

# **Příprava a antimikrobní účinky emulzí netradičních rostlinných olejů**

Bc. Veronika Mikulcová

---

Diplomová práce  
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky  
akademický rok: 2012/2013

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Mikulcová**  
Osobní číslo: **T11147**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů  
a kosmetiky**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Příprava a antimikrobní účinky emulzí netradičních  
rostlinných olejů**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Charakteristika surovin pro přípravu netradičních rostlinných olejů.
2. Charakteristika, výskyt a bioaktivní účinky sekundárních rostlinných metabolitů.
3. Minoritní a netradiční rostlinné oleje.
4. Emulgační vlastnosti mléka.

### II. Praktická část

1. Příprava emulzí s různými emulgátory.
2. Základní charakterizace použitých olejů a připravených emulzí.
3. Antimikrobní účinky sledovaných olejů a emulzí.
4. Formulace závěrů na základě získaných výsledků.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**GUNSTONE, F. D. Vegetable Oils in Food Technology – Composition, Properties and Uses. 2nd ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2011.**

**WINK, M. Annual Plant Reviews, Volume 39 – Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites. 2nd ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010.**

**THOMPSON, A., BOLAND, M., SINGH, H. Milk Proteins: From Expression To Food. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2009.**

**SHAHIDI, F., BALEY, A. E. Bailey's Industrial Oil & Fats Products. Volumes 1-6. 6th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Interscience, 2005.**

Vedoucí diplomové práce:

**doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

**11. února 2013**

Termín odevzdání diplomové práce:

**22. května 2013**

Ve Zlíně dne 11. února 2013

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
děkan



doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.  
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: .....

Obor: .....

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně .....

.....

---

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **ABSTRAKT**

Tato práce popisuje přípravu stabilních emulzí tvořených olejem z hroznových jader v disperzním prostředí mléka za přítomnosti různých emulgátorů. K charakterizaci připravených emulzí byla použita fotonová korelační spektroskopie (PCS), přičemž sledované parametry představovala velikost a distribuce částic. V další části práce byly připravené emulze hroznového oleje a také neředěný olej testovány vůči vybraným potravinářsky významným bakteriím. Bylo zjištěno, že neředěný olej z hroznových jader stejně jako jeho emulze stabilizované lecitinem a Tweenem 80 neměly antimikrobní účinek na sledované mikroorganismy. Inhibiční účinky na gramnegativní i grampozitivní bakterie byly zaznamenány pouze u emulzí obsahujících jako emulgátor monokaprylin. Výsledky této práce proto naznačují, že olej z hroznových jader není vhodný pro konzervaci potravin.

**Klíčová slova:** olej z hroznových jader, polyfenoly, emulze, fotonová korelační spektroskopie, antimikrobní účinky

## **ABSTRACT**

This study describes the formulation of stable emulsions containing grape seed oil dispersed in the milk with several emulsifiers (Tween 80, MAG C8:0, lecithin). Photon correlation spectroscopy (PCS) was used to evaluate the emulsions. Parameters investigated included mean droplet size and droplet size distribution. In the next part of this thesis, model emulsions and concentrated grape seed oil were screened against selected food grade bacteria. Results showed that both concentrated grape seed oil and Tween 80 and lecithin-stabilised grape seed oil emulsions had no antimicrobial activity on selected microorganisms. Only monicaprylin-based emulsions have inhibitory activity againsts gram-positive and gram-negative bacteria. The result of this study suggests that selected grape seed oil couldn't be suitable for the preservation of food.

**Keywords:** grape seed oil, polyphenols, emulsions, photon correlations spectroscopy, antimicrobial activity

Děkuji vedoucí doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za cenné rady, odborné vedené a podmínky při realizaci této práce. Dále patří mé poděkování doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. za poskytnutý čas, rady a pomoc při zpracování dat získaných pomocí fotonové korelační spektroskopie.

Prohlašuji, že odevzdaná verzediplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné. V případě publikace výsledku, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 SEKUNDÁRNÍ METABOLITY ROSTLIN</b> .....	<b>13</b>
1.1 VÝZNAM .....	13
1.2 SEKUNDÁRNÍ METABOLITY S ANTIMIKROBNÍMI ÚČINKY .....	13
1.3 KLASIFIKACE.....	15
1.3.1 Klasifikace dle biologických funkcí.....	15
1.3.2 Klasifikace dle biosyntézy.....	16
1.3.3 Klasifikace dle chemické struktury .....	17
<b>2 FENOLICKÉ LÁTKY</b> .....	<b>18</b>
2.1 FLAVONOIDY .....	21
2.1.1 Flavony.....	22
2.1.2 Flavonoly.....	23
2.1.3 Flavan-3-oly .....	23
2.1.3.1 Monomery.....	24
2.1.3.2 Kondenzované taniny.....	24
2.1.4 Flavanony .....	25
2.1.5 Antokyaniny .....	25
2.1.6 Izoflavonoidy.....	26
2.2 NEFLAVONOIDY.....	26
2.2.1 Jednoduché fenoly.....	26
2.2.2 Fenolické kyseliny.....	27
2.2.2.1 Kyseliny hydroxybenzoové a jejich deriváty .....	28
2.2.2.2 Kyseliny hydroxyskořicové a jejich deriváty .....	28
2.2.3 Stilbeny.....	29
<b>3 CHARAKTERISTIKA SUROVIN PRO PŘÍPRAVU NETRADIČNÍCH ROSTLINNÝCH OLEJŮ</b> .....	<b>30</b>
3.1 RÉVA VINNÁ ( <i>VITIS VINIFERA</i> L.).....	30
3.1.1 Morfologická stavba hroznu.....	31
3.1.2 Sekundární metabolity hroznů .....	32
3.1.2.1 Fenolické látky.....	33
3.1.2.2 Terpeny .....	36
3.1.2.3 Alkaloidy.....	37
<b>4 MINORITNÍ A NETRADIČNÍ ROSTLINNÉ OLEJE</b> .....	<b>38</b>
4.1 OLEJ Z HROZNOVÝCH JADER .....	38
4.1.1 Specifikace .....	39
<b>5 EMULGAČNÍ VLASTNOSTI MLÉKA</b> .....	<b>42</b>
5.1 POVRCHOVÉ NAPĚTÍ MLÉKA .....	42
5.2 POVRCHOVĚ AKTIVNÍ SLOŽKY MLÉKA .....	43
5.2.1 Membrána tukové kuličky.....	43



5.2.2	Mléčné proteiny.....	44
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>CÍL PRÁCE .....</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>47</b>
7.1	POUŽITÉ MATERIÁLY .....	47
7.1.1	Olej z hroznových jader .....	47
7.1.2	Mléko .....	47
7.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	47
7.2.1	Emulgátory .....	47
7.2.2	Ostatní .....	47
7.3	ROZTOKY .....	48
7.3.1	Fyziologický roztok.....	48
7.4	PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ.....	48
7.5	BAKTERIÁLNÍ KMENY .....	49
7.6	KULTIVAČNÍ MÉDIA .....	49
7.6.1	Masopeptonový agar (MPA).....	49
7.6.2	Mueller-Hintonův agar (MHA).....	50
7.6.3	Agar pro <i>Lactobacillus</i> sp. podle DeMana, Rogosiho a Sharpeho (MRS agar).....	50
7.6.4	Müller-Hintonův bujón (MHB).....	51
7.6.5	Bujón pro <i>Lactobacillus</i> sp. podle DeMana, Rogosiho a Sharpeho (MRS bujón).....	51
7.6.6	Plate count agar (PCA).....	52
7.7	METODIKA .....	52
7.7.1	Příprava emulzí .....	52
7.7.1.1	Použití hřidelového míchadla .....	53
7.7.1.2	Použití desintegrátoru Ultra-Turrax.....	54
7.7.2	Analýza emulzí fotonovou korelační spektroskopií (PCS).....	54
7.7.3	Testování citlivosti mikroorganismů k připraveným emulzím a oleji z hroznových jader .....	55
7.7.3.1	Zkouška mikrobiální čistoty .....	55
7.7.3.2	Difúzní disková metoda .....	55
7.7.3.3	Doplňková metoda.....	56
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>57</b>
8.1	CHARAKTERIZACE PŘIPRAVENÝCH EMULZÍ .....	57
8.1.1	Vizuální pozorování .....	57
8.1.1.1	Vizuální hodnocení kontrolních emulzí.....	57
8.1.1.2	Vliv přítomnosti Tweenu 80 na stabilitu připravených emulzí .....	58
8.1.1.3	Vliv přítomnosti lecitinu na stabilitu připravených emulzí .....	58
8.1.1.4	Vliv přítomnosti MAG C8:0 na stabilitu připravených emulzí .....	59
8.1.2	Analýza emulzí fotonovou korelační spektroskopií.....	60
8.1.2.1	Průměrná velikost a distribuce velikosti částic u kontrolních emulzí bez emulgátoru.....	62

8.1.2.2	Vliv přítomnosti emulgátorů na průměrnou velikost a distribuci velikosti částic u připravených emulzí.....	62
8.2	STUDIUM ANTIMIKROBNÍCH ÚČINKŮ.....	65
8.2.1	Zkouška mikrobiální čistoty.....	65
8.2.2	Antimikrobní účinky oleje z hroznových jader.....	65
8.2.3	Antimikrobní účinky připravených emulzí .....	66
8.2.3.1	Antimikrobní účinky kontrolních emulzí.....	66
8.2.3.2	Vliv Tweenu 80 a lecitinu na antimikrobiální účinky připravených emulzí	67
8.2.3.3	Vliv monokaprylinu na antimikrobní účinky připravených emulzí.....	69
<b>9</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>74</b>
	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>79</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>80</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>87</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>88</b>
	<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>89</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH</b> .....	<b>92</b>

## ÚVOD

Poptávka spotřebitelů po čerstvých a přírodních produktech zvýšila zájem potravinářského průmyslu o alternativní způsoby uchovávání potravin, které jsou schopny omezit množství použitých tradičních aditivních látek. Pozornost potravinářského výzkumu se proto soustřeďuje na screening přírodních antimikrobních sloučenin, jež by mohly napomáhat k údržnosti potravin a zároveň zlepšovat jejich nutriční případně sensorickou hodnotu.

Rostliny, byliny, koření, ovoce i zelena jsou zdrojem velkého množství látek, jež inhibují různé metabolické aktivity bakterií, kvasinek i plísní. U celé řady z nich ovšem není jejich možné využití ke konzervaci potravin dostatečně ověřeno. K takovým nadějným rostlinám se řadí také réva vinná. Olej získávaný ze semen hroznů se vyznačuje vysokou dietetickou hodnotou a působí též jako antioxidant. Antioxidační účinky vyplývají z obsahu fenolických sloučenin – fenolových kyselin, stilbenů a flavonoidů. Tyto skupiny látek mají podle mnohých studií rovněž antimikrobní účinky. Díky svým uvedeným vlastnostem se tedy olej z hroznových jader jeví jako slibný přírodní konzervant potravinářských produktů.

Tato práce si klade za cíl ověřit inhibiční účinky oleje z hroznových jader na deseti potravinářsky významných kmenech bakterií. Dalším záměrem je vytvořit stabilní emulze hroznového oleje s mlékem a u těch následně testovat potenciál hroznového oleje ve zvyšování údržnosti mléka.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 SEKUNDÁRNÍ METABOLITY ROSTLIN

Metabolismus rostlin můžeme dělit na primární a sekundární. Primární metabolismus zahrnuje tvorbu a přeměny základních sloučenin buňky a jeho cesty jsou ve všech organizmech velmi podobné. Týká se sacharidů, lipidů, nukleových kyselin a proteinů. Sekundární metabolismus zahrnuje tvorbu a přeměny substancí, které se označují jako sekundární (druhotné) látky nebo jako sekundární metabolity. Mohou být volně definovány jako produkty metabolismu, které nemají výraznou funkci v látkové přeměně producenta, ačkoli mu mohou poskytovat selektivní výhodu. Vhodnost termínu „sekundární metabolit“ je stále předmětem diskuze, neboť u mnoha těchto látek byla prokázána jejich důležitá funkce v metabolismu, hlavně jako signálních molekul. Je však obecně používán, protože se dosud nenašlo označení přesnější [1, s. 109]; [2, s. 140].

### 1.1 Význam

Obecně platí, že sekundární metabolity vykonávají v rostlinných pletivech řadu rozličných biologických funkcí. Mnohé jsou pro rostlinu životně nezbytné – fytohormony, purinové a pyrimidinové báze nukleových kyselin, porfyriny, koenzymy, lignin aj. [3, s. 62]. Jiné nabývaly ekologického významu a fungují jako atraktanty (barevné a pachové látky), odpuzující látky a toxické obranné nebo útočné látky (některé alkaloidy, fytoncidy) [1, s. 109]. Současně některé z nich představují skutečné odpadní produkty, jež jsou z cytoplazmy přemisťovány v poměrně vysokých koncentracích do vakuol a buněčných stěn nebo se hromadí ve speciálních buňkách a pletivech (silice a kaučuk) [2, s. 140]; [3, s. 62]; [4, s. 1]. Na druhé straně u celé řady z nich není dosud známa jejich funkce [3, s. 62]. Prakticky každý druh vyšších rostlin má vlastní specifický typ sekundárního metabolismu, zatímco svým základním metabolismem se jeden druh od druhého příliš neliší. Přítomnost určitých sekundárních látek v rostlině může být využita jako taxonomický znak [2, s. 140]. Řada sekundárních metabolitů nachází praktické uplatnění v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu, ve výrobě nátěrových hmot a v zemědělství [1, s. 111].

### 1.2 Sekundární metabolity s antimikrobními účinky

Rostliny syntetizují a akumulují jako reakci na vnější podnět ve svých pletivech sloučeniny s antimikrobními účinky. Vnější podnětem může být napadení viry a fytopatogenními

organizmy (bakteriemi, plísněmi), ale také stresové faktory (ultrafialové záření, chlad, ionty těžkých kovů, ošetření fungicidy, herbicidy aj.) [5, s. 355]. Tyto nízkomolekulární antimikrobní látky lze zařadit do dvou tříd – fytoalexiny a fytoanticipiny. Základní rozdíl mezi nimi spočívá v mechanismu jejich vzniku. Fytoanticipiny jsou stálou součástí rostlinných pletiv a tvoří první chemickou obrannou linii rostliny vůči napadení. Jsou syntetizovány zdravou rostlinou z již vytvořených prekurzorů a slouží pouze jako pasivní obrana proti případným škodlivým činitelům. Typickým příkladem takových prekurzorů jsou glukosinoláty, které jsou při porušení rostlinného pletiva enzymově hydrolyzovány za vzniku antimikrobně působících izothiokyanátů. Naproti tomu fytoalexiny zvané také jako fytoncidy, rostlinná antibiotika nebo i rostlinné pesticidy vznikají *de novo* v důsledku vnějšího podnětu a představují tak aktivní obranný mechanismus. Fytoalexiny jsou toxické vůči patogením elicitorům (viry, mikroorganizmy) i živočišným škůdcům (hmyz, vyšší živočichové). Jedná se o chemicky nejednotnou skupinu. Příkladem mohou být jednoduché fenylpropenoidy, alkaloidy, terpeny, flavonoidy, izoflavonoidy, sloučeniny síry i polyketidy. Stejná látka může rostlině sloužit zároveň jako fytoanticipin i jako fytoalexin. Obě skupiny se často označují souhrnně fytoalexiny [5, s. 355]; [6, s. 20]; [7, s. 353]; [8, s. 192].

Antimikrobní látky nacházející se v rostlinách jsou chemicky značně heterogenní. Jako hlavní zástupce lze uvést jednoduché fenoly, fenolické kyseliny, chinony, flavonoidy, taniny, kumariny, deriváty acetyleny, terpenoidní látky, polyaminy, izothiokyanáty, sulfidy, lektiny a polyketidy, thiosulfínáty, stilbeny, heterocyklické dusíkaté sloučeniny a mnohé další [5, s. 355]; [8, s. 192]. Schopnost syntetizovat a akumulovat tyto látky je doložena u více než 200 druhů rostlin náležejících zhruba do 40 rodů a 20 čeledí. Mezi čeledí rostlin a strukturou fytoalexinů existuje souvislost. Bobovité rostliny produkují především izoflavonoidy, z dalších fenolických sloučenin jsou pak aktivní některé stilbeny. Pro čeleď lilkovitých jsou typické terpenové sloučeniny, pro čeleď brukvovitých se jedná o deriváty indolu a pro čeleď miříkovitých polyacetyleny. Mnohé z nich jsou těkavé látky s chuťově nebo pachově výraznými vlastnostmi. Často bývají podstatnými složkami některých koření a aromatické zeleniny. Bývají uplatňovány při konzervaci potravin [5, s. 355]; [9, s. 78].

Mechanismus účinku antimikrobních metabolitů rostlin zahrnuje inhibici různých mikrobiálních enzymů, membránových pump spojených s mnohočetnou lékovou rezistencí, biosyntézy mikrobiálních nukleových kyselin. Dále bývá narušena integrita buněčné stěny a buněčné membrány [10, s. 276].

### 1.3 Klasifikace

Pokračují snahy o systematické uspořádání doposud získaných údajů o chemické struktuře a výskytu sekundárních látek v přírodě. Ačkoli zatím bylo analyzováno pouze 20–30 % vyšších rostlin, podařilo se z nich izolovat již několik desítek tisíc těchto látek. Jejich chemická struktura byla identifikována pomocí moderních analytických metod – hmotnostní spektrometrie, nukleární magnetické rezonance nebo rentgenové difrakce [4, s. 2].

Ke klasifikaci sekundárních metabolitů rostlin lze použít hledisko strukturní (alkaloidy, terpeny, heteroglykosidy aj.), hledisko jejich biogeneze (odvozené od aminokyselin, sacharidů, různých organických kyselin aj.) nebo hledisko funkční (barviva, fytohormony, fytoalexiny aj.). Vzhledem k často komplexní struktuře, zahrnující různé strukturní prvky, možnosti vzniku z různých prekurzorů a nejasnosti funkce mnoha sekundárních metabolitů, se při přehledu těchto látek používají spíše hlediska kombinovaná [5, s. 67].

#### 1.3.1 Klasifikace dle biologických funkcí

Obecně platí, že sekundární metabolity vykonávají v rostlinných pletivech řadu rozličných biologických funkcí. V souvislosti s předmětem praktické části předkládané práce je třeba vyzdvihnout zejména obrannou roli sekundárních metabolitů při ochraně rostlin vůči případným vnějším činitelům. Vnější podnětem může být nejen napadení viry a fytopatogenními organismy (bakteriemi, plísněmi), ale také různé stresové faktory (UV záření, nepříznivé klimatické podmínky, ionty těžkých kovů, nedostatek vody, ošetření herbicidy, fungicidy aj.) [11, s. 581]; [12, s. 355].

Podle biologických funkcí lze sekundární metabolity rozdělit na tyto hlavní skupiny:

- intracelulární a extracelulární přenašeče informací (fytohormony),
- efekторы jiných organismů (barviva, vůně, atraktanty, fytoalexiny, toxiny, insekticidy),
- faktory umožňující využívání specifických ekologických situací (chelatační činidla, rostlinná antibiotika, inhibitory antibiotické aktivity),
- skladovací formy odpadních produktů primárního metabolismu (silice, balzámy, pryskyřice, fytosteroly, saponiny, alkaloidy, hořčiny, glykosidy) [1, s. 109]; [3, s. 63].

### 1.3.2 Klasifikace dle biosyntézy

Dlouho se předpokládalo, že syntéza sekundárních metabolitů je specifickým rysem látkové přeměny rostlin. Nicméně důležité skupiny těchto látek byly prokázány i v kulturách mikroorganismů a u zvířat. S nejširší škálou se ovšem lze setkat v rostlinné říši. Největší rozšíření a pestrost sekundárních metabolitů u rostlin je důsledkem bohaté vnitřní sekrece, charakteristické právě pro rostliny. Sekundární metabolity v rostlinách většinou zůstávají a skladují se v jejich buněčných kompartmentech (např. vakuolách), buněčných stěnách nebo ve speciálních buňkách k tomu určených (např. lipofilní těkavé oleje a pryskyřice) [1, s. 110].

Navzdory enormní rozmanitosti sekundárních metabolitů je počet jim odpovídajících biosyntetických drah omezený a jasný, neboť sekundární metabolismus plynule navazuje na metabolismus primární, kdy tvorba sekundárních metabolitů probíhá biosyntézou, přeměnami a odbouráváním z meziproductů primárního metabolismu. Důležitý stavební materiál tvoří kódované aminokyseliny nebo jejich prekurzory (např. kyselina šikimová), acetyl- a succinyl-CoA a koenzymem A aktivované další karboxylové kyseliny, izopentenylidifosfát a sacharidy (viz Tabulka 1) [1, s. 110-111]; [4, s. 1].

Tabulka 1 – Skupiny sekundárních metabolitů podle způsobu jejich biosyntézy [1, s. 110].

Prekurzor (primární metabolit)	Metabolická dráha	Sekundární metabolity
aminokyseliny ferylpropanoidy šikimát	aminokyselinová  šikimátová	nekódované aminokyseliny, aminy, betalainy, kyano- genní glykosidy, alkaloidy, diketopiperaziny  skořicová kys., kumariny, lignin, lignany, fenoly, fenolkarboxylové kys., složky těkavých olejů  naftochinony, flavonoidy, fenoxaziny, chinoliny, fenaziny, akridiny
izopentenylidifosfát	mevalonová	fytoosteroly, terpeny
organické kyseliny acetát propionát	acetátová	deriváty mastných kyselin, polyketidy (antracénové deriváty, fenyلكarboxylové kyseliny, piperidinové deriváty)  methylkarboxylové kyseliny
cukry		neobvyklé sacharidy a heteroglykosidy, redukční produkty (cukerné alkoholy, cyklitoly), oxidační pro- dukty (uronové, aldonové a cukerné dikarboxylové kyseliny)



Další charakteristický rys biosyntézy představuje její kompartmentace v rostlinné buňce do různých reakčních prostorů. Většina biosyntetických cest prochází (alespoň parciálně) cytoplazmou. Některé alkaloidy (kofein, koniin), furanokumariny a některé terpeny (monoterpeny, diterpeny, karotenoidy) jsou syntetizovány v chloroplastech. Biogeneze vybraných alkaloidů může probíhat i ve vezikulech (protoberberiny) a mitochondriích (koniin). Sekviterpeny, fytosteroly a dolicholy se vytvářejí v endoplazmatickém retikulu nebo cytozolu. V endoplazmatickém retikulu také dochází k hydroxylaci lipofilních sloučenin. Jednotlivé kroky biosyntézy mohou probíhat v kompartmentech, případně se může jednat o různé rostlinné orgány, pletiva nebo organely [4, s. 7-8].

### **1.3.3 Klasifikace dle chemické struktury**

Hlavními skupinami rostlinných sekundárních látek jsou na základě chemické struktury fenolické látky, terpeny a alkaloidy [2, s. 140]. Podrobně rozebrány budou v tomto textu především fenolické látky kvůli jejich přímé souvislosti s praktickou částí diplomové práce.

## 2 FENOLICKÉ LÁTKY

Fenolické látky jsou široce distribuovány napříč celou rostlinnou říší a představují na anti-oxidanty bohatou složku lidské stravy [13, s. 3]. Dosud jich bylo identifikováno v rostlinných zdrojích přes 8000, přičemž jejich obsah může dosahovat až několika gramů na kilogram [10, s. 478]. V přírodě zastávají důležité fyziologické funkce jako přenašeče elektronů, impregnační materiál buněčných stěn a strukturální materiál dodávající rostlinám stabilitu, ochrana před UV-zářením, lákadla opylovačů, signální látky a fytoalexiny [2, s. 141].

V potravinách jsou rostlinné fenoly a polyfenoly objektem pokračujícího výzkumu nejen potravinářských chemiků, kteří stanovují jejich výskyt a strukturní charakteristiky, ale také pracovníků v biomedicíně výzkumu. V posledních letech byly zpřesněny znalosti o chemické struktuře fenolických sloučenin a také o koncentraci v potravinách. Potvrdily se i jiné než antioxidační účinky. Epidemiologická data především upozorňují na korelaci mezi množstvím polyfenolů v potravě a snížením rizika kardiovaskulárních onemocnění. Některé z nich, zejména ty blokující iniciační a progresní fáze karcinogeneze, jsou využívány ve studiu rakoviny a slibují využití nejen v prevenci, ale i v terapii tohoto onemocnění. V biologických testech s tkáňovými kulturami, v pokusech na zvířatech a s lidskými dobrovolníky i v klinických studiích se opakovaně prokazuje, že tyto látky nemají pouze aditivní, ale často synergistické účinky. Projevují se běžně antioxidační aktivitou, která převyšuje celkovou antioxidační kapacitu vitamínu C a E a karotenoidů vyskytujících se v téže potravě. Předpokládá se, že na protektivním účinku se podílí schopnost rostlinných polyfenolů inaktivovat reaktivní kyslíkové radikály a omezovat jejich tvorbu chelatací iontů přechodných kovů, především kationtů železa, které jsou schopny generovat vysoce reaktivní hydroxylové radikály. Polyfenoly chrání lipoproteiny o nízké hustotě před oxidační modifikací, která je považována za jeden z klíčových dějů při rozvoji aterosklerózy. Mohou také působit proti vzniku krevních sraženin a tímto způsobem snižovat riziko infarktu myokardu nebo mozkové mrtvice [14, s. 226-227]; [16, s. 239].

Nové separační a identifikační metody uplatňované při analýze potravin umožňují získávat kvalifikovanější údaje o obsahu fenolických látek. Ukazuje se, že starší data byla často nadsazená, zároveň se potvrzuje, že charakteristiky biologické aktivity i při opravených koncentračních hodnotách zůstávají v platnosti. Běžné manipulace s potravinami rostlinné-

ho původu, jako je chlazení a zmrazování, pasterace a kuchyňské úpravy pravděpodobně obsah biologicky aktivních forem těchto látek podstatně neovlivňují. Rostlinné fenolické látky napomáhají ke zvýšení biologické hodnoty potravin, ve kterých se vyskytují, a jsou nositeli jejich kvality vyjadřované pojmem funkční potraviny. Předpokládá se, že některé potraviny jimi budou v příštích letech obohacovány. Příjem těchto sloučenin v potravě a zejména spotřeba potravin, jež jsou jejich zdrojem, tj. ovoce, zeleniny, cereálií, luštěnin a brambor, by se podle odborníků měl v naší společnosti významně zvýšit [14, s. 226-228]. Kromě potravinářství bývají používány jako aditiva v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu [17, s. 155].

Rostlinné fenolické látky představují chemicky značně různorodou skupinu sloučenin, v důsledku čeho jsou pestré i jejich vlastnosti a biologické účinky [18, s. 69]. Obecně jsou charakterizovány jako aromatické sekundární metabolity, které obsahují jeden nebo více hydroxylů vázaných přímo na aromatickou (fenylovou) část molekuly. Fenolické skupiny vnášejí do těchto látek slabě kyselý charakter, který je dosud využíván pro jejich detekci, izolaci i chemickou transformaci. Jsou také zdrojem jejich chemické reaktivity a často i biologických aktivit [18, s. 69]; [19, s. 623]. Pokud se na jednom nebo více aromatických jádrech nachází více než jedna fenolická funkční skupina, označují se jako polyfenoly. Tento pojem bývá zaměňován s termínem polymerních fenolických látek, který se stále častěji objevuje v odborné biologické i chemické literatuře [19, s. 623-624]. Fenolické látky jsou charakteristické především pro rostliny a jako skupina se v nich nacházejí běžněji ve formě esterů nebo glykosidů než jako volné sloučeniny [20, s. 2].

Je třeba poznamenat, že termín „polyfenol“ je předmětem probíhajících diskuzí. Podle mnohých odborníků je tento výraz vágní a někdy matoucí, protože pouze z chemického hlediska naznačuje, že v molekule sloučenin je vyšší počet (2–20) fenolických hydroxylů, nehovoří však zároveň o povaze základního skeletu. Proto by měl být tento pojem používán k označení široké skupiny látek, které se vyskytují v určité rostlinné surovině (flavonoidy, taniny, fenolkarboxylové kyseliny, některé lignany) [21, s. 113]. Vznik a formování termínu „polyfenol“ lze datovat do 50. let 20. století, kdy T. Withe definoval taniny (třísloviny) jako „polyfenolické látky s molekulovou hmotností od 500 do 3000 Da a dostatečným počtem fenolických skupin schopných vytvářet příčné můstky v kolagenových vláknech (třísilit bílkoviny)“. Následně v roce 1962 E. C. Bate-Smithe a T.

Swain navrhli termín „polyfenol“, přičemž k výkladu tohoto pojmu pozměnili předchozí definici na „ve vodě rozpustné fenolické sloučeniny s molekulovou hmotností od 500 do 3000 Da, které kromě klasických vlastností charakteristických pro fenoly, mají schopnost vytvářet nerozpustné komplexy s alkaloidy, želatinou a dalšími proteiny“ [22, s. 7-8]. Kromě této obecné vlastnosti vykazují i řadu dalších biologických aktivit, které často souvisí s jejich antioxidační aktivitou [21, s. 113-114]. Posledně jmenovaná definice byla posléze rozšířena E. Haslamem, který navrhoval následující znění: „Ve vodě rozpustné rostlinné fenolické sloučeniny s molekulovou hmotností od 500 do 3000–4000 Da a obsahující 12 až 16 fenolických hydroxylových skupin na pět až sedm aromatických kruhů s molekulovou hmotností 1000 Da. Navíc, kromě klasických vlastností charakteristických pro fenoly, mají schopnost vytvářet nerozpustné komplexy s alkaloidy, želatinou a dalšími proteiny“ [22, s. 8]. Tato definice navrhovaná Haslamem, známá také jako White-Bate-Smith-Swain-Haslamova, zcela opomíjí množství literatury, která se o sloučeninách s jedním aromatickým kruhem a jednou hydroxylovou skupinou zmiňuje také jako o polyfenolech. Nejnovější formulace poskytnutá Quideauovou et al. se proto jeví jako více vhodná: „Termín polyfenoly by měl být používán k popisu rostlinných sekundárních metabolitů pocházejících výlučně z šikimátové cesty fenylypropanových látek a/nebo polyketidové dráhy, obsahujících více než jeden fenolový kruh a jejichž základní skelet je prostý jakékoliv dusíkaté funkční skupiny“ [23, s. 197-198].

Fenolické látky představují velmi rozsáhlou a různorodou skupinu chemických sloučenin [20, s. 2]. Jejich struktura se pohybuje od jednoduchých aromatických sloučenin o malé molekulové hmotnosti až k vysokomolekulárním komplexům jako jsou polyfenoly. Tyto sloučeniny jsou syntetizovány především z uhlovodíků skrze šikimátovou nebo acetátovou metabolickou cestu [17, s. 155]. Nejběžnější typy rostlinných fenolických látek lze přehledně klasifikovat např. podle počtu uhlíků a jejich vzájemných vazeb (viz Tabulka 2). Všechny typy uvedené v této tabulce mohou tvořit polyfenoly nebo jejich methoxy-, methylenedioxy-, acyloxy- a mnoho dalších derivátů [19, s. 623]. Další možnou kategorizaci dle chemické struktury představuje členění na flavonoidy a neflavonoidy, které bude použito i v tomto textu [24, s. 54].

Tabulka 2 – Nejběžnější typy fenolických látek v rostlinách seřazené podle počtu uhlíků [19, s. 623]; [25, s. 100].

Složení	Počet uhlíků	Typy fenolických látek	Příklady
$C_6$	6	jednoduché fenoly, benzochinony	katechol, hydrochinon
$C_6-C_1$	7	fenolické kyseliny	kyselina salicylová
$C_6-C_2$	8	acetofenony, benzofurany	izobenzofuranon
$C_6-C_3$	9	fenylpropanoidy, benzopyrany	chromen, kumariny
$C_6-C_4$	10	naftochinony	juglon, plumbagin
$C_6-C_5$	11	ageratochromeny (prekoceny)	prekocen I, II
$(C_6)_2$	12	dibenzofurany, dibenzochinony, bifenyly	difenyleter, PCB
$C_6-C_1-C_6$	13	dibenzopyrany, benzofenony, xantony	difenylmetan, fluoren
$C_6-C_2-C_6$	14	stilbeny, antrachinony, fenantreny	resveratrol, emodin
$C_6-C_3-C_6$	15	flavonoidy, izoflavony, chalkony, aurony	kvercetin, genistein
$C_6-C_4-C_6$	16	norlignany (difenylbutadieny)	hinokirezol
$C_6-C_5-C_6$	17	norlignany (conioidy)	sugirezol
$(C_6-C_3)_2$	18	lignany, neolignany	podofylotoxin, trachelosid
$(C_6-C_3-C_6)_2$	30	biflavonoidy	amentoflavon
$(C_6-C_3-C_6)_n$	$n$	kondenzované taniny (flavolany)	gallotaniny, ellagitaniny
$(C_6-C_3)_n$	$n$	ligniny	guajacylové ligniny
$(C_6)_n$	$n$	katecholmelaniny	rostlinné pigmenty

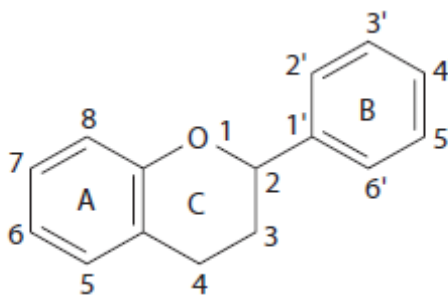
## 2.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou polyfenolické látky, jejichž základní strukturu tvoří flavanový skelet s uspořádáním  $C_6-C_3-C_6$ , jak znázorňuje Obrázek 1 [17, s. 156]. Flavanový skelet se skládá ze dvou substituovaných kruhů (A a B) a pyranového kruhu C napojeného na kruh A. Běžně bývají všechny tři kruhy substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace [26, s. 19]. Substituce mění rozpustnost flavonoidů, kdy hydroxylace a glykosylace vede k hydrofilitě sloučenin, zatímco jiné reakce, jako např. methylace, vedou k větší lipofilitě [17, s. 156].

Heterocyklus C, obsahující kyslíkový atom, zodpovídá za typické reakce flavonoidů. Fenyl B může být napojen na pyranový kruh v pozici 2 (běžné flavonoidy, mezi něž patří většina flavonoidních barviv), v pozici 3 (izoflavonoidy) nebo v postavení 4 (neoflavonoidy). Další

z klasifikace je založena na stupni oxidace pyranového kruhu. Potom se jedná o flavany, flavanoly, flavony, flavonoly, antokyaniny atd. [9, s. 70].

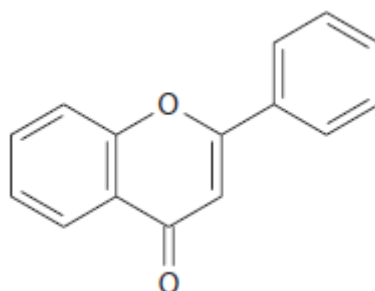
Flavonoidy tvoří nejrozsáhlejší skupinu ze všech rostlinných fenolických sloučenin. V rostlinách fungují jako ochranné filtry před ultrafialovým zářením, podílí se na pigmentaci květů a odolnosti vůči chorobám. [17, s. 156]. Vyskytují se jako volné látky nebo častěji jako glykosidy. Flavonoidních látek je v současnosti známo kolem 5000, ale pouze některé mají významné biologické účinky, jsou důležité pro svoji chuť nebo se používají jako přírodní rostlinná barviva. Většina z nich se v potravinách účastní reakcí enzymového hnědnutí. Jejich schopnost vázat těžké kovy se spolu se schopností terminovat radikálové oxidační reakce propůjčuje flavonoidům antioxidační vlastnosti [26, s. 19, s. 29]; [4, s. 2].



Obrázek 1 – Flavanový skelet [13, s. 173].

### 2.1.1 Flavony

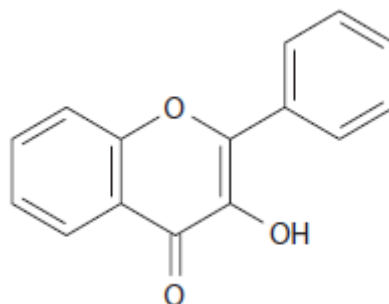
Flavony obsahují v pozici 4 flavanového skeletu oxoskupinu (viz Obrázek 2). V rostlinách se vyskytují buď ve volné formě, nebo vázané jako glykosidy či estery. Flavony mívají žluté zbarvení, ale většinou je překrývají intenzivněji vybarvené látky [5, s. 70]. Kruhy A a B flavanového skeletu mohou být výrazně substituovány. Probíhají zde hydroxylace, methylace, alkylace i glykosylace [27, s. 31]. Běžnými sloučeninami v potravinách jsou flavony substituované v polohách 5, 7 a 4'. Fungují jako přírodní inhibitory škodlivých oxidačních změn v potravinách. Ve vyšších koncentracích se v potravinách vyskytuje především apigenin, který je obsažen v petrželi, celeru a heřmánku. Dalšími zástupci jsou luteolin, nobiletin a tangeretin [26, s. 30]; [3, s. 173].



Obrázek 2 – Flavony [13, s. 173].

### 2.1.2 Flavonoly

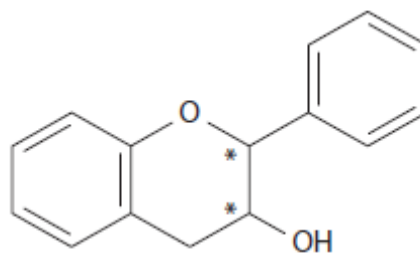
Jedná se pravděpodobně o nejrozšířenější skupinu flavonoidů. Strukturně se velmi podobají flavonům (viz Obrázek 3) [28, s. 5]. Všechny významnější flavonoly v potravinách mají v poloze 3, 5, 7 a 4' hydroxyskupinu a vzájemně se liší substitucí v poloze 3' a 5'. Hlavními zástupci jsou především kvercetin, kemferol a myricetin, které se v rostlinách nacházejí především ve formě glykosidů. Jako volné aglykony se vyskytují v poměrně malém množství [26, s. 31]. Nejvýznamnějším z uvedených flavonolů je kvercetin, jedno z nejrozšířenějších barviv v přírodě. Vykytuje se v dubové kůře, chmelu i česneku. Je oranžově hnědý a tvoří aglykon několika glykosidů, např. rutinu izolovaného z routy vonné a ovlivňujícího permeabilitu buněčných stěn [3, s. 173].



Obrázek 3 – Flavonoly [13, s. 173].

### 2.1.3 Flavan-3-oly

Odvozují se stejně jako ostatní flavonoidy od flavanového skeletu, který je v tomto případě substituován hydroxylovými skupinami v poloze 3 (viz Obrázek 4) [18, s. 71]. Tyto sloučeniny se v rostlinách vyskytují ve formě monomerů, izomerů až po oligomery a polymery, které jsou známy jako kondenzované taniny [27, s. 31].



Obrázek 4 – Flavan-3-oly [13, s. 173].

### 2.1.3.1 Monomery

Monomerní flavan-3-oly jsou bezbarvé látky postrádající vlastnosti taninů. Vznikají jako produkty biosyntézy dalších flavonoidů. Vyskytují se prakticky ve všech druzích ovoce a zeleniny. V rostlinných materiálech jsou dobře prostudovány flavan-3-oly nazývané jako katechiny, jejichž kruh B je odvozen od kyseliny protokatechové a dále gallokatechiny odvozené od kyseliny gallové. Jedná se o chirální sloučeniny, takže se mohou vyskytovat ve čtyřech izomerech. Ačkoliv biosyntéza těchto látek v rostlinách umožňuje vznik všech čtyř izomerů, v přírodě se ale nalézají pouze (+)-katechiny, (+)-gallokatechiny a (-)-epikatechiny a (-)-epigallokatechiny. Množství katechinů v ovoci se běžně pohybuje v jednotkách až stovkách miligramů na kilogram [29, s. 266-267]; [21, s. 114].

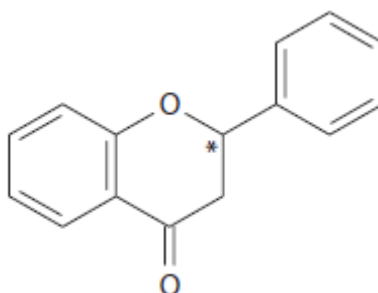
### 2.1.3.2 Kondenzované taniny

Kondenzací monomerních flavanolů vznikají dimerní, vyšší oligomerní až polymerní kondenzované třísloviny nebo kondenzované taniny nazývané proantokyanidiny [26, s. 268]. Vyskytují se ve formě dimerů a trimerů, které snadno podléhají enzymové oxidaci za vzniku polymerních hnědě až červeně zbarvených látek. Příkladem je hnědnutí rozříznutého jablka nebo mechanicky poškozeného listu [1, s. 74]. Adstringentní vlastnosti a také hořkou chuť vykazují polymery vzniklé kondenzací 2 až 10 flavanových jednotek, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje zhruba 500 Da. Proantokyanidiny odvozené v kruhu B od prokatechové kyseliny se nazývají prokyanidiny, deriváty kyseliny gallové jsou označovány jako prodelfinidiny [26, s. 266-268]. Proantokyanidiny byly izolovány z mnoha druhů rostlin a jsou často součástí lidské stravy. Jejich nejrozsáhlejší skupinu tvoří prokyanidiny skupiny B. Prokyanidin B-1 se nachází např. v grepu, čiroku, brusinkách, B-2 v jablcích, třešních, B-3 v jahodách, chmelu a B-4 v malinách a ostružinách. Známými zdroji jsou dále červené víno, zelený čaj, kakao nebo čokoláda [21, s. 114].



### 2.1.4 Flavanony

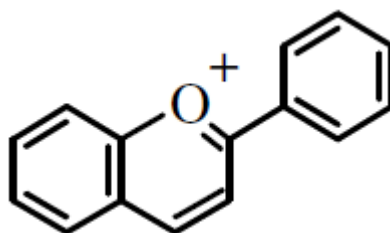
Flavanony jsou charakteristické nepřítomností  $\Delta^{2,3}$  dvojité vazby a vznikem chirálního centra v poloze 2, jak znázorňuje Obrázek 5. Díky dvě struktuře jsou velmi reaktivní [28, s. 12-13]. V potravinách jsou tyto bezbarvé až světle žluté sloučeniny rozšířeny poměrně málo. Ve vyšších koncentracích se nacházejí pouze v citrusovém ovoci. Nejvýznamnějšími aglykony jsou naringenin a hesperetin [26, s. 29-30].



Obrázek 5 – Flavanony [13, s. 173].

### 2.1.5 Antokyaniny

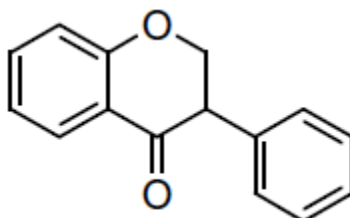
Antokyaniny jsou ve vodě rozpustná červená, modrofialová až modrá barviva květů, listů a plodů vyšších rostlin [5, s. 3]. Jejich barva je značně závislá na pH prostředí a přítomnosti iontů některých kovů, zvláště železitých a hlinitých [3, s. 173]. Jsou zapojeny do ochrany rostlin před nadměrným slunečním zářením a také slouží jako atraktanty pro opylující hmyz [27, s. 33]. Jedná se o nejrozšířenější a početně velmi rozsáhlou skupinu rostlinných barviv. Po chemické stránce jsou antokyaniny glykosidy, jejichž aglykon tedy vlastní barevnou část, tvoří antokyanidiny. Základní strukturu – flavyliový iont – zobrazuje Obrázek 6. Cukernou složkou bývá glukóza, galaktóza, rhamnóza nebo arabinóza popř. různé oligosacharidy [9 s. 3]. Nejrozšířenějšími jsou antokyanidiny kyanidin (barvivo chrpy), pelargonidin (pelargonie), delphinidin (stračka), petunidin (petunie), malvidin (sléz) a peonidin (pivoňka), které se v rostlinných materiálech nacházejí ve formě glykosidů. Volné aglykony se vyskytují v rostlinných pletivech zřídka a pouze ve stopových množstvích [26, s. 21].



Obrázek 6 – Flavyliový kation [27, s. 30].

### 2.1.6 Izoflavonoidy

Tyto žluté pigmenty obsahují kruh B spojený s pyranovým kruhem C v poloze 3 (viz Obrázek 7) [28, s. 19]. V rostlinách byly ve vyšších koncentracích prokázány pouze v luštěninách, zejména semenech sóji. V menším množství se vyskytují v některých dalších rostlinných čeledích jako např. laskavcovitých, morušovníkovitých, kosatcovitých a růžovitých. Hlavními představiteli těchto látek jsou izoflavony a od nich oxidací a cyklizací během biogeneze odvozené izoflavanony a pterokarpany. Izoflavony a některé jejich deriváty se řadí mezi toxické látky z důvodu své estrogení aktivity. Kromě toho některé vykazují antimikrobní účinky. V sójových bobech se nachází aglykon daidzein, který je nejaktivnějším estrogením izoflavonem, a také genistein, formononetin, glycitein a biochanin A. Izoflavony se vyskytují především jako glukosidy [26, s. 109].



Obrázek 7 – Izoflavony [30, s. 23].

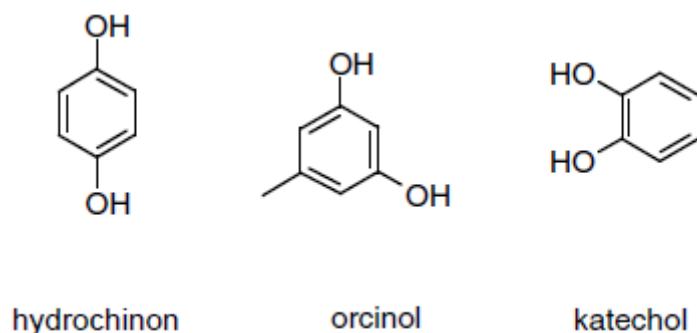
## 2.2 Neflavonoidy

Hlavní skupiny neflavonoidních látek v rostlinách jsou jednoduché fenoly, fenolické kyseliny a stilbeny [17, s. 160].

### 2.2.1 Jednoduché fenoly

Obsahují aromatický kruh s jednou nebo více hydroxylovými skupinami [3, s. 91]. Fenoly ve volné formě jsou v rostlinách vzácné. Nejrozšířenějším z nich je hydrochinon. Podzimní tmavnutí některých listů je projevem oxidace chinonu a jeho glykosidu arbutinu na přísluš-

né chinony. Další fenoly jako pyrogallol, katechol, orcinol a floroglucinol se nacházejí v přírodě ve volné formě podstatně méně, spíše se vyskytují jako součást taninů a glykosidů [31, s. 25]; [9 s. 72]. Jednoduché fenoly vykazují antioxidační i antimikrobní aktivitu. Zejména se jedná o hydrochinon, guajakol, izoeugenol a salicylaldehyd. Vysokou antioxidační aktivitu vykazují také fenoly, které jsou obvyklou součástí některých druhů koření. Zástupci těchto sloučenin mohou být např. v mateřídoušce obecné se vyskytující thymol a karvakrol [2, s. 142]; [12, s. 366]. Základní jednoduché fenoly znázorňuje Obrázek 8.



Obrázek 8 – Jednoduché rostlinné fenoly [30, s. 21].

### 2.2.2 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny jsou odvozeny zejména od kyseliny benzoové ( $C_6-C_1$ ) a *trans*-skořicové ( $C_6-C_3$ ), které se spolu s geneticky příbuznými alkoholy, z nichž je vystavěn lignin, označují též jako fenylpropeny nebo fenylpropanoidy [18, s. 73]. Bývají běžnou součástí všech rostlinných materiálů, přičemž jejich množství v pletivech se mění v závislosti na druhu rostliny, stupni zralosti i růstových podmínkách [32, s. 2867]. Fenolické kyseliny a jejich deriváty mají výborné antioxidační účinky. Tato aktivita závisí na počtu hydroxylových skupin v molekule. Za aktivnějšími antioxidanty jsou obecně pokládány skořicové kyseliny a *o*-difenoly např. kyselina kávová a její ester chlorogenová kyselina [12, s. 366-367]. V přírodě se mohou vyskytovat ve volné formě, nicméně mnohem častěji se nacházejí vázané v esterech, éterech nebo glykosidech jako součást strukturních složek rostlin (celulóza, proteiny, lignin), polyfenolů (flavonoidy), menších organických molekul (glukóza, kyselina maleinová, kyselina tartarová) nebo dalších přírodních látek (terpeny). Jejich přítomnost v potravinách je spojována s barvou, sensorickými, nutričními a antioxidačními vlastnostmi. Potravinářský průmysl se zabývá vlivem profilu a obsahu těchto látek na zrání ovoce, prevenci enzymatického hnědnutí a údržnost potravin [32, s. 2867]. Příklady hydrobenzoových a hydroxyskořicových kyselin ilustrují Obrázek 9 a Obrázek 10.

### 2.2.2.1 Kyseliny hydroxybenzoové a jejich deriváty

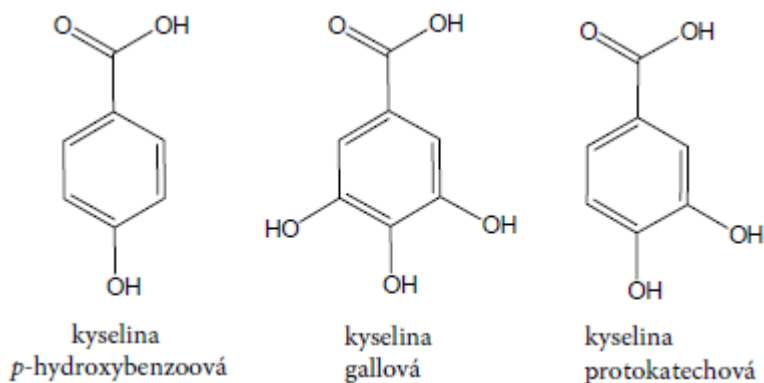
Jedná se o jednoduché fenoly s navázanou karboxylovou skupinou [3, s. 92]. V rostlinách jsou dosti rozšířené, zejména jako polymery kyseliny gallové tj. hydrolyzovatelné taniny (třísloviny) [2, s. 142]. K dalším zástupcům se řadí kyseliny *p*-hydroxybenzoová, protokatechová, salicylová a vanilová [20, s. 2]. Některé z nich jsou znázorněny na Obrázku 9.

Hydrolyzovatelné taniny jsou většinou estery glukózy nebo jiných polyalkoholů s kyselinou gallovou, tzv. gallotaniny, nebo kyselinou ellagovou, ellagitaniny [9, s. 74]. Jejich relativní molekulová hmotnost bývá přibližně do 5 kDa. Vyznačují se trpkou chutí, která je způsobena, stejně jako u kondenzovaných taninů, interakcí proteinů slin s fenolickými hydroxylovými skupinami, jež jsou jejich součástí [29, s. 263]. Hydrolyzovatelné taniny jsou charakteristické pro duby (kůra, dřevo, duběnky) a řadu léčivých bylin [18, s. 72].

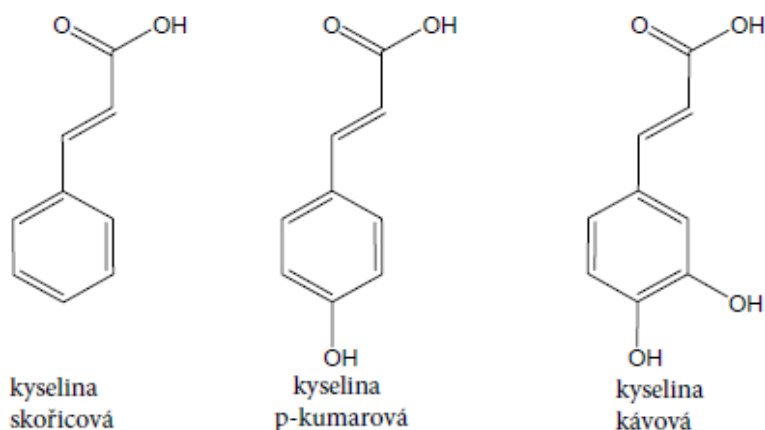
Oba druhy taninů, hydrolyzovatelné a kondenzované, bývají v literatuře často uváděny společně jako jedna samostatná skupina polyfenolických látek – tříslovin, nicméně v tomto textu je brána v úvahu především jejich zcela odlišná chemická stavba, od níž se odvíjí i použité rozčlenění na deriváty flavan-3-olů a hydroxybenzoových kyselin.

### 2.2.2.2 Kyseliny hydroxyskořicové a jejich deriváty

Obsahují uhlíkový skelet fenylypropanu – aromatický systém s připojeným postranním řetězcem ze tří atomů uhlíku [3, s. 93]. Nejběžnějšími zástupci jsou kyseliny *p*-kumarová, kávová a ferulová, jež se často vyskytují jako estery s vinnou kyselinou v podobě kyseliny koutarové, kaftarové a fertarové [33, s. 12]. Kyselinu skořicovou včetně některých svých homologů zobrazuje Obrázek 10.



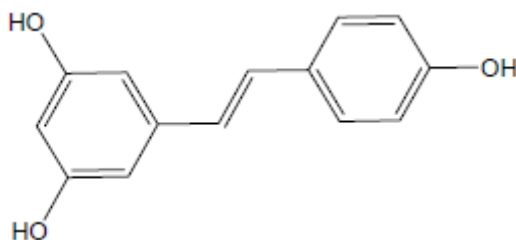
Obrázek 9 – Hydroxybenzoové kyseliny [20, s. 4].



Obrázek 10 – Skořicová kyselina a její homology [20, s. 5].

### 2.2.3 Stilbeny

Stilbeny (také nazývané diarylethanoidy) jsou polyfenolické sloučeniny obsahující ve své molekule strukturu C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>. Hypoteticky jsou odvozeny od uhlovodíku *trans*-stilbenu. Volné stilbeny se v malém množství nacházejí v několika druzích rostlin, kde doprovázejí příslušné glykosidy. Základním členem řady běžných stilbenů je *trans*-pinosylvin (viz Obrázek 11), který se vyskytuje s dalšími stilbeny hlavně v jehličnanech. Stilbeny je možné řadit mezi fytoalexiny, sloučeniny produkované rostlinami jako odpověď na napadnutí houbovými, bakteriálními a virovými patogeny. Představitelem stilbenů s antimikrobními, antioxidačními a fungicidními účinky je *trans*-resveratrol. Jedná se o látku produkovanou omezeným počtem rostlinných druhů jako reakce na biotický a abiotický stres. Resveratrol je syntetizován některými luštěninami, révou vinnou, jehličnany a některými dalšími rostlinami [12, s. 356]; [33, s. 12].

Obrázek 11 – *Trans*-resveratrol [20, s. 16].

### 3 CHARAKTERISTIKA SUROVIN PRO PŘÍPRAVU NETRADIČNÍCH ROSTLINNÝCH OLEJŮ

Podle množství vyráběného oleje představují hlavní světové olejninu sója, palma, řepka a slunečnice. Kromě toho existuje řada dalších olejnatých surovin, které mají místní nebo jinak omezený význam a na globálním trhu se výrazně neuplatňují. [37, s. 297]. Obecně se jedná o plodiny vykazující specifické vlastnosti, které získané oleje předurčují k technickým, kulinářským, nutričním či zdravotním účelům. Mezi tyto suroviny můžeme řadit avokádo, argánii, lničku, dýni, rakytník, mango, révu, brutnák, makadámii aj. [40, s. 291-324]; [41, s. 12-13]. Podrobněji bude v rámci textu charakterizována réva vinná z důvodu návaznosti na praktickou část předložené diplomové práce.

#### 3.1 Réva vinná (*Vitis vinifera* L.)

Čeleď *Vitaceae* L. (révovité) zahrnuje asi 700 druhů zařazených do 14 rodů. Hospodářsky nejvýznamnější je rod *Vitis* (réva) [34, s. 16]. Všechny druhy poskytují jedlé, ovšem ne vždy chutné ovoce. Zdaleka nejdůležitějším druhem je réva vinná (*Vitis vinifera* L.) zahrnující více než 95 % veškeré celosvětové produkce hroznů, která podle aktuálních údajů dosahuje necelých 71 milionů tun ročně (databáze FAO STAT, 2011) [35, s. 259-260]; [36]. Plocha světových vinic zabírá 7.66 mil. ha, z toho největší rozlohu zaujímají vinice v Evropě, následuje Asie a Amerika [34, s. 14]. Réva vinná (*Vitis vinifera* L.) se dělí na dva poddruhy. Prvním je ušlechtilá réva vinná – *Vitis vinifera* subs. *vinifera* označovaná také jako evropská réva vinná. Druhý poddruh představuje divoká forma nazývaná lesní réva – *Vitis vinifera* subs. *silvestris*. Oba poddruhy lze odlišit především podle morfologických znaků. Vlivem domestikace docházelo k morfologickým a fyziologickým změnám, které se týkaly především velikosti a kvality bobulí, větší a pravidelnější plodnosti a vyšší cukernatosti hroznů. Z původní lesní formy se tak oddělila réva ušlechtilá [34, s. 17]. Cíleně pěstované tzv. kulturní odrůdy jsou určeny převážně pro přímý konzum jako ovoce. Moštové odrůdy jsou hlavní surovinou pro výrobu révových vín, moštů nebo různých nealkoholických nápojů. Rozdělují se obvykle na odrůdy určené pro výrobu bílých vín, k nimž patří odrůdy se zelenými, žlutými, růžovými nebo červenými hrozny a na odrůdy určené pro výrobu červených vín, k nimž patří pouze odrůdy s modrou barvou bobulí [37, s. 384].

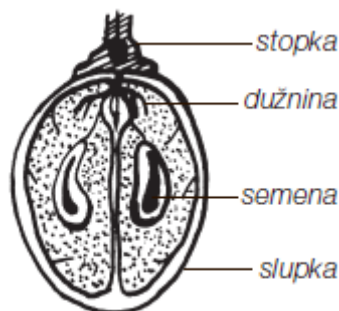
Aktuálně roste význam révy vinné jako cenného zdroje fytonutrientů. Zájem vědecké obce se soustřeďuje zejména na její příznivý vliv ve vztahu ke kardiovaskulárnímu systému a možné chemoprotektivní účinky [38, s. 154].

### 3.1.1 Morfologická stavba hroznu

Plodem révy vinné je bobule – dužnatý plod, který se po úspěšném opylení a oplození vyvíjí z pletiv vajíčka. Květenství se přeměňuje na souplodí – hrozen [34, s. 61]. Po morfologické stránce se hrozny révy vinné skládají z třapin se stopkami, které tvoří hlavní nosnou kostru hroznu a z bobulí různé velikosti, barvy a tvaru [37, s. 386].

Třapina vzniká změnou osy květenství, při níž se zvětšují mechanická a vodivá pletiva, a představuje přibližně 3–7 % z celkové hmotnosti hroznu. V závislosti na stupni zralosti obsahuje malé množství cukrů, průměrnou koncentraci kyselin a vysoký obsah fenolických látek. Na celkovém obsahu fenolických látek v hroznu se třapina podílí asi 20 %. Bobule ke třapině upevňují stopky [34, s. 61].

Bobule se skládají ze skupiny pletiv nazývaných perikarp (oplodí), která obklopují semena. Perikarp se rozděluje na exokarp (slupku), mezokarp (dužninu) a endokarp (pletivo ohraničující semena) [34, s. 61]. Řez bobulí je znázorněn na Obrázku 12.



Obrázek 12 – Řez bobulí révy vinné  
[42, s. 197].

Slupku bobule tvoří kutikula, epidermis a hypodermis. Kutikula je vrstva na povrchu bobule a v závislosti na odrůdě může být různě silná [34, s. 61]. Na jejím povrchu se může vyskytovat tenká vosková vrstva zabraňující odpařování vody, chránící bobule před účinky dešťové vody a postřiků, hmyzu a mikroorganismů [37, s. 386]; [39, s. 181]. Slupka bývá různě zbarvená. Bílé odrůdy mívají zelené, žlutozelené a jantarové bobule. Červené odrůdy mají slupky červené až červenofialové barvy. U modrých odrůd bývají slupky tmavočerve-

né, modré až tmavomodré. Slupky mohou být tenkostěnné nebo tlustostěnné podle odrůdy, jejich hmotnost tvoří v průměru 8–10 % hmotnosti bobule. Sytost zbarvení bobulí je podmíněna stupněm jejich zralosti [39, s. 181]. Koncentrace cukru v buňkách slupky je velmi nízká, obsah kyselin vyšší. Slupka obsahuje hlavně kyselinu citronovou. Hodnota pH bývá ve slupce vyšší než v dužnině. Charakterizuje ji zejména obsah sekundárních metabolitů, předně fenolických a aromatických (vonných) látek [34, s. 62].

Dužninu tvoří velké mnohoúhelníkovité buňky s tenkými buněčnými stěnami. Tyto buňky vytvářejí 25–30 vrstev rozdělených na tři různé části. Dužnina představuje 75–85 % z celkové hmotnosti bobule [34, s. 62]. Dužnina většiny odrůd je bezbarvá, jen výjimečně je narůžovělá až načervenalá a obsahuje převážně sladkou šťávu – mošt. Pouze u odrůd zvaných barvířky obsahují antokyanová barviva [37, s. 386]. Dužnina obsahuje cukry, zvláště glukózu a fruktózu. Sacharóza se vyskytuje minimálně. Z organických kyselin mají nejvýznamnější zastoupení kyseliny vinná a jablečná, z anorganických kyselina fosforečná. Hlavními dusíkatými složkami jsou amonné ionty, aminokyseliny a bílkoviny. Dužnina bývá rovněž bohatá na kationty, z nichž nejvýznamnější je draslík, dále následuje vápník, hořčík, sodík a zinek. Sekundární metabolity v dužnině zastupují vonné látky a u barvířek rovněž antokyany [34, s. 62].

Semena jsou uložena uvnitř bobulí ve formě peciček s vysokým obsahem lipidů a tříslovin [37, s. 386]. Morfologie semen je odrůdovou vlastností, přičemž počet semen v bobuli a jejich hmotnost mohou být v různé závislosti na stanovišti, ročníku a ošetřování vinice. Délka semen bývá 3–8 mm, šířka 3–5 mm a činí 0,6 % z celkové hmotnosti bobule. Semena představují významný zdroj fenolických látek (až 20–55 %) [34, s. 62]. Dále také obsahují 10–20 % olejů, které se skládají z acylglycerolů, kyseliny stearové, palmitové a linolové. Ze semen se vyrábí jedlý olej a vinný tanin [39, s. 182].

### 3.1.2 Sekundární metabolity hroznů

Sekundární metabolity hroznů se nacházejí v jejich dřevnatých částech, listech, stoncích bobulích. Přestože jsou plody hroznů konzumovány jako ovoce a spolu se stonky slouží k výrobě vína, listy se jako zelenina běžně nekonzumují. Výjimku tvoří některé typické pokrmy z řecké a středovýchodní kuchyně, jako např. vinné listy plněné rýží [11, s. 582].



V rostlinách rodu *Vitis* bylo dosud identifikováno několik tisíc fytochemikálií, včetně tří hlavních skupin bioaktivně působících látek, fenolických sloučenin, terpenů a alkaloidů, široce rozšířených v potravinách rostlinného původu a léčivkách [11, s. 582].

### 3.1.2.1 Fenolické látky

Fenolické látky u odrůd révy vinné se nacházejí primárně ve slupce bobulí a semenech, v menší míře v třapině a dužnině. Jejich obsah ovlivňuje odrůda, pěstitelské podmínky, mezi něž můžeme zařadit nejen klimatické a půdní vlastnosti stanoviště, ale i agrotechnické zásahy používané na vinici. Tabulka 3 dokládá obsah fenolických látek v různých částech hroznu v závislosti na barvě odrůdy. Celkové vyšší zastoupení polyfenolů v modrých odrůdách je ovlivněno přítomností červených pigmentů antokyaninů v jejich slupce [43, s. 11]; [44, s. 403].

Hrozny révy vinné patří mezi ovoce s nejvyšším množstvím fenolických látek a představují tak jeden z jejich hlavních zdrojů v potravě [17, s. 154]. Zájem o chemické složení a zdravotní benefity plynoucí z konzumace hroznů révy vzrostl po jednom z pravděpodobných objasnění tzv. francouzského paradoxu. Tedy, že zvýšený příjem červeného vína, které je zvláště bohaté na polyfenoly, zodpovídá za nízkou mortalitu na kardiovaskulární onemocnění při relativně vysokém obsahu tuků v potravě Francouzů [16, s. 239]. V poslední době se pozornost výzkumu zaměřuje na jejich antioxidační, kardioprotektivní, antikancerogenní, protizánětlivé a antimikrobní vlastnosti [45, s. 626].

Fenolické sloučeniny v hroznech lze rozdělit na základě chemické struktury na flavonoidy a neflavonoidy. Do skupiny neflavonoidů se zařazují fenolové kyseliny a stilbeny. Flavonoidy zahrnují antokyany, flavan-3-oly a flavonoly [34, s. 71]. Přehled hlavních fenolických látek je znázorněn v Tabulce 4.

Tabulka 3 – Celkové množství fenolů (mg/kg FW) [44, s. 404].

Pletivo	Čerstvá hmotnost [%]	Modrá odrůda [mg/kg]	Bílá odrůda [mg/kg]
Slupka	15	1800	900
Dužnina	1	40	35
Mošt	78	210	175
Semena	6	3500	2800
Celkem	100	5600	3900

Tabulka 4 – Základní rozdělení fenolických sloučenin v hroznech [34, s. 71].

<b>neflavonoidní fenolické látky</b>	<b>hydroxybenzoové kyseliny</b>	kyselina gallová
	<b>hydroxyskořicové kyseliny</b>	kyselina koutarová, kaftarová, fertarová
	<b>stilbeny</b>	resveratrol, piceid, piceatannol, astrigin
<b>flavonoidní fenolické látky</b>	<b>antokyaniny</b>	malvidin-3-glukosid, kyanidin-3-glukosid, delphinidin-3-glukosid, petunidin-3-glukosid
	<b>flavan-3-oly</b>	katechin, epikatechin, gallokatechin, epigallokatechin
	<b>flavonoly</b>	kvercetin, myricetin, kaempfenol, izorhamnetin

Fenolické kyseliny se nalézají ve vakuolách buněk dužniny a slupky hroznů. Jedná se o deriváty kyseliny benzoové a skořicové [24, s. 54-55]. Hydroxybenzoové kyseliny se v hroznech nacházejí hlavně ve formě glykosidů a esterů (gallové a elagické kyseliny). Kyselina gallová je nejvýznamnější a zároveň jediná hydroxybenzoová kyselina, která se nalézá přímo v hroznech, a to v pevných částech bobule [34, s. 71]. Její obsah v nich kolísá v rozmezí 100 až 230 mg/kg [17, s. 160]. Hydroxyskořicové kyseliny jsou hlavními fenolickými sloučeninami bílých odrůd. V bobulích se vyskytují jako estery kyseliny vinné ve vakuolách buněk slupky a dužniny. Jsou hlavními prekurzory tzv. těkavých fenolů, které způsobují hořké a připálené tóny a také zastřené a nevýrazné ovocné aroma charakteristické pro danou odrůdu. Konkrétně se jedná o kyselinu koutarovou, kaftarovou a fertarovou. Nejhojněji zastoupená je kyselina kaftarová v množství okolo 170 mg/kg, dále kyselina koutarová při 20 mg/kg a nakonec kyselina fertarová o obsahu 5 mg/kg hroznů [17, s. 160-161]; [34, s. 71, 78]; [44, s. 405].

Stilbeny se zařazují mezi fytoalexiny, tj. nízkomolekulární antimikrobiální látky, které tvoří réva vinná na ochranu proti abiotickým a biotickým stresům. Hlavním představitelem stilbenů je *trans*-resveratrol. Ve vinných hroznech je především přítomen ve slupkách bobulí červených odrůd. Doprovází jej zde *cis*-resveratrol a produkty oxidace, *trans*- a *cis*-piceatannol. Větší množství resveratrolu bývá také vázáno ve formě glykosidů jako *trans*-piceid a *trans*-astrigin. Resveratrol je kromě toho prekurzorem dimerního derivátu  $\epsilon$ -viniiferin a trimerního  $\alpha$ -viniiferinu, které vykazují vyšší fungicidní účinky než resveratrol. V poslední době se oceňují zejména kardioprotektivní a antikarcinogenní účinky resveratrolu [12, s. 356]; [34, s. 72]; [46, s. 68]. Biosyntéza obou izomerů resveratrolu byla sledo-

vána po dobu tří let u zdravých zrajících bobulí 78 odrůd révy vinné. Koncentrace resveratrolu se u pokusných kultivarů pohybovaly v rozmezí od 3-22 mg/l [17, s. 161].

Flavonoidy zastupují nejvýznamnější skupinu fenolických látek u révy vinné. V hroznech lze najít tři hlavní skupiny flavonoidů – antokyaniny, flavonoly a flavan-3-oly, které jsou syntetizovány především v slupce a jádrech bobulí. V menším množství je produkuje i stopka [34, s. 72]; [47, s. 284].

Flavonoly se v hroznech objevují ve slupkách bobulí, kde plní funkci ochrany před UV zářením. Vyskytují se zde v podobě glukosidů, galaktosidů a glukuronidů. Průměrný obsah flavonolů činí přibližně 50 mg/kg, přičemž kolísá mezi 10 až 285 mg/kg. Při tvorbě jejich analytického profilu u 91 odrůd révy vinné bylo zjištěno, že v modrých varietách je dominantním flavonolem kvercetin (43,99 %), následovaný myricetinem (38,81 %), kaempferolem (6,43 %), laricitrinem (5,65 %), izorhamnetinem (3,89 %) a syringetinem (3,22 %). V bílých odrůdách je hlavním reprezentantem kvercetin (81,35 %), následovaný kaempferolem (16,91 %) a izorhamnetinem (1,74 %) [17, s. 157-158]; [34, s. 72].

Antokyanová barviva se nalézají zejména u modrých odrůd – u většiny ve vakuolách buněk ve slupce, u některých lze najít zbarvenou také dužninu (odrůdy nazývané barvířky). V závislosti na pH buněčné šťávy mění svou barvu od červené po modrou. Jejich hlavní funkcí je ochrana rostlin vůči nadměrnému slunečnímu záření. Základ barviv u modrých odrůd tvoří antokyanidiny – malvidin, kyanidin, delfinidin, petunidin a peonidin. V hroznech bývají nestabilní a vyskytují se tudíž jako antokyaniny většinou vázané na glukózu, která je stabilizuje. Mezi antokyaniny hroznů se zařazují malvidin-3-glukosid, dále kyanidin-3-glukosid, delfinidin-3-glukosid, petunidin-3-glukosid a peonidin-3-glukosid. Antokyaniny se vytvářejí v průběhu zrání hroznů a jejich obsah v bobulích bývá ovlivněn ročníkem i pěstitelskými podmínkami. Složení antokyanů, které vznikají ve slupkách bobulí v průběhu dozrávání, se mění podle odrůdy. Každá jedna má tedy vlastní vzorec těchto sekundárních metabolitů, který lze využít ke klasifikaci odrůd. V modrých odrůdách jejich obsah dosahuje přibližně 500-3000 mg/kg. V případě barvířek se může jednat až o 5000 mg/kg [17, s. 160]; [34, s. 72].

Flavan-3-oly a jejich polymery označované jako proantokyanidiny nebo také kondenzované taniny se nacházejí ve slupkách bobulí, semenech a třapínách. Jedná se o nejhojněji zastoupené sloučeniny v hroznech. K jednoduchým flavan-3-olům se řadí katechin, epikatechin,

epikatechin galát a epigallokatechin. Během zrání hroznů tyto monomerní sloučeniny polymerizují do formy proantokyanidinů. V semenech polymerizují do podoby taninů o velikosti 10 monomerních jednotek, ve slupkách vznikají polymery o velikosti 30 jednotek. Stupeň polymerizace ovlivňuje chuťové vlastnosti hroznů. Flavan-3-oly mohou být hořké nebo tříslovité, přičemž hořké chuťové tóny se odvozují od nízkomolekulárních sloučenin s nižším stupněm polymerizace a tříslovité tóny od vysokomolekulárních s vyšším stupněm polymerizace. Hořké tóny bývají spojeny s flavan-3-oly semen a tříslovité s flavan-3-oly ze slupek [34, s. 72]; [44, s. 408]. Koncentrace a struktura taninů se během dozrávání hroznů mění, poměrně vysoká je na počátku zrání bobulí. V semenech jejich obsah klesá po začátku vybarvování hroznů do doby zralosti. Taniny ve slupce mají komplexnější strukturu a malou proměnlivost ve své polymerizaci v průběhu dozrávání [43, s. 13]. Obsah flavan-3-olů se v hroznech pohybuje od 243 do 1108 mg/kg, přičemž přes 89 % se nachází v semenech a do značné míry závisí na odrůdě révy vinné [17, s. 159].

### 3.1.2.2 Terpeny

Jednu ze základních skupin aromatických látek vyskytujících se u velkého množství zejména bílých odrůd tvoří monoterpeny. Nejvýrazněji přispívají k odrůdovému aromatu a podle jejich analytického profilu lze rozlišovat odrůdy. Jejich základním projevem je muškátové aroma doplněné květinovými a jemnými ovocnými tóny. U odrůd révy vinné se monoterpeny obvykle nalézají ve slupce bobulí. Postupné žloutnutí a jemně zlatavé odstíny korespondují se zvyšujícím se obsahem monoterpenů. Většina z nich se nachází v hroznech ve vázané formě. Přesto bývá dostatečné množství dostupné také ve volné podobě, kterou lze v bobulích během zrání hroznů sensoricky vyhodnotit. Mezi nejvýraznější monoterpeny se řadí linalol, geraniol, nerol, citronelol a  $\alpha$ -terpineol. U intenzivně aromatických muškátových odrůd může být koncentrace volných monoterpenů vyšší než 6 mg/l. Nemuškátové odrůdy obsahují monoterpeny v koncentraci 1–4 mg/l. Neutrální odrůdy jich obsahují podstatně méně a monoterpeny ovlivňují jejich aroma nevýznamně. Obsah monoterpenů se postupně zvyšuje od zaměkání bobulí až ke zralosti. Hlavními klimatickými faktory ovlivňujícími jejich tvorbu jsou teplota a sluneční záření [34, s. 75].

Dalšími skupinami terpenických látek v hroznech jsou karotenoidy a C13-norizoprenoidy. Norizoprenoidy jsou sloučeniny s vonnými vlastnostmi vyznačující se především ovocnými a květinovými tóny. Jedná se o produkty odbourávání karotenoidů, které u některých odrůd

v průběhu dozrávání silně ubývají, zatímco obsah norizoprenoidů se současně zvyšuje. Mezi jejich významné zástupce patří  $\beta$ -ionon (fialka, malina, dřevitá vůně),  $\beta$ -damascenon (jablko, květinové tóny) a vitispiran (kafr, eukalyptus). Karotenoidy jsou z větší části uloženy v pevných částech bobule – v dužnině a především ve slupce [34, s. 75-76]; [43, 13-14].

### 3.1.2.3 Alkaloidy

V hroznech byly detekovány indolové alkaloidy odvozující se od aromatické aminokyseliny tryptofanu. Příkladem je derivát indolu tetrahydro- $\beta$ -karbolin, jenž se nachází v malém množství v hroznech (ng/g), hroznovém džuse i víně ( $\mu\text{g/l}$ ) a přispívá k antioxidačnímu účinku těchto produktů [11 s. 386-387].

Jiným zástupcem alkaloidů hroznového vína je melatonin. Jedná se o neurohormon dříve pokládáný za vlastní pouze obratlovcům. Jeho produkce byla aktuálně prokázána u bakterií, prvoků, řas, hub, bezobratlých i některých rostlin, včetně révy vinné. Ačkoliv není jeho fyziologická role v rostlinách stále objasněna, v případě některých druhů se mu funkce hormonu připisuje. Kromě toho je i silným antioxidantem. Koncentrace melatoninu v jednotlivých hroznových kultivarech je velmi variabilní. Nejvyšší naměřená hodnota melatoninu představovala 0,8 až 0,9 ng/g, zatímco nejnižší hladina odpovídala pouze 0,005 ng/g [11, s. 387-388].

## 4 MINORITNÍ A NETRADIČNÍ ROSTLINNÉ OLEJE

Minoritní a netradiční rostlinné oleje jsou získávány šetrnými způsoby s ohledem na zachování specifických vlastností původních olejnatých surovin. Většinou nacházejí uplatnění jako součást potravin a kosmetických a farmaceutických produktů. Zpravidla bývají k dispozici pouze v omezeném množství. Při použití ve zdravé výživě, doplňcích stravy nebo ke gurmánským účelům je nezbytné při manipulaci, přepravě a skladování olejnin dodržovat podmínky zaručující zachování požadované jakosti. Během pěstování plodin také bývají uplatňovány podmínky minimalizující nutnost aplikace pesticidů [48, s. 232-233].

Tyto oleje mohou být získávány několika metodami. Může se jednat o lisování za studena, kdy teplota nepřesahuje 45 °C, lisování při vyšších teplotách anebo extrakce rozpouštědly. Extrakce pomocí rozpouštědel není příliš uplatňována k získávání olejů o vysoké kvalitě sloužících ke gurmánským účelům. Metodu superkritické extrakce oxidem uhličitým k získání těchto typů olejů lze považovat za přijatelnou variantu, nicméně v současnosti není rozšířená. Další možnost představuje aplikace hydrolytických enzymů, kdy dochází k porušení buněčných stěn rostlinného materiálu, což umožní následnou extrakci provést za mírnějších podmínek [48, s. 233].

Některé oleje z této skupiny jako např. ořechový, pistáciový a sezamový, mohou být používány i jako filtrované. U ostatních je rafinace k získání požadované kvality nezbytná. Na druhé straně, jestliže má olej svou charakteristickou chuť, může být žádoucí mu ji ponechat a vysoké teploty používané při dezodoraci by měly být vyloučeny nebo sníženy na minimum [48, s. 233].

K zástupcům lze zařadit olej mandlový, hroznový, brutnákový, avokádový, makadamový, mangový, lničkový, měsíčkový, dýňový atd. [48, s. 233-241] Pozornost bude věnována v rámci tohoto textu oleji z hroznových jader vzhledem k spojitosti s praktickou částí diplomové práce.

### 4.1 Olej z hroznových jader

Tento zelenozlatý olej ořechové chuti představuje vedlejší produkt vinařského průmyslu. Vyrábí se z výlisků hroznů révy vinné tzv. matolin. Z matolin jsou odseparována semena, ze kterých je následně extrahován olej lisováním nebo pomocí rozpouštědel. Lisované oleje

jsou z hlediska jakosti kvalitnější, nejlepší kvality dosahují oleje získané na hydraulických lisech za studena. Výtěžnost bývá ovšem nižší. Množství získaného oleje závisí na řadě faktorů. Mezi hlavní lze zařadit zejména půdní a klimatické podmínky společně s odrůdovými vlastnostmi (jádra z bílých hroznů obsahují více oleje než jádra z modrých hroznů). V zahraničí představuje olej z vinných jader velmi ceněnou surovinu pro své příznivé dietetické hodnoty. Vyznačuje se vysokým obsahem esenciálních mastných kyselin a tetrafenolů. Pro své vlastnosti je využíván v gastronomii, v kosmetickém průmyslu, ale také při výrobě barev a fermeží. Při použití v gastronomii je nutné olej rafinovat z důvodu zbavení tríslovitých látek, jinak by zůstal trpkým a prakticky nepoživatelným. Po rafinaci (záleží na stupních rafinace) se získá vysoce kvalitní olej, který je téměř bez chuti a vůně. Díky svému vysokému bodu přepalování (okolo 190–230 °C) jej lze použít i v teplé kuchyni [49, s. 121]; [50, s. 258-259]; [51]; [52, s. 1123].

#### 4.1.1 Specifikace

Podle aktuální studie Madawaly et al. [53, s. 146] tvoří profil mastných kyselin hroznového oleje z 88 % poly- a mononenasyčené mastné kyseliny. V největší míře jsou zastoupeny kyselina linolová (68,4 %) a kyselina olejová (18,3 %), jak dokládá Tabulka 5. Nasycené mastné kyseliny zauímají pouze 11,2 % z celkového obsahu mastných kyselin.

Zastoupení fytoosterolů dle již uvedené analýzy hroznového oleje ilustruje Tabulka 6. Převládajícím fytosterolem se stal  $\beta$ -sitosterol, následovaný kampesterolem, stigmasterolem a  $\Delta^5$ -avenasterolem. Tyto identifikované steroly byly obsaženy v množství 1784 mg/kg. Steroly, jež nebylo možné kvalitativně určit, představovaly 881 mg/kg [53, s. 148].

Celkové množství tokolů dle studie Madawaly et al. bylo stanoveno na 655 mg/kg, přičemž z kvantitativního hlediska byly hlavními sloučeninami  $\alpha$ -tokoferol a  $\gamma$ -tokotrienol [53, s. 147]. Podrobné zastoupení tokolů je znázorněno v Tabulce 7.

U některých vzorků hroznových olejů byly zaznamenány vyšší hladiny polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) než je žádoucí [54, s. 104]. Práce Moreta et al. tento fakt vysvětluje vlivem způsobu zpracování matoliny na výsledný obsah PAH v oleji [55, s. 1289].

Semena hroznů obsahují několik typů antioxidačních a zdraví prospěšných sloučenin. Jedná se především o tokotrienoly a polyfenoly [40, s. 318]. Bailová et al. [52, s. 1130] stano-

vila celkové množství fenolických látek vyskytujících se v oleji extrahovaném z hroznových semen na 59–115,5 µg/g GAE (ekvivalenty kyseliny gallové). V olejích z modrých odrůd byl zjištěn vyšší obsah celkových fenolických sloučenin v porovnání s rafinovanými či lisovanými oleji z odrůd bílých. Yilmaz a Toledo [56, s. 44-46] ve svém výzkumu sledují vliv typu rozpouštědla na extrakci polyfenolů z hroznových jader. Z jejich závěru vyplývá, že polyfenoly nejsou v hroznovém oleji výrazně zastoupeny z důvodu jejich vyšší polarit. Více polyfenolických látek se koncentruje v hroznové šťávě nebo vínu. Potenciální zdravotní benefity hroznového oleje tedy pravděpodobně vyplývají z vysoké hladiny fytoosterolů a tokotrienolů [40, s. 318].

Tabulka 5 – Zastoupení mastných kyselin v oleji z hroznových jader [51, s. 146].

<b>Mastné kyseliny</b>	<b>Hmotnostní procenta [%]</b>
Palmitová kyselina (16:0)	6,9
Stearová kyselina (18:0)	4,1
Arachová kyselina (20:0)	0,2
Nasyčené mastné kyseliny celkem	11,2
Olejová kyselina (18:1 n-9)	18,3
Vakcenová kyselina (18:1 n-7)	0,8
Eikosenová kyselina (20:1)	0,2
Mononenasyčené mastné kyseliny celkem	19,3
Linolová kyselina (18:2)	68,4
Linolenová kyselina (18:3)	0,3
Polynenasycené mastné kyseliny celkem	68,7
Ostatní	0,8



Tabulka 6 – Zastoupení sterolů v oleji z hroznových jader [51, s. 148].

<b>Steroly</b>	<b>Hmotnostní podíl [mg/kg]</b>
Brasikasterol	9
Kampesterol	184
Stigmasterol	164
$\beta$ -sitosterol	1336
$\Delta^5$ -avenasterol	91
Identifikované steroly celkem	1784
Neidentifikované steroly celkem	881
Steroly celkem	2665

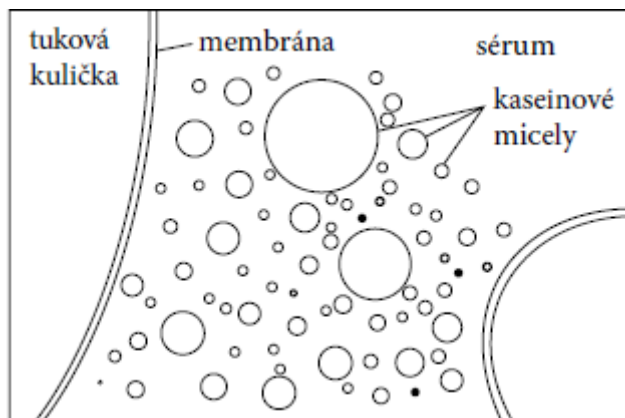
Tabulka 7 – Zastoupení tokolů v oleji z hroznových jader [51, s. 147].

<b>Tokoferoly</b>	<b>Hmotnostní podíl [mg/kg]</b>
$\alpha$ -tokoferol	216
$\gamma$ -tokoferol	111
$\alpha$ -tokotrienol	137
$\gamma$ -tokotrienol	191
Celkem	655

## 5 EMULGAČNÍ VLASTNOSTI MLÉKA

Mléko představuje polydisperzní systém. Mléčný tuk je přítomen ve formě emulze v tzv. mléčné plazmě. Hlavní mléčná bílkovina, kasein, se nachází v podobě koloidní disperze v tzv. mléčném séru, které obsahuje koloidní roztok sérových bílkovin a pravý roztok laktózy, minerálních látek a dalších složek [37, s. 227]. Pohled na strukturu a složení mléka při použití zvětšení ilustruje Obrázek 13.

Kravske mléko obsahuje průměrně 4 % tuku, 3,2 % bílkovin (2,6 % kaseinu a 0,6 % sérových bílkovin), 4,6 % laktózy a 0,7 % popelovin. Konkrétní hodnoty jsou ovšem značně variabilní [37, s. 227].



Obrázek 13 – Struktura a složení mléka při zvětšení 50 000x [57, s. 5].

### 5.1 Povrchové napětí mléka

Povrchové napětí lze popsat jako práci potřebnou k jednotkovému zvětšení plochy roztoku. U mléka se pohybuje v rozmezí 40–60 mN/m při teplotě 20 °C. Průměrně činí asi 52 mN/m. V případě jednotlivých mléčných frakcí představuje povrchové napětí u vody 72,8, syřidlové syrovátky 51–52, odstředěného mléka 52–53, 25% smetany 42–45, sladkého podmáslní 39–40 [58, s. 94]; [59, s. 470].

Nízké hodnoty povrchového napětí mléka v porovnání s vodou jsou způsobeny přítomností povrchově aktivních látek. Ty se adsorbují na fázové rozhraní vzduch-voda a redukují tak povrchové napětí. Jedná se o sérové bílkoviny, kaseiny a komponenty membrán tukových kuliček. Všechny tyto složky se spolupodílejí na tvorbě a stabilitě emulze mléčného tuku v mléčné plazmě [60, s. 494].

Povrchové napětí mléka se mění v závislosti na jeho složení a zpracování. Hodnota může být ovlivněna obsahem tuku, homogenizací i teplotními změnami. Klesá s narůstajícím množstvím tuku až do hodnoty 4 %, kdy další navýšení obsahu tuku již nevede k poklesu povrchového napětí. Homogenizace aplikovaná u pasterovaného mléka povrchové napětí zvyšuje, u syrového mléka naopak může vést ke snížení v důsledku uvolnění volných mastných kyselin vlivem aktivace lipáz. Tepelné zpracování mléka při sterilizačních teplotách může způsobit mírné zvýšení povrchového napětí, pravděpodobně způsobené denaturací syrovátkových bílkovin, které jej za obvyklých podmínek napomáhají snižovat [59, s. 470].

## 5.2 Povrchově aktivní složky mléka

### 5.2.1 Membrána tukové kuličky

Tuk je v mléce dispergován ve formě tukových kuliček. Velikost tukových kuliček se pohybuje v rozmezí 0,1–15  $\mu\text{m}$ , 90 % tuku se však nachází v kuličkách o průměru 2–6  $\mu\text{m}$ . Nepolární triacylglyceroly, které představují až 99 % mléčného tuku, jsou obklopeny tenkou membránou (10–50 nm) tvořenou vrstvou povrchově aktivních látek, především fosfolipidů a membránových proteinů. Tato membrána bývá v literatuře nazývána také jako membrána tukové kuličky (milk fat globule membrane). Membrány tukových kuliček pocházejí z apikální plazmatické membrány, endoplazmatického retikula případně dalších intracelulárních složek sekrečních buněk mléčné žlázy. V přirozeném pH mléka působí jako přírodní emulgátory, které svým negativním nábojem a hydratačním obalem zabraňují slévání mléčného tuku a spojování tukových kuliček. Srovnání hodnot povrchových napětí na fázových rozhraních sérum-tukové kuličky (2 N/m) a sérum-kapalný tuk (15 N/m) poukazuje na vysokou emulgační účinnost složek membrán tukových kuliček. Pokud dojde k porušení těchto membrán, např. mechanickým zásahem nebo působením enzymů, lze zejména na zahřátém mléce pozorovat tzv. volný tuk, který podléhá snadněji rozkladu [37, s. 230]; [61, s. 19]; [62, s. 3-4,]; [63, s. 449].

Unikátní emulgační vlastnosti materiálu membrán tukových kuliček vedou k výzkumu a vývoji technologií pro jeho izolaci, separaci a následné použití v různých potravinářských emulzích [60, s. 10].

### 5.2.2 Mléčné proteiny

Proteiny jsou amfoterní sloučeniny, ve své molekule tedy obsahují polární i nepolární části. Díky tomu představují účinné povrchově aktivní látky, které snižují povrchové napětí na mezifázovém rozhraní, kam se adsorbují. Vzhledem ke své amfifilní struktuře se podílejí na tvorbě a stabilizaci emulzí typu o/v i v/o. Stabilizační efekt proteinů spočívá ve vytvoření ochranného obalu kolem kapének tuku, čímž je zabráněno koalescenci emulze. V současné době představují proteiny jednu z nejpoužívanějších skupin potravinářských emulgátorů [64, s. 64]; [65, s. 135].

Mléčné proteiny, kaseiny a syrovátkové bílkoviny jsou ceněny pro své emulgačně-stabilizační vlastnosti. Kaseiny mají výborné povrchově aktivní vlastnosti a snadno se adsorbují na fázové rozhraní olej-voda. Syrovátkové bílkoviny jsou dobrá emulgační a pěnotvorná činidla. Flexibilní kaseiny s vyšším obsahem nepolárních skupin jsou účinnějšími emulgátory než rigidní syrovátkové proteiny s menším počtem nepolárních skupin. Pořadí jednotlivých mléčných proteinů uspořádaných podle velikosti povrchové aktivity je následující:  $\beta$ -kasein > kaseinové micely > sérový albumin >  $\alpha$ -laktalbumin >  $\alpha_s$ -kaseiny =  $\kappa$ -kasein >  $\beta$ -laktoglobulin. Stupeň pokrytí povrchu tukových kuliček proteinem se obvykle vyjadřuje v miligramech proteinu na jednotku plochy dispergované fáze ( $\text{mg m}^{-2}$ ) a záleží na koncentraci a typu proteinu i podmínkách nastalých při tvorbě emulze. Faktory ovlivňující plochu pokrytí povrchu tukových kapiček proteinem představují koncentrace proteinu, obsah oleje, dodaná energie, agregace proteinů, pH, iontová síla, teplota a koncentrace vápenatých iontů [59, s. 890]; [62, s. 3]; [64, s. 64]; [66, s. 324].

V potravinářství našly uplatnění především kaseinát sodný a syrovátkové proteiny, jež mají výborné emulgační vlastnosti umožňující vytvořit stabilní emulze při použití relativně malého množství. Syrovátkový proteinový koncentrát a kaseinát vápenatý mají emulgační schopnost mnohem nižší [66, s. 325].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 6 CÍL PRÁCE

Cíle této diplomové práce byly stanoveny následovně:

- vypracovat literární rešerši týkající se charakteristiky rostlinných sekundárních metabolitů s důrazem na fenolické látky, netradičních rostlinných olejů stejně jako surovin využívaných k jejich výrobě a emulgačních vlastností mléka,
- připravit stabilní emulze mléka a oleje z hroznových jader s použitím různých emulgátorů a tyto analyzovat pomocí fotonové korelační spektroskopie,
- ověřit antimikrobní účinky oleje z hroznových jader a připravených emulzí,
- na základě získaných výsledků formulovat závěry a doporučení.

## **7 MATERIÁL A METODY**

### **7.1 Použité materiály**

#### **7.1.1 Olej z hroznových jader**

Hroznový olej extra panenský za studena lisovaný nefiltrovaný (Saint George's)

Hroznový olej rafinovaný (M+H, Míča a Harašta)

#### **7.1.2 Mléko**

Mléko Lactel trvanlivé odtučněné (Mlékárna Kunín)

Mléko Lactel trvanlivé polotučné (Mlékárna Kunín)

Mléko Lactel trvanlivé plnotučné (Mlékárna Kunín)

### **7.2 Použité chemikálie**

#### **7.2.1 Emulgátory**

Tween 80 (Sigma-Aldrich)

Sójový lecitin granulovaný (Mogador)

MAG C8:0 (ÚTTTK)

#### **7.2.2 Ostatní**

Destilovaná voda

Denaturovaný líh

Glycidol (Sigma-Aldrich)

Chromium III acetát hydroxid (Sigma-Aldrich)

Kyselina kaprylová (Sigma-Aldrich)

## 7.3 Roztoky

### 7.3.1 Fyziologický roztok

NaCl (LachNer)..... 8,5 g

H<sub>2</sub>O .....1000,0 ml

Příprava: 8,5 g chloridu sodného bylo rozpuštěno v 1 litru destilované vody a sterilizováno v autoklávu 15 minut při 121 °C.

## 7.4 Přístroje a vybavení

Autokláv (Wolf SANOclav)

Autokláv Varioklav (H+P Labortechnik AG)

Denzitometr Densi-La-Meter (Emo)

Desintegrátor T 25 digital Ultra-Turrax (IKA Labortechnik)

Chladnička (Elektrolux)

Laboratorní sklo

Laboratorní plasty

Laminární box BIO-II-A (Telstar)

Míchadlo hřidelové RZR 2020 (Heidolph Instruments GmbH)

Mikrobiologický inkubátor (Mettler GmbH + Co. KG)

Mikropipety Biohit Proline

Očkovací pomůcky

Plastové zkumavky Nunc (Thermo Scientific Nunc)

Počítač kolonií Count plus (Schuett-Biotec GmbH)

Stříkačkové filtry o velikosti pórů 0,22 µm (Millipore)

Sušárna (Mettler GmbH + Co. KG)

Třepačka Reax top (Heidolph Instruments GmbH)



Váhy laboratorní Adventurer Pro 500 (OHAUS)

Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments)

## 7.5 Bakteriální kmeny

Pro testování antimikrobních účinků připravených emulzí a oleje z hroznových jader byly použity následující bakteriální kmeny, které byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM) v Brně nebo ze sbírky Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí:

*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* CCM 2216

*Enterococcus faecalis* CCM 4224

*Escherichia coli* CCM 3954

*Lactobacillus* sp.

*Micrococcus luteus* CCM 732

*Proteus vulgaris* CCM 1799

*Pseudomonas fluorescens* CCM 2798

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

*Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303

*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953

Bakteriální kmen *Lactobacillus* sp. byl uchováván na MRS agaru při teplotě  $4 \pm 2$  °C a byl přeočkováván po 3 až 4 týdnech. Ostatní kmeny byly uchovávány na masopeptonovém agaru za stejných podmínek jako v případě *Lactobacillus* sp.

## 7.6 Kultivační média

### 7.6.1 Masopeptonový agar (MPA)

Masový výtažek (HiMedia)	3,0 g
Pepton (HiMedia)	5,0 g
NaCl (LachNer)	3,0 g
Agar (HiMedia)	15,0 g

Destilovaná voda            ad 1000,0 ml

Příprava: Do 1 litru destilované vody bylo naváženo 26 g přípravku a rozpuštěno v zásobní láhvi. Poté bylo médium sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

### 7.6.2 Mueller-Hintonův agar (MHA)

Hovězí masová infúze            300,0 g

Kyselý hydrolyzát kaseinu        17,5 g

Škrob                                1,5 g

Agar                                 17,0 g

Destilovaná voda            ad 1000,0 ml

Příprava: 38 g přípravku (HiMedia) bylo naváženo do 1000 ml destilované vody, rozpuštěno v zásobní láhvi a následně sterilizováno při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

### 7.6.3 Agar pro *Lactobacillus* sp. podle DeMana, Rogosiho a Sharpeho (MRS agar)

Proteázový pepton            10,00 g

Hovězí extrakt                    10,00 g

Kvasničný extrakt                5,00 g

Dextróza                          20,00 g

Polysorbát 80                    1,00 g

Citran amonný                    2,00 g

Octan sodný                        5,00 g

Síran hořečnatý                  0,10 g

Síran manganatý                 0,05 g

Hydrogenfosforečnan draselný 2,00 g

Agar                                 12,00 g

Destilovaná voda            ad 1000,00 ml

Příprava: 67,15 g přípravku (HiMedia) bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody a následně sterilizováno v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

#### 7.6.4 Müller-Hintonův bujón (MHB)

Hovězí masová infúze	300,0 g
Kyselý hydrolyzát kaseinu	17,5 g
Škrob	1,5 g
Destilovaná voda	ad 1000,0 ml

Příprava: 21 g přípravku (HiMedia) bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody a poté byla provedena sterilizace v autoklávu po dobu 15 minut při 121 °C.

#### 7.6.5 Bujón pro *Lactobacillus* sp. podle DeMana, Rogosiho a Sharpeho (MRS bujón)

Proteázový pepton	10,00 g
Hovězí extrakt	10,00 g
Kvasničný extrakt	5,00 g
Dextróza	20,00 g
Polysorbát 80	1,00 g
Citran amonný	2,00 g
Octan sodný	5,00 g
Síran hořečnatý	0,10 g
Síran manganatý	0,05 g
Hydrogenfosforečnan draselný	2,00 g
Destilovaná voda	ad 1000,00 ml

Příprava: 55,15 g přípravku (HiMedia) bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody a poté sterilizováno při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

### 7.6.6 Plate count agar (PCA)

Enzymatický hydrolyzát kaseinu	5,0 g
Kvasničný extrakt	2,5 g
Dextróza	1,0 g
Agar	15,0 g
Destilovaná voda	ad 1000,0 ml

Příprava: 23,5 g směsi (HiMedia) bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody a následně sterilizováno v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

## 7.7 Metodika

### 7.7.1 Příprava emulzí

Pro přípravu emulzí bylo použito metody mechanické homogenizace s využitím dvou přístrojů o rozdílné rychlosti otáček – hřídelového míchadla Heidolph RZR 2020 a desintegrátoru Ultra-Turrax. U všech připravených emulzí byla základem původní, přirozená emulzní fáze mléka, tedy emulze typu olej ve vodě (o/v). Z důvodu vlastní emulgační schopnosti mléka byly nejprve emulze připraveny bez přítomnosti emulgátorů. Pro zlepšení výsledné stability emulzí byly posléze do receptury přidány potravinářské emulgátory. Konkrétně se jednalo o lecitin, MAG C8:0 a Tween 80.

V prvním bloku experimentů bylo vyrobeno celkem 60 emulzí o 2% koncentraci oleje a různé koncentraci emulgátorů (3, 5, 8 % w/w). U všech připravených emulzí byla vizuálně sledována stabilita ihned po emulgaci a po jednom dnu skladování při teplotě 25 °C, jak je znázorněno v Příloze 1. Z těchto emulzí byly vybrány ty, které měly složení zajišťující stabilitu a zároveň obsahovaly nejnižší koncentraci emulgátorů. V bloku druhém byly tyto emulze připraveny s 5% koncentrací hroznového oleje, tedy nejvyšší koncentrací umožňující vznik homogenní emulze při zachování původní koncentrace emulgátorů. K analýze velikosti, velikostní distribuce částic a studiu antimikrobních účinků byly od každého použitého emulgátoru vybrány pouze nejstabilnější emulze.

Emulgátor monokaprylin (MAG C8:0) byl připraven adicí kyseliny kaprylové na glycidol za katalytického působení chromitých iontů podle postupu Janiš et al. [67]. Finální produkty byly poté purifikovány rekrystalizací z etanolu a filtrací. Uchovány byly za laboratorních podmínek.

Granulovaný lecitin bylo nejprve nutno rozmělnit v třence a pro zlepšení rozpustnosti byl ponechán dobu 24 hodin v mléce, kde došlo k jeho nabobtnání. Po následné homogenizaci byla mléčná suspenze lecitinu aplikována k vlastní přípravě emulzí.

### 7.7.1.1 Použití hřídelového míchadla

Do dvou kádinek byla navážena příslušná množství složek vodné a olejové fáze. Následně byly zahřáty ve vodní lázni o teplotě 85 °C. Receptury emulzí s 2% a 5% koncentrací oleje jsou uvedeny v Tabulce 8 a Tabulce 9. Do již míchané olejové fáze byla postupně přidávána fáze vodná tvořená samotným mlékem, popř. v mléce rozpuštěným emulgátorem. Tímto způsobem byla emulze homogenizována po dobu 10 minut za konstantní rychlosti 1050 otáček/min.

Tabulka 8 – Receptura emulze připravované míchadlem s 2 % (w/w) hroznového oleje.

Koncentrace emulgátoru [%]	Emulgátor [g]	Vodná fáze [g]	Olejová fáze [g]
0	-	49,0	1,0
3	1,5	47,5	1,0
5	2,5	46,5	1,0
8	4,0	45,0	1,0

Tabulka 9 – Receptura emulze připravované míchadlem s 5 % (w/w) hroznového oleje.

Koncentrace emulgátoru [%]	Emulgátor [g]	Vodná fáze [g]	Olejová fáze [g]
0	-	47,5	2,5
3	1,5	46,0	2,5
5	2,5	45,0	2,5
8	4,0	43,5	2,5

### 7.7.1.2 Použití desintegrátoru Ultra-Turrax

Složky vodné i olejové fáze byly naváženy do dispergační zkumavky a následně zahřívány ve vodní lázni. Navážky pro přípravu emulzí o různé koncentraci oleje jsou uvedeny v Tabulce 10 a Tabulce 11. Po dosažení teploty vodní lázně 85 °C byla směs homogenizována 10 minut při rychlosti 13 400 otáček/min.

Tabulka 10 – Receptura emulze připravované Ultra-Turraxem s 2 % (w/w) hroznového oleje.

Koncentrace emulgátoru [%]	Emulgátor [g]	Vodná fáze [g]	Olejová fáze [g]
0	-	19,6	0,4
3	0,6	19,0	0,4
5	1,0	18,6	0,4
8	1,6	18,0	0,4

Tabulka 11 - Receptura emulze připravované Ultra-Turraxem s 5 % (w/w) hroznového oleje.

Koncentrace emulgátoru [%]	Emulgátor [g]	Vodná fáze [g]	Olejová fáze [g]
0	-	19,6	1,0
3	0,6	18,4	1,0
5	1,0	18,0	1,0
8	1,6	17,4	1,0

### 7.7.2 Analýza emulzí fotonovou korelační spektroskopií (PCS)

U vybraných emulzí byla analyzována velikost a velikostní distribuce částic metodou fotonové korelační spektroskopie pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS. Analyzovaná emulze byla nejprve homogenizována manuálním protřepáním. Vzorek pro měření byl připraven do plastové kyvety nadávkováním 1 ml destilované vody přefiltrované přes filtr o velikosti pórů 0,22  $\mu\text{m}$ , ke kterému byly pipetovány 3  $\mu\text{l}$  emulze. Kvůli udržení konstantní teploty vzorku byla kyveta zakryta víčkem a následně temperována v přístroji na 25 °C. Na přístroji byly nastaveny následující parametry měření: viskozita disperzního média 0.8872 cP,

index lomu disperzního média 1.330 a index lomu dispergovaného podílu 1.450. Zpracování naměřených dat bylo provedeno softwarem přístroje.

V rámci každého měření byla provedena tři stanovení vedle sebe. Směrodatná odchylka  $S$  byla vypočtena podle Deana a Dixona pro malý počet paralelních stanovení ( $n \ll 10$ ).

### **7.7.3 Testování citlivosti mikroorganismů k připraveným emulzím a oleji z hroznových jader**

Před samotným testem inhibičních účinků oleje v rafinované i nerafinované formě byla provedena zkouška mikrobiální čistoty. Pro každý vybraný vzorek probíhala dvě opakování. Z důvodu malého počtu jednotlivých stanovení v rámci statistického souboru byl k výpočtu směrodatné odchylky použit Dean-Dixonův test.

#### **7.7.3.1 Zkouška mikrobiální čistoty**

Z originálního balení oleje byl za aseptických podmínek odebrán vzorek o objemu 0,5 ml. Následně byl rozetřen sterilní hokejkou po povrchu plotny s PCA. Kultivace probíhala při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin. Následně byla vyhodnocena přítomnost mikrobiální kontaminace.

#### **7.7.3.2 Difúzní disková metoda**

Za aseptických podmínek suspenze testovaných bakteriálních kmenů byla připravena naočkováním čisté kultury z Petriho misky do zkumavky s MRS bujónem (*Lactobacillus* sp.) a MHB (ostatní kultury). Následně byla kultivována po dobu 24 hodin při teplotě 30 °C v případě kmenů *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* a *Lactobacillus* sp. Inkubace zbylých bakteriálních suspenzí proběhla při teplotě 37 °C po stejný časový úsek.

V laminárním boxu třídy II. byla bakteriální suspenze (kultivovaná přes noc) stokrát zředěna sterilním fyziologickým roztokem a v objemu 100 µl naočkována na sterilní plotnu s MRS agarem (*Lactobacillus* sp.) a MHA (ostatní bakteriální kmény). Sterilní hokejkou pak byla rozetřena po celé ploše plotny. Po zaschnutí byly na povrch půdy pinzetou asepticky položeny sterilní disky z filtračního papíru o průměru 5 mm. Na disky byly postupně

pipetovány neředěné vzorky oleje, popř. připravených emulzí v množství 5  $\mu$ l na jeden disk. Výjimku tvořily v rámci testování olejů disky kontrolní, na které byla pipetována sterilní destilovaná voda, a v případě testování emulzí disky slepého pokusu, na které byly pipetovány emulze analogické zkoušeným, ale bez obsahu hroznového oleje. Misky byly kultivovány v termostatu v závislosti na použité kultuře při teplotě 30 °C nebo 37 °C po dobu 24 hodin. Po kultivaci byly změřeny inhibiční zóny (mm) vzniklé v okolí disků inhibičním působením zvolených vzorků.

### 7.7.3.3 *Doplňková metoda*

Inokulum bylo za aseptických podmínek naočkováno z Petriho misky do sterilních zkumavek s MRS bujónem (*Lactobacillus* sp.) a MHB (ostatní kultury). Poté bylo kultivováno za stálého protřepávání po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě. Některé z pomnožených kultur bylo nezbytné z důvodu vysoké hustoty inokula zředit fyziologickým roztokem v požadovaném poměru na hodnotu 1,5 podle McFarlandovy stupnice.

Připravená bakteriální suspenze v objemu 200  $\mu$ l a 5  $\mu$ l testovaného vzorku byly postupně dávkovány do jamek mikrotitrační destičky. Takto naplněná mikrotitrační destička byla inkubována při 30 °C po dobu 30 minut. Po skončení kultivace byly suspenze vzorků s pomnoženou kulturou z jamek mikrotitrační destičky přeočkovány po 100  $\mu$ l na Petriho misky s PCA. Stejně se postupovalo i v případě slepých vzorků. Kultivace misek položených dnem vzhůru probíhala při teplotách 30 °C (*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* a *Lactobacillus* sp ) nebo 37 °C (ostatní kultury) po dobu 24 hodin. Poté byl sledován nárůst bakteriálních kolonií na miskách. Inhibiční účinky vzorků se projevíly nepřítomností nárůstu daného kmene bakterií.



## 8 VÝSLEDKY

### 8.1 Charakterizace připravených emulzí

Z šedesáti emulzí připravených v prvním bloku experimentů (viz Příloha P I) bylo na základě primární selekce k vlastnímu experimentu navrženo celkem 24 vzorků (včetně kontrolních emulzí). Tyto byly hodnoceny vizuálně, fotonovou korelační spektroskopií a metodami pro stanovení citlivosti bakterií k antimikrobním látkám.

#### 8.1.1 Vizuální pozorování

Vzhled emulzí byl studován ihned po emulgaci a po jednom dnu skladování při teplotě 25 °C. Sledovanými parametry byly vzhled a stabilita emulze. Výsledky vizuálního pozorování emulzí jsou shrnuty v Tabulkách 12–15.

Z důvodu obsahu mléka v receptuře bylo u všech emulzí patrné mléčně bílé zabarvení. Stabilitní emulze byly homogenní bez náznaků fázové separace. Nestabilita se u připravených emulzí projevovala postupným dělením fází. Konkrétně bylo pozorováno tzv. krémování, kdy se v horní části systému hromadila vrstva oleje z důvodu jeho nižší hustoty.

##### 8.1.1.1 Vizuální hodnocení kontrolních emulzí

Vizuálním pozorováním bylo zjištěno, že všechny používané typy mléka ošetřené UHT metodou mají dostatečnou emulgační kapacitu umožňující tvorbu homogenních emulzí s rafinovaným i nerafinovaným olejem z hroznových jader (5 % w/w). Tato stabilita ovšem nebyla trvalá, druhý den u všech sledovaných emulzí došlo k fázové separaci, jak ostatně dokládá Tabulka 12.

Tabulka 12 – Vizuální pozorování kontrolních emulzí bez přídavku emulgátoru pro 5% koncentraci hroznového oleje.

Druh oleje	Typ mléka	Příprava [ot./min]	Stabilita emulze při 25 °C	
			0. den	1. den
rafinovaný	plnotučné	13400/10	homogenní	nehomogenní
	polotučné		homogenní	nehomogenní
	odtučněné		homogenní	nehomogenní
nerafinovaný	plnotučné	13400/10	homogenní	nehomogenní
	polotučné		homogenní	nehomogenní
	odtučněné		homogenní	nehomogenní

### 8.1.1.2 Vliv přítomnosti Tweenu 80 na stabilitu připravených emulzí

Emulze s 3% koncentrací Tweenu 80 v základní receptuře vykazovaly v den přípravy i den následující vynikající stabilitu bez známek rozpadu systému. Tento trend je zaznamenán v Tabulce 13.

Tabulka 13 – Vizuální pozorování emulzí pro 5% koncentraci hroznového oleje a 3% koncentrací Tweenu 80.

Druh oleje	Mléko	Příprava [ot./min]	Stabilita emulze při 25 °C	
			0. den	1. den
rafinovaný	plnotučné	13400/10	homogenní	homogenní
	polotučné		homogenní	homogenní
	odtučněné		homogenní	homogenní
nerafinovaný	plnotučné	13400/10	homogenní	homogenní
	polotučné		homogenní	homogenní
	odtučněné		homogenní	homogenní

### 8.1.1.3 Vliv přítomnosti lecitinu na stabilitu připravených emulzí

Z hlediska vizuálního hodnocení byly homogenní také emulze stabilizované lecitinem (3 % w/w). Během sledování nebyla zpozorována ani minimální separace systému, což dokládá Tabulka 14.

Tabulka 14 – Vizuální pozorování emulze pro 5% koncentraci hroznového oleje a 3% koncentraci lecitinu.

Druh oleje	Mléko	Příprava [ot./min]	Stabilita emulze při 25 °C	
			0. den	1. den
rafinovaný	plnotučné	13400/10	homogenní	homogenní
	polotučné		homogenní	homogenní
	odtučněné		homogenní	homogenní
nerafinovaný	plnotučné	13400/10	homogenní	homogenní
	polotučné		homogenní	homogenní
	odtučněné		homogenní	homogenní

#### 8.1.1.4 Vliv přítomnosti MAG C8:0 na stabilitu připravených emulzí

V případě emulzí s obsahem monokaprylinu bylo nutné navýšit jeho koncentraci na 8 % (w/w), při které byly pozorovány destabilizační projevy v nejmenší míře. Nicméně i při této koncentraci byla ihned po emulgaci viditelná pozvolná separace olejové a vodné fáze systému. Při sledování těchto emulzí po 24 hodinách od výroby bylo u všech bez výjimky pozorováno opětovné spojení původně oddělených fází, tedy úplný rozpad emulze. Tento jev, zaznamenaný pouze při použití tohoto emulgátoru, uvádí Tabulka 15.

Tabulka 15 – Vizuální pozorování emulze pro 5% koncentraci hroznového oleje a 8% koncentraci MAG C8:0.

Druh oleje	Koncentrace emulgátoru	Mléko	Příprava [ot./min]	Stabilita emulze při 25 °C	
				0. den	1. den
rafinovaný	8	plnotučné	13400/10	nehomogenní	homogenní
	8	polotučné		nehomogenní	homogenní
	8	odtučněné		nehomogenní	homogenní
nerafinovaný	8	plnotučné	13400/10	nehomogenní	homogenní
	8	polotučné		nehomogenní	homogenní
	8	odtučněné		nehomogenní	homogenní

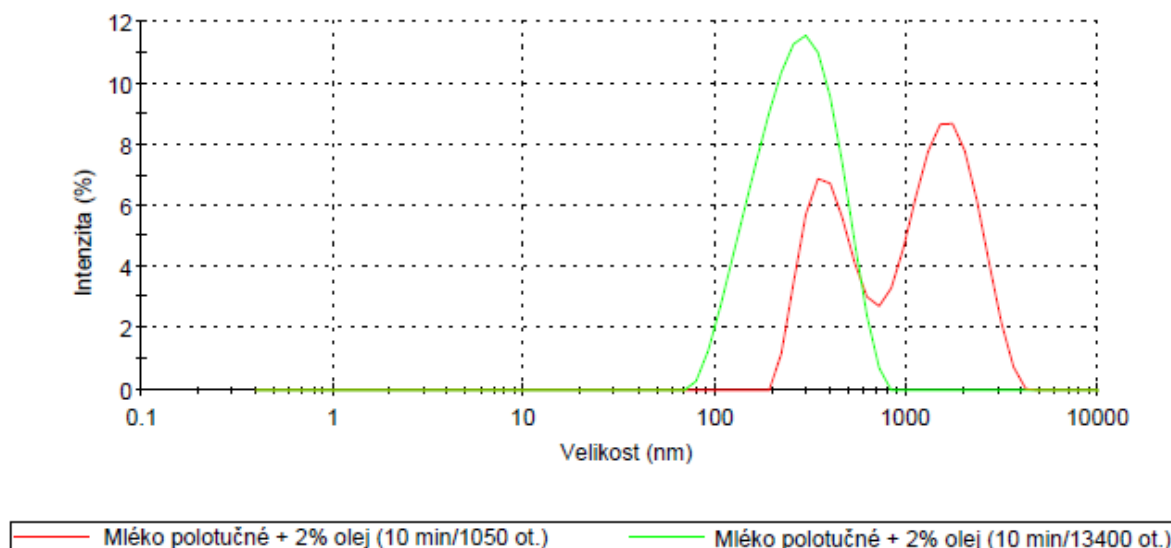
### 8.1.2 Analýza emulzí fotonovou korelační spektroskopií

Stabilita připravených emulzí byla hodnocena pomocí střední hodnoty velikosti všech částic nacházejících se v emulzi (z-průměr velikosti částic), velikosti a objemového obsahu částic jednotlivých frakcí přítomných v emulzi.

Z první série experimentů vyplynulo, že pro vznik emulzí požadované stability představuje optimální přípravu homogenizace za použití dispergátoru Ultra-Turrax, v trvání 10 minut při otáčkách 13 400/min. Tímto způsobem lze získat stabilní emulze o malé střední velikosti částic a s monomodální velikostní distribucí, jak znázorňuje Tabulka 16 tak i Obrázek 14.

Tabulka 16 – Vliv přípravy na zvolené parametry emulze.

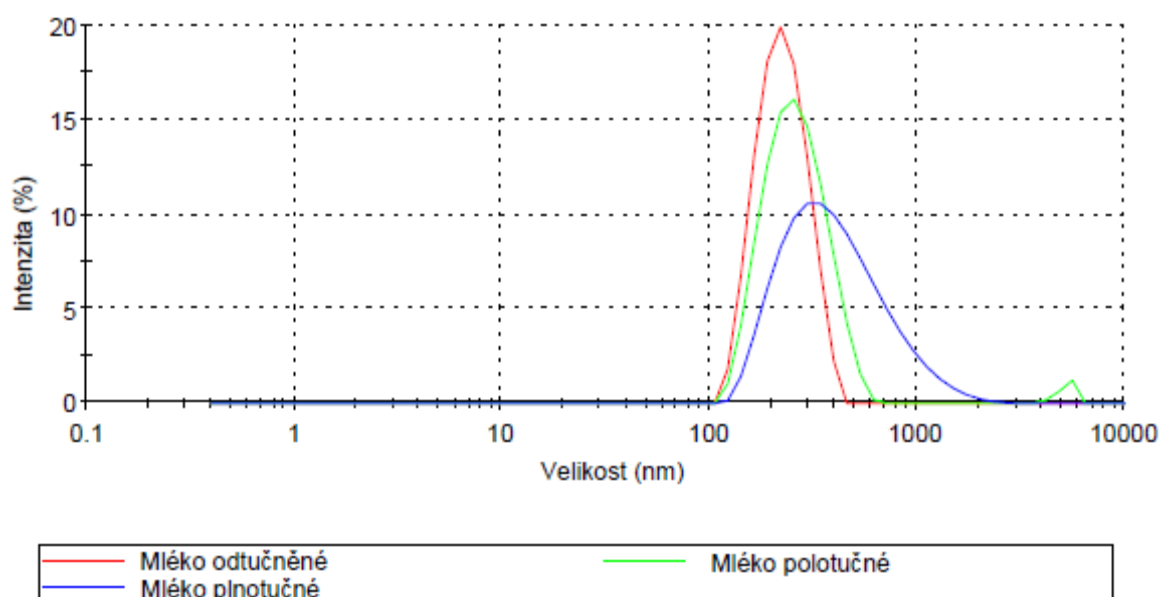
Příprava [ot./min]	$\Phi$ z-průměr $\pm S$ [nm]	Velikost částic zastoupené frakce [nm]			Obsah částic za- stoupené frakce [% v/v]		
1050/10	710,0 $\pm$ 15,7	1651	416	-	62	38	-
13400/10	271,0 $\pm$ 22,4	288	-	-	100	-	-



Obrázek 14 – Vliv druhu přípravy na distribuci velikosti částic.

Z důvodu srovnání byly kromě připravených emulzí charakterizovány korelační fotonovou spektroskopií také použité druhy mléka. Jak vyplývá z Obrázku 15 a Tabulky 17, distribu-

ní křivky lze považovat u odtučněného i plnotučného mléka za monomodální. Z identifikovaných dvou populací částic v případě polotučného mléka tvoří menší podíl částice o velikosti na samé hranici měřicího rozsahu přístroje. Můžeme se proto domnívat, že i vzorky odtučněného a plnotučného mléka mohou být v konečném důsledku vícemodální, což ovšem přístroj nedokáže z důvodu limitovaného měřicího rozsahu detekovat. Z výsledků analýzy vzorků mlék dále vyplývá, že obsah tuku ovlivňuje výslednou velikost částic. S narůstajícím obsahem tuku dochází k postupnému zvyšování z-průměru. Převažující monomodální distribuční křivky a malá střední velikost částic poukazují na homogenitu těchto systémů.



Obrázek 15 – Distribuce velikosti částic v závislosti na typu mléka.

Tabulka 17 – Stanovení průměrné velikosti a distribuce velikosti částic u různých druhů mlék.

Mléko	$\Phi$ z-průměr $\pm S$ [nm]	Velikost částic zastoupené frakce [nm]			Obsah částic zastoupené frakce [% v/v]		
odtučněné	214,0 $\pm$ 12,0	229	-	-	100	-	-
polotučné	259,0 $\pm$ 13,0	269	5188	-	96	4	-
plnotučné	341,0 $\pm$ 13,1	466	-	-	100	-	-

### 8.1.2.1 Průměrná velikost a distribuce velikosti částic u kontrolních emulzí bez emulgátoru

Velikost a distribuce částic byla stanovena také u kontrolních emulzí, které obsahovaly 5% koncentraci oleje z hroznových jader bez přítomnosti emulgátorů. Výsledky měření zaznamenané v Tabulce 18 naznačují, že přidavek hroznového oleje do všech druhů mléka se projevil zvýšením střední velikosti částic i polydisperzity systému. Dále bylo zjištěno, že emulze s obsahem rafinovaného oleje měly střední hodnotu velikosti větší než ty s obsahem oleje nerafinovaného. Přítomnost druhu oleje měla vliv i na počet a velikost zastoupených frakcí. Trend zvětšování velikosti částic s přibývajícím obsahem mléčného tuku v systému pokračoval i zde.

Tabulka 18 – Stanovení průměrné velikosti a distribuce velikosti částic u kontrolních emulzí hroznového oleje bez emulgátoru.

Olej	Mléko	$\Phi$ z-průměr $\pm S$ [nm]	Velikost částic zastoupené frakce [nm]			Obsah částic zastoupené frakce [% v/v]		
Raf.	odtučné	847,0 $\pm$ 24,9	575	3691	-	67	33	-
	polotučné	922,0 $\pm$ 12,0	1754	572	-	26	74	-
	plnotučné	928,0 $\pm$ 15,5	916	-	-	100	-	-
Neraf.	odtučné	510,0 $\pm$ 27,1	613	126	5394	90	8	2
	polotučné	603,0 $\pm$ 19,8	759	-	-	100	-	-
	plnotučné	773,0 $\pm$ 24,2	1287	-	-	100	-	-

### 8.1.2.2 Vliv přítomnosti emulgátorů na průměrnou velikost a distribuci velikosti částic u připravených emulzí

Vliv přítomnosti použitých emulgátorů na velikost a distribuci částic u připravených emulzí jsou shrnuty v Tabulkách 19–21. Odlišnosti ve vzhledu distribučních křivek v závislosti na použitých emulgátorech ilustruje Obrázek 16.

Emulze stabilizované Tweenem 80 popisuje Tabulka 19. Na základě údajů uvedených v této tabulce lze konstatovat, že při použití 3% koncentrace Tweenu 80 došlo k výraznému poklesu střední hodnoty velikosti částic oproti kontrolním emulzím. Nerafinovaný olej, stejně jako v předchozích případech, vytvářel emulze s částicemi o menším z-

průměru. Obsah mléčného tuku i nadále ovlivňoval velikost částic. Distribuční křivky byly sice většinou bimodální, ale s jednou výrazně převažující frakcí.

Tabulka 19 – Stanovení průměrné velikosti a distribuce velikosti částic u emulzí s 5% koncentrací hroznového oleje a 3% koncentrací Tweenu 80.

Olej	Mléko	$\Phi$ z-průměr ± S [nm]	Velikost částic zastoupené frakce [nm]			Obsah částic zastoupené frakce [% v/v]		
Raf.	odtučněné	250,0 ± 15,7	269	4976	-	95	5	-
	polotučné	270,0 ± 17,0	365	4817	-	95	5	-
	plnotučné	328,0 ± 30,0	505	137	4910	71	23	6
Neráf.	odtučněné	239,0 ± 15,6	279	4974	-	97	3	-
	polotučné	241,0 ± 23,8	262	4935	-	96	4	-
	plnotučné	315,0 ± 11,3	512	4028	47	94	5	1

V emulzích s 3% koncentrací lecitinu byla převážně detekována jedna populace částic. V porovnání s kontrolními vzorky bez emulgačních činidel byl z-průměr velikosti částic menší. Rafinovaný olej i v případě této skupiny tvořil emulze o větší velikosti částic. Také tendence zvyšování velikosti částic se stoupajícím obsahem mléčného tuku ve vzorcích zůstala zachována.

Tabulka 20 – Stanovení průměrné velikosti a distribuce velikosti částic u emulzí s 5% koncentrací hroznového oleje a 3% koncentrací lecitinu.

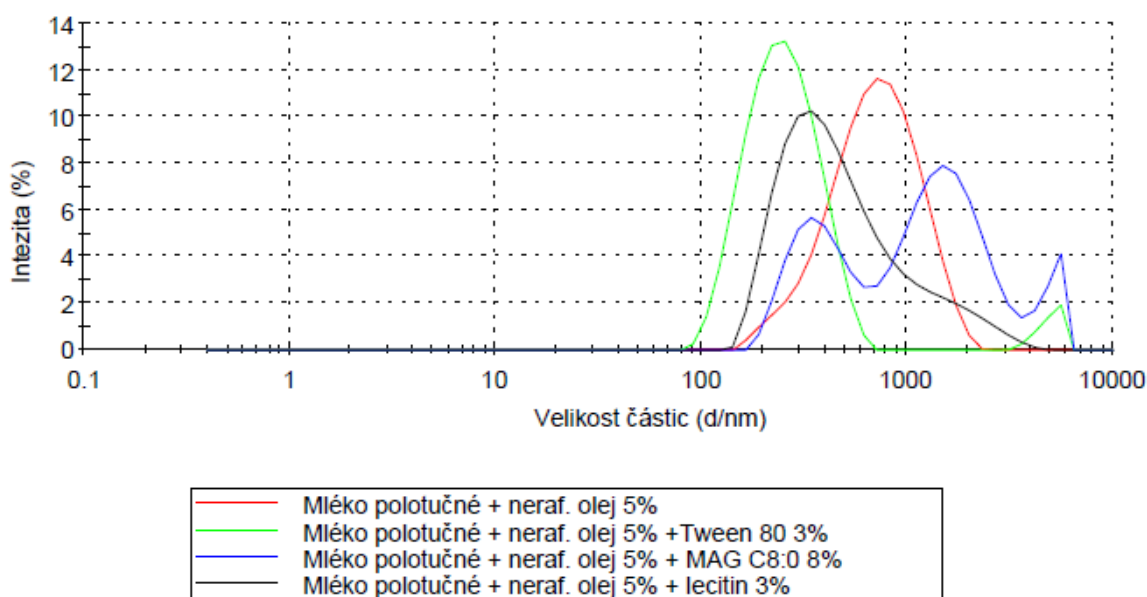
Olej	Mléko	$\Phi$ z-průměr ± S [nm]	Velikost částic zastoupené frakce [nm]			Obsah částic zastoupené frakce [% v/v]		
Raf.	odtučněné	374,0 ± 15,6	612	-	-	100	-	-
	polotučné	409,0 ± 17,8	397	3127	-	88	12	-
	plnotučné	493,0 ± 17,3	702	178	-	91	9	-
Neráf.	odtučněné	356,0 ± 22,0	573	-	-	100	-	-
	polotučné	400,0 ± 15,2	626	-	-	100	-	-
	plnotučné	441,0 ± 10,1	560	-	-	100	-	-

Výsledky analýzy emulzí s 8% koncentrací monokaprylinu jsou uvedeny v Tabulce 21. Velikostní distribuce, vyjma emulzí s plnotučným mlékem, byly multimodální, což svědčí o vysoké polydisperzitě systému. V porovnání se zbylými emulgátory nezpůsobil monokaprylin zmenšení velikostí emulzních částic. Výjimkou z tohoto trendu byla emulze, kde spojitou fázi tvořilo plnotučné mléko, jejíž emulzní částice byly menší než částice emulzí v plnotučném mléku, kde nebyl použit emulgátor. Další odchylku od chování sledovaných emulzí představovala skutečnost, že s rostoucím obsahem mléčného tuku v mléku docházelo k poklesu velikosti částic. Většina měření byla vyhodnocena softwarem přístroje jako nevyhovující z důvodů velké polydiperzity vzorku.

Tabulka 21 – Stanovení průměrné velikosti a distribuce velikosti částic u emulzí s 5% koncentrací hroznového oleje a 8% koncentrací MAG C8:0.

Olej	Mléko	$\Phi$ z-průměr $\pm S$ [nm]	Velikost částic zastoupené frakce [nm]			Obsah částic zastoupené frakce [% v/v]		
Raf.	odtučněné <sup>^</sup>	1065 $\pm$ 17,4	2235	258	-	77	23	-
	polotučné <sup>^</sup>	943,0 $\pm$ 14,5	1017	205	-	75	25	-
	plnotučné	691,0 $\pm$ 20,0	611	-	-	100	-	-
Neráf.	odtučněné <sup>^</sup>	982,0 $\pm$ 17,8	2015	418	-	75	25	-
	polotučné <sup>^</sup>	879,7 $\pm$ 26,7	1577	379	4833	58	32	10
	plnotučné	607,1 $\pm$ 13,7	794	-	-	100	-	-

Pozn. <sup>^</sup> Nevyhovující měření



Obrázek 16 - Vliv typu emulgátoru na distribuci velikosti částic vybraných emulzí.



## 8.2 Studium antimikrobních účinků

### 8.2.1 Zkouška mikrobiální čistoty

Originální balení hroznových olejů byla podrobena zkoušce mikrobiální čistoty. Na pevném médiu nebyla nalezena mikrobiální kontaminace ani u jednoho z testovaných vzorků.

### 8.2.2 Antimikrobní účinky oleje z hroznových jader

Antimikrobní účinky oleje z hroznových jader byly sledovány u pěti grampozitivních a pěti gramnegativních bakterií. Difúzní diskovou metodou nebyla prokázána inhibice růstu ani jednoho z testovaných bakteriálních kmenů, což dokazují Tabulka 22 a Tabulka 23. Z důvodu ověření získaných výsledků byla navíc použita doplňková metoda stanovení citlivosti, která potvrdila závěry metody diskové (viz Tabulka 24 a Tabulka 25).

Tabulka 22 – Studium inhibičních účinků oleje z hroznových jader na vybraných grampozitivních bakteriálních kmenech.

Druh oleje	Φ inhibiční zóny ± S (v mm) u testovaných kmenů				
	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>
Rafinovaný	-	-	-	-	-
Nerafinovaný	-	-	-	-	-

Pozn. - nepřítomnost zóny inhibice

Tabulka 23 – Studium inhibičních účinků oleje z hroznových jader na vybraných gramnegativních bakteriálních kmenech.

Druh oleje	Φ inhibiční zóny ± S (v mm) u testovaných kmenů				
	<i>P. vulgaris</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>E.coli</i>
Rafinovaný	-	-	-	-	-
Nerafinovaný	-	-	-	-	-

Pozn. - nepřítomnost zóny inhibice

Tabulka 24 – Růst testovaných grampozitivních bakteriálních kmenů v přítomnosti oleje z hroznových jader.

Druh oleje	Bakteriální kmeny				
	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>
Rafinovaný	+++	+++	+++	+++	+++
Nerafinovaný	+++	+++	+++	+++	+++

Pozn. + ++ +++ stupeň nárůstu bakteriálního kmene na pevném médiu

- médium bez přítomnosti testovaného bakteriálního kmene

Tabulka 25 – Růst testovaných gramnegativních bakteriálních kmenů v přítomnosti oleje z hroznových jader.

Druh oleje	Bakteriální kmeny				
	<i>P. vulgaris</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>E.coli</i>
Rafinovaný	+++	+++	+++	+++	+++
Nerafinovaný	+++	+++	+++	+++	+++

Pozn. + ++ +++ stupeň nárůstu bakteriálního kmene na pevném médiu

- médium bez přítomnosti testovaného bakteriálního kmene

## 8.2.3 Antimikrobní účinky připravených emulzí

### 8.2.3.1 Antimikrobní účinky kontrolních emulzí

Na základě výsledků difúzní diskové metody i doplňkové metody bylo zjištěno, že testované kontrolní emulze hroznového oleje (bez emulgátoru) nevyvolaly inhibici růstu ani jedné sledované bakteriální kultury. Testování na bakteriích s grampozitivním typem buněčné stěny shrnuje Tabulka 26 a Tabulka 27. U gramnegativních bakterií bylo dosaženo identických výsledků.

Tabulka 26 – Inhibiční účinky kontrolních emulzí (bez emulgátoru) o 5% koncentraci hroznového oleje na vybrané grampozitivní mikroorganismy.

Číslo	Olej	Mléko	Φ inhibiční zóny ± S (v mm) u testovaných kmenů				
			<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>
1	Raf.	plno.	-	-	-	-	-
2		polo.	-	-	-	-	-
3		od.	-	-	-	-	-
4	Neraf.	plno.	-	-	-	-	-
5		polo.	-	-	-	-	-
6		od.	-	-	-	-	-

Pozn. - nepřítomnost inhibiční zóny

Tabulka 27 – Růst testovaných grampozitivních bakteriálních kmenů v přítomnosti kontrolních emulzí.

Číslo	Bakteriální kmeny				
	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>
1	+++	+++	+++	+++	+++
2	+++	+++	+++	+++	+++
3	+++	+++	+++	+++	+++
4	+++	+++	+++	+++	+++
5	+++	+++	+++	+++	+++
6	+++	+++	+++	+++	+++

Pozn. + ++ +++ stupeň nárůstu bakteriálního kmene na pevném médiu

- médium bez přítomnosti testovaného bakteriálního kmene

### 8.2.3.2 Vliv Tweenu 80 a lecitinu na antimikrobiální účinky připravených emulzí

U připravených emulzí hroznového oleje stabilizovaných emulgátory Tween 80 a lecitinem (3 % w/w) nebyly zaznamenány inhibiční účinky na testované grampozitivní a gramnegativní bakteriální kultury. Získané výsledky na gramnegativní kmeny jsou uvedeny v Tabulkách 28–30.

Tabulka 28 – Inhibiční účinky emulzí slepého pokusu (bez oleje z hroznových jader) o 3% koncentraci emulgátorů lecitinu a Tweenu 80 na vybrané druhy gramnegativních bakterií.

Č.	Mléko	Emulgátor	Φ inhibiční zóny ± S (v mm) u testovaných kmenů				
			<i>P. vulgaris</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>E.coli</i>
19	plno.	Lecitin	-	-	-	-	-
20	polo.		-	-	-	-	-
21	od.		-	-	-	-	-
22	plno.	Tween 80	-	-	-	-	-
23	polo.		-	-	-	-	-
24	od.		-	-	-	-	-

Pozn. - nepřítomnost inhibiční zóny

Tabulka 29 – Inhibiční účinky emulzí o 5% koncentraci hroznového oleje a 3% koncentraci emulgátorů lecitinu a Tweenu 80 na vybrané druhy gramnegativních bakterií.

Č.	Olej	Mléko	Emul- gátor	Φ inhibiční zóny ± S (v mm) u testovaných kmenů				
				<i>P. vulgaris</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>E.coli</i>
7	Raf.	plno.	Lecitin	-	-	-	-	-
8		polo.		-	-	-	-	-
9		od.		-	-	-	-	-
10		plno.	Tween 80	-	-	-	-	-
11		polo.		-	-	-	-	-
12		od.		-	-	-	-	-
13	Neraf.	plno.	Lecitin	-	-	-	-	-
14		polo.		-	-	-	-	-
15		od.		-	-	-	-	-
16		plno.	Tween 80	-	-	-	-	-
17		polo.		-	-	-	-	-
18		od.		-	-	-	-	-

Pozn. - nepřítomnost inhibiční zóny

Tabulka 30 – Růst testovaných gramnegativních bakteriálních kmenů v přítomnosti emulzí hroznového oleje a slepých vzorků.

Číslo	Bakteriální kmeny				
	<i>P. vulgaris</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>E.coli</i>
7	+++	+++	+++	+++	+++
8	+++	+++	+++	+++	+++
9	+++	+++	+++	+++	+++
10	+++	+++	+++	+++	+++
11	+++	+++	+++	+++	+++
12	+++	+++	+++	+++	+++
13	+++	+++	+++	+++	+++
14	+++	+++	+++	+++	+++
15	+++	+++	+++	+++	+++
16	+++	+++	+++	+++	+++
17	+++	+++	+++	+++	+++
18	+++	+++	+++	+++	+++
19	+++	+++	+++	+++	+++
20	+++	+++	+++	+++	+++
21	+++	+++	+++	+++	+++
22	+++	+++	+++	+++	+++
23	+++	+++	+++	+++	+++
24	+++	+++	+++	+++	+++

Pozn. + ++ +++ stupeň nárůstu bakteriálního kmene na pevném médiu

- médium bez přítomnosti testovaného bakteriálního kmene

### 8.2.3.3 Vliv monokaprylinu na antimikrobní účinky připravených emulzí

Potenciální antimikrobní účinky byly testovány také u emulzí hroznového oleje s 8% koncentrací monoacylglycerolu kyseliny kaprylové. Z Tabulek 31–34 vyplývá, že zóny inhibice byly pozorovány napříč celým bakteriálním spektrem vyjma gramnegativního kmene *Serratia marcescens*. Ze srovnání velikosti inhibičních zón u vzorků slepého pokusu (viz

Tabulka 31–32) a emulzí o 5% koncentraci oleje z hroznových jader (viz Tabulka 33–34) je patrné, že antimikrobní účinky byly v případě slepých vzorků prokazatelně výraznější. Velikost inhibičních zón testovaných emulzí hroznového oleje s 8% koncentrací monokaprylinu byla buď srovnatelná anebo, a to ve většině případů, menší než u slepých vzorků. Z toho vyplývá, že synergistický účinek mezi olejem z hroznových jader a monokaprylinem nebyl pozorován. Lze dokonce i konstatovat, že přídavek hroznového oleje u některých vzorků snížil antimikrobní účinek monokaprylinu, jak je patrné i z Obrázku 17. Ze získaných údajů lze také odvodit, že antimikrobní účinnost emulzí nezávisela na tučnosti mléka ani druhu použitého oleje. Zjištění získaná difúzní diskovou metodou potvrzuje doplňková metoda, jejíž výsledky zaznamenávají Tabulka 35 a Tabulka 36.

Z výsledků experimentů vyplývá, že bakterie s buněčnou stěnou grampozitivního typu jsou k účinku emulzí s 8% koncentrací monokaprylinu vnímavější. Výjimku představoval *Staphylococcus aureus*, který se stal na základě obou použitých metod druhou nejodolnější testovanou bakterií. Nejvýraznější inhibiční účinky emulzí byly zaznamenány jak v případě grampozitivní skupiny bakterií, tak i celého testovaného souboru, u mikrokoka.

Z gramnegativních bakterií se na základě provedeného testování jeví nejcitlivější k působení emulzí s 8% koncentrací monokaprylinu *Escherichia coli*, těsně následovaná *Pseudomonas fluorescens*. Nejodolnější vůči účinku emulzí byla shledána *Serratia marcescens*, u níž jako u jediné testované bakterie nebyla nalezena inhibiční zóna. Také z Tabulky 35 lze vypožorovat, že stupeň jejího nárůstu po vyočkování na pevném médiu byl nejvýraznější.

Tabulka 31 – Inhibiční účinky emulzí slepého pokusu (bez oleje z hroznových jader) o 8% koncentraci monokaprylinu na vybrané grampozitivní bakterie.

Číslo	Mléko	Φ inhibiční zóny ± S (v mm) u testovaných kmenů				
		<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>
25	plno.	1,0 ± 0,0	6,5 ± 0,9	3,0 ± 1,8	3,0 ± 0,9	3,5 ± 0,9
26	polo.	1,0 ± 0,0	5,5 ± 0,9	3,5 ± 2,7	2,5 ± 1,8	3,0 ± 0,9
27	od.	1,5 ± 0,9	5,0 ± 1,8	3,5 ± 0,9	2,5 ± 0,9	3,0 ± 1,8

Tabulka 32 – Inhibiční účinky emulzí slepého pokusu (bez oleje z hroznových jader) o 8% koncentraci monokaprylinu na vybrané gramnegativní bakterie.

Číslo	Mléko	Φ inhibiční zóny ± S (v mm) u testovaných kmenů				
		<i>P. vulgaris</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>E. coli</i>
25	plno.	2,0 ± 0,9	2,0 ± 0,9	4,0 ± 1,8	-	5,5 ± 0,9
26	polo.	2,5 ± 3,5	2,0 ± 0,9	4,5 ± 2,7	-	5,0 ± 0,0
27	od.	2,0 ± 2,7	2,5 ± 0,9	4,5 ± 0,9	-	5,5 ± 0,9

Pozn. - nepřítomnost inhibiční zóny

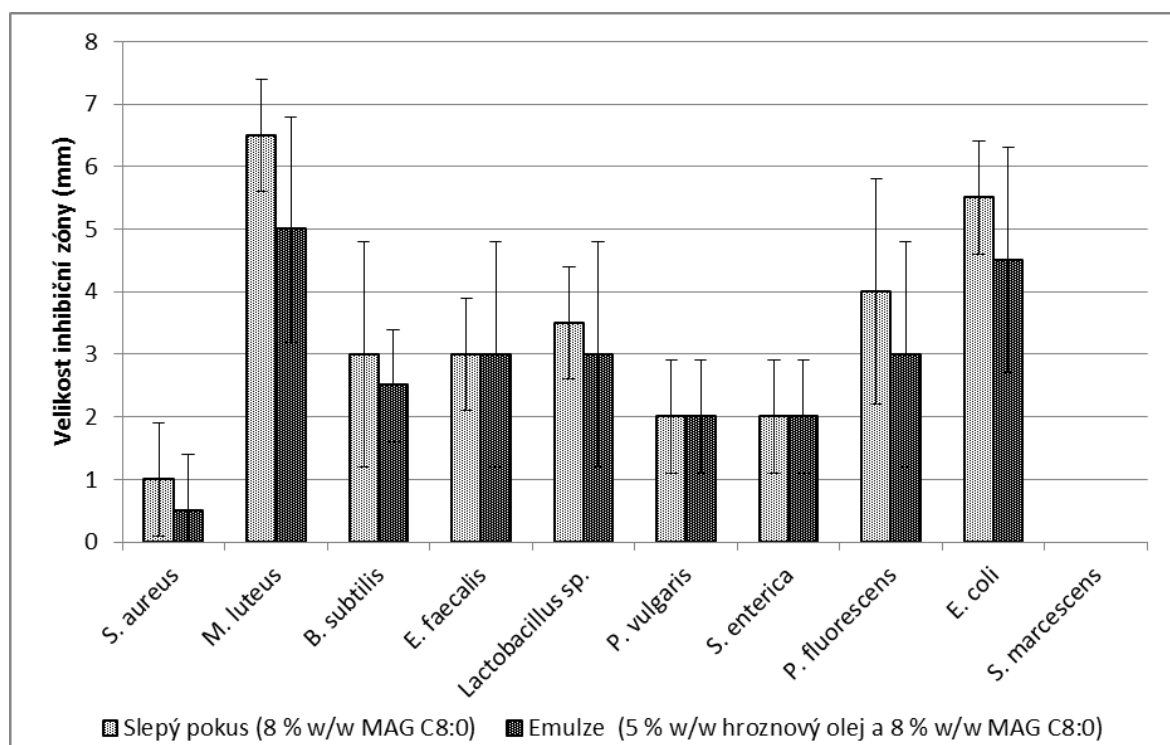
Tabulka 33 – Inhibiční účinky emulzí o 5% koncentraci hroznového oleje a 8% koncentraci monokaprylinu na vybrané grampozitivní bakterie.

Číslo	Olej	Mléko	Φ inhibiční zóny ± S (v mm) u testovaných kmenů				
			<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>
28	Raf.	plno.	0,5 ± 0,9	5,0 ± 1,8	2,5 ± 0,9	3,0 ± 1,8	3,0 ± 1,8
29		polo.	0,5 ± 0,9	5,5 ± 1,8	1,5 ± 0,9	2,5 ± 1,8	2,5 ± 2,7
30		od.	1,0 ± 0,9	4,0 ± 2,5	1,5 ± 1,8	2,5 ± 0,9	3,0 ± 1,8
31	Neráf.	plno.	1,0 ± 1,8	5,5 ± 0,9	3,0 ± 0,9	2,0 ± 0,0	2,5 ± 0,9
32		polo.	0,5 ± 0,9	4,5 ± 2,7	3,5 ± 1,8	2,5 ± 2,7	2,0 ± 0,0
33		od.	1,0 ± 1,8	5,0 ± 1,8	2,0 ± 2,7	2,5 ± 1,8	3,0 ± 2,7

Tabulka 34 – Inhibiční účinky emulzí o 5% koncentraci hroznového oleje a 8% koncentraci monokaprylinu na vybrané gramnegativní bakterie.

Číslo	Olej	Mléko	Φ inhibiční zóny ± S (v mm) u testovaných kmenů				
			<i>P. vulgaris</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>E. coli</i>
28	Raf.	plno.	2,0 ± 0,9	2,0 ± 0,9	3,0 ± 1,8	-	4,5 ± 1,8
29		polo.	2,5 ± 1,8	2,0 ± 0,0	4,5 ± 0,9	-	4,0 ± 2,7
30		od.	2,0 ± 2,7	1,5 ± 1,8	4,0 ± 1,8	-	5,5 ± 0,9
31	Neráf.	plno.	2,5 ± 2,7	1,5 ± 2,7	3,5 ± 0,9	-	5,0 ± 0,0
32		polo.	2,0 ± 1,8	2,0 ± 1,8	4,0 ± 0,0	-	4,5 ± 1,8
33		od.	2,0 ± 0,9	2,0 ± 1,8	3,5 ± 0,9	-	4,0 ± 0,9

Pozn. - nepřítomnost inhibiční zóny



Obrázek 17 – Velikost inhibičních zón (mm) v závislosti na složení emulzí s plnotučným mlékem.

Tabulka 35 – Růst testovaných gram pozitivních bakteriálních kmenů v přítomnosti emulzí hroznového oleje (5 % w/w) s monokaprylinem (8 % w/w) a slepých vzorků.

Číslo	Bakteriální kmeny				
	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Lactobacillus sp.</i>
25	++	+	+	+	+
26	++	+	+	+	+
27	++	+	+	+	+
28	++	+	++	+	++
29	++	+	++	+	+
30	++	++	++	++	+
31	++	+	++	+	++
32	++	+	++	++	+
33	++	+	++	+	++

Pozn. + ++ +++ stupeň nárůstu bakteriálního kmene na pevném médiu

- médium bez přítomnosti testovaného bakteriálního kmene



Tabulka 36 – Růst testovaných gramnegativních bakteriálních kmenů v přítomnosti emulzí hroznového oleje (5 % w/w) s monokaprylinem (8 % w/w) a slepých vzorků.

Číslo	Bakteriální kmeny				
	<i>P. vulgaris</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>E. coli</i>
25	+	+	+	++	+
26	+	+	+	++	+
27	+	+	+	++	+
28	++	++	++	++	+
29	++	++	++	+++	++
30	++	++	+	++	+
31	+	++	+	++	+
32	++	++	++	+++	++
33	++	++	++	++	++

Pozn. + ++ +++ stupeň nárůstu bakteriálního kmene na pevném médiu

- médium bez přítomnosti testovaného bakteriálního kmene

## 9 DISKUZE

Současné využívání přírodních antimikrobních látek, především pocházejících z rostlin, ke konzervaci potravin vyvolalo zvýšený zájem také o fenolické látky obsažené v hroznech révy vinné. Existuje proto předpoklad, že olej získávaný z hroznových jader může prodloužit trvanlivost obtížně udržitelných potravin, jako je např. mléko. Kromě toho je polyfenolům hroznů připisována celá řada zdraví prospěšných vlastností.

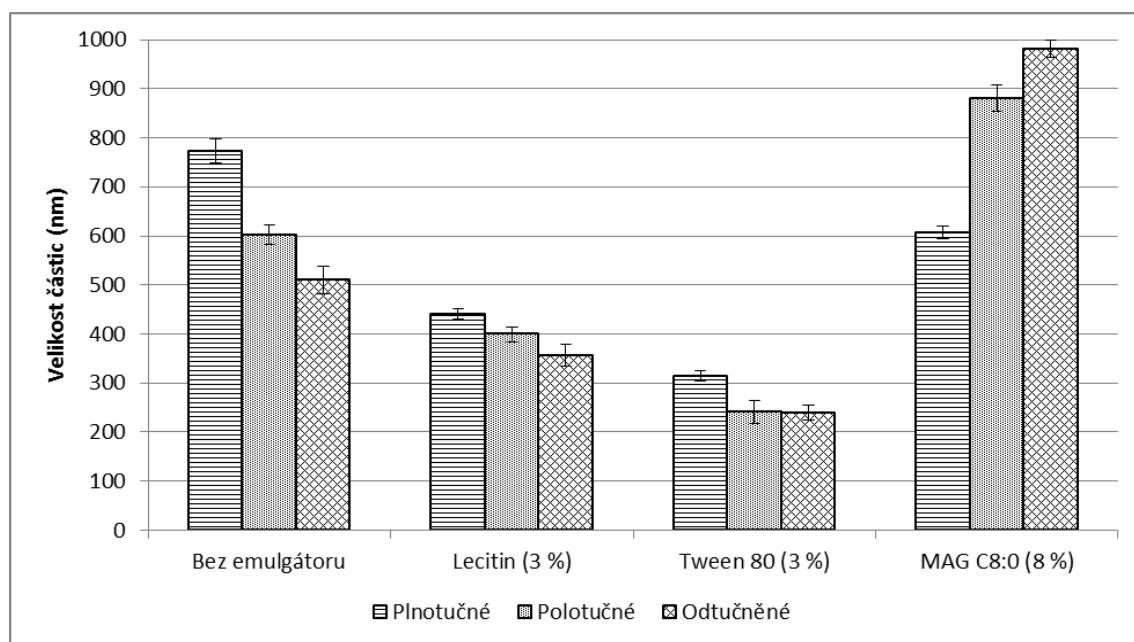
Jedním z cílů této práce bylo připravit stabilní emulze rafinovaného a nerafinovaného hroznového oleje s mlékem ošetřeným UHT metodou. Za hodnotící parametr stability byla zvolena vizuálně zaznamenaná fázová separace svědčící o rozpadu systému, která také představovala jev nevyhovující z případného spotřebitelského hlediska.

Na základě provedených experimentů bylo zjištěno, že každý z druhů testovaného trvanlivého mléka vykazoval dostatečnou emulgačně-stabilizační kapacitu umožňující vznik homogenní emulze s 5% koncentrací oleje z hroznových jader (rafinovaného i nerafinovaného) v trvání jednoho dne. Vznik emulzí bez použití emulgátorů byl umožněn díky přítomností povrchově aktivních složek, kaseinu a syrovátkových bílkovin, v mléčném séru. Z důvodu zvýšení stability byly k základní receptuře sestávající z mléka a 5 % (w/w) hroznového oleje přidány potravinářské emulgátory (monokaprylin, lecitin, Tween 80). Vyjma monokaprylinu umožnila 3% koncentrace emulgátorů v systému tvorbu homogenní emulze po sledovanou dobu 2 dnů.

Mnohé fyzikálně-chemické a senzorické vlastnosti potravinářských emulzí jsou závislé na povaze částic, které obsahují. K důležitým charakteristikám emulzních částic se řadí i v této práci stanovované parametry. Konkrétně se jednalo o střední hodnotu velikosti částic a velikostní distribuci. Každý z nich ovlivňuje vlastnosti, stabilitu i aplikaci emulzí.

Všechny připravené emulze je možné klasifikovat jako klasické potravinářské emulzní systémy, jejichž velikost částic se v závislosti na složení pohybovala v rozmezí od 250 až 1000 nm [68, s. 458]. Jak vyplynulo z analýzy, do skupiny makroemulzí spadaly již samotné testované vzorky mléka se střední hodnotou velikosti částic od 200 do 350 nm, takže z celkového pohledu velikostní charakteristika v případě připravených emulzí nevybočuje z předem nastaveného trendu.

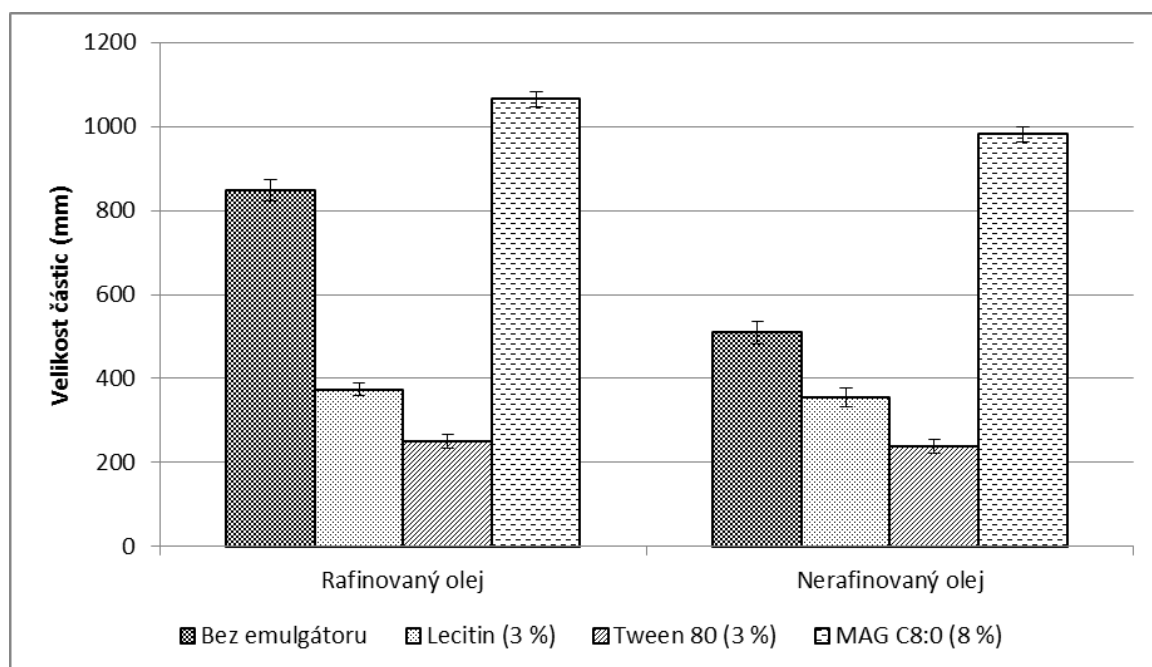
Při podrobnějším hodnocení velikosti z-průměru emulzních částic byl potvrzen výchozí teoretický předpoklad, a to závislost velikosti emulzních částic na typu použitého emulgátoru. Jak je zřejmé z Obrázku 18, 3% koncentrace lecitinu i Tweenu 80 bez ohledu na druh použitého mléka znamenala viditelný pokles z-průměru velikosti částic v porovnání s kontrolními emulzemi připravenými bez přítomnosti jakéhokoliv emulgátoru. V případě 3% koncentrace Tweenu 80 byla velikost emulzních částic redukována nejmarkantněji. U vzorků s 8% koncentrací monokaprylinu byl až na emulzi, kde disperzní prostředí tvořilo plnotučné mléko, pozorován trend opačný, a to zvýšení velikosti částic v porovnání s emulzemi, kde tento emulgátor chyběl. Tyto odlišné výsledky napříč testovanými emulzemi lze vysvětlit za pomoci konkrétní hodnoty hydrofilně-lipofilní rovnováhy (HLB) jednotlivých emulgátorů. Tween 80 s HLB hodnotou 15 představuje hydrofilní surfaktant s velkou rozpustností ve vodě, proto efektivně stabilizuje systémy o/v, což se nakonec odrazilo i ve výsledné malé velikosti částic. Naproti tomu monokaprylin o HLB hodnotě kolem šesti se, vzhledem ke své rozměrnější lipofilní části, rozpouští ve vodě méně, a tak dobře stabilizuje emulze typu v/o. HLB hodnota sójového lecitinu rovná osmi se nachází na pomezí obou zmíněných krajních situací [69]. To se v souladu s teorií hydrofilně-lipofilní rovnováhy odrazilo na velikosti částic emulzí připravených s tímto emulgátorem, které tvoří přechod mezi předešlými systémy.



Obrázek 18 – Vliv použití různých emulgátorů na velikost částic při 5% koncentraci nerafinovaného oleje z hroznových jader.

Na Obrázku 18 si lze dále povšimnout toho, že rostoucí obsah mléčného tuku v systému zvyšoval výslednou velikost částic. Odchytku od tohoto chování znovu tvořily emulze s 8% koncentrací monokaprylinu, u nichž byla pozorována tendence opačná.

Přídavek hroznového oleje (5 % w/w) do různých druhů mléka se bez výjimky projevil zvýšením velikosti emulzních částic. Srovnání velikosti částic u použitých olejů z hroznových jader odhalilo zajímavé zjištění, a to že nerafinovaný extra panenský olej tvořil emulzní částice o menší velikosti (viz Obrázek 19). Tento výsledek je možné dát do souvislosti s přítomností povrchově aktivních látek, volných mastných kyselin, bílkovin a fosfolipidů, které se nacházejí v surovém oleji a mohou tak přispívat k jeho lepší emulgaci. V rafinovaném oleji je obsah těchto nežádoucích látek snížen na minimální koncentraci.



Obrázek 19 – Vliv druhu použitého hroznového oleje (5 % w/w) na velikost částic v případě odtučněného mléka jako spojité fáze emulze.

Distribuce velikostí částic byla rovněž ovlivněna přítomností emulgátorů. Přídavek hroznového oleje do monodisperzního systému mléka znamenal nárůst polydisperzity, který se projevil vznikem multimodálních distribučních křivek. Výrazný pokles polydisperzity byl pak zaznamenán u emulzí stabilizovaných lecitinem (3 % w/w). Naopak emulze s monokaprylinem měly polydisperzitu natolik vysokou, že negativně ovlivňovala vyhodnocení měření velikosti částic.

V další části studie byl ověřován inhibiční efekt oleje z hroznových jader a jeho emulzí s mlékem na růst vybraných deseti bakterií. Z výsledků získaných v rámci difúzní diskové metody a doplňkové metody vyplývá, že hroznový olej (rafinovaný i nerafinovaný) v neředěné podobě, stejně jako připravené emulze s jeho 5% koncentrací, nevykazovaly antimikrobní účinky ani v případě jedné z testovaných bakteriálních kultur. Tyto negativní výsledky mohly být ovlivněny nedostatečným obsahem polyfenolických látek v oleji z hroznových jader. Yilmaz a Toledo [56, s. 44-46] k tomu ve své studii uvádějí, že polyfenoly nejsou v hroznovém oleji výrazně zastoupeny z důvodu jejich vyšší polariry. Více polyfenolických látek se tak koncentruje např. v extraktu z hroznových jader (GSE), ve kterém v závislosti na odrůdách podle analýzy Baydara a kol. [70, s. 799-803], představuje celkový obsah fenolických látek 507–589 mg/g GAE. Následné ověření antimikrobní účinnosti těchto extraktů pomocí difúzní diskové metody potvrdilo v rámci zmíněné studie inhibici všech sledovaných bakterií, včetně devíti testovaných i v této předkládané diplomové práci. Porovnání s množstvím fenolických látek stanovených v oleji z hroznových jader dle práce Bailové a kol. (59–115,5 µg/g GAE) [52, s. 1130] umožňuje konstatovat, že obsah polyfenolů v testovaných olejích, potažmo emulzích nedostačoval k prokázání antimikrobních účinků.

Inhibiční účinky byly zaznamenány pouze u emulzí s 8% koncentrací monokaprylinu a to napříč celým bakteriálním spektrem. Podle aktuální studie publikované Hyldgaardem a kol. [71] spočívá mechanismus antimikrobního účinku monokaprylinu v začlenění do plazmatické membrány bakteriální buňky, kde následně dochází k zvýšení hydratace doprovázené permeabilizací membrány. Výraznější antimikrobní účinky byly pozorovány u grampozitivních bakterií. Z této skupiny a zároveň v rámci všech testovaných kmenů byl nejcitlivější k působení emulzí s monokaprylinem *Micrococcus luteus*. Nejdolnější grampozitivní bakterií byl shledán *Staphylococcus aureus*. V rámci bakterií s gramnegativním typem buněčné stěny byly nejvíce inhibovány *Escherichia coli* a *Pseudomonas fluorescens*. Naopak nejvyšší rezistence byla prokázána u *Serratia marcescens*. Navrátil ve své práci [72, s. 36-50], kdy sledoval růst bakterií v přítomnosti monokaprylinu, dospěl k podobným závěrům. Z hlediska rozdílnosti metodiky však není možné přímé srovnání.

Srovnání inhibiční aktivity připravených emulzí s monokaprylinem odhalilo, že vzorky slepých pokusů vykazovaly v rámci obou použitých metod stejnou nebo vyšší inhibiční

aktivitu než emulze s 5% koncentrací oleje z hroznových jader. Místo očekávaného synergistického účinku lze spíše usuzovat na antagonistické působení hroznového oleje.

Pro praktické využití ke konzervaci potravin přicházely v úvahu pouze emulze s 8% koncentrací monokaprylinu. Ze sensorického hlediska se však osloveným spotřebitelům jevily jako nepříjemné, zejména díky nepříznivé vůni.

## ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na přípravu stabilních emulzí mléka a hroznového oleje za použití různých emulgátorů. Vyrobené emulze byly následně hodnoceny vizuálně a pomocí fotonové korelační spektroskopie. V další části studie byly ověřeny antimikrobní vlastnosti připravených emulzí stejně jako samotného rafinovaného i nerafinovaného oleje z hroznových jader.

Na základě výsledků experimentální části je možné vyvodit následující závěry:

- pro vznik emulze o malé střední velikosti částic a s monomodální velikostní distribucí představuje optimální přípravu homogenizace v trvání 10 minut při otáčkách 13 400/min,
- velikost částic připravených emulzí závisela na typu emulgátoru a jeho HLB hodnotě, dále na tučnosti mléka a způsobu zpracování hroznového oleje,
- z hlediska vlivu na velikost částic se jako optimální emulgátor jevil Tween 80, kdy při jeho 3% koncentraci v systému se z-průměr velikosti částic nacházel v nejmenším sledovaném intervalu z celého testovaného souboru emulzí (250–315 nm),
- z pohledu velikostní distribuce částic v emulzním systému představoval nejvhodnější emulgátor lecitin, který umožnil u připravených emulzí vznik převážně monomodálních distribučních křivek,
- rafinovaný ani nerafinovaný olej z hroznových jader, stejně jako emulze sestávající z mléka a 5 % (w/w) hroznového oleje nezpůsobily inhibici sledovaných bakterií,
- 3% koncentrace Tweenu 80 ani lecitinu nezvýšila antimikrobní aktivitu emulzí,
- emulze s 8% koncentrací monokaprylinu inhibovaly růst testovaných bakterií, přičemž nejodolnější vůči jejich působení byla gramnegativní *Serratia marcescens*, zatímco nejvyšší citlivost byla zaznamenána u *Micrococcus luteus*,
- emulze bez obsahu hroznového oleje vykazovaly stejnou nebo vyšší antimikrobní aktivitu než emulze s jeho 5% koncentrací.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2., opr. vyd. Praha: Academia, 1996, dotisk 2007. Kniha druhá, Kapitola čtvrtá, Živý systém jako chemický stroj. ISBN 80-200-0600-1.
- [2] LUŠTINEC, Jiří a Viktor ŽÁRSKÝ. *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-0563-5.
- [3] NOVÁČEK, František. *Fytochemické základy botaniky*. Vyd. 2., dopl. Olomouc: Fontána, 2009. ISBN 80-7336-457-1.
- [4] WINK, Michael. *Biochemistry of plant secondary metabolism*. 2nd ed. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell, 2010. Annual plant reviews, v. 40. ISBN 978-1-4051-8397-0.
- [5] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 2 sv. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [6] ZUKALOVÁ, Helena a Jarmil VÝMOLA. Glukosinoláty a krmivářství. In: *AGRICULTURA – SCIENTIA – PROSPERITAS: Řepka, Mák, Hořčice, Praha 19. února 2003: sborník referátů z konference katedry rostlinné výroby ČZU v Praze* [online]. Praha: ČZU, Katedra rostlinné výroby AF, 2003 [cit. 2013-02-15]. Dostupné z: [http://konference.agrobiologie.cz/2003-02-19/03-zukalovavymola\\_glukosinolaty\\_a\\_krmivarstvi.pdf](http://konference.agrobiologie.cz/2003-02-19/03-zukalovavymola_glukosinolaty_a_krmivarstvi.pdf)
- [7] REIGOSA, Manuel J. et al. *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications*. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2006. ISBN 978-1-4020-4279-9.
- [8] PATRAN, Amlan K. *Dietary phytochemicals and microbes*. Dordrecht: Springer, 2012. ISBN 978-9400739253.
- [9] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2., opr. vyd. Praha: Academia, 1996, dotisk 2007. Kniha třetí, Kapitola šestá, Rostliny – důležitý zdroj přírodních látek. ISBN 80-200-0600-1.
- [10] WINK, Michael. *Functions and biotechnology of plant secondary metabolites*. 2nd ed. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell, 2010. Annual plant reviews, v. 39. ISBN 978-1-4051-8528-8.



- [11] WATSON, Ronald Ross a Victor R PREEDY. *Bioactive foods in promoting health: Fruits and vegetables*. IRITI, Marcello a Franco FAORO. Boston: Academic Press, 2010, s. 581-620. Chap. 38, Bioactive Chemicals and Health Benefits of Grapevine Products. ISBN 978-0-12-374628-3.
- [12] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 2 sv. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [13] TOKUSOGLU, Ozlem a Clifford HALL, III. *Fruit and cereal bioactives: sources, chemistry, and applications*. Boca Raton: CRC Press, 2011. ISBN 978-1-4398-0665-4.
- [14] WAKSMUNDZKA-HAJNOS, Monika a Joseph SHERMA. *High performance liquid chromatography in phytochemical analysis*. HYÖTYLÄINEN, Tuulia a Maarit KIVILOMPOLO. Boca Raton: CRC Press, 2011, s. 477-512. Chap. 19, Application of HPLC in the analysis of phenols, phenolic acids, and tannins. *Chromatographic science*, v. 102. ISBN 978-1-4200-9260-8.
- [15] ZLOCH, Zdeněk. Zdravotní efekt polyfenolů z hlediska jejich příjmu a využitelnosti. *Vojenské zdravotnické listy*. 2003, roč. 72, č. 5, s. 226-229. ISSN 0372-7025.
- [16] SLANINA, Jiří a Eva TÁBORSKÁ. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2004, roč. 98, č. 5, s. 239-245. ISSN 0009-2770.
- [17] TERRY, Leon A. *Health-promoting properties of fruits and vegetables*. TEISSEDRE, Pierre-Louis and Christian CHERVIN. Wallingford, Oxfordshire: CABI, 2011, s. 154-170. Chap. 9, Grape. ISBN 978-1845935283.
- [18] KALAČ, Pavel. *Organická chemie přírodních látek a kontaminantů*. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 2001. ISBN 80-7040-520-1.
- [19] HARMATHA, JURAJ. Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenylypropanoidů. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2005, roč. 99, č. 9, s. 622-632. ISSN 0009-2770.
- [20] VERMERRIS, Wilfred a Ralph L NICHOLSON. *Phenolic compound biochemistry*. Dordrecht: Springer, 2006. ISBN 978-1-4020-5163-0.

- [21] KOLEČKÁŘ, Vít et al. Proanthocyanidiny a jejich antioxidační aktivita. *Chem. Listy*. 2012, roč. 106, č. 2, s. 113-121. ISSN 0009-2770.
- [22] SILVESTRI, Ilaria Proietti. *Synthesis of antioxidant compounds and polyfunctionalized intermediates by transition metalmediated reactions* [online]. Roma, 2011 [2013-02-10]. Disertační práce. Sapienza - Università di Roma, Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali, Scuola di Dottorato in Scienze Chimiche. Vedoucí práce Giuliana Righi. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10805/1221>
- [23] FISHBEIN, James C. *Advances in Molecular Toxicology, Volume 6*. OBIED, Hassan K. et al. Oxford: Elsevier, 2012, s. 195-242. Chapter Six, Pharmacology of Olive Biophenols. ISBN 978-0-444-59389-4.
- [24] MORENO, Juan a Rafael PEINADO. *Enological chemistry*. Amsterdam: Elsevier, 2012. ISBN 978-0123884381.
- [25] SCHMIDT, Olaf. *Wood and Tree Fungi: Biology, Damage, Protection, and Use*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006. ISBN 978-3-540-32138-5.
- [26] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902391-5-3.
- [27] GOLDBERG, Gail. *Plants: Diet and Health*. Oxford: Blackwell Science for the British Nutrition Foundation, 2003. ISBN 978-0-632-05962-1.
- [28] FRAGA, Cesar G. *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition and Pharmacology*. JAGANATH, Indu B. and Alan CROZIER. Hoboken, N.J. : Wiley, 2010, s. 1-49. Chap. 1, Dietary Flavonoids and Phenolic Compounds. Wiley-IUBMB series on biochemistry and molecular biology. ISBN 978-0-470-28721-7.
- [29] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 8090239145.
- [30] CSEKE, Leland J. et al. *Natural products from plants*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC/Taylor & Francis, 2006. ISBN 0-8493-2976-0.
- [31] KURIAN, Alice a Asha M. SANKAR. *Medicinal Plants: Vol.02*. New delhi: New India Publishing Agency, 2007. Horticulture science series. ISBN 81-89422-42-1.
- [32] ROBBINS, Rebecca J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2003, roč. 51, č.

- 10, s. 2866-2887 [cit. 2013-02-01]. ISSN 1520-5118. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1021/jf026182t>
- [33] CROZIER, Alan et al. *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Oxford, UK: Blackwell Pub., 2006. ISBN 978-1-4051-2509-3.
- [34] PAVLOUŠEK, Pavel. *Pěstování révy vinné: moderní vinohradnictví*. Praha: Grada, c2011. ISBN 978-80-247-3314-2.
- [35] SMALL, Ernest. *Top 100 Food Plants*. Ottawa: NRC Research Press, 2009. National government publication. ISBN 978-0-660-19858-3.
- [36] *Food And Agriculture Organization Of The United Nations Statistics (FAOSTAT)* [online databáze]. Rome: FAO Statistical Division, 2011 [cit. 2013-02-25]. Dostupné z: <http://faostat.fao.org/>
- [37] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2010. ISBN 978-80-7418-051-4.
- [38] TERRY, Leon A. *Health-promoting Properties of Fruit and Vegetables*. TEISSEDRE, Pierre-Louis a Christian CHERVIN. Oxfordshire: CABI, 2011, s. 154-170. Chap. 9, Grape. ISBN 978-1845935283
- [39] KRAUS, Vilém, HUBÁČEK, Vítězslav a ACKERMANN, Petr. *Rukověť vinaře*. Vyd. 1. Praha: Květ, 2000. 262 s., [8] barev. obr. příl. ISBN 80-85362-34-1.
- [40] GUNSTONE, Frank D. *Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses*. 2nd ed. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell, 2011. ISBN 978-1-4443-3268-1.
- [41] GUNSTONE, Frank D. *The chemistry of oils and fats: sources, composition, properties, and uses*. Boca Raton, FL : CRC Press, 2004. ISBN 978-1405116268.
- [42] KRAUS, Vilém et al. *Réva a víno v Čechách a na Moravě: tradice a současnost*. Praha: Radix, 1999. ISBN 80-86031-23-3.
- [43] PAVLOUŠEK, Pavel. *Výroba vína u malovinařů. 2., aktualiz. a rozš. vyd.* Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3487-3.

- [44] CADENAS, Enrique a Lester PACKER. *Handbook of antioxidants*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, c2002. ISBN 0-8247-0547-5.
- [45] XIA, En-Qin et al. Biological activities of polyphenols from grapes. *Int J Mol Sci* [online]. 2010, roč. 11, č. 2, s. 622-46 [cit. 2013-03-20]. ISSN 1422-0067. Dostupné z:  
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms11020622>
- [46] KRAUS, Vilém, Zuzana FOFFOVÁ a Bohumil VURM. *Nová encyklopedie českého a moravského vína*. Praha: Praga Mystica, c2008. ISBN 978-80-86767-09-3.
- [47] JACKSON, Ron S. *Wine science: principles and applications*. 3rd ed. Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press, 2008. Food science and technology international series. ISBN 978-0123736468.
- [48] SHAHIDI, Fereidoon a Bailey A. E. *Bailey's industrial oil and fat products: edible oil and fat products*. Chemistry, properties, and health effects. 6th ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2005. Volume 1, Edible Oil and Fat Products: Chemistry, Properties, and Health Effects. ISBN 0-471-38552-2.
- [49] PILS, Ingeborg. *Kuchařské suroviny: příručka o více než 1000 ingrediencích*. Praha: Slovart, 2012. ISBN 978-80-7391-596-4.
- [50] BURG, Patrik a Pavel ZEMÁNEK. Možnosti využití matolin z vinařské produkce. *Vinařský obzor*. 2012, roč. 105, č. 5, s. 258-259. ISSN 1212-7884.
- [51] SEDLÁČEK, Milan. Hroznový olej. In: *Encyklopedie vína, vinařství a vinohradnictví* [online]. [cit. 2013-03-20]. Dostupné z: <http://www.znalecvin.cz/hroznovy-olej/>
- [52] BAIL, Stefanie et al. Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chemistry* [online]. 2008, roč. 108, č. 3, s. 1122-1132 [cit. 2013-04-10]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.063>
- [53] MADAWALA, S.R.P. Lipid components and oxidative status of selected specialty oils. *Grasas y Aceites* [online]. 2012, roč. 63, č. 2, s. 143-151 [cit. 2013-03-25]. ISSN 0017-3495. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.083811>
- [54] SHAHIDI, Fereidoon. *Nutraceutical and specialty lipids and their co-products*. GUNSTONE, Frank D. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis, 2006, 91-125. Chap.

- 5, Minor specialty Oils. Nutraceutical science and technology, 5. ISBN 978-1574444995.
- [55] MORET, Sabrina et al. Processing effect on the polyaromatic hydrocarbon content of grapeseed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2000, roč. 77, č. 12, s. 1289–1292. ISSN 0003-021X.
- [56] YILMAZ, Yusuf a Romeo T. TOLEDO. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seeded polyphenols [online]. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006, roč. 19, č. 1, s. 41-48 [cit. 2013-04-12]. ISSN 0889-1575. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2004.10.009>
- [57] WALSTRA, Pieter, Jan T. M. WOUTERS a T. J. GEURTS. *Dairy science and technology*. 2nd ed. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis, 2006. Food science and technology (Taylor & Francis), 146. ISBN 978-0824727635.
- [58] CHANDAN, Ramesh C, Arun KILARA a Nagendra P SHAH. *Dairy processing & quality assurance*. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2008. ISBN 978-0813827568.
- [59] FUQUAY, John W., Patrick F. FOX a Paul L. H. MCSWEENEY. *Encyclopedia of dairy sciences*. 2. ed. Boston: Elsevier/Academic Press, 2011. Volume 3: L-N. ISBN 978-0-12-374402-9.
- [60] FOX, Patrick F. *Advanced dairy chemistry. Vol. 3, Lactose, water salts and vitamins*. 2nd ed. New York: Chapman & Hall, 1997. ISBN 978-0412630200.
- [61] GAJDŮŠEK, Stanislav. *Laktologie*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 80-7157-687-3.
- [62] ASADUZZAMAN, Md. *Emulsifying Properties of Milk Fat Globule Fragment Prepared from Butter Milk by Microfiltration* [online]. Gent, 2011 [2013-04-15]. Disertační práce. Universiteit Gent, Faculty of bioscience engineering, Option Food Science and Technology. Vedoucí práce Koen Dewettinck. Dostupné z: [http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/001/789/759/RUG01-001789759\\_2012\\_0001\\_AC.pdf](http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/001/789/759/RUG01-001789759_2012_0001_AC.pdf)
- [63] FOX, Patrick P. a Paul L. H. MCSWEENEY. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. New York: Blackie Academic & Professional, 1998. ISBN 978-0412720000.

- [64] FUQUAY, John W., Patrick F. FOX a Paul L. H. MCSWEENEY. *Encyclopedia of dairy sciences*. 2. ed. Boston: Elsevier/Academic Press, 2011. Volume 1: A-C. ISBN 978-0-12-374402-9.
- [65] ZAYAS, Joseph F. *Functionality of proteins in food*. New York: Springer, 1997. ISBN 978-3540602521.7
- [66] THOMPSON, Abby, Mike BOLAND a Harjinder SINGH. *Milk proteins : from expression to food*. Boston: Academic Press/Elsevier, 2009. Food science and technology, International series. ISBN 978-0123740397.
- [67] JANIŠ, Rahula, Jiří KREJČÍ a Antonín KLÁSEK. Preparation of 1-monoacylglycerols from glycidol and fatty acids catalyzed by the chromium (III)-fatty acid system. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2000, roč. 102, č. 5, s. 351-354. ISSN 1438-7697.
- [68] SHAHIDI, Fereidoon a Bailey A. E. *Bailey's industrial oil and fat products: edible oil and fat products*. Chemistry, properties, and health effects. 6th ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2005. Volume 4, Lipid emulsions. ISBN 0-471-38552-2.
- [69] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. Hydrofilně-lipofilní rovnováha (HLB). *Co je co v povrchové a koloidní chemii* [online]. © 2005 [cit. 2013-05-19]. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-001/hesla/hydrofilne-lipofilni\\_rovnovaha\\_-hlb-.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/hydrofilne-lipofilni_rovnovaha_-hlb-.html)
- [70] BAYDAR, Nilgun Gokhur et al. Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts. *International Journal of Food Science and Technology*. 2006, roč. 41, č. 7, s. 799-804. ISSN 1365-2621.
- [71] HYLDGAARD, Morten et al. Antimicrobial mechanism of Monocaprylate [online]. *Appl Environ Microbiol*. 2012, roč. 78, č. 8, s. 2957-2965 [cit. 2013-05-12]. ISSN 1098-5336. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1128%2FAEM.07224-11>
- [72] NAVRÁTIL, Jan. *Inhibice růstu vybraných bakterií vlivem monokaprylinu* [online]. Zlín, 2009 [2013-05-15]. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická, Ústav potravinářského inženýrství. Vedoucí práce Leona Buňková. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10563/10758>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

FAO	Organizace pro výživu a zemědělství.
GAE	Ekvivalenty kyseliny gallové.
GSE	Extrakt z hroznových jader.
MAG C8:0	Monoacylglycerol kyseliny kaprylové.
MHA	Mueller-Hintonův agar.
MHB	Mueller-Hintonův bujón.
MPA	Masopeptonový agar.
MRS	Podle DeMana, Rogosiho a Sharpeho.
o/v	Olej ve vodě.
PAH	Polyaromatické uhlovodíky.
PCA	Plate count agar.
PCS	Fotonová korelační spektroskopie.
UHT	Ultra High Temperature.
v/o	Voda v oleji.

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 – Flavanový skelet [13, s. 173].....	22
Obrázek 2 – Flavony [13, s. 173].....	23
Obrázek 3 – Flavonoly [13, s. 173].....	23
Obrázek 4 – Flavan-3-oly [13, s. 173]. ....	24
Obrázek 5 – Flavanony [13, s. 173].....	25
Obrázek 6 – Flavyliový kation [27, s. 30].....	26
Obrázek 7 – Izoflavony [30, s. 23].....	26
Obrázek 8 – Jednoduché rostlinné fenoly [30, s. 21].....	27
Obrázek 9 – Hydroxybenzoové kyseliny [20, s. 4]. ....	28
Obrázek 10 – Skořicová kyselina a její homology [20, s. 5]. ....	29
Obrázek 11 – <i>Trans</i> -resveratrol [20, s. 16].....	29
Obrázek 12 – Řez bobulí révy vinné.....	31
Obrázek 13 – Struktura a složení mléka při zvětšení.....	42
Obrázek 14 – Vliv druhu přípravy na distribuci velikosti částic. ....	60
Obrázek 15 – Distribuce velikosti částic v závislosti na typu mléka.....	61
Obrázek 16 - Vliv typu emulgátoru na distribuci velikosti částic vybraných emulzí. ....	64
Obrázek 17 – Velikost inhibičních zón (mm) v závislosti na složení emulzí s plnotučným mlékem.....	72
Obrázek 18 – Vliv použití různých emulgátorů na velikost částic při 5% koncentraci nerafinovaného oleje z hroznových jader.....	75
Obrázek 19 – Vliv druhu použitého hroznového oleje (5 % w/w) na velikost částic v případě odtučněného mléka jako spojité fáze emulze. ....	76



**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 – Skupiny sekundárních metabolitů podle způsobu jejich biosyntézy [1, s. 110].....	16
Tabulka 2 – Nejběžnější typy fenolických látek v rostlinách seřazené podle počtu uhlíků [19, s. 623]; [25, s. 100]. .....	21
Tabulka 3 – Celkové množství fenolů (mg/kg FW) [44, s. 404]. .....	33
Tabulka 4 – Základní rozdělení fenolických sloučenin v hroznech [34, s. 71]. .....	34
Tabulka 5 – Zastoupení mastných kyselin v oleji z hroznových jader [51, s. 146]. .....	40
Tabulka 6 – Zastoupení sterolů v oleji z hroznových jader [51, s. 148]. .....	41
Tabulka 7 – Zastoupení tokolů v oleji z hroznových jader [51, s. 147]. .....	41
Tabulka 8 – Receptura emulze připravované míchadlem s 2 % (w/w) hroznového oleje. ....	53
Tabulka 9 – Receptura emulze připravované míchadlem s 5 % (w/w) hroznového oleje. ....	53
Tabulka 10 – Receptura emulze připravované Ultra-Turraxem s 2 % (w/w) hroznového oleje. ....	54
Tabulka 11 - Receptura emulze připravované Ultra-Turraxem s 5 % (w/w) hroznového oleje. ....	54
Tabulka 12 – Vizuální pozorování kontrolních emulzí bez přídavku emulgátoru pro 5% koncentraci hroznového oleje. ....	58
Tabulka 13 – Vizuální pozorování emulzí pro 5% koncentraci hroznového oleje a 3% koncentraci Tweenu 80.....	58
Tabulka 14 – Vizuální pozorování emulze pro 5% koncentraci hroznového oleje a 3% koncentraci lecitinu. ....	59
Tabulka 15 – Vizuální pozorování emulze pro 5% koncentraci hroznového oleje a 8% koncentraci MAG C8:0. ....	59
Tabulka 16 – Vliv přípravy na zvolené parametry emulze. ....	60
Tabulka 17 – Stanovení průměrné velikosti a distribuce velikosti částic u různých druhů mlék.....	61
Tabulka 18 – Stanovení průměrné velikosti a distribuce velikosti částic u kontrolních emulzí hroznového oleje bez emulgátoru.....	62

Tabulka 19 – Stanovení průměrné velikosti a distribuce velikosti částic u emulzí s 5% koncentrací hroznového oleje a 3% koncentrací Tweenu 80. ....	63
Tabulka 20 – Stanovení průměrné velikosti a distribuce velikosti částic u emulzí s 5% koncentrací hroznového oleje a 3% koncentrace lecitinu.....	63
Tabulka 21 – Stanovení průměrné velikosti a distribuce velikosti částic u emulzí s 5% koncentrací hroznového oleje a 8% koncentrací MAG C8:0. ....	64
Tabulka 22 – Studium inhibičních účinků oleje z hroznových jader na grampozitivních vybraných bakteriálních kmenech. ....	65
Tabulka 23 – Studium inhibičních účinků oleje z hroznových jader na gramnegativních vybraných bakteriálních kmenech. ....	65
Tabulka 24 – Růst testovaných grampozitivních bakteriálních kmenů v přítomnosti oleje z hroznových jader.....	66
Tabulka 25 – Růst testovaných gramnegativních bakteriálních kmenů v přítomnosti oleje z hroznových jader.....	66
Tabulka 26 – Inhibiční účinky kontrolních emulzí (bez emulgátoru) o 5% koncentraci hroznového oleje na vybrané grampozitivní mikroorganismy.....	67
Tabulka 27 – Růst testovaných grampozitivních bakteriálních kmenů v přítomnosti kontrolních emulzí.....	67
Tabulka 28 – Inhibiční účinky emulzí slepého pokusu (bez oleje z hroznových jader) o 3% koncentraci emulgátorů lecitinu a Tweenu 80 na vybrané druhy gramnegativních bakterií. ....	68
Tabulka 29 – Inhibiční účinky emulzí o 5% koncentraci hroznového oleje a 3% koncentraci emulgátorů lecitinu a Tweenu 80 na vybrané druhy gramnegativních bakterií. ....	68
Tabulka 30 – Růst testovaných gramnegativních bakteriálních kmenů v přítomnosti emulzí hroznového oleje a slepých vzorků. ....	69
Tabulka 31 – Inhibiční účinky emulzí slepého pokusu (bez oleje z hroznových jader) o 8% koncentraci monokaprylinu na vybrané grampozitivní bakterie.....	70
Tabulka 32 – Inhibiční účinky emulzí slepého pokusu (bez oleje z hroznových jader) o 8% koncentraci monokaprylinu na vybrané gramnegativní bakterie. ....	71
Tabulka 33 – Inhibiční účinky emulzí o 5% koncentraci hroznového oleje a 8% koncentraci monokaprylinu na vybrané grampozitivní bakterie. ....	71

---

Tabulka 34 – Inhibiční účinky emulzí o 5% koncentraci hroznového oleje a 8% koncentraci monokaprylinu na vybrané gramnegativní bakterie.....	71
Tabulka 35 – Růst testovaných grampozitivních bakteriálních kmenů v přítomnosti emulzí hroznového oleje (5 % w/w) s monokaprylinem (8 % w/w) a slepých vzorků.....	72
Tabulka 36 – Růst testovaných gramnegativních bakteriálních kmenů v přítomnosti emulzí hroznového oleje (5 % w/w) s monokaprylinem (8 % w/w) a slepých vzorků.....	73

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Seznam připravených emulzí s 2% koncentrací hroznového oleje.

Příloha 2: Vybraná vyhodnocení difúzní diskové metody.

Příloha 3: Vybraná vyhodnocení doplňkové metody.

**PŘÍLOHA 1: SEZNAM PŘIPRAVENÝCH EMULZÍ S 2%  
KONCENTRACÍ (W/W) HROZNOVÉHO OLEJE**

Emulgátor	Koncentrace emulgátoru [%]	Typ mléka	Příprava [ot./min]	Stabilita emulze při 25 °C	
				0. den	1. den
		plnotučné	1050/10	nehomogenní	nehomogenní
		polotučné		nehomogenní	nehomogenní
		odtučněné		nehomogenní	nehomogenní
		plnotučné	13400/10	homogenní	homogenní
		polotučné		homogenní	homogenní
		odtučněné		homogenní	homogenní
Tween 80	3	plnotučné	1050/10	homogenní	nehomogenní
	3	polotučné		homogenní	nehomogenní
	3	odtučněné		homogenní	nehomogenní
	3	plnotučné	13400/10	homogenní	homogenní
	3	polotučné		homogenní	homogenní
	3	odtučněné		homogenní	homogenní
	5	plnotučné	1050/10	homogenní	nehomogenní
	5	polotučné		homogenní	nehomogenní
	5	odtučněné		homogenní	nehomogenní
	5	plnotučné	13400/10	homogenní	homogenní
	5	polotučné		homogenní	homogenní
	5	odtučněné		homogenní	homogenní
	8	plnotučné	1050/10	homogenní	nehomogenní
	8	polotučné		homogenní	nehomogenní
	8	odtučněné		homogenní	nehomogenní
	8	plnotučné	13400/10	homogenní	homogenní
	8	polotučné		homogenní	homogenní
	8	odtučněné		homogenní	homogenní

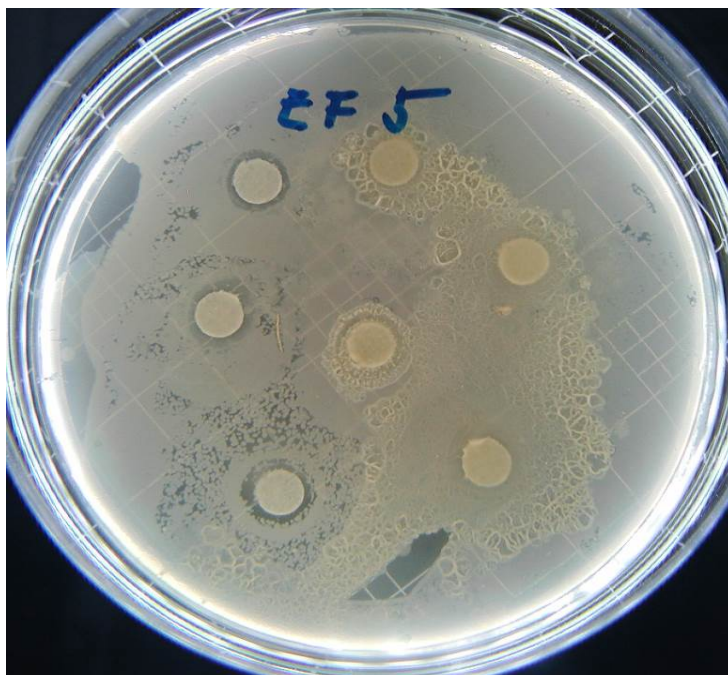
Příloha 1 – pokračování 1.

Emulgátor	Koncentrace emulgátoru [%]	Typ mléka	Příprava [ot./min]	Stabilita emulze	
				0. den	1. den
Lecitin	3	plnotučné	1050/10	homogenní	nehomogenní
	3	polotučné		homogenní	nehomogenní
	3	odtučněné		homogenní	nehomogenní
	3	plnotučné	13400/10	homogenní	homogenní
	3	polotučné		homogenní	homogenní
	3	odtučněné		homogenní	homogenní
	5	plnotučné	1050/10	homogenní	nehomogenní
	5	polotučné		homogenní	nehomogenní
	5	odtučněné		homogenní	nehomogenní
	5	plnotučné	13400/10	homogenní	homogenní
	5	polotučné		homogenní	homogenní
	5	odtučněné		homogenní	homogenní
	8	plnotučné	1050/10	homogenní	nehomogenní
	8	polotučné		homogenní	nehomogenní
	8	odtučněné		homogenní	nehomogenní
	8	plnotučné	13400/10	homogenní	homogenní
	8	polotučné		homogenní	homogenní
	8	odtučněné		homogenní	homogenní
MAG C8:0	3	plnotučné	1050/10	nehomogenní	nehomogenní
	3	polotučné		nehomogenní	nehomogenní
	3	odtučněné		nehomogenní	nehomogenní
	3	plnotučné	13400/10	nehomogenní	nehomogenní
	3	polotučné		nehomogenní	nehomogenní
	3	odtučněné		nehomogenní	nehomogenní
	5	plnotučné	1050/10	nehomogenní	nehomogenní
	5	polotučné		nehomogenní	nehomogenní
	5	odtučněné		nehomogenní	nehomogenní
	5	plnotučné	13400/10	nehomogenní	nehomogenní
	5	polotučné		nehomogenní	nehomogenní
	5	odtučněné		nehomogenní	nehomogenní

Příloha 1 – pokračování 2.

Emulgátor	Koncentrace emulgátoru [%]	Typ mléka	Příprava [ot./min]	Stabilita emulze	
				0. den	1. den
MAG C8:0	8	plnotučné	1050/10	nehomogenní	nehomogenní
	8	polotučné		nehomogenní	nehomogenní
	8	odtučněné		nehomogenní	nehomogenní
	8	plnotučné	13400/10	nehomogenní	homogenní
	8	polotučné		nehomogenní	homogenní
	8	plnotučné		nehomogenní	homogenní

## PŘÍLOHA 2: VYBRANÁ VYHODNOCENÍ DIFÚZNÍ DISKOVÉ METODY



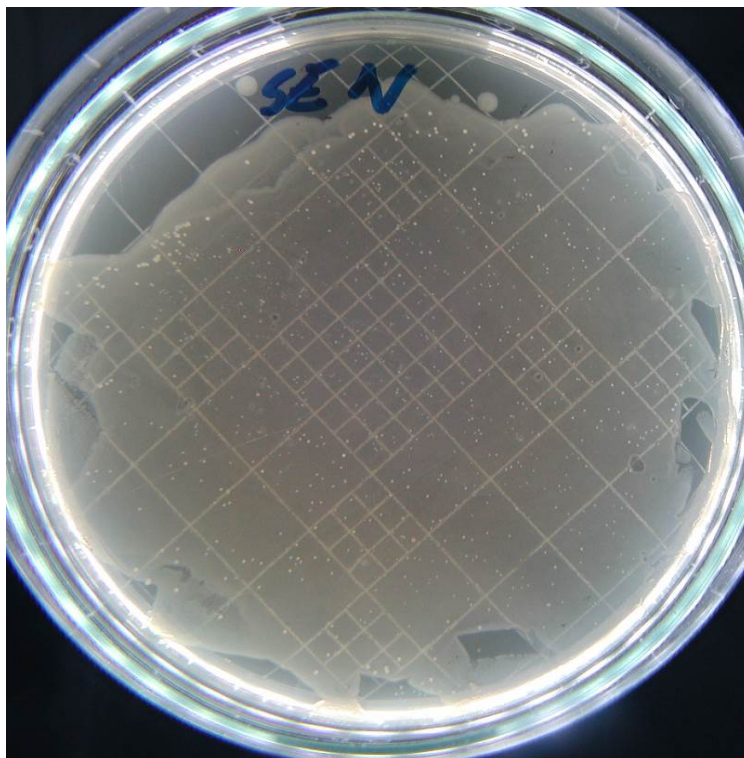
Příloha 2.1 - Vliv emulzí hroznového oleje s monokaprylinem (vlevo) a emulzí hroznového oleje s lecitinem (vpravo) na růst *E. faecalis*.



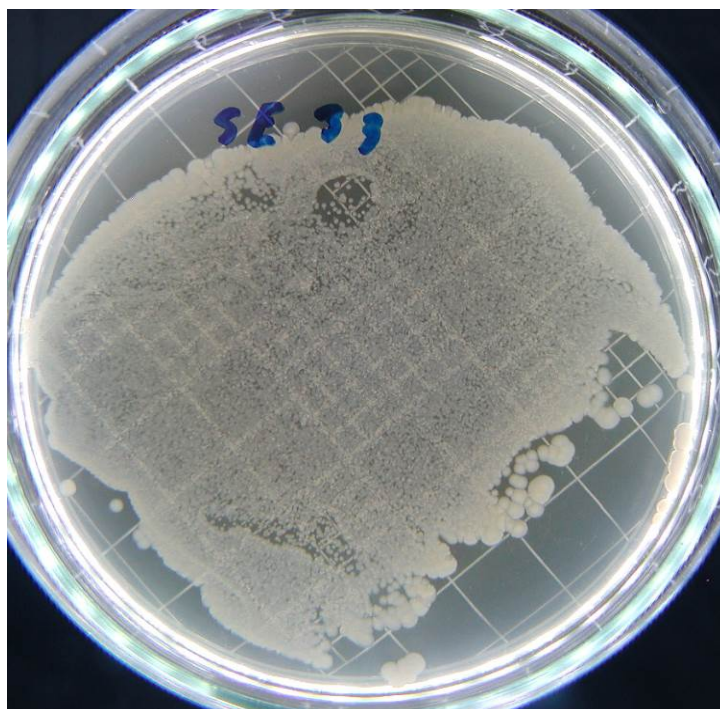
Příloha 2.2 - Vliv emulzí hroznového oleje s monokaprylinem na růst *M. luteus*.



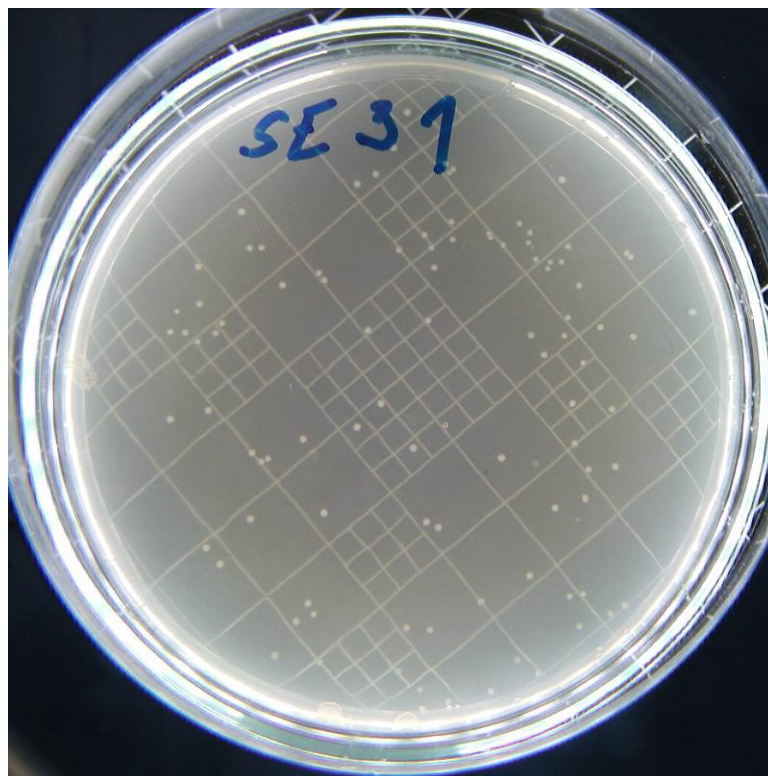
### PŘÍLOHA 3: VYBRANÁ VYHODNOCENÍ DOPLŇKOVÉ METODY



Příloha 3.1- Růst *S. enterica* v přítomnosti nerafinovaného oleje z hroznových jader.



Příloha 3.2 - Inhibice růstu *S. enterica* v přítomnosti emulze hroznového oleje s monokaprylinem.



Příloha 3.3 – Inhibice růstu *S. enterica* v přítomnosti slepého vzorku s monokarylinem.