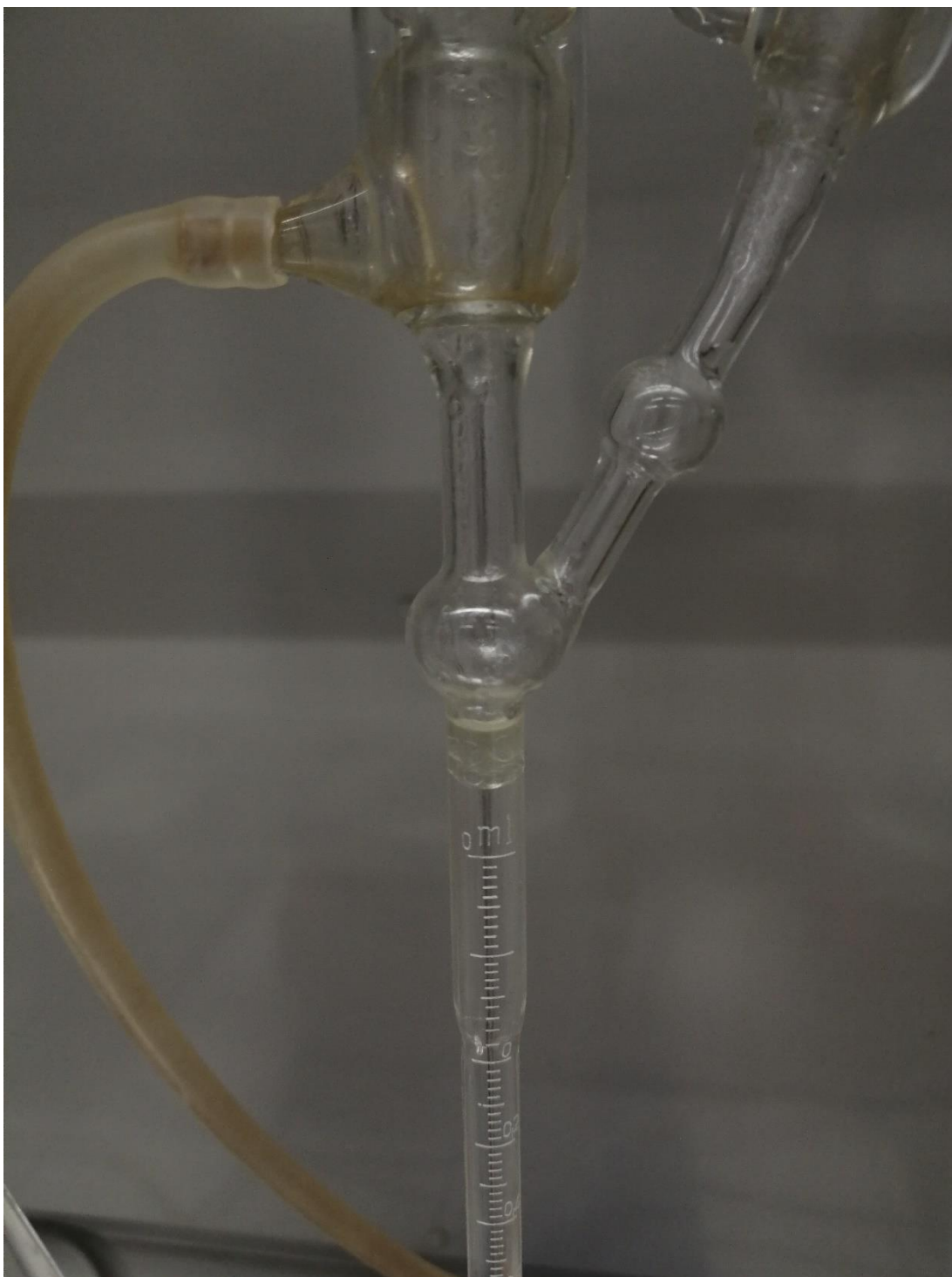
Obrázek 3 - graf optimalizace času reakce pro metodu DPPH, 517 nm



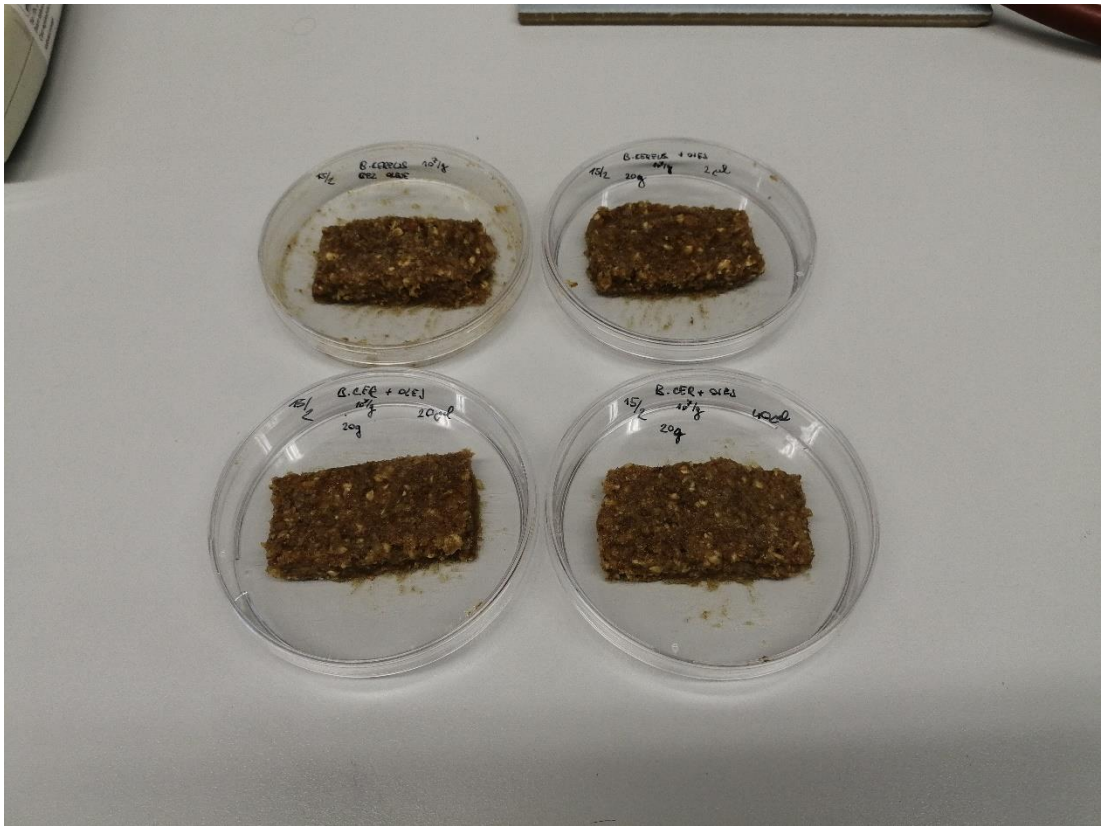
Obrázek 4 - mikrobiologický rozbor surovin (foto autor)



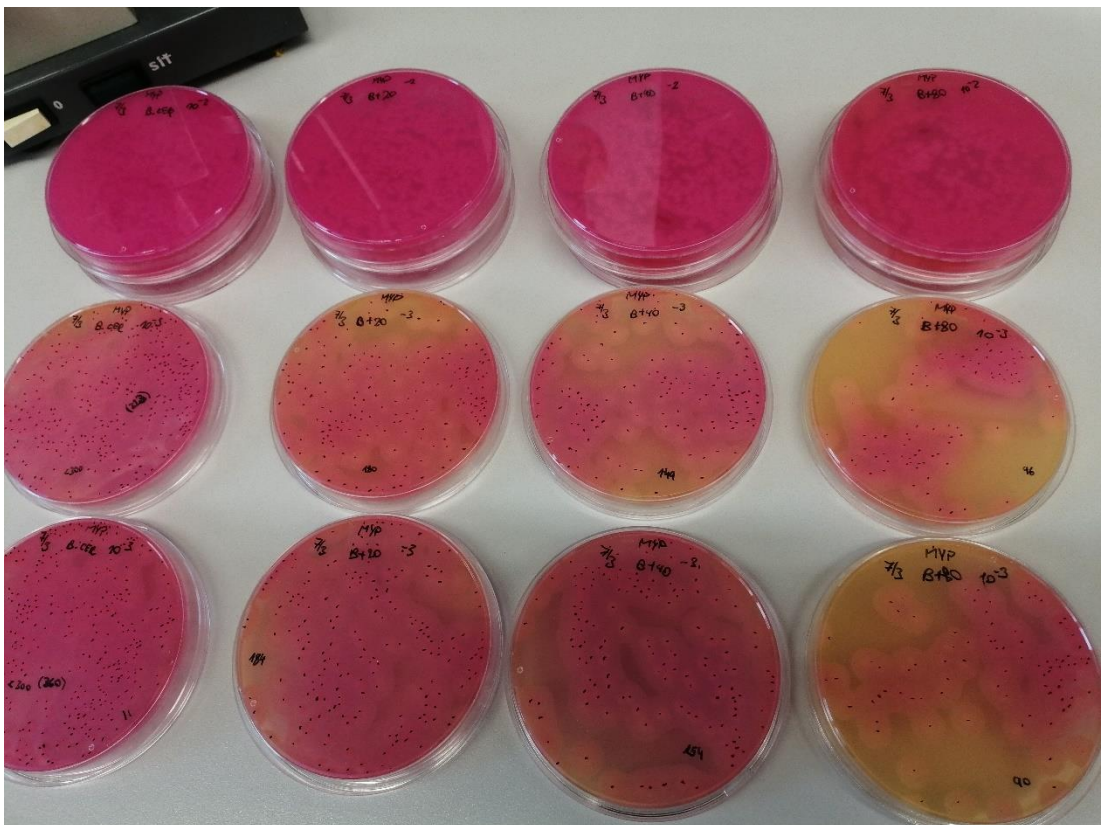
Obrázek 5 - destilační aparatura pro destilaci rýmovníkového oleje (foto autor)



Obrázek 6 - detail na jímání předestilovaného oleje (foto autor)



Obrázek 7 - připravené a vytvarované raw tyčinky s různými přídávky oleje (foto autor)



Obrázek 8 - mikrobiologické rozборы jednotlivých raw tyčinek (foto autor)