

Účinek kyseliny kaprylové na vybrané kmeny bakterií

Bc. Eva Kašpárková

Diplomová práce
2006



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství a chemie
akademický rok: 2005/2006

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eva KAŠPÁRKOVÁ**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů
a kosmetiky**

Téma práce: **Účinek kyseliny kaprylové na vybrané kmeny
bakterií**

Zásady pro vypracování:

1. teoretický a taxonomický popis testovaných druhů bakterií
2. fyzikálně-chemické vlastnosti kyseliny kaprylové a její průmyslové využití
3. testování účinku kyseliny kaprylové na vybrané kmeny bakterií
4. zhodnocení antimikrobiálního účinku kyseliny kaprylové a další doporučení pro její využití

Rozsah práce:
Rozsah příloh:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
Dle doporučení vedoucího DP.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.**
Ústav potravinářského inženýrství a chemie
Datum zadání diplomové práce: **10. října 2005**
Termín odevzdání diplomové práce: **31. května 2006**

Ve Zlíně dne 20. dubna 2006


prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
děkan




prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Na základě vědeckých studií bylo potvrzeno, že mastné kyseliny vykazují značné antimikrobiální účinky. Cílem diplomové práce bylo testovat potenciální antibakteriální účinek kyseliny kaprylové. Tato mastná kyselina se vyskytuje v kozím, kravském a mateřském mléce a v mléce kokosových ořechů. Její antibakteriální aktivita byla testována na *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus* a *Staphylococcus aureus*.

Klíčová slova: kyselina kaprylová, antibakteriální účinek, mastná kyselina, lipidy, patogeny, salmonelosa, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The aim of this thesis is the application of caprylic acid on particular bacteria: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus* a *Staphylococcus aureus*. Caprylic acid is a natural 8-carbon fatty acid presented in breast, goat and bovine milk and is approved as GRAS by the US FDA. Furthermore, the evaluation of the antimicrobial activity and potential utilization of caprylic acid is included.

Keywords: caprylic acid, antibacterial effect, fatty acid, lipids, cosmetics, pathogen, salmonellosis, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*.

Ráda bych tímto velmi poděkovala vedoucí této diplomové práce, tedy PhD. Daniele Kramářové za odborné vedení, ochotu a podporu. Její cenné rady a připomínky mi velmi pomohly v napsání této práce. Velký dík patří také PhD. Leoně Čechové za pomoc a vstřícnost. Za emocionální a ekonomické zázemí velmi děkuji svým rodičům.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| ÚVOD | 10 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 11 |
| 1 OBECNÉ VLASTNOSTI BAKTERIÍ | 12 |
| 2 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH BAKTERIÍ | 14 |
| 2.1 ROD BACILLUS..... | 14 |
| 2.2 ROD PSEUDOMONAS..... | 15 |
| 2.3 ROD STAPHYLOCOCCUS | 15 |
| 2.4 ROD MICROCOCCUS | 16 |
| 2.5 ČELEĎ ENTEROBACTERIACEAE | 17 |
| 3 OBECNÉ ZÁSADY KULTIVACE MIKROORGANISMŮ | 21 |
| 4 LIPIDY | 23 |
| 5 MASTNÉ KYSELINY | 25 |
| 5.1 FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI MASTNÝCH KYSELIN | 27 |
| 6 ZÍSKÁVÁNÍ ROSTLINNÝCH OLEJŮ A TUKŮ | 29 |
| 7 KYSELINA KAPRYLOVÁ | 31 |
| 7.1 ZDROJE KYSELINY KAPRYLOVÉ | 31 |
| 7.2 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY KYSELINY KAPRYLOVÉ..... | 34 |
| 7.3 VYUŽITÍ KYSELINY KAPRYLOVÉ V PRŮMYSLU..... | 34 |
| 8 DALŠÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ ČINITELÉ | 36 |
| 9 RŮZNÉ STUDIE PROVÁDĚNÉ S POUŽITÍM KYSELINY KAPRYLOVÉ | 39 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 9.1 | ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINEK KYSELINY KAPRYLOVÉ NA <i>L. MONOCYTOGENES</i> A <i>E. COLI</i> V MLÉCE A TESTOVÁNÍ ÚČINKU KYSELINY KAPRYLOVÉ NA ZAŽIVACÍ TRAKT KRÁLÍKŮ..... | 39 |
| 9.2 | INAKTIVACE <i>ENTEROBACTER SAKAZAKII</i> V KOJENECKÉ VÝŽIVĚ POMOCÍ MONOKAPRYLÁTU | 40 |
| 9.3 | INAKTIVACE <i>ESCHERICHIA COLI</i> O157:H7 <i>IN VITRO</i> V TEKUTINĚ KRAVSKÉHO BACHORU POMOCÍ KYSELINY KAPRYLOVÉ..... | 40 |
| 9.4 | CITLIVOST <i>ESCHERICHIA COLI</i> VŮČI MASTNÝM KYSELINÁM O DÉLCE ŘETĚZCE C ₂ AŽ C ₁₈ | 41 |
| 9.5 | VÝROBA STRUKTUROVANÝCH TRIACYLGLYCEROLŮ BOHATÝCH NA N-3 POLYENENASYCENÉ MASTNÉ KYSELINY ACIDOLÝZOU RYBÍHO TUKU KYSELINOU KAPRYLOVOU V REAKTORU S OBALENÝM LOŽEM..... | 42 |
| 9.6 | ZPŮSOBY DENKONTAMINACE DRŮBEŽÍHO MASA A KŮŽE..... | 42 |
| 9.7 | ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINEK KYSELINY KAPRYLOVÉ A MONOKAPRYLÁTU NA HLAVNÍ BAKTERIÁLNÍ PATOGENY ZPŮSOBUJÍCÍ MASTITIDU | 44 |
| II | PRAKTICKÁ ČÁST | 45 |
| 10 | METODIKA | 46 |
| 10.1 | POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY..... | 46 |
| 10.2 | MATERIÁL..... | 46 |
| 10.2.1 | Živné půdy | 46 |
| 10.2.2 | Pomnožovací média | 48 |
| 10.2.3 | Použité roztoky a chemikálie | 49 |
| 10.3 | ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINEK KYSELINY KAPRYLOVÉ NA <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 50 |
| 10.3.1 | Aplikace kyseliny kaprylové na <i>Escherichia coli</i> metodou „roztěrem na půdu“ | 50 |
| 10.3.2 | Aplikace kyseliny kaprylové na <i>Escherichia coli</i> metodou „v bujónu“ | 50 |
| 10.4 | ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINEK KYSELINY KAPRYLOVÉ NA <i>SALMONELLA</i> <i>TYPHIMURIUM</i> | 51 |
| 10.4.1 | Aplikace kyseliny kaprylové na <i>Salmonella typhimurium</i> „roztěrem na půdu“ | 51 |
| 10.4.2 | Aplikace kyseliny kaprylové na <i>Salmonella typhimurium</i> metodou „v bujónu“ | 51 |
| 10.5 | ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINEK KYSELINY KAPRYLOVÉ NA <i>PSEUDOMONAS</i> <i>FLUORESCENS</i> | 52 |
| 10.6 | ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINEK KYSELINY KAPRYLOVÉ NA <i>STAPHYLOCOCCUS</i> <i>AUREUS</i> | 52 |
| 10.6.1 | Aplikace kyseliny kaprylové na <i>Staphylococcus aureus</i> „v bujónech“ | 53 |
| 10.6.2 | Aplikace kyseliny kaprylové na <i>Staphylococcus aureus</i> „v neutralizovaném bujónu“ | 53 |
| 10.7 | ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINEK KYSELINY KAPRYLOVÉ NA <i>SERRATIA MARCESCENS</i> | 54 |
| 10.7.1 | Aplikace kyseliny kaprylové na <i>Serratia marcescens</i> metodou „v bujónu“ | 54 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 10.8 | ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINEK KYSELINY KAPRYLOVÉ NA <i>MICROCOCCUS LUTEUS</i> 54 | |
| 10.8.1 | Aplikace kyseliny kaprylové na <i>Micrococcus luteus</i> „v bujónu“ | 54 |
| 10.9 | ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINEK KYSELINY KAPRYLOVÉ NA <i>BACILLUS CEREUS</i> | 55 |
| 10.9.1 | Aplikace kyseliny kaprylové na <i>Bacillus cereus</i> metodou „v bujónu“ | 55 |
| 10.10 | ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINEK KYSELINY KAPRYLOVÉ NA <i>BACILLUS SUBTILIS</i> | 55 |
| 10.10.1 | Aplikace kyseliny kaprylové na <i>Bacillus subtilis</i> metodou „v bujónu“ | 55 |
| 10.11 | IDENTIFIKACE POUŽÍVANÝCH KMENŮ BAKTERIÍ | 55 |
| 10.11.1 | Charakteristika testů | 55 |
| 10.12 | CHARAKTERISTIKA STATISTICKÉHO VYHODNOCOVARÁČÍHO POČÍTAČOVÉHO PROGRAMU | 56 |
| 11 | VÝSLEDKY A DISKUSE | 58 |
| 11.1 | VÝSLEDKY MĚŘENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍHO ÚČINKU KYSELINY KAPRYLOVÉ NA <i>ESCHERICHIA COLI</i> METODOU „ROZTĚREM NA PŮDU“ | 58 |
| 11.2 | VÝSLEDKY MĚŘENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍHO ÚČINKU KYSELINY KAPRYLOVÉ NA <i>ESCHERICHIA COLI</i> METODOU „V BUJÓNU“ | 60 |
| 11.3 | VÝSLEDKY MĚŘENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍHO ÚČINKU KYSELINY KAPRYLOVÉ NA <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> METODOU „ROZTĚREM NA PŮDU“ | 63 |
| 11.4 | VÝSLEDKY MĚŘENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍHO ÚČINKU KYSELINY KAPRYLOVÉ NA <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> METODOU „V BUJÓNU“ | 65 |
| 11.5 | VÝSLEDKY MĚŘENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍHO ÚČINKU KYSELINY KAPRYLOVÉ NA <i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i> METODOU „V BUJÓNU“ | 68 |
| 11.6 | VÝSLEDKY MĚŘENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍHO ÚČINKU KYSELINY KAPRYLOVÉ NA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> METODOU „V BUJÓNU“ | 69 |
| 11.7 | VÝSLEDKY MĚŘENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍHO ÚČINKU KYSELINY KAPRYLOVÉ NA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> METODOU „V NEUTRALIZOVANÉM BUJÓNU“ | 72 |
| 11.8 | VÝSLEDKY MĚŘENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍHO ÚČINKU KYSELINY KAPRYLOVÉ NA <i>SERRATIA MARCESCENS</i> METODOU „V BUJÓNU“ | 73 |
| 11.9 | VÝSLEDKY MĚŘENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍHO ÚČINKU KYSELINY KAPRYLOVÉ NA <i>MICROCOCCUS LUTEUS</i> METODOU V „BUJÓNU“ | 75 |
| 11.10 | VÝSLEDKY MĚŘENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍHO ÚČINKU KYSELINY KAPRYLOVÉ NA <i>BACILLUS CEREUS</i> METODOU „V BUJÓNU“ | 77 |
| 11.11 | VÝSLEDKY MĚŘENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍHO ÚČINKU KYSELINY KAPRYLOVÉ NA <i>BACILLUS SUBTILIS</i> METODOU „V BUJÓNU“ | 78 |
| 11.12 | VYHODNOCENÍ ENTERO- A STAPHY- TESTŮ | 80 |
| 11.13 | CELKOVÉ SHRNTÍ ÚČINKU KYSELINY KAPRYLOVÉ NA SLEDOVANÉ KMENY BAKTERIÍ | 82 |
| | ZÁVĚR..... | 86 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 88 |
| | SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK | 93 |

| | |
|-----------------------------|-----------|
| SEZNAM OBRÁZKŮ | 94 |
| SEZNAM TABULEK..... | 95 |
| SEZNAM PŘÍLOH..... | 97 |

ÚVOD

Po celém světě přibývá případů infekcí a intoxikací, které vznikají po požití kontaminovaných potravin. Zajištění bezpečnosti potravin je přední snahou evropské i české legislativy. Vzhledem k ekonomickým, politickým a sociologickým změnám, které ve společnosti proběhly, již není důležitá kvantita, ale mnohem více kvalita potravin, jejich výživová hodnota a hlavně zdravotní nezávadnost.

Escherichia coli, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis* jsou bakterie, které jsou schopny způsobit onemocnění člověka. Jejich přítomnost v potravinách je nejen závažným zdravotním, ale i ekonomickým problémem. Proto je nezbytné hledat různé mechanismy, schopné co nejúčinněji ošetřit potraviny proti kontaminaci patogenními mikroorganismy.

Na mastné kyseliny je v celosvětovém měřítku pohlíženo, jako na možnou náhradu antibiotik, jejichž používání je v mnoha ohledech nevýhodné. Antimikrobiální aktivita mastných kyselin závisí na stupni a typu nasycenosti, na délce řetězce a na vlastnostech rozpouštědla, ve kterém je jejich aktivita vyhodnocována. Přesný mechanismus jejich působení na bakterie není znám. Bylo navrženo mnoho hypotéz, které tento jev vysvětlují. Inhibiční

účinek mastných kyselin například spočívá v tom, že jsou schopny změnit permeabilitu plasmatické membrány bakterií, způsobit kolaps protonového gradientu membrány, nebo difundovat ve svém nedisociovaném stavu do bakteriálních buněk, uvnitř disociovat, a tím způsobit zvýšení kyselosti v buňce a následnou inhibici růstu bakterie.

Předmětem této práce je studium antibakteriálního účinku kyseliny kaprylové na výše uvedené kmeny bakterií. Kyselina kaprylová patří mezi mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem. Vyskytuje se mimo jiné v kozím, kravském a mateřském mléce, v kokosovém a palmojádrovém oleji. Organizací FDA (Food & Drug Administration) byla uznána za GRAS (Generally Recognized As Safe).

V předložené práci byl testován potenciální antimikrobiální účinek kyseliny kaprylové na vybrané kmeny bakterií. Zároveň byla věnována pozornost možnosti působení kyseliny kaprylové jako inhibičního prostředku nebo dokonce růstového faktoru.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 OBECNÉ VLASTNOSTI BAKTERIÍ

Bakterie jsou jednobuněčné organismy, které se od sebe liší morfologickými znaky, barvitelností, pohyblivostí, kultivačními nároky, biochemickými a fyzikálními vlastnostmi atd. Podle toho se také systematicky rozdělují.

Zástupce bakterií řadíme do nadříše Prvojaderní (*Prokaryota*), říše Prvobuněční (*Protocellulata*) a oddělení Bakterie (*Bacteria*).

Tloušťka bakterií se pohybuje zhruba od 0,2 do 2 μm a délka od 1,5 do 5 μm . Velikost bakterií je variabilní i u jedinců z jedné a téže čisté kultury a závisí také na stáří buněčné kultury, na růstové fázi i na kultivačních podmínkách.

Bakteriální buňky jsou pleomorfní, tzn. že vykazují morfologickou diverzitu. Základní jsou tři tvary: kulovitý, tyčinkovitý a spirálovitý. Bakterie kulovitého tvaru pojmenováváme jako koky, tyčinkovité jako bakterie, mezi spirálovité patří např. spirochéty. (17)

Mezi základní struktury bakteriální buňky patří cytoplazma, nukleus, ribozómy, cytoplazmatická membrána, buněčná stěna. Některé bakterie obsahují navíc plasmidy, pouzdro, bičík, fimbrie, inkluze, mesozómy.

Podle vztahu k optimální teplotě růstu rozdělujeme mikroorganismy do tří hlavních skupin:

1. Psychrofilní mikroorganismy rostou ještě poměrně intenzivně při teplotě 0 °C až 5 °C. Pro mikroorganismy rozmnožující se při teplotě nižší než 0 °C se někdy používá název psychrotrofní. K psychrofilním bakteriím patří například příslušníci rodu *Pseudomonas*. Optimální teplota některých psychrofilů se pohybuje v rozmezí 15 až 22 °C, kdežto u jiných dosahuje 30 °C.

2. Mezofilní mikroorganismy mají minimální teplotu růstu vyšší než 5 °C a optimální teplotu nižší než 45 °C. U bakterií se optimální teplota pohybuje nejčastěji kolem 37 °C.

3. Termofilní mikroorganismy mají optimální teplotu růstu 45 °C nebo vyšší, pro růst většiny z nich je optimální teplota mezi 50 a 60 °C, pro některé dokonce ještě vyšší. Některé mohou růst výjimečně i při teplotě až 80 °C (např. některé kmeny druhu *Bacillus stearothermophilus*). (35)

Pokud je mikroorganismus označen jako patogen, znamená to, že je schopný vyvolat v organismu onemocnění. Jako patogeny označujeme parazity, které jsou schopné poškodit svého hostitele. Patogenita parazita je dána jeho schopností vyvolat u hostitele onemocně-

ní. Virulence se používá jako kvantitativní pojem k vyjádření míry patogenity specifického mikroorganismu. Faktory virulence patogenu jsou genetické, biochemické a strukturální faktory, které jsou schopné vyvolat poškození hostitelského organismu. Vztahy mezi hostitelem a parazitem jsou dynamické, neboť oba organismy vzájemně ovlivňují své aktivity a funkce. Zvířata i lidé jsou v neustálém styku s mikroorganismy, z nichž někteří jsou schopni kolonizovat povrch těla (tzv. normální flóra). V řídkých případech vstupují mikroorganismy do parazitického vztahu se svými hostiteli a vyvolávají onemocnění. (40)

2 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH BAKTERIÍ

Diplomová práce byla zaměřena na následující bakterie: *Bacillus* (*B. cereus*, *B. subtilis*), *Pseudomonas* (*P. fluorescens*), *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* a *Micrococcus luteus*.

2.1 Rod *Bacillus*

Rod *Bacillus* se taxonomicky zařazuje do skupiny sporotvorných tyčinek a sporotvorných koků. Je to rod velmi rozsáhlý a v přírodě velmi rozšířený. Jeho druhy tvoří většinou gram-pozitivní peritrichální tyčinky. Většina druhů má velmi aktivní amylolytické enzymy, řada druhů má pektolytické enzymy a většina druhů má velmi aktivní proteolytické enzymy. Mnoho z nich produkuje polypeptidová antibiotika, z nichž některá se pomocí těchto bakterií vyrábějí průmyslově.

Bacillus subtilis je nejrozšířenějším druhem tohoto rodu, je téměř všudypřítomný. Tvoří poměrně malé peritrichální buňky (0,7 x 2 až 3 μm), produkuje několik polypeptidových antibiotik. Bakteriální *amylasy* získané z *Bacillus subtilis* se uplatňují v pivovarnictví a v textilním průmyslu. (35)

Psychrotrofní kmeny *Bacillus cereus* jsou běžnou kontaminací čerstvého a pasterizovaného mléka a smetany. Spory *Bacillus cereus* jsou téměř všudypřítomné, přežívají pasterizační záhřev a produkují různé enterotoxiny, které způsobují otravy z jídla, doprovázené průjmy nebo zvracením. (9)

Z dalších druhů sem patří například *Bacillus sphaericus*, který rovněž způsobuje otravu, *Bacillus anthracis*, který je původcem onemocnění sněti slezinné. Velký význam pro konzervářský průmysl má *Bacillus stearothermophilus* a *Bacillus coagulans*.

Co se týče výskytu v potravinách, rod *Bacillus* tvoří převážnou část mikroflóry kakaa. Spory bacilů mohou být součástí hotové čokolády a čokoládových cukrovinek. Zástupci rodu *Bacillus* se mohou podílet na kažení konzerv sterilovaných teplem a na bombážích. Spory *Clostridium perfringens* a *Bacillus cereus* jsou citlivější vůči teplu než spory *Clostridium botulinum*, a proto jejich výskyt indikuje nedostatečnou sterilaci. (11)

2.2 Rod *Pseudomonas*

Rod *Pseudomonas* řadíme do skupiny gramnegativních aerobních tyčinek a koků. *Pseudomonas* jsou přísně aerobní bakterie, které využívají nejrozumnější organické sloučeniny jako zdroj energie a uhlíku. Některé druhy se používají pro průmyslové oxidace. Řada z nich tvoří fenazinová barviva žlutých, zelených, modrých nebo červených odstínů, které uvolňují do růstového prostředí. Tím způsobují mimo jiné nežádoucí zbarvení potravin. Některé druhy uvolňují do prostředí fluoreskující žlutozelené barvivo. Určité druhy vyvolávají v potravinách cizí vůně, pachy nebo pachuti. Pseudomonády patří k nejpočetnějším mikroorganismům na povrchu masa. Mají silné proteolytické a lipolytické účinky. Jsou psychrofilní, některé, např. *Pseudomonas aeruginosa*, jsou patogenní i pro člověka. Po morfologické stránce jsou to monotrichální nebo lofotrichální tyčinky. (35)

Zástupci rodu *Pseudomonas* způsobují nežádoucí chuťové a barevné změny ve vejcích. *Pseudomonas aeruginosa* produkuje modrozelený pyokyanin, *P. fluorescens* žlutozelený pyofluorescein a *P. putida* červený pyorubin. (31)

Pseudomonády se také podílejí na kažení kosmetických přípravků. Rozkládají parafinové uhlovodíky i estery kyselin parahydroxybenzoové, používané jako konzervační činidlo. Tvorbou pyocyaninu způsobují někdy i modrozelené zbarvení přípravků. Mají silné proteolytické účinky stejně jako další bakterie, například *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis*. Zástupci rodu *Pseudomonas* společně s rodem *Acinetobacter* a *Moraxella* se podílejí na kažení drůbežního masa. Jsou to silně proteolytické mikroorganismy, schopné i lipolytické aktivity. Pomnožení pseudomonád vede ke zvýšení pH vlivem zvýšení obsahu čpavku, a tím i ke vzniku zápachu. Senzorické změny jsou patrné, když počet těchto psychrotrofů dosahuje počtu 10^7 až $10^8 \cdot \text{g}^{-1}$. (11)

2.3 Rod *Staphylococcus*

Rod *Staphylococcus* řadíme mezi grampozitivní koky. *Staphylococcus* má aerobní i anaerobní metabolismus, zkvašuje cukry za tvorby organických kyselin. Tvoří žluté až oranžové kolonie, někdy bílé. Nejčastěji se vyskytuje na kůži a mukózních membránách teplokrevných zvířat a člověka. (35)

Staphylococcus aureus je patogenní druh, způsobující např. anginu. Výskyt *S. aureus* v potravinách živočišného nebo rostlinného původu představuje závažný zdravotní

a ekonomický problém. *S. aureus* tvoří buněčné exoprodukty nazývané enterotoxiny. Jde o bílkoviny s nízkou molekulární hmotností, které vedou k tzv. enterotoxikóze. Tu doprovází těžké zvracení, průjem, střevní a svalové křeče, bolesti hlavy, pocení a celková slabost. Stafylokokové infekce z jídla jsou obecně spojeny s ruční manipulací s potravinami. (12)

Detekce stafylokoků v potravinách je založena na jejich odolnosti k chloridu sodnému a na schopnosti tvořit kyseliny z mannitolu. *Staphylococcus aureus* rozeznáme od zbývajících dvou druhů, které netvoří toxiny, na základě jeho schopnosti koagulovat krevní plazmu. (35)

Vážným problémem je přítomnost této bakterie v lahůdkářských výrobcích, zejména v těch, které obsahují vejce nebo majonézu. S ohledem na nižší vodní aktivitu, kterou bakterie snáší se může pomnožit a vyprodukovat enterotoxin. Za běžných podmínek je růst *Staphylococcus aureus* pomalejší než ostatních mikroorganismů, které rovněž způsobují kažení potravin. Pokud je však běžná mikroflóra potlačována (například nízkou vodní aktivitou), pak *S. aureus* může přerůst a stát se dominantní mikroflórou, přičemž jeho minimální teplota růstu je 7°C. (11)

Výskyt *Staphylococcus aureus* je nebezpečný taktéž v sýrech balkánského typu, které jsou uchovávány ve slaném nálevu. Může zde dlouhodobě přežívat, a to i několik týdnů. Stafylokokový enterotoxin byl objeven dokonce i v sýru Čedar. Pro bakterie *Staphylococcus aureus* jsou optimálním růstovým prostředím i vejce. Jeho výskyt jak v tekutém, tak v sušeném vaječném výrobku, může způsobit vážné potíže, neboť vaječná hmota je používána jako surovina do dalších potravin, např. těstoviny, cukrářské a lahůdkářské výrobky. Tím nastává tzv. sekundární kontaminace dalších potravin. Rod *Staphylococcus* způsobuje také kontaminaci kosmetických přípravků, zejména pak kosmetiky určené pro oči. Byla popsána řada případů vzniku blefaritidy (zánět okrajů očních víček) po používání maskary. (11)

2.4 Rod *Micrococcus*

Mezi grampozitivní koky patří také rod *Micrococcus*. Rod *Micrococcus* zahrnuje přísně aerobní druhy tvořící balíčky nebo shluky buněk. Všechny jsou schopny růstu v přítomnosti 5 % chloridu sodného, čehož se využívá také při jejich stanovení. Vyskytují se
hlavně

v solených potravinách, kde mohou tvořit žluté, oranžové až intenzivně růžové kolonie. Toto zbarvení je způsobeno nerozpustnými karotenoidními barvivou přítomnými v jejich buňkách. Tato barviva chrání buňky před letálními účinky ultrafialové složky slunečního světla, a proto se uvedené bakterie vyskytují jako častá vzdušná kontaminace. U rodu *Micrococcus* jsou dnes uznávány pouze tři druhy: *M. luteus*, *M. roseus* a *M. varians*. (35)

Mikrokoky jsou součástí mikroflóry chlazeného masa, uzeného masa a šunky a jsou převládající mikroflórou v mléce zdravých krav. Problémem může být jejich výskyt ve vejcích, kam se dostávají již při průchodu vejcovodem. Jsou to jedni z činitelů, které mohou znehodnocovat kosmetické přípravky, jelikož jsou schopni částečně hydrolyzovat tuky za vzniku glycerolu a vyšších mastných kyselin. (11)

2.5 Čeleď Enterobacteriaceae

Čeleď *Enterobacteriaceae* zahrnuje rod *Escherichia* a patří sem také střevní patogeny jako *Salmonella*, *Shigella* a dále rod *Serratia* a *Yersinia*. Zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* jsou gramnegativní tyčinky se zaoblenými konci, dlouhé 2 až 3 μm . Růstové optimum je 37 °C. (15) Příslušníci této čeledě fermentují glukosu na organické kyseliny za tvorby plynu, jsou oxidáza negativní a jsou-li pohybliví, pak na základě peritrichálně umístěných bičíků. (2) Jsou nesporetvorné, mají respirační i fermentační metabolismus, jsou tedy fakultativně anaerobní a jsou prototrofní. (35)

Escherichia coli se nachází ve spodní části střevního traktu člověka a teplokrevných zvířat a vyskytuje se logicky i ve výkalech. Je nejprozkoumanějším mikrobiálním druhem, neboť slouží jako modelový organismus pro biochemické, genetické i fyziologické studie. *Escherichia coli* zkvašuje cukry (např. glukosu, laktosu, některé pentosy a alkoholické cukry) za intenzivní tvorby kyselin a plynu. (35)

Je známo přes 700 serotypů *E. coli* podle antigenů O, H a K. Serotypizace je důležitá pro rozlišení malého počtu kmenů, které způsobují onemocnění. *E. coli* může vyvolat tři typy onemocnění člověka: infekce močových cest (UTI – Urinary Tract Infections), neonatální meningitidu a infekce gastrointestinálního traktu. Tyto tři skupiny infekcí závisí na specifickém souboru patogenních faktorů. Jako patogen je *E. coli* nejlépe známá pro schopnost vyvolat střevní onemocnění. V současnosti se rozlišuje 5 tříd (virotypů) *E. coli*, které způsobují průjemová onemocnění: enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), enteroin-

vazivní *E. coli* (EIEC), enterohemoragické *E. coli* (EHEC), enteropatogenní *E. coli* (EPEC) a enteroagregativní *E. coli* (EAggEC). (18)

Alimentární infekce člověka vyvolané enterohemoragickými kmeny *Escherichia coli* (EHEC) byly popsány poprvé v roce 1982. K přenosu dochází z člověka na člověka nebo také kontaminovanými potravinami, jako jsou např. syrové hovězí maso, syrové mléko, sýry z nepasterovaného mléka, syrová zelenina, tepelně neošetřená jablečná šťáva a nedostatečně tepelně opracované výrobky. (34)

Salmonella typhi způsobuje velmi vážné a často i smrtelné střevní onemocnění lidí, tzv. břišní tyf, který se projevuje silnými bolestmi břicha, malátností a vysokými teplotami. Inkubační doba trvá jeden až tři týdny. Infekce se do zažívacího traktu dostává potravinami nebo pitnou vodou. Během nemoci jsou bakterie vylučovány výkaly nemocného. Někteří lidé jsou k tomuto onemocnění odolní a působí jako bacilonosiči.

Salmonella enteritidis se vyskytuje často v trusu ptáků, odkud se může dostat do potravin třeba při nevhodném skladování nebo následném převozu potravin ke spotřebiteli. U člověka vede k lehčím onemocněním, která mají krátkou inkubační dobu a jsou spojena s průjmami a často i zvracením. Tento typ onemocnění se označuje jako salmonelóza. Tu vyvolává také druh *Salmonella choleraesuis* (cholery vepřů). Salmonelóza může být smrtelná především u kojenců nebo malých dětí. Druhy rodu *Salmonella* jsou hostiteli specifických bakteriofágů. Od *Escherichia coli* se liší schopností využívat citrát jako zdroj uhlíku a slabší schopností zkvašovat laktosu. (35)

Salmonella typhimurium je dalším druhem, který způsobuje infekce živočišných produktů. Z epidemiologického hlediska se *S. typhimurium* chová poněkud jinak než například *S. enteritidis*. *S. typhimurium* se totiž vyskytuje prakticky všude a je schopná infikovat různé druhy savců i ptáků. (37)

Rod *Salmonella* zasluhuje zvláštní pozornost při hodnocení mikrobiálního stavu vajec V systému HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points, Analýza nebezpečí a systém kritických kontrolních bodů) jsou salmonely, resp. některé druhy, řazeny do čtvrtého stupně nebezpečí. Představují nebezpečí mírné a přímé, s možností plošného rozšíření. Salmonely jsou poměrně odolné bakterie. Minimální teplota růstu je podle nejnovějších zdrojů 2 až 6 °C. K vysokým teplotám jsou citlivé, spolehlivě hynou po 10 minutovém záhřevu při 70 °C. Minimální hodnota aktivity vody pro rozmnožování je 0,95. Salmonely jsou

bohužel značně odolné vůči běžným technologickým úpravám potravin jako je sušení, mražení, solení a uzení.

V poslední době se u nás i na celém světě stala závažným zdravotním i ekonomickým problémem onemocnění způsobená salmonelami. Z 20 % jsou zdrojem onemocnění vejce. Ta mohou být kontaminována na povrchu skořápky nebo i ve vaječném obsahu. Nejvyšší výskyt salmonel na skořápce je u vajec vodní drůbeže (kachen), a proto se vejce vodní drůbeže nesmí u nás používat k potravinářským účelům. Slepíčí vejce, příp. výrobky obsahující vejce jsou totiž nejdůležitějším zdrojem alimentárních salmonelóz. Pravděpodobnost přežití salmonel na skořápce a jejich průnik do vaječného obsahu závisí na teplotě a podmínkách skladování vajec. Ve vlhkém prostředí přežívá *S. enteritidis* na skořápce při 7 °C až 12 dní. V suchém prostředí hyne i při pokojové teplotě během 1 dne. (2)

Co do počtu onemocnění z jídla, je salmonelóza nejčastější alimentární nákazou. Pro kontaminaci potravin salmonelami je typické, že existuje celá řada jejich zdrojů. Boj se salmonelózou je pak velmi obtížný, neboť se musí tyto četné infekční řetězce účinně přerušit. Je proto zcela logické, že se hlavní pozornost zaměřuje na nejdůležitější zdroje salmonelózy - chovy drůbeže a vepřů. Přičemž drůbeží maso je silně zatížené, ale vzhledem k tepelné úpravě před vlastní konzumací je pouze zřídka přímým zdrojem alimentární infekce. Salmonely disponují výraznou schopností adaptace a perzistence v prostředí, a to i v potravinách. (7)

Tab. 1. Výskyt salmonel v potravinách

| Kategorie potravin | Množství <i>Salmonella spp.</i> v % |
|--------------------|-------------------------------------|
| jalovice | 1 |
| kráva/býk | 2,7 |
| mleté hovězí maso | 7,5 |
| vepři | 8,7 |
| brojleři | 20 |
| mleté kuřecí maso | 49,9 |
| mleté krůtí maso | 44,6 |

Pro výzkum a kontrolní testy, které se zabývají lidskými infekcemi způsobenými rodem *Salmonella*, je nesmírně důležitá molekulární typizace. Existují různé metody molekulární typizace. Je to například multilokální sekvenční typizace (MLST), pulzní gelová elektrofo-

réza (PFGE) a polymorfizmus zesílené délky fragmentů (AFLP). Tyto metody slouží k výzkumu diskriminační schopnosti, reprodukovatelnosti a genetických vztahů mezi jednotlivými izoláty. (39)

Rod *Serratia* se taxonomicky zařazuje do čeledi *Enterobacteriaceae*. Zástupci rodu *Serratia* mají tvar rovných tyčinek, které jsou gramnegativní, fakultativně anaerobní a jsou schopny pohybu pomocí bičičků. Způsob výživy je chemoorganotrofní. Optimální inkubační teplota je 37 °C. Tento rod se vyskytuje v půdě, vodě a na povrchu rostlin. (30) Je to oportunní patogen člověka, působí nosokomiální (nemocniční) infekce. Tato bakterie bývá zpravidla polyresistentní. (19) *Serratia marcescens* patří k tzv. hnilobným bakteriím, které rozkládají bílkoviny a dusíkaté látky. (1)

Serratia marcescens a *Escherichia coli* jsou uváděny v literatuře jako původci nosokomiálních infekcí urogenitálního ústrojí. Z tohoto důvodu je výskyt těchto mikrobů nejzávažnější v dětské kosmetice, a to zejména v zásypech a dětských olejích nebo lotionech, které mohou přijít do styku se zevními orgány urogenitálního ústrojí. Koliformní mikroby celkově ukazují na špatnou hygienickou úroveň ve výrobě a indikují možnou kontaminaci výrobku patogenními mikroby čeledi *Enterobacteriaceae*. (11)

3 OBECNÉ ZÁSADY KULTIVACE MIKROORGANISMŮ

Hlavní zásady kultivace mikroorganismů a způsob zpracování výsledků při mikrobiologickém zkoušení potravinářských výrobků uvádí norma ČSN 56 0082. Půdy se rozdělují na neselektivní, selektivní a selektivně-diagnostické. Při kvantitativním vyhodnocování se většinou hovoří o počtu kolonií, resp. o počtu kolonie-tvořících jednotek KTJ (Colonia Forming Units = C.F.U.)

Koliformní bakterie se stanovují na selektivních půdách, na nichž je rozmnožování grampozitivních bakterií úplně inhibováno nějakým bakteriostatickým barvivem nebo aniontovou povrchově aktivní látkou.

Príslušníci rodu *Salmonella* tvoří gramnegativní nesporulující, většinou peritrichální tyčinky. Většinou nezkašují laktosu a jsou poněkud odolnější vůči inhibičním účinkům barviv na růst než ostatní bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, čehož se používá v selektivních půdách.(36)

Pro selektivní izolaci a stanovení počtu *Salmonella spp.* se používá Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD Agar). Půda se nesmí autoklávovat. Endo Agar se používá pro stanovení a rozlišení laktosa-pozitivních a laktosa-negativních koliformních bakterií. Je vhodný pro kultivaci *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus* a *Serratia marcescens*. *Escherichia coli* tvoří při 44°C indol pozitivní, růžové kolonie. Většina sérovarů *E. coli* (cca 96 %) tvoří enzym β -glukuronidasu, na rozdíl od jiných klinicky důležitých druhů čeledi *Enterobacteriaceae*, které tento enzym neprodukují, čímž je lze poměrně spolehlivě odlišit od *E. coli*. Na Endo Agar vytváří tato bakterie temně růžové kolonie s kovovým leskem. *Salmonella typhimurium* tvoří slabě růžové, někdy až průhledné kolonie.

Pro diferenciaci enteropatogenních bakterií na základě schopnosti fermentovat sacharidy a produkovat sirovodík se používá Triple Sugar Iron Agar. Půda se dává do zkumavek a autoklávuje.

Slanetz and Bartley medium se používá pro detekci a stanovení počtů *Enterococcus spp.* metodou membránové filtrace. Půda se neautoklávuje. Na půdě lze kultivovat *Staphylococcus aureus*.

Pro selektivní izolaci *Pseudomonas aeruginosa* z klinického materiálu a dalších vzorků se používá Cefrimide Agar Base.

Mannitol Salt Agar je selektivní médium pro izolaci patogenních stafylokoků. Stafylokoky rozkládají mannitol za vzniku organických kyselin. *Staphylococcus aureus* na této půdě tvoří, jak už napovídá jeho název, zářivé žluto-zlaté kolonie.

Plate Count Agar se používá pro stanovení celkového počtu mikroorganismů v potravinách a vodě. (4)

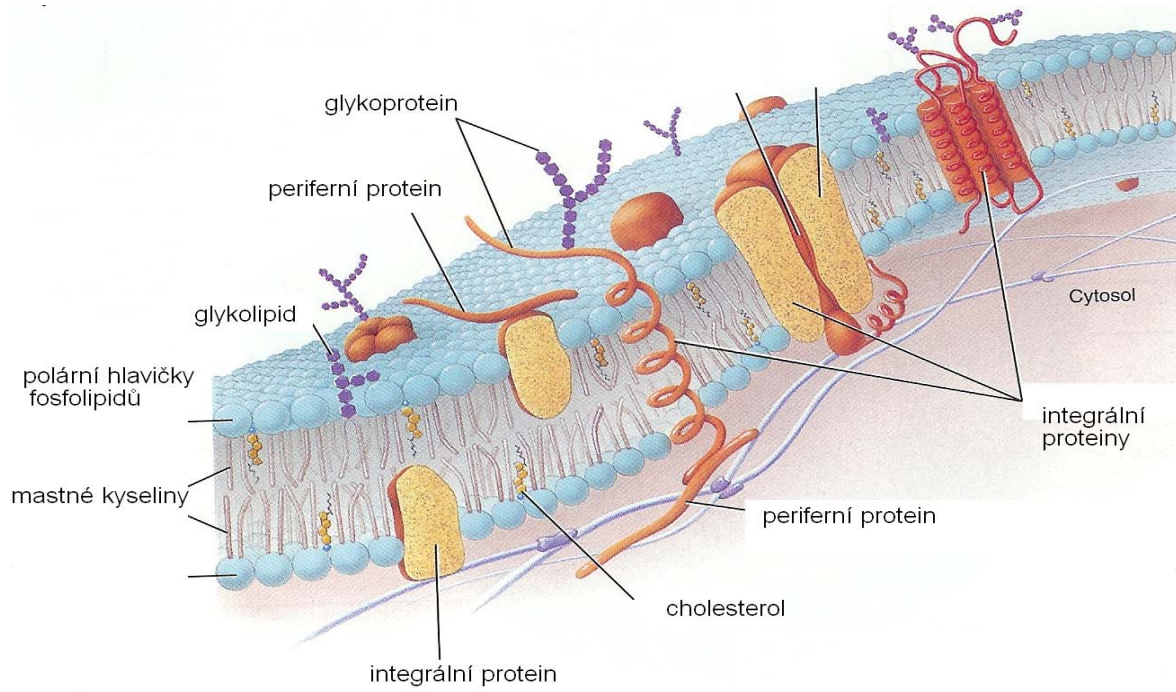
4 LIPIDY

Lipidy (řecky lipos = tuk) jsou látky rozpustné v organických rozpouštědlech a částečně rozpustné nebo úplně nerozpustné ve vodě. Jejich společným znakem je převaha dlouhých nepolárních uhlovodíkových řetězců, které dodávají lipidům hydrofobní olejovou nebo voskovou povahu. Podle chemického složení dělíme lipidy na homolipidy; heterolipidy, mezi které patří fosfolipidy, ceramidy a cerebrosidy, glykolipidy, sulfolipidy a sírany a sialolipidy; komplexní lipidy a doprovodné látky lipidů. (14)

Mezi homolipidy se řadí vosky, což jsou estery mastných kyselin a jednosytných alkoholů, a tuky a oleje, tedy estery mastných kyselina a glycerolu. Nejdůležitějšími sloučeninami z heterolipidů jsou fosfolipidy. Jsou to látky, které kromě mastných kyselin a alkoholů obsahují ještě vázaný zbytek kyseliny fosforečné. Komplexní lipidy obsahují nelipidové složky vázané kovalentními i různými fyzikálními vazbami. Nejdůležitější z nich jsou lipoproteiny a mukolipidy. Doprovodnými látkami lipidů se myslí jednak vitamíny rozpustné v tucích, A, D, E a K, dále přirozená barviva tuků a provitaminy vitamínu A – karotenoidy. V některých olejích se vyskytují terpenické uhlovodíky, z nichž nejvýznamnější je triterpen skvalen. (27)

Lipidy polárního charakteru tvoří spontánně micely, mono a dvouvrstvy, které jsou stavebním materiálem biomembrán. Jsou též důležité pro přenos podnětů v nervové tkáni, chrání některé vnitřní orgány, mají katalytické funkce. (14)

Lipidy jsou jediným zdrojem esenciálních mastných kyselin. Ty mají řadu důležitých funkcí v lidském organismu. Zodpovídají například za dobrý stav pokožky, zúčastňují se výstavby buněčných membrán, jsou prekurzory prostaglandinů atd. Lipidy slouží hlavně jako rezerva energie pro organismus. Typickým příkladem je podkožní tuková tkáň savců, kde jsou mastné kyseliny vázány převážně jako triacylglyceroly. (5)

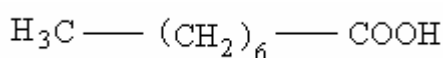


Obr. 1. Biomembrána

5 MASTNÉ KYSELINY

Mastné kyseliny jsou podstatnou a nejvýznamnější složkou všech lipidů. K přírodním lipidům patří různé deriváty mastných kyselin, hlavně jejich estery a amidy. Mastné kyseliny se od sebe navzájem liší délkou a charakterem uhlovodíkového řetězce, stupněm nenasycenosti, isomerií dvojných vazeb *cis* a *trans* a v některých případech také přítomností dalších substituentů. (5)

Nasyčené mastné kyseliny přítomné v lipidech mají obvykle sudý počet atomů uhlíku v molekule a rovný, nerozvětvený uhlovodíkový řetězec.:



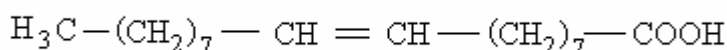
kyselina kaprylová (oktanová)

Tab. 2. Nasyčené mastné kyseliny jedlých tuků

| Mastná kyselina | Systematický název | Počet atomů uhlíku | Molekulová hmotnost | Číslo kyselosti | Bod tání |
|------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-----------------|-------------|
| másečná | butanová | 4 | 88,1 | 636,8 | -4,6 |
| kapronová | hexanová | 6 | 116,16 | 483 | -1,5 |
| kaprylová | oktanová | 8 | 144,21 | 389,1 | 16,3 |
| kaprinová | dekanová | 10 | 172,26 | 325,7 | 31,6 |
| laurová | dodekanová | 12 | 200,31 | 280,1 | 43,6 |
| myristová | tetradekanová | 14 | 228,36 | 245,6 | 56,8 |
| palmitová | hexadekanová | 16 | 256,42 | 218,8 | 62,8 |
| stearová | oktadekanová | 18 | 284,47 | 197,2 | 70,6 |
| arachová | ikosanová | 20 | 312,52 | 179,5 | 76,3 |
| behenová | dokosanová | 22 | 340,57 | 164,7 | 82,6 |
| lignocerová | tetrakosanová | 24 | 368,62 | 152,2 | 84,8 |
| cerotová | hexakosanová | 26 | 396,68 | 141,4 | 87,7 |

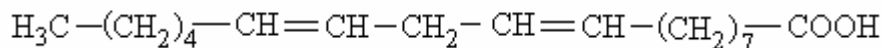
Kyselina palmitová je hojně zastoupena v tucích domácích zvířat, nižší homology (C_{10} až C_{14}) jsou hlavní složkou tuku palmových semen, kyseliny C_4 až C_{12} jsou značně zastoupeny v mléčném tuku, vyšší homology (C_{22} – C_{36}) jsou přítomny ve voscích. (5)

Nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou se nazývají monoenové a patří k hlavním složkám přírodních lipidů. Dvojná vazba má zpravidla *cis*-konfiguraci a leží ve střední části řetězce, nejčastěji na devátém atomu uhlíku. Zástupcem je např. kyselina olejová.



kyselina olejová

Nenasycené mastné kyseliny se dvěma a více dvojnými vazbami v molekule se řadí mezi kyseliny polyenové. Dvojně vazby jsou většinou typu *cis* a v pentadienovém uspořádání. Nejběžnější z nich je kyselina linolová, která bývá často provázena kyselinou linolenovou. Její polohový isomer je kyselina γ -linolenová. Metabolitem kyseliny linolové je kyselina arachidonová. (27)



kyselina linolová

Podstatnou část tuků a olejů tvoří estery mastných kyselin s glycerolem. Rozdělení mastných kyselin v triacylglycerolech přírodních tuků a olejů není náhodné, ale je určeno specifickou aktivitou příslušných lipolytických enzymů. V rostlinných olejích bývá poloha C_2 glycerolu obsazena hlavně kyselinou linolovou, kdežto v polohách C_1 a C_3 bývají vázány převážně nasycené kyseliny nebo různé kyseliny s anomální strukturou. V živočišných tucích jsou nasycené mastné kyseliny vázány především v poloze C_1 . Linolová kyselina bývá přednostně vázána v poloze C_2 a také kyseliny s kratším uhlíkovým řetězcem bývají vázány ve stejné poloze. V poloze C_3 bývají mastné kyseliny s dvaceti a více atomy uhlíku. (27)

Tab. 3. Složení mastných kyselin některých důležitých tuhých tuků

| Mastná kyselina | Obsah (% veškerých mastných kyselin) | | | | | |
|------------------|--------------------------------------|---------------|------------|--------------------|---------------------|----------------------|
| | kokosový tuk | vepřové sádlo | hovězí lůj | mléčný tuk kravský | lidský tuk podkožní | tuk mateřského mléka |
| máselná | 0 | 0 | 0 | 2-4 | 0 | 0 |
| kapronová | 0-0,8 | 0 | 0 | 1,4-2 | 0 | 0-0,1 |
| kaprylová | 5,5-9,5 | 0-0,2 | 0 | 0,5-1,5 | 0 | 0-0,1 |
| kaprinová | 4,5-9,5 | 0-0,2 | 0 | 1,6-2,7 | 0 | 0,5-1 |
| laurová | 44-52 | 0,1-0,6 | 0,1-0,4 | 1,7-3,7 | 0,3-0,7 | 3-4 |
| myristová | 13-19 | 1,4-2,4 | 2-3 | 7,9-12,1 | 3,1-4,3 | 6-8 |
| palmitová | 7,5-10,5 | 24-30 | 24-31 | 25-32 | 22-25 | 26-32 |
| stearová | 1-3 | 12-19 | 21-27 | 8-12 | 5,2-7 | 11-15 |
| palmitoolejová | 0-1,3 | 2,3-3,7 | 1,7-3 | 1,6-5 | 4,3-7 | 2,2-3 |
| olejová | 5-8 | 38-46 | 38-48 | 26-33 | 41-47 | 23-28 |
| linolová | 1,5-2,5 | 4,2-9,4 | 1,7-2 | 1-2,4 | IX.13 | 4-6 |
| linolenová | 0 | 0,1-1,3 | 0-0,2 | 0-0,5 | 0-1 | 0,5-1,5 |
| arachidonová | 0 | 0-1 | 0-1,1 | 0-0,8 | 0-0,5 | 0,4-1 |

5.1 Fyzikální vlastnosti mastných kyselin

Bod tání mastných kyselin stoupá s rostoucím počtem atomů uhlíku v molekule. Nenasycené mastné kyseliny mají podstatně nižší body tání než nasycené mastné kyseliny o stejném počtu atomů uhlíku. Nenasycené kyseliny s konfigurací *trans* mají značně vyšší bod tání než odpovídající kyseliny s konfigurací *cis*. Bod tání směsí mastných kyselin je nižší než bod tání některé ze složek. Body varu nasycených mastných kyselin stoupají s rostoucím počtem atomů uhlíku.

Mastné kyseliny se poměrně snadno rozpouštějí ve středně polárních rozpouštědlech. Při vyšších teplotách se velmi dobře rozpouštějí v alkoholech. Ve vodě se rozpouštějí jen nižší mastné kyseliny (v 1 kg vody se například při 60 °C rozpustí 11,7 g kyseliny kapronové, 1,1 g kyseliny kaprylové, 0,3 g kyseliny kaprinové a jen 5 mg kyseliny stearové). Ve vodě jsou mastné kyseliny disociovány, jsou však jen slabými kyselinami, jejichž diso-

ciační konstanty se pohybují mezi 1,1 až $1,6 \cdot 10^{-5}$. Ve vodní fázi mají mastné kyseliny a jiné lipidy tendenci hromadit se na mezifázovém rozhraní s nepolární fází nebo se vzduchem a snižovat tak mezipovrchové napětí.

Mastné kyseliny vyskytující se v jedlých tucích nemají asymetrický uhlíkový atom a nejeví tedy optickou otáčivost. Viskozita mastných kyselin roste s rostoucí molekulovou hmotností, nenasyčené mastné kyseliny mají menší viskozitu než nasycené deriváty. Povrchové napětí nasycených mastných kyselin se pohybuje v intervalu 20 až $35 \cdot 10^{-3} \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$. Tato hodnota mírně stoupá s rostoucím počtem atomů uhlíku a mírně klesá s rostoucím počtem dvojných vazeb. (27)

6 ZÍSKÁVÁNÍ ROSTLINNÝCH OLEJŮ A TUKŮ

Proces získávání surových olejů a tuků by se dal rozdělit na dvě skupiny operací. Je to jednak úprava semene a poté vlastní získávání oleje.

Úpravou semene se myslí sušení, čištění, odslupkování a někdy i delintrace. Pak se semena drtí, melou a nakonec jsou podrobeny působení určité teploty a vlhkosti po určitou dobu, tzv. klimatizaci.

Základními postupy vlastního získávání oleje jsou lisování, extrakce nebo kombinace těchto dvou procesů. Lisování znamená vytlačování oleje z olejnatého materiálu mechanickým tlakem. Používají se různé typy lisů. Extrakcí se rozumí rozpouštění oleje v olejnatém materiálu vhodným rozpouštědlem a získání oleje z roztoku odpařením rozpouštědla. V posledních letech se jako rozpouštědlo hojně používá n-hexan. Při rozpouštění oleje vzniká jeho roztok v rozpouštědle, tzv. miscela, kterou je potřeba dále upravit.

Co se týče získávání živočišných tuků, ty se získávají nejčastěji působením horké vody, která tuk vyplaví. Naopak mléčný tuk se získává z mléka odstředěním frakce bohaté na tuk (smetana) od vodné fáze (vlastního mléka). Ze smetany se tuk mechanicky oddělí od podmásli obrácením emulze na typ voda v oleji.

Druhou fází výroby olejů a tuků je jejich rafinace. Surové tuky a oleje obsahují řadu průvodních látek, převážně netukového charakteru, které je nutné před dalším technologickým zpracováním odstranit. Cílem rafinace je zušlechtit surovinu tak, aby byla zdravotně nezávadná, vůní a chutí příjemná, popřípadě neutrální, vyhovující barvou a dostatečnou trvanlivostí.

K základním operacím rafinace patří odslizování, jehož cílem je odstranit všechny průvodní látky, a to jak nerozpustné, tak i ty látky, které jsou původně rozpustné v tucích a které lze přidavkem vody – hydratací - převést na nerozpustnou formu. Dále je to odkyselování, to znamená odstraňování mastných kyselin. Základní jsou dva postupy: chemický (neutralizace) nebo fyzikální (destilace). Mezi další úpravy pak patří bělení, tedy odbarvování oleje, a deodorace, tedy odstranění látek, které mají nevhodnou chuť a aroma.

Mastné kyseliny získané průmyslově štěpením tuků a destilací obsahují vždy řadu mastných kyselin, jejichž složení závisí na druhu výchozího tuku. Při rektifikaci směsí mastných kyselin se zpravidla zajímáme o získání destilačních frakcí mastných kyselin, jejichž

obsah je v surovině vysoký, zatímco destilační zbytky se zužitkují jako směsi mastných kyselin.

Pro získání destilačních frakcí mastných kyselin $C_6 - C_{16}$ se používají frakce z kokosového a palmojádrového oleje. Počet destilačních frakcí, které se z jednotlivých typů surovin získávají, se pohybuje od dvou do pěti, takže se v praxi vystačí s rektifikační stanicí, která má jednu až čtyři rektifikační kolony.

Podstata rektifikace (frakční destilace) spočívá v tom, že směs par mastných kyselin vznikajících při jednoduché destilaci je v protiproudu vedena proti kondenzátu těchto par, a to tak, aby mezi kapalnou a plynnou fází docházelo k intenzivnímu styku. Přestupem hmoty se pak dosahuje rozdělení původní kapalně směsi mastných kyselin. (27)

7 KYSELINA KAPRYLOVÁ

Kyselina kaprylová je osmiuhlíkatá mastná kyselina, která se přirozeně vyskytuje v kozím, kravském a mateřském mléce a mléce kokosových ořechů. Je schválena Úřadem pro kontrolu potravin a léků (FDA) za GRAS (Generally Recognised As Safe). (8) Je tekutá při pokojové teplotě a je schopna tvořit emulzi typu olej ve vodě. (29)

Již dříve bylo zjištěno, že kyselina kaprylová a její monoacylglycerol monokaprylát (monocaprilin) inaktivují některé viry. Antimikrobiální účinek kyseliny kaprylové a její potenciální použití pro různé druhy potravin je v současné době laboratorně testováno.

7.1 Zdroje kyseliny kaprylové

Kokosový olej se vyrábí z čerstvých kokosových ořechů. Z rozbitých kokosů se speciální škrabkou vydlabe dužina a vytlačí se z ní husté mléko. Výsledná emulze kokosového mléka se poté zchladí asi na 10 °C. Zchlazení usnadní oddělení oleje z mléka. Samotné rozdělení se provádí odstředováním, čímž se tedy původní kokosové mléko rozdělí na čistý olej a odstředěné kokosové mléko. Protože během výroby není tento olej tepelně zpracováván, teplota během výroby nepřekročí 25°C, zachovává si všechny výživné hodnoty. (3)

Panenský kokosový olej (tj. vyrobený z čerstvých kokosových ořechů za studena) se skládá převážně z MCT (Medium Chain Triglycerides) – z triacylglycerolů, které jsou složeny z nasycených mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem. Je vhodný jako čistě rostlinná péče o celé tělo i vlasy, je to skvělý koupelový i masážní olej, ideální je také po holení. Silně potlačuje kvasinky a plísně. Některé zdroje uvádí, že tento olej stimuluje metabolismus, pomáhá při diabetu, nadváze, poruchách štítné žlázy a používá se při léčbě podvýživy. (3)

Tab. 4. Složení kokosového oleje

| Mastná kyselina | Obsah v % |
|----------------------------------|------------|
| C ₆ - kapronová | 0,6 |
| C₈ - kaprylová | 7,6 |
| C ₁₀ - kaprinová | 6 |
| C ₁₂ - laurová | 57,1 |
| C ₁₄ - myristová | 16,5 |
| C ₁₆ - palmitová | 6,4 |
| C _{18:0} - stearová | 0 |
| C _{18:1} - olejová | 3,7 |
| C _{18:2n6} - linolová | 0 |
| C ₂₀ - arachidonová | 0,1 |
| C ₂₄ - lignocerová | 0 |

Palmojádrový olej se získává z jader palmy olejové. Nejprve se provede extrakce dužiny plodů, čímž se získá palmový olej. Od dužiny, která zůstane po extrakci, se oddělí jádra, ze kterých se už získá samotný palmojádrový olej. Tento olej se využívá hlavně v mydlářství a při výrobě cukrovinek. (26)



Obr. 2. Plod palmy olejné

Tab. 5. Složení palmojádrového oleje

| Mastná kyselina | Obsah v % |
|----------------------------------|--------------|
| C ₆ – kapronová | <0,8 |
| C₈ – kaprylová | 3 – 8 |
| C ₁₀ – kaprinová | 3 – 7 |
| C ₁₂ – laurová | 47 – 51 |
| C ₁₄ – myristová | 15 – 20 |
| C ₁₆ – palmitová | 6,5 – 11 |
| C _{18:0} – stearová | 1,5 – 3 |
| C _{18:1} – olejová | 5 – 10 |
| C _{18:2n6} - linolová | 1 – 3 |

Mlékem se nazývá tekutý sekret mléčné žlázy savců. Podle vzájemného poměru kaseinové a albuminové části bílkovin rozlišujeme mléka albuminová (mateřské, psí, kočičí a kobyli) a mléka kaseinová (kravské, kozí, ovčí, velbloudí). V našich podmínkách se průmyslově zpracovává především mléko kravské, v menší míře mléko ovčí a kozí. (2)

Tab. 6. Průměrný obsah jednotlivých živin v 1 litru kravského mléka

| Druh živin | Obsah živin [g/l] |
|--------------------------|-------------------|
| Bílkoviny | 34 – 36 |
| Esenciální aminokyseliny | 1,3 |
| Mléčný tuk | 28 – 40 |
| Mléčný cukr | 47 – 49 |
| Minerální látky | 3,2 |
| Vitamíny | 11,4 – 42,4 |

Mléčný tuk je využitelný až z 99 % a z hlediska výživy je jedním z nejvýhodnějších tuků vůbec. Obsah kyseliny kaprylové v mléčném kravském tuku se pohybuje mezi 0,5 až 1,5 % z celkového množství mastných kyselin. Kozí mléko obsahuje poněkud více kyselin kapronové, kaprylové a kaprinové, což je jedna z příčin charakteristického zápachu kozího mléka. (2)

7.2 Antimikrobiální účinky kyseliny kaprylové

Antimikrobiální aktivita mastné kyseliny závisí na stupni a typu nasycenosti, na délce řetězce a na vlastnostech rozpouštědla, ve kterém je její aktivita vyhodnocována. Přestože antimikrobiální účinek volných mastných kyselin a jejich esterů byl prokázán v různých syntetických laboratorních médiích, jejich schopnost ničení bakterií v mléce nebo v rozpouštědle bohatém na nějakou živinu, zejména při vysokém organickém obsahu, je limitovaná. Snížená antimikrobiální účinnost mastných kyselin a monoacylglycerolů v mléce a v dalších potravinách je přisuzována tvorbě komplexů s ostatními živinami, zejména

s bílkovinami, které snižují biologickou využitelnost lipidů. (24)

Přesný mechanismus působení mastných kyselin na bakterie není znám. Bylo navrženo mnoho hypotéz, které tento jev vysvětlují. Na základě výsledků studie monoacylglycerolů za pomoci elektronové mikroskopie je možno se domnívat, že tyto látky se chovají jako neionogenní povrchově aktivní látky, které penetrují a včleňují se do bakteriální plasmatické membrány, a tak změni její permeabilitu. Jiná hypotéza říká, že mastné kyseliny s krátkým a středním řetězcem difundují ve svém nedisociovaném stavu do bakteriálních buněk, uvnitř disociují, a tím způsobí zvýšení kyselosti v buňce, která inaktivuje intracelulární

enzymy

a inhibuje transport aminokyselin. (24)

Dále bylo zjištěno, že mastné kyseliny zajišťují transport protonů přes bakteriální membránu a tak způsobují kolaps protonového gradientu. To vede ke spotřebě buněčné energie a následné denaturaci nukleových kyselin a bílkovin citlivých na kyseliny. (21)

7.3 Využití kyseliny kaprylové v průmyslu

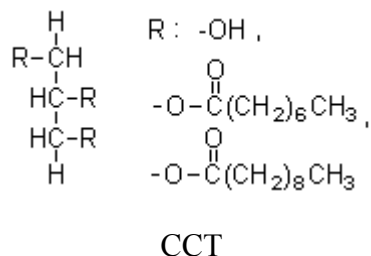
Významné využití kyseliny kaprylové je v oblasti kosmetického průmyslu. Zejména v poslední době nastal významný pokrok v používání syntetických triacylglycerolů, tedy takových, které nejsou obsaženy v běžných tucích. V převážné většině tyto triacylglyceroly obsahují kyselinu kaprylovou.

V celé řadě kosmetických přípravků se používá látka, která má anglický název caprylic/capric triglyceride (CCT, frakcionovaný kokosový tuk). Jedná se o směsný ester kaprylové a kaprinové kyseliny. Je to velmi čistý triacylglycerol se středně dlouhým řetězcem.

Má vynikající oxidační stabilitu a téměř neomezenou trvanlivost. CCT je žádoucí změkčovač. Je schopen rychle penetrovat do kůže. Nevykazuje barevné, vonné ani chuťové organoleptické vlastnosti. Je to výborné dispergační činidlo a je použitelný jako rozpouštědlo pro vitamíny a jiné aktivní látky. Zlepšuje roztíratelnost přípravků pečujících o pleť. Je vhodný pro masáže, nezanechává mastný film. (10)

Z praktického hlediska jde o bezbarvou nebo slabě nažloutlou olejovitou kapalinu, široce používanou v potravinářském a kosmetickém průmyslu a v medicíně. Nemá dráždivý účinek na lidskou kůži, působí na dobrý stav pokožky. Způsobuje hladkost a lesk vlasů. Používá se jako stabilizační činidlo a zimovzdorná přísada v kosmetice. Často je obsažen ve rtěnkách a holicích krémech. (15)

Může být použit jako rozpouštědlo se specifickými účinky, jako stabilizátor emulzí, jako solubilizátor a jako matrix pro různé esence, resp. jako rozpouštědlo pro opalovací krémy, vitamíny a další aktivní látky. (16) Své využití nachází též v potravinářském průmyslu jako odpěňovač a jako konzervační prostředek. (15)



8 DALŠÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ ČINITELE

Infekce a intoxikace pocházející z požití infikované potravin jsou celosvětovým problémem. Onemocnění, jako např. salmonelóza, kampylobakteriόza či enterohemoragie jsou na vzestupu ve spouště průmyslových zemích. Testují se proto různé způsoby, jak snížit povrchovou kontaminaci potravin a především jak, a co nejvíce, redukovat množství patogenů, vyskytujících se v potravinách. (8)

Základní zásady pro použití dané látky s antibakteriálním účinkem jsou obecně tři. Prostředek určený k dekontaminaci musí být účinný, bezpečný a dostatečně kontrolovatelný. Ideální antimikrobiální prostředek by neměl mít nepříznivý vliv na organoleptické vlastnosti

potravin jako je vzhled, pach a chuť. Neměl by také měnit nutriční hodnotu a zanechávat nežádoucí rezidua v potravine. Důležité je také to, aby nepředstavoval riziko pro životní prostředí a byl dobře přijímán zákazníky a zákonodárci. Jednotlivá antimikrobiální ošetření smí být používána pouze jako pomocný doplněk ke správné hygienické praxi, nikoli jako její náhrada. (8)

Tab. 7. Některé příklady používaných antimikrobiálních látek

| Fyzikální | Chemické | Mikrobiální |
|----------------------|-------------------------|---------------------------|
| vodní pára | organické kyseliny | antibiotika |
| ultrazvuk | anorg. kyseliny | bakteriociny |
| elektromag. záření | alkálie | mikrobiální parazité |
| ionizující záření | sorbáty | |
| elektrické metody | chlor a jeho sloučeniny | bakterie mléčného kvašení |
| vysoký tlak | fosfáty | |
| cykly tání - tuhnutí | peroxid vodíku | |
| | lysozym | |
| | desinfekční prostředky | |
| | ethanol | |

Jak je na první pohled patrné z tabulky 7., antimikrobiální prostředky by se daly rozdělit v podstatě do tří kategorií. K těm fyzikálním patří například ionizující záření. Ionizujícím zářením se podle platné vyhlášky rozumí záření tvořené částicemi nabitými, nenabitými nebo obojími, schopnými přímo nebo nepřímo ionizovat. K ošetření potravin lze použít gama záření radionuklidů ^{60}Co nebo ^{137}Cs , rentgenové záření, či záření urychlených elektronů. Dávka ionizujícího záření musí být omezena na nejnižší nutnou míru. Například u drůbežního masa je povolena NPD 5,0 kGy. (42)

Co se týče organických kyselin, dává se přednost hlavně kyselinám s kratším řetězcem. Středem zájmu jsou především kyseliny octová, mléčná, citronová, propionová, fumarová, vinná a jantarová. (8)

Enzym lysozym je významným proteinem bílku vajec. Ničí zejména *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus subtilis* a rod *Micrococcus*. Rezistentní vůči lysozymu jsou například *Staphylococcus aureus* a různé bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*. (31)

Inhibiční účinek proti některým typům mikroorganismů mají i monoacylglyceroly (MAG). Tyto látky nacházejí stále větší uplatnění v oblasti potravinářského průmyslu. Výhodou je, že vedle antimikrobiálního účinku mají také emulgační a stabilizační schopnosti. Například MAGy s kyselinou kaprinovou (C_{10}) vykazují antimikrobiální účinek především na stafylokoky, bacily, kvasinky a vláknité houby. (28)

Využití antibiotik jako konzervačních prostředků v potravinářském průmyslu je omezeno jen na ty látky, které nenalezly širší uplatnění v humánní nebo veterinární medicíně. Nebezpečí vytvoření rezistentních kmenů brání jejich většímu rozšíření v potravinářské praxi. Pouze některá antibiotika, např. chlortetracyklin, se používají jako aditiva do krmných směsí. Jejich použití je však přísně regulováno. Z antibiotik je pro účely konzervace potravin v některých státech určen pouze nisin, chlortetracyklin, oxytetracyklin a pimaricin. (5)

Co se týče nisinu, byla provedena studie, při níž byl testován účinek tohoto antibiotika na *Listeria monocytogenes*. Tato bakterie byla jednak přímo suspendována ve vodě a jednak aplikována na povrchu drůbežního masa. Nisin významně snižoval počty bakterií suspendovaných ve vodě. Antibakteriální účinek na *Listerii* aplikovanou na mase nebyl tak významný. (20)

9 RŮZNÉ STUDIE PROVÁDĚNÉ S POUŽITÍM KYSELINY KAPRYLOVÉ

9.1 Antimikrobiální účinek kyseliny kaprylové na *L. monocytogenes* a *E. coli* v mléce a testování účinku kyseliny kaprylové na zaživací trakt králíků

Listeria monocytogenes a *Escherichia coli* O157:H7 jsou hlavní potravinářské patogeny. Postihují také pasterované i nepasterované mléko a další mléčné výrobky. Předmětem této studie bylo stanovit antimikrobiální účinek kyseliny kaprylové a jejího monoglyceridu, monocaprilinu, na *L. monocytogenes* a *E. coli* v mléce. Tyto bakterie byly očkovány do autoklávovaného mléka. Byl prokázán inhibiční účinek jak kyseliny kaprylové tak monocaprilinu na tyto dva patogeny. Potenciálnímu použití pro mléko a mléčné výrobky však musí ještě předcházet senzorické studie. (24)

Velkým problémem v oblasti zemědělské výroby je náchylnost králíků na různé infekce a vysoká úmrtnost mladých králíků po odkojení. Nejčastější příčinou úmrtnosti jsou průjemová onemocnění. Chovatelé králíků proto široce používají antibiotika. V současné době je však na antibiotika pohlíženo negativně. Některá z nich už byla zcela zakázána, jiným nebyla obnovena licence. Z tohoto důvodu sílí potřeba najít bezpečnou antimikrobiální látku. Již v roce 1961 bylo zjištěno, že žaludek a tenké střevo kojených králíků je zcela sterilní. O rok později byly v tuku králíčího mléka stanoveny antimikrobiální látky, osmi a desetiuhlíková nasycená mastná kyselina (kyselina kaprylová a kyselina kaprinová). Obsah těchto kyselin je v králíčím mléku značně vysoký. Tvoří jednu třetinu až jednu polovinu ze všech mastných kyselin, které jsou v tuku králíčího mléka obsaženy. Králíci mají schopnost syntetizovat tyto kyseliny ve své mléčné žláze. Baktericidní účinek mastných kyselin je dobře známý. Mastné kyseliny prostupují bakteriálními membránami, uvnitř buňky zasahují do energetického metabolismu a narušují energetické procesy. (33)

Marounek a kol. publikovali v roce 2002 studii o antibakteriálních účincích kyseliny kaprylové. Cílem pokusů bylo zjistit její účinek na růst a úhyny mladých králíků ve výkrmu. Kyselina kaprylová byla přidána do granulované krmné směsi v množství 0, 2 a 5 g.kg⁻¹. Uskutečnili se dva pokusy na různých farmách s odstavenými králíky genotypu Hyla 2000 a Hyplus, ve věku pět týdnů. Bylo sledováno celkem 288 zvířat. V žádném z pokusů nemě-

la kyselina kaprylová vliv na přírůstky hmotnosti. Nebyl pozorován ani záporný účinek na příjem krmiva. Úhyny králíků v kontrolních skupinách 1. a 2. pokusu byly 16,7 a 9,3 %. U králíků přijímajících krmivo s 5 g kyseliny kaprylové v 1 kg byly odpovídající úhyny 0 a 2 %. V 1. pokusu byl tento rozdíl statisticky významný. Byl vysloven závěr, že kyselina kaprylová je použitelná jako jeden z prostředků ke snížení úhynu mladých králíků na farmách, kde úhyny přesahují únosnou mez. (33)

9.2 Inaktivace *Enterobacter sakazakii* v kojenecké výživě pomocí monokaprylátu

Enterobacter sakazakii je patogen způsobující meningitidu, infekci krevního řečiště, sepsi a nekrozní enterokolitidu novorozenců a malých dětí. Míra úmrtnosti je 14 %. Epidemiologické studie se zabývaly především sušenou kojeneckou výživou, což je hlavní zdroj tohoto patogenu. Cílem této studie bylo stanovit antibakteriální účinek monokaprylátu (esteru

glycerolu a kyseliny kaprylové) na *E. sakazakii* v ředěné kojenecké výživě. Použita byla směs pěti kmenů *E. sakazakii*, která byla očkovaná do 10 ml vzorku kojenecké výživy ($6,0 \log \text{CFU.ml}^{-1}$). Do vzorku bylo pak přidáno 0,25 nebo 50 mM (1%) monokaprylátu. Vzorky byly inkubovány při 37 a 23 °C a vyhodnoceny v čase 0 a pak po 1, 6 a 24 hod. Zároveň byla provedena inkubace při 8 a 4 °C a vyhodnocení v čase 0, 6, 24 a 48 hodin. U vzorků, které obsahovaly monokaprylát, byla zjištěna znatelně nižší populace *E. sakazakii*. Přídavek monokaprylátu (50 mM) snížil množství patogenu o více jak $5 \log \text{CFU.ml}^{-1}$ při inkubaci po dobu 1 hod. při 37 a 23 °C a při inkubaci po dobu 24 hod. při teplotě 8 a 4 °C. Monokaprylát je tedy potenciálně použitelný pro inaktivaci *E. sakazakii*. Před jeho použitím v praxi je však nutno provést senzorické posouzení. (22)

9.3 Inaktivace *Escherichia coli* O157:H7 *in vitro* v tekutině kravského bacheru pomocí kyseliny kaprylové

V uvedené studii byl zkoumán antibakteriální účinek kyseliny kaprylové (35 nebo 50 mM) na *Escherichia coli* O157:H7 a celkově na anaerobní bakterie rostoucí při 39 °C. K výzkumu byla použita tekutina z bacheru (pH 5,6 nebo 6,8) z dvanácti kusů masných plemen hovězího dobytka. CA (Caprylic Acid, kyselina kaprylová) způsobila při obou pH výrazný pokles populace *E. coli* v porovnání s kontrolním vzorkem. Při pH 5,6 oba přídav-

ky kyseliny kaprylové velmi znatelně inhibovaly *E. coli*. Po 1 minutě inkubace byla populace patogenu snížena o více jak 6 log CFU.ml⁻¹. Při pH 6,8 snížil přídavek 50mM CA populaci *E. coli* úplně. Po přídavku 35 mM kyseliny kaprylové kleslo množství patogenu přibližně o 3 log CFU.ml⁻¹ po osmihodinové a o 5 log CFU.ml⁻¹ po 24-hodinové inkubaci. U obou pH vykazovala kyselina kaprylová značně nižší inhibiční účinek na celkovou populaci anaerobních bakterií bacheru než na *E. coli*. Po 24 hod. inkubaci snížila CA celkovou populaci anaerobních bakterií přibližně o 2 log CFU.ml⁻¹ při pH 6,8, zároveň CA nevykazovala významnější inhibiční účinek na celkový bakteriální obsah. Výsledky ukázaly, že kyselina kaprylová je účinná proti *E. coli* obsažené v tekutině bacheru hovězího dobytka. Proto je vhodné její používání jako doplněk stravy před porážkou, což vede ke snížení počtu patogenů u hovězího dobytka. (38)

9.4 Citlivost *Escherichia coli* vůči mastným kyselinám o délce řetězce C₂ až C₁₈

V této studii byla zjišťována antimikrobiální aktivita mastných kyselin C₂ – C₁₈ *in vitro* u dvou kmenů *Escherichia coli* rostoucích na glukose. Antimikrobiální aktivita byla vyjádřena jako IC₅₀ (tzn. koncentrace, při které je kulturou využito pouze 50 % počátečního množství glukosy). Využívání glukosy bylo inhibováno kyselinou kaprylovou (IC₅₀ 0,30-0,85 g.l⁻¹) a kaprinovou (IC₅₀ 1,25-2,03 g.l⁻¹). Kyseliny s krátkým řetězcem (C₂-C₆), ani kyseliny s delším řetězcem neovlivňovaly využívání substrátu. Kyselina kapronová již snížila výtěžek buněk v kultuře *E. coli* v závislosti na dávce. Aplikace nenasyčených mastných kyselin olejové a linolenové nezpůsobila žádný inhibiční efekt na využívání

glukosy. Přídavek Ca²⁺ iontů tlumil antimikrobiální účinek kyseliny kaprinové. U kyseliny kaprylové tento efekt nebyl pozorován. Antimikrobiální aktivita kaprylové a kaprinové kyseliny klesla, když bakterie rostly v přítomnosti slámových částic, nebo byly opakovaně subkultivovány v médiu, které tyto částice v nízké koncentraci obsahovalo. Počty živých bakterií stanovených plotnovou metodou poklesly po inkubaci s kyselinou kaprylovou, resp. kaprinovou (30 min; 1 g.l⁻¹) při pH 5,2 z 10⁹ na 10².ml⁻¹. Pokles o více než 0,94 log₁₀CFU byl pozorován při pH 6,5-6,6. Bylo prokázáno, že kyselina kaprylová a v menší míře i kyselina kaprinová vykazují značnou antimikrobiální aktivitu vůči *E. coli*. Účinek jiných mastných kyselin byl málo významný, nebo nebyl prokázán. (21)

9.5 Výroba strukturovaných triacylglycerolů bohatých na n-3 polynenasycené mastné kyseliny acidolýzou rybího tuku kyselinou kaprylovou v reaktoru s obaleným ložem

Strukturované triacylglyceroly (ST) bohaté na n-3 polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), kyselinu eikosapentaenovou (EPA) a dokosahexaenovou (DHA) v pozici 2 byly syntetizovány acidolýzou rybího oleje s kyselinou kaprylovou (CA), za katalýzy 1, 3- specifické imobilizované lipasy *Lipozyme IM*. Reakce byla vedena třemi způsoby: (1) v sádkovém reaktoru (byl studován vliv teploty na inkorporaci CA do triacylglycerolu rybího tuku); (2) v reaktoru s obaleným ložem (Packed-Bed Reactor, PBR), které obsahovalo imobilizovanou *lipasu*. V reaktoru cirkulovala reakční směs z výstupu lože do rezervoáru substrátu (cirkuloval produkt), přičemž bylo stanovováno rovnovážné složení směsi; a (3) v reaktoru s obaleným ložem, kde směs necirkulovala. Byla pozorována jakási klidová doba trvání nepřímo úměrná počátečnímu obsahu vody v *lipase*, při použití nové *lipasy*. Tato klidová perioda byla patrně potřebná k tomu, aby se v hydro-enzymatické vrstvě, která obklopuje povrch *lipasy*, ustálil rovnovážný obsah vody. Bylo navrženo reakční schéma, ve kterém je kyselinou kaprylovou nahrazena pouze ta mastná kyselina, která zaujímá v glycerolu pozici 1 a 3. Byly stanovovány rovnovážné konstanty výměny CA za původní mastnou kyselinu v rybím tuku. Nejvíce odolné vůči výměně byly n-3 PUFA. Rovnovážné konstanty výměny byly 1,32 u EPA a 0,28 u DHA. Do úvahy byla brána i zpětná reakce a byla vypočítána kinetická konstanta výměny CA a původní mastné kyseliny v rybím tuku. Nízké kinetické konstanty byly zjištěny u EPA, DHA a kyseliny palmítové. (25)

9.6 Způsoby denkontaminace drůbežího masa a kůže

Kontaminace drůbeže a drůbežích produktů bakterií *Salmonella enteritidis* je velkým mezinárodním problémem. Výskyt *S. enteritidis* ve střevech kuřat vede k horizontálnímu přenosu infekce, ke kontaminaci skořápek vajec trusem a ke kontaminaci kůže při porážce. Cílem studie Vasudevana a kol. bylo zjistit antibakteriální účinek kyseliny kaprylové na *S. enteritidis in vitro* ve střevním obsahu kuřat. Střevní obsahy získané od 60 brojlerů byly vyluhovány a smíchány s úměrným množstvím fosfátového tlumivého roztoku. Pak byly autoklávovány, aby byly vyloučeny původní bakterie. Směs pěti kmenů *S. enteritidis* byla očkována v množství $10^6 \text{ log CFU.ml}^{-1}$ do střevních obsahů obsahujících 0,50 nebo

100 mM CA. Vzorby byly inkubovány při 40°C za anaerobních podmínek a populace *S. enteritidis* byla vyhodnocena v čase 0, 1 a 8 min a po 24 hodinách. Obě koncentrace CA snižují populaci *S. enteritidis* o přibližně 5,0 log CFU.ml⁻¹ za 1 min inkubace, kompletní inaktivace nastává za 24 hod. V neautoklávovaných střevních obsazích vykazovala CA značně nižší a minimální inhibiční účinek na celkový počet anaerobních střevních bakterií, než na *S. enteritidis*. Podle získaných výsledků by kyselina kaprylová mohla být používána jako doplněk stravy před porážkou, jako látka redukující počty *S. enteritidis* v drůbeži. Praktické aplikaci ale musí ještě předcházet experimenty *in vivo*. (41)

Drůbež je častou příčinou střevních infekcí z jídla. Hledají se proto různé způsoby, jak snížit kontaminaci drůbežního masa a jak zlepšit hygienickou úroveň na jatkách. Technika sloužící k dekontaminaci by měla být jednoduchá, přijatelná, levná, přátelská k životnímu prostředí, nesmí zanechávat nebezpečné zbytky v potravině a musí být v souladu s existující legislativou. Drůbežím masem a snižováním počtu patogenů v něm se zabývá spousta studií. Zkoumána byla, jak je uvedeno výše, i kyselina kaprylová. Studie Sinhamahapatry a kol. se zabývala porovnáním inhibičního účinku několika látek. Jednalo se o horkou vodu, kyselinu mléčnou, roztok chloru a kyselý chloritan sodný (ASC). Výsledkem studie bylo, že všechny látky snížily celkový počet mikroorganismů ($P < 0,01$). Nejúčinnější, co se týče eliminace mikrobiální kontaminace, byla technika namáčení v horké vodě a namáčení v kyselině mléčné. Dále to byla technika sprejování horkou vodou, sprejování kyselinou mléčnou, namáčení v kyselém chloritanu sodném (ASC), namáčení v roztoku chloru, sprejování roztokem chloru a sprejování ASC. Celkový počet bakterií byl horkou vodou snížen o 1,28 log₁₀ a kyselinou mléčnou o 1,36 log₁₀. Co se týče snižování počtu koliformních mikroorganismů z kůže brojlerů, byla nejúčinnější technika namáčení v kyselém chloritanu sodném (ASC) a namáčení v horké vodě. U ASC byl zjištěn úbytek mikroorganismů o 1,37 log₁₀, u horké vody 1,34 log₁₀. (32)

Hinton a Ingram zkoumali kyselinu olejovou, jako možný způsob snižování populace bakteriální flóry na drůbeží kůži. Kůže byla jednou nebo dvakrát proprána v roztocích 0, 2, 4, 6, 8, nebo 10 % (w/v) kyselině olejové a poté opláchnuta peptonovou vodou. Ve výluhu byly vyhodnoceny aerobní bakterie, čeled' *Enterobacteriaceae*, *Campylobacter* a enterokoky. Ve výluzích s obsahem kyseliny olejové bylo zjištěno značně nižší množství těchto mikroorganismů oproti kontrolnímu vzorku. V roztocích s vyšší koncentrací kyseliny olejové bylo zjištěno nižší množství mikroorganismů než v roztocích nižších koncentrací.

rací. Dvojnásobné propírání drůbeží kůže v 10 % roztoku kyseliny olejové významně snížilo počet aerobních bakterií, čeledi *Enterobacteriaceae*, *Campylobacter* a enterokoků. (13)

9.7 Antibakteriální účinek kyseliny kaprylové a monokaprylátu na hlavní bakteriální patogeny způsobující mastitidu

Bovinní mastitida způsobuje významné ekonomické ztráty v mlékárenském průmyslu po celém světě. Antibiotika, jako prostředek proti mastitidě, vykazují poměrně slabý léčebný účinek a vedou navíc ke vzniku rezistence u bakterií a zanechávají rezidua v mléce. Všechny tyto důvody nutně vedou k vývoji alternativních léčebných prostředků proti mastitidě. Cílem této studie bylo posoudit účinnost kyseliny kaprylové a jejího monoacylglycerolu, monokaprylátu (monocaprylin), vůči běžným patogenům způsobujícím mastitidu: mezi nimi *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Ke vzorkům mléka obsahujícím 50 či 100 mM CA, nebo 25 či 50 mM monokaprylátu, byla přidána suspenze daného patogenu (celkem bylo očkováno pět různých patogenů). Vzorky byly inkubovány při 39 °C. Populace přežívajících bakterií byla vyhodnocena v čase 0, a pak po 1 min, 6 hod., 12 hod. a 24 hod. inkubace. CA i monokaprylát redukovaly všech pět patogenů o více jak 5,0 log CFU.ml⁻¹ po 6 hod. inkubace. Z testovaných druhů bakterií byly vůči kyselině kaprylové a monokaprylátu nejvíce citlivé *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* a *S. uberis*. *Escherichia coli* byla nejvíce odolná. Podle výsledků této studie je možné použití kyseliny kaprylové a monokaprylátu jako alternativy vůči antibiotikům nebo jako jejich doplněk, v praxi jako účinná složka infúze proti boviní mastitidě vemene. (23)

II. PRAKTICKÁ ČÁST

10 METODIKA

10.1 Použité přístroje a pomůcky

- Aseptický očkovací box
- Biologický termostat BT 120 (Laboratorní přístroje Praha)
- Bunsenův kahan
- Horkovzdušný sterilizátor Memmert (elektronicky regulovaná sušárna)
- Chladnička Electrolux (1 – 4 °C)
- Laboratorní sklo
- Mikropipeta Biohit Labsystems (100 µl, 500 µl, 10 – 100 µl)
- Mikrovlnná trouba Electrolux
- Parní sterilizátor H + P Varioklav (121 °C, přetlak 0,1 MPa)
- pH – metr (GRYF)
- Sušárna KBC G100/250
- UV zářič Prolux GM 55 W
- Váhy KERN 440 – 47N

10.2 Materiál

10.2.1 Živné půdy

Endo Agar

Živná půda Endo Agar je používána pro detekci a rozlišení laktosa-pozitivních a laktosa-negativních koliformních bakterií.

Složení:

Tab. 8. Složení Endo Agarů

| Látka | Množství [g.l ⁻¹] |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| masový pepton | 10,0 |
| laktosa | 10,0 |
| siřičitan sodný | 2,5 |
| hydrogenfosforečnan (di)draselný | 3,5 |
| basický fuchsin | 0,5 |
| agar | 15,0 |

Mannitol Salt Agar

Mannitol Salt agar je selektivním médiem pro izolaci patogenních stafylokoků.

Složení:

Tab. 9. Složení Mannitol Salt Agarů

| Látka | Množství (g.l ⁻¹) |
|-------------------|-------------------------------|
| proteosový pepton | 10,00 |
| hovězí extrakt | 1,00 |
| chlorid sodný | 75,00 |
| D-mannitol | 10,00 |
| fenolová červeň | 0,025 |
| agar | 15,00 |

Mueller Hinton Agar No. 2

Mueller Hinton Agar je medium pro stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám diskovou Bauer-Kirbyho metodou u rychle rostoucích aerobních a fakultativně anaerobních patogenních bakterií.

Složení:

Tab. 10. Složení Mueller Hinton Agarů

| Látka | Množství (g.l ⁻¹) |
|---------------------------|-------------------------------|
| kyselý hydrolyzát kaseinu | 17,5 |
| hovězí srdcová infuze | 2,0 |
| škrob, rozpustný | 1,5 |
| agar | 17,0 |

Plate Count Agar

Půda PCA se používá pro stanovení počtu mikroorganismů v potravinách a vodě. Složení přípravku odpovídá požadavkům ČSN ISO 4833; 2293 a 7698.

Složení:

Tab. 11. Složení Plate Count Agarů

| Látka | Množství (g.l ⁻¹) |
|--------------------------------|-------------------------------|
| enzymatický hydrolyzát kaseinu | 5,0 |
| kvasničný extrakt | 2,5 |
| glukosa | 1,0 |
| agar | 15,0 |

10.2.2 Pomnožovací média

Pomnožovací bujón

Pomnožovací (masopeptonový) bujón se používá pro inkubaci kultur celé řady bakterií, jako vhodné medium pro jejich růst.

Složení:

Tab. 12. Složení pomnožovacího bujónu

| Látka | Množství (g.l ⁻¹) |
|-------------------------------|-------------------------------|
| masový výtažek (Protose – BE) | 6,0 |
| pepton | 8,0 |
| NaCl | 5,0 |

Masopeptonový agar

Masopeptonový agar se používá pro izolaci bakterií křížovým roztěrem. Je univerzálním médiem pro celou řadu bakterií

Složení:

Tab. 13. Složení masopeptonového agaru

| Látka | Množství (g.l ⁻¹) |
|-------------------------------|-------------------------------|
| masový výtažek (Protose – BE) | 6,0 |
| pepton | 8,0 |
| NaCl | 5,0 |
| agar | 15 |

10.2.3 Použité roztoky a chemikálie

- Fyziologický roztok (8,5 g NaCl na 1000 ml destilované vody)
- Kyselina kaprylová (Caprylic acid, purum (≥98%), Fluka, Chemika, 21650)
- Chlorid sodný (Dodavatel: Petr Lukeš, Uherský Brod)
- Destilovaná voda
- Ethanol
- Hydroxid draselný (KOH, 10%)

- Savo (Výrobce: Bochemie s.r.o., Bohumín)

10.3 Antibakteriální účinek kyseliny kaprylové na *Escherichia coli*

Při testování antibakteriálního účinku kyseliny kaprylové byly použity dvě metody. První byla nazvána jako „metoda roztěrem na půdu“ a druhá jako „metoda v bujónu“.

10.3.1 Aplikace kyseliny kaprylové na *Escherichia coli* metodou „roztěrem na půdu“

Experiment byl proveden na půdě Plate Count Agar (PCA) a na půdě Endo Agar (EA).

Příprava půdy PCA:

S přesností na 0,01 g bylo naváženo 23,50 g půdy do 1000 ml destilované vody. Směs byla zahřívána do úplného rozpuštění a sterilována v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut.

Příprava půdy EA:

S přesností na 0,01 g bylo naváženo 41,50 g půdy do 1000 ml destilované vody a směs byla zahřívána do úplného rozpuštění. Poté byla sterilována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Před naléváním na Petriho misky byla důkladně rozmíchána.

Vlastní experiment:

Na živnou půdu bylo nejprve vyočkováno 300 µl kyseliny kaprylové o předem dané koncentraci. Byla připravena základní suspenze daného kmene *E. coli* a z ní připraveno desítkové ředění 10^{-5} a 10^{-6} . Na půdu s aplikovanou kyselinou kaprylovou bylo očkováno 100 µl daného ředění. Zároveň byl připraven kontrolní vzorek, který neobsahoval kyselinu kaprylovou. Vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin.

10.3.2 Aplikace kyseliny kaprylové na *Escherichia coli* metodou „v bujónu“

Experiment byl proveden na živných půdách Plate Count Agar (PCA) a Endo Agar (EA). Půdy byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 10.3.1.

Příprava pomnožovacího bujónu:

Bylo naváženo 6,0 g masového výtažku (Protose-BE), 8,0 g peptonu a 5,0 g chloridu sodného do 1000 ml destilované vody. Hydroxidem draselným (10 %) bylo upraveno pH na hodnotu 6,8 – 7,2. Bujón byl sterilován v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut.

Vlastní experiment:

Bylo připraveno 5 x 50 ml roztoku sterilního bujónu a do něj bylo přidáno tolik kyseliny kaprylové, aby její celková koncentrace v bujónu byla 0,25 %, 0,5 %, 0,75 % a 1 %. Zároveň byl připraven kontrolní vzorek, který kyselinu kaprylovou neobsahoval. Ke všem vzorkům byla přidána suspenze *Escherichia coli* (500 µl). Vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hod. Poté byla z každého vzorku provedena příslušná ředění a ta se očkovala v množství 100 µl na Petriho misky s půdami PCA a EA. Následovala opět inkubace při 37 °C po dobu 24 hod.

10.4 Antibakteriální účinek kyseliny kaprylové na *Salmonella typhimurium*

Při výzkumu antibakteriálního účinku kyseliny kaprylové na kmen *S. typhimurium* byly použity opět metody „roztěrem na půdu“ a „v bujónu“, stejně jako u *E. coli*.

10.4.1 Aplikace kyseliny kaprylové na *Salmonella typhimurium* „roztěrem na půdu“

Živné půdy pro bakteriální kmen *S. typhimurium*, PCA a EA, byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 10.3.1.

Na živnou půdu bylo nejprve postupně vyočkováno 300 µl kyseliny kaprylové o koncentraci 1,5; 2; 2,5; 3 a 5 %. Byla připravena základní suspenze daného kmene *S. typhimurium* a z ní připraveno ředění 10^{-5} a 10^{-6} . Na půdu s kyselinou kaprylovou bylo očkováno 100 µl dané naředěné suspenze. Zároveň byl připraven kontrolní vzorek, který kyselinu kaprylovou neobsahoval. Vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin.

10.4.2 Aplikace kyseliny kaprylové na *Salmonella typhimurium* metodou „v bujónu“

Živné půdy pro bakteriální kmen *S. typhimurium*, PCA a EA, byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 10.3.1. Příprava pomnožovacího bujónu je popsána v kapitole 10.3.2.

Bylo připraveno 6 x 50 ml roztoku sterilního bujónu a do něj přidáno tolik kyseliny kaprylové, aby její celková koncentrace v bujónu byla 0,1 %, 0,125 %, 0,25 %, 0,5 % a 0,75 %. Zároveň byl připraven kontrolní vzorek, který kyselinu kaprylovou neobsahoval. Ke všem

vzorkům byla přidána suspenze *Salmonella typhimurium* (500 µl). Vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hod. Poté byla z každého vzorku provedena příslušná ředění a ta se očkovala v množství 100 µl na Petriho misky s půdami PCA a EA. Následovala opět inkubace při 37 °C po dobu 24 hod.

10.5 Antibakteriální účinek kyseliny kaprylové na *Pseudomonas fluorescens*

Při testování účinku kyseliny kaprylové na další bakteriální kmeny byla použita pouze metoda „v bujónu“. Tato metoda vykazovala statisticky průkaznější výsledky. K tomuto rozhodnutí bylo přistoupeno na základě výsledků při testování kmenů *E. coli* a *S. typhimurium*. Byl učiněn závěr, že přímou aplikací kyseliny kaprylové na povrch půd nedochází k dobré difúzi kyseliny do živného media a tudíž metoda „roztěrem na půdu“ není v tomto případě vhodná.

Při testování antibakteriálního účinku kyseliny kaprylové na *P. fluorescens* byla použita živná půda Plate Count Agar (PCA). Postup její přípravy je uveden v kapitole 10.3.1.

Bylo připraveno 6 x 50 ml sterilního bujónu a do něj přidáno tolik kyseliny kaprylové, aby její celková koncentrace v bujónu byla 0,1 %, dále 0,125 %, 0,25 %, 0,5 % a 1 %. Zároveň byl připraven kontrolní vzorek, který kyselinu kaprylovou neobsahoval. Ke všem vzorkům byla přidána suspenze *Pseudomonas fluorescens* (500 µl). Vzorky byly inkubovány při 25 °C po dobu 24 hod. Poté byla z každého vzorku provedena příslušná ředění a ta se očkovala v množství 100 µl na Petriho misky s půdou PCA. Následovala opět inkubace při 25 °C po dobu 24 hod.

10.6 Antibakteriální účinek kyseliny kaprylové na *Staphylococcus aureus*

Kromě aplikace kyseliny kaprylové na *Staphylococcus aureus* „metodou inkubace v bujónech“, byl také proveden vedlejší experiment, který měl prověřit, jestli, a o jakou hodnotu, snižuje kyselina kaprylová pH v bujónu, a jaký podíl má toto okyselení na antibakteriálním účinku kyseliny kaprylové.

10.6.1 Aplikace kyseliny kaprylové na *Staphylococcus aureus* „v bujónech“

Experiment byl proveden na půdě Plate Count Agar (PCA) a Mannitol Salt Agar (MSA). Příprava živné půdy PCA je popsána v kapitole 10.3.1.

Příprava půdy MSA:

S přesností na 0,01 g bylo naváženo 111,00 g půdy do 1000 ml destilované vody. Tato suspenze byla zahřívána do úplného rozpuštění a potom sterilována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Vlastní experiment:

Bylo připraveno 6 x 50 ml sterilního bujónu a do něj přidáno tolik kyseliny kaprylové, aby její celková koncentrace v bujónu byla 0,1 %, 0,125 %, 0,25 %, 0,5 % a 0,75 obj.%. Zároveň byl připraven kontrolní vzorek, který kyselinu kaprylovou neobsahoval. Ke všem vzorkům byla přidána suspenze *Staphylococcus aureus* (500 µl). Vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hod. Poté byla z každého vzorku provedena příslušná ředění a ta se očkovala v množství 100 µl na Petriho misky. Následovala opět inkubace při 37 °C po dobu 24 hod.

10.6.2 Aplikace kyseliny kaprylové na *Staphylococcus aureus* „v neutralizovaném bujónu“

Pokus byl proveden pouze vyočkováním na půdu PCA, která byla připravena postupem uvedeným v kapitole 10.3.1.

Bylo připraveno 4 x 50 ml sterilního bujónu a do něj přidáno tolik kyseliny kaprylové, aby její celková koncentrace byla 0,125 %, 0,25 a 0,5 %. Zároveň byl připraven kontrolní vzorek, který kyselinu kaprylovou neobsahoval. U bujónů s příslušnou koncentrací kyseliny kaprylové bylo změřeno pH a jeho hodnota byla zaznamenána do tabulky 34. Bujóny, které obsahovaly kyselinu kaprylovou byly neutralizovány 10 % roztokem hydroxidu draselného a neutralizační reakce byla ověřena pH papírkem. Poté byla do bujónů přidána suspenze *Staphylococcus aureus* (500 µl). Vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hod. Poté byla z každého vzorku provedena příslušná ředění a ta se očkovala v množství 100 µl na Petriho misky s půdou PCA. Následovala opět inkubace při 37 °C po

dobu

24 hod.

10.7 Antibakteriální účinek kyseliny kaprylové na *Serratia marcescens*

10.7.1 Aplikace kyseliny kaprylové na *Serratia marcescens* metodou „v bujónu“

Experiment byl proveden s živnou půdou Plate Count Agar (PCA), jejíž příprava je popsána v kapitole 10.3.1.

Bylo připraveno 8 x 50 ml sterilního bujónu a do něj přidáno tolik kyseliny kaprylové, aby její celková koncentrace byla 0,1 %, 0,125 %, 0,25 %, 0,5 %, 1 %, 1,5 % a 2 %. Zároveň byl připraven kontrolní vzorek, který kyselinu kaprylovou neobsahoval. Ke všem vzorkům byla přidána suspenze *Serratia marcescens* (500 µl). Vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hod. Poté byla z každého vzorku provedena příslušná ředění a ta se očkovala v množství 100 µl na Petriho misky s půdou PCA. Následovala opět inkubace při 37 °C po dobu 24 hod.

10.8 Antibakteriální účinek kyseliny kaprylové na *Micrococcus luteus*

10.8.1 Aplikace kyseliny kaprylové na *Micrococcus luteus* „v bujónu“

Experiment byl proveden s živnou půdou Plate Count Agar (PCA). Postup přípravy je uveden v kapitole 10.3.1.

Bylo připraveno 5 x 50 ml sterilního bujónu a do něj přidáno tolik kyseliny kaprylové, aby její celková koncentrace byla 0,1 %, dále 0,125 %, 0,25 % a 0,5%. Zároveň byl připraven kontrolní vzorek, který kyselinu kaprylovou neobsahoval. Ke všem vzorkům byla přidána suspenze *Serratia marcescens* (500 µl). Vzorky byly inkubovány při 30 °C po dobu 24 hod. Poté byla z každého vzorku provedena příslušná ředění a ta se očkovala v množství 100 µl na Petriho misky. Následovala opět inkubace při 30 °C po dobu 72 hod.

10.9 Antibakteriální účinek kyseliny kaprylové na *Bacillus cereus*

10.9.1 Aplikace kyseliny kaprylové na *Bacillus cereus* metodou „v bujónu“

Experiment byl proveden s živnou půdou PCA. Ta byla připravena postupem uvedeným v kapitole 10.3.1.

Bylo připraveno 6 x 50 ml sterilního bujónu a do něj přidáno tolik kyseliny kaprylové, aby její celková koncentrace v bujónu byla 0,1 %, 0,25 %, 0,5 %, 1 % a 3 %. Zároveň byl připraven kontrolní vzorek – 50 ml bujónu bez kyseliny kaprylové. Ke všem vzorkům byla přidána suspenze *Bacillus cereus* (500 µl). Vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hod. Poté byla z každého vzorku provedena příslušná ředění a ta se očkovala v množství 100 µl na Petriho misky. Následovala opět inkubace při 37 °C po dobu 24 hod.

10.10 Antibakteriální účinek kyseliny kaprylové na *Bacillus subtilis*

10.10.1 Aplikace kyseliny kaprylové na *Bacillus subtilis* metodou „v bujónu“

Experiment byl opět proveden pouze s půdou PCA. Postup přípravy této živné půdy je uveden v kapitole 10.3.1.

Bylo připraveno 7 x 50 ml sterilního bujónu a do něj přidáno tolik kyseliny kaprylové, aby její celková koncentrace byla 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2 a 3 obj.%. Zároveň byl připraven kontrolní vzorek, který kyselinu kaprylovou neobsahoval. Ke všem vzorkům byla přidána suspenze *Bacillus subtilis* (500 µl). Vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hod. Poté byla z každého vzorku provedena příslušná ředění a ta se očkovala v množství 100 µl na Petriho misky s půdou. Následovala opět inkubace při 37 °C po dobu 24 hod.

10.11 Identifikace používaných kmenů bakterií

10.11.1 Charakteristika testů

ENTEROtestem a STAPHYtestem byly ověřeny použité kmeny bakterií. Byl proveden křížový roztěr jednotlivých druhů bakterií na půdu Masopeptonový agar a tyto kultury byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Poté byly připraveny suspenze jednotlivých bakterií (kultura + fyziologický roztok). Pak byly provedeny samotné testy.

Živná půda mastopeptonový agar byla připravena následujícím způsobem: bylo naváženo 6,0 g masového výtažku (Protose-BE), 8,0 g peptonu, 5,0 g chloridu sodného a 15 g agaru do 1000 ml destilované vody. Hydroxidem draselným (KOH) bylo upraveno pH na hodnotu 6,8 – 7,2. Půda byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Souprava ENTEROtest 24 je určena pro rutinní identifikaci významných druhů střevních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*. Dvacet čtyři biochemických testů je umístěno v jamkách mikrotitrační destičky. Do každé jamky se přidává 100 µl suspenze bakterie. Testy na indol (IND), sirovodík (H₂S), lysin (LYS), ornithin (ORN), ureasu (URE) a arginin (ARG) se zakápnou parafinovým olejem. Po 24 hodinové inkubaci se provede zhodnocení reakcí. Některé jamky se zakápnou příslušnými činidly, a sice: 1. řada, jamka H (test Indol) dvěma kapkami činidla pro indol (IND), 3. řada, jamka H (test Acetoin) činidly pro acetoin VPT I a VPT II a 2. řada, jamka H (test Fenylyalanin) jednou kapkou činidla pro fenylyalanin (PHE). Výsledky jsou zaznamenány do formuláře pro záznam výsledků. Identifikace se vyhodnotí na počítači identifikačním programem TNW Lite 6.5. ENTEROtestem byly prověřeny kultury *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* a *Serratia marcescens*.

Souprava STAPHYtest 16 je určena pro identifikaci zástupců rodu *Staphylococcus* i dalších grampozitivních kataláza pozitivních koků. Při provádění STAPHYtestu se postupovalo obdobně jak je popsáno výše u ENTEROtestu podle přiloženého návodu. STAPHYtestem byla ověřována kultura *Staphylococcus aureus* a *Micrococcus luteus*.

10.12 Charakteristika statistického vyhodnocovacího počítačového programu

Ke statistickému vyhodnocení experimentálních dat byl použit statistický software STATVYD verze 2.0 beta. Tento program je určen běžným uživatelům statistiky jako podpora vyhodnocování dat získaných v konkrétních reálných situacích. Tento program umožňuje zpracovávat data ve známém prostředí Microsoft Excel.

Při vyhodnocování dat se postupovalo následujícím způsobem. Nejprve bylo zapotřebí zvolit jeden ze tří modulů: srovnání jednorozměrných dat, analýza rozptylu a senzorická analýza. Mezi těmito byl vybrán modul analýzy rozptylu. Modul analýza rozptylu zahrnuje jednofaktorovou analýzu rozptylu pro nezávislé výběry. U analýzy rozptylu jde o testování

významnosti odchylek hodnot mezi více jako dvěma výběrovými soubory. Jedná se o oboustranné testy.

Modul zahrnuje tři sady metod: parametrické metody, neparametrické metody a metodu pro nominální znaky. Byla zvolena neparametrická analýza, protože zde lze zadat 3 až 20 výběrových souborů, přičemž každý z výběrových souborů může zahrnovat až 200 dat. V tomto případě se pracovalo s pěti až osmi výběrovými soubory. Množství dat bylo u každé bakterie různé. První analýzou software vyhodnotí, zda se hypotéza o shodě hodnot přijímá nebo zamítá. Pokud je hypotéza zamítnuta, je vhodné se zabývat tím, které soubory se od sebe liší.

Software poskytuje tři možnosti párových testování. Protože v tomto případě byl vždy v daných srovnávaných souborech stejný počet dat, bylo zvoleno srovnání dvojic pro hladinu významnosti $\alpha = 0,05$ pro stejné rozsahy výběrů s maximálně 25 daty v jednom výběru a pro počet výběrů menší než 11. Samotné vyhodnocení je pak provedeno Kruskal-Wallisovým testem. Zobrazí se tabulka, kde jak v záhlaví, tak i v legendě jsou čísla výběrových souborů (popisky např. K, 0,1 % atd.). V jejich průsečících jsou výsledky testů. Zobrazí-li se „S“, pak na dané hladině významnosti nebyl shledán statisticky významný rozdíl mezi hodnotami srovnávaných souborů. Zobrazí-li se „R“, pak na dané hladině významnosti existuje statisticky významný rozdíl mezi hodnotami srovnávaných souborů.

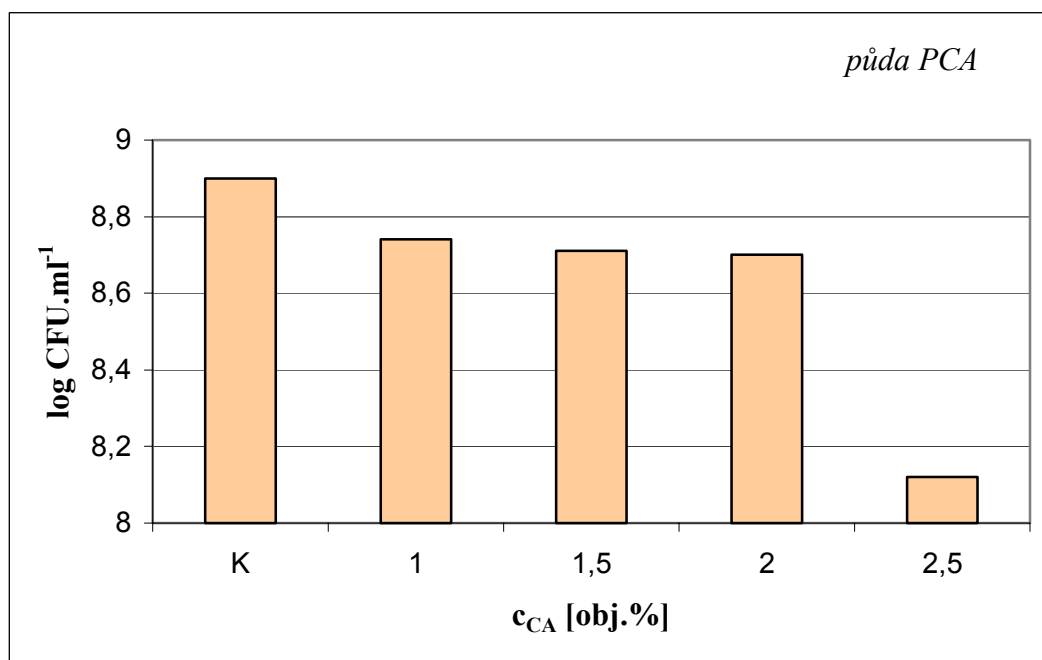
11 VÝSLEDKY A DISKUSE

11.1 Výsledky měření antibakteriálního účinku kyseliny kaprylové na *Escherichia coli* metodou „roztěrem na půdu“

Tab. 14. Vyhodnocení CFU *E. coli* na půdě PCA

| c_{CA} [obj.%] | Kontrolní vzorek | 1 | 1,5 | 2 | 2,5 |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| CFU.ml ⁻¹ | $7,86 \cdot 10^8$ | $5,46 \cdot 10^8$ | $5,07 \cdot 10^8$ | $5,05 \cdot 10^8$ | $1,31 \cdot 10^8$ |
| log CFU.ml ⁻¹ | 8,90 | 8,74 | 8,71 | 8,70 | 8,12 |

Pozn.: c_{CA} – koncentrace kyseliny kaprylové



Obr. 3. Závislost log CFU *Escherichia coli* na koncentraci CA

Statistické zhodnocení:*Tab. 15. Statistické vyhodnocení antibakteriálního účinku**CA na E. coli Kruskal-Wallisovým testem*

| Výběry | Výběry | | | | |
|--------|--------|-----|-------|-----|-------|
| | K | 1 % | 1,5 % | 2 % | 2,5 % |
| K | | | | | |
| 1 % | S | | | | |
| 1,5 % | S | S | | | |
| 2 % | S | S | S | | |
| 2,5 % | R | R | S | S | |

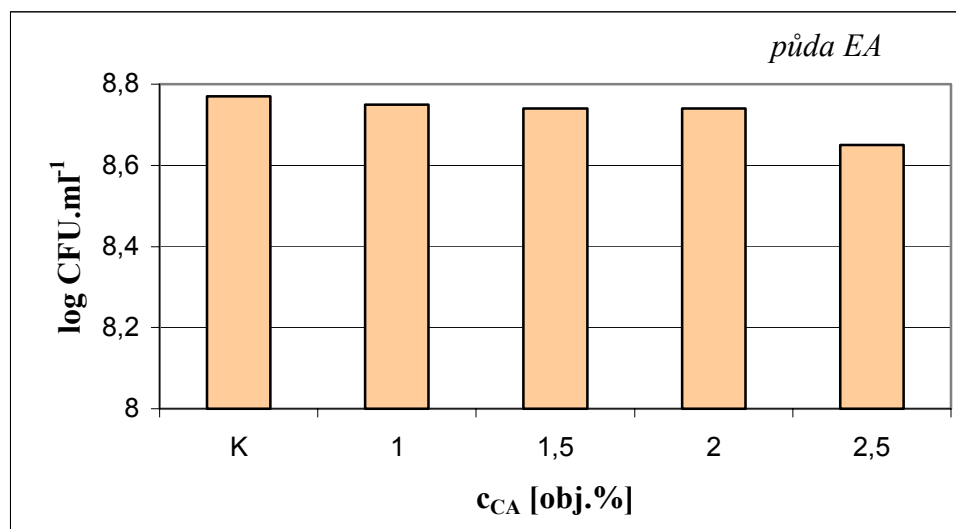
Pozn.: S – nebyl shledán statisticky významný rozdíl

R – byl shledán statisticky významný rozdíl

Na hladině významnosti 5 % existuje statisticky významný rozdíl pouze mezi kontrolním vzorkem a koncentrací kyseliny kaprylové 2,5 obj.%.

Tab. 16. Vyhodnocení CFU E. coli na půdě Endo Agar

| c _{CA} [obj.%] | kontrolní vzorek | 1 | 1,5 | 2 | 2,5 |
|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| CFU.ml ⁻¹ | 5,89.10 ⁸ | 5,56.10 ⁸ | 5,55.10 ⁸ | 5,52.10 ⁸ | 4,47.10 ⁸ |
| log CFU.ml ⁻¹ | 8,77 | 8,75 | 8,74 | 8,74 | 8,65 |



Obr. 4. Závislost CFU *Escherichia coli* na koncentraci CA

Statistické zhodnocení:

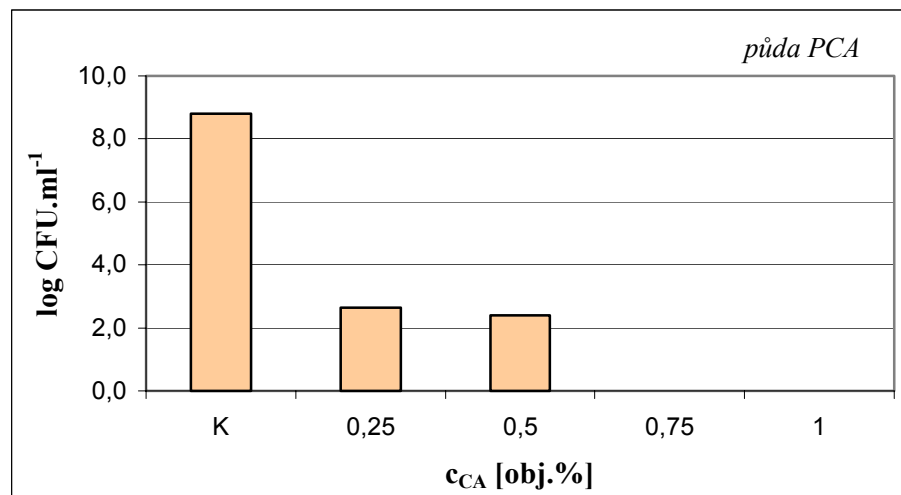
Na hladině významnosti 5 % nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi srovnávanými soubory.

Metodou roztěrem na půdy PCA a EA bylo zjištěno, že kyselina kaprylová snižuje populaci *Escherichia coli* pouze slabě, statisticky nevýznamně. Hodnoty poklesu celkového počtu mikroorganismů se pohybovaly stále v rámci jednoho řádu.

11.2 Výsledky měření antibakteriálního účinku kyseliny kaprylové na *Escherichia coli* metodou „v bujónu“

Tab. 17. Vyhodnocení CFU *Escherichia coli* na půdě PCA

| koncentrace [obj.%] | kontrolní vzorek | 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1 |
|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------|---|
| CFU.ml ⁻¹ | 6,33.10 ⁸ | 4,40.10 ² | 2,47.10 ² | 0 | 0 |
| log CFU.ml ⁻¹ | 8,80 | 2,64 | 2,39 | - | - |



Obr. 5. Závislost CFU Escherichia coli na koncentraci CA

Statistické zhodnocení:

Tab. 18. Statistické vyhodnocení antibakteriálního účinku

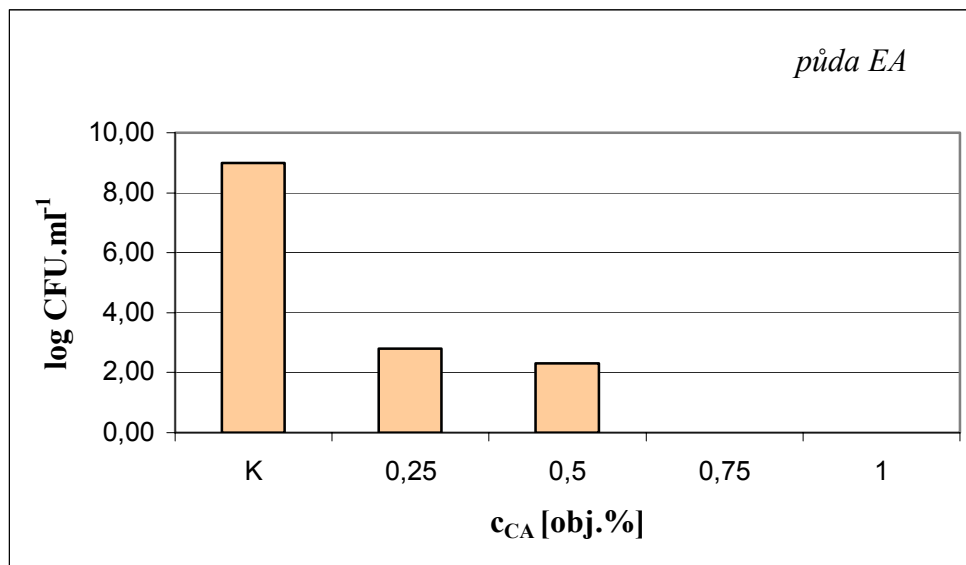
CA na *E. coli* Kruskal-Wallisovým testem

| Výběry | Výběry | | | | |
|--------|--------|--------|-------|--------|-----|
| | K | 0,25 % | 0,5 % | 0,75 % | 1 % |
| K | | | | | |
| 0,25 % | S | | | | |
| 0,5 % | S | S | | | |
| 0,75 % | R | R | S | | |
| 1 % | R | R | S | S | |

Statisticky významný rozdíl byl sledován mezi kontrolním vzorkem a 0,75 obj.% CA a mezi kontrolním vzorkem a 1 obj.% CA.

Tab. 19. Vyhodnocení CFU Escherichia coli na půdě Endo Agar

| koncentrace [obj.%] | kontrolní vzorek | 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1 |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|---|
| CFU.ml ⁻¹ | $1,01 \cdot 10^9$ | $6,23 \cdot 10^2$ | $2,07 \cdot 10^2$ | 0 | 0 |
| log CFU.ml ⁻¹ | 9,00 | 2,79 | 2,32 | - | - |



Obr. 6. Závislost CFU Escherichia coli na koncentraci CA

Statistické zhodnocení:

Tab. 20. Statistické vyhodnocení antibakteriálního účinku

CA na *E. coli* Kruskal-Wallisovým testem

| Výběry | Výběry | | | | |
|--------|--------|--------|-------|--------|-----|
| | K | 0,25 % | 0,5 % | 0,75 % | 1 % |
| K | | | | | |
| 0,25 % | S | | | | |
| 0,5 % | S | S | | | |
| 0,75 % | R | R | S | | |
| 1 % | R | R | S | S | |

Na hladině významnosti 5 % existují mezi srovnávanými soubory statisticky významné rozdíly. Významné je zjištění rozdílu mezi kontrolou a 0,75 obj.% CA a mezi kontrolou a 1 obj.% CA.

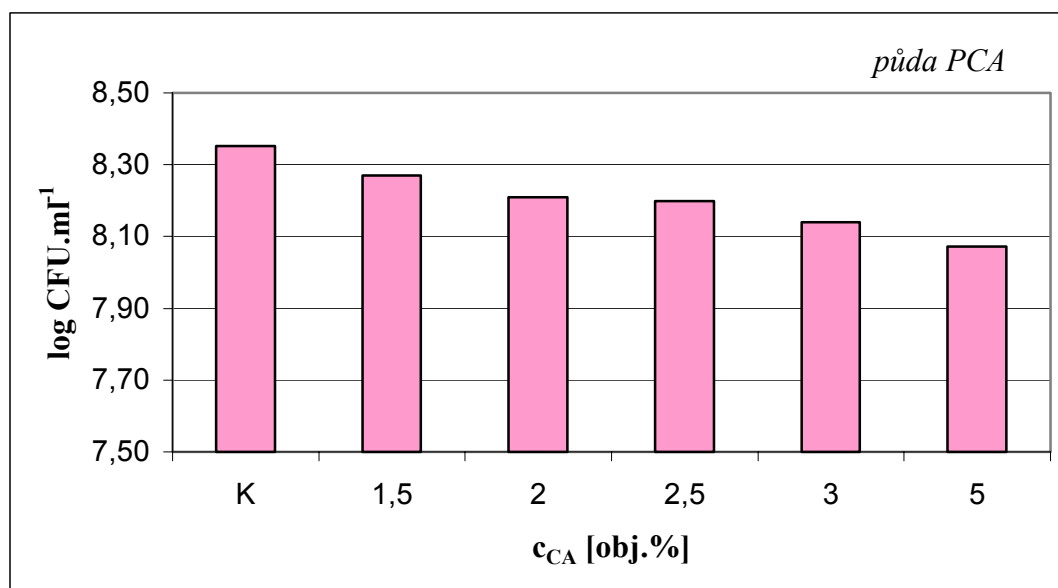
Experiment byl původně proveden s koncentracemi kyseliny kaprylové 1, 1,5, 2 a 2,5 %. K lepší charakterizaci antibakteriálního účinku kyseliny kaprylové byly však poté zvoleny nižší koncentrace.

Bylo potvrzeno, že kyselina kaprylová prokazatelně snižuje populaci *Escherichia coli*. Pozitivní účinek snižování počtu *E. coli* byl zaznamenán již při koncentraci kyseliny kaprylové 0,25 %. Při koncentraci této kyseliny 0,75 % byl již růst *E. coli* zastaven.

11.3 Výsledky měření antibakteriálního účinku kyseliny kaprylové na *Salmonella typhimurium* metodou „roztěrem na půdu“

Tab. 21. Vyhodnocení CFU *Salmonella typhimurium* na půdě PCA

| c_{CA} [obj.%] | kontrolní vzorek | 1,5 | 2 | 2,5 | 3 | 5 |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| CFU.ml ⁻¹ | $2,25 \cdot 10^8$ | $1,86 \cdot 10^8$ | $1,62 \cdot 10^8$ | $1,58 \cdot 10^8$ | $1,38 \cdot 10^8$ | $1,18 \cdot 10^8$ |
| log CFU.ml ⁻¹ | 8,35 | 8,27 | 8,21 | 8,20 | 8,14 | 8,07 |



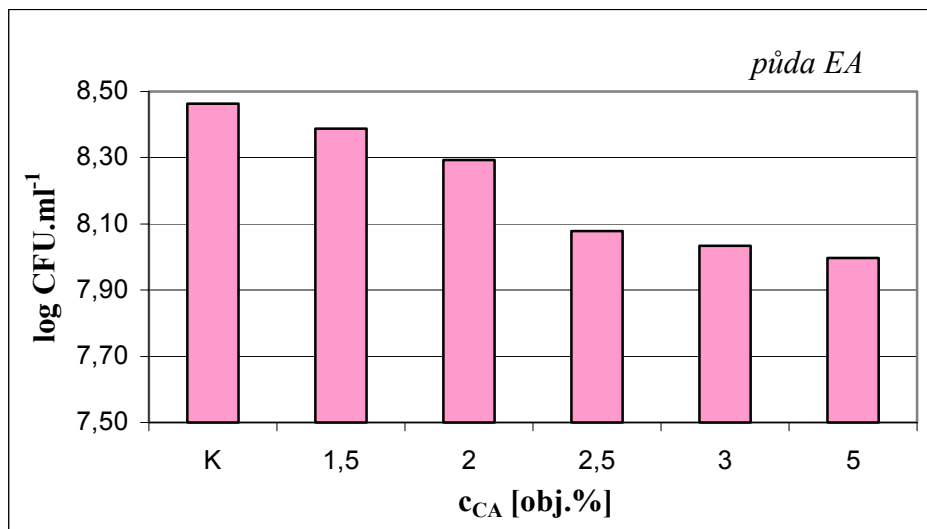
Obr. 7. Závislost CFU *Salmonella typhimurium* na koncentraci CA

Statistické zhodnocení:

Na hladině významnosti 5 % nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi srovnávanými soubory.

Tab. 22. Vyhodnocení CFU *Salmonella typhimurium* na půdě EA

| | | | | | | |
|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| c _{CA} [obj.%] | kontrolní vzorek | 1,5 | 2 | 2,5 | 3 | 5 |
| CFU.ml ⁻¹ | 2,91.10 ⁸ | 2,44.10 ⁸ | 1,96.10 ⁸ | 1,20.10 ⁸ | 1,08.10 ⁸ | 9,93.10 ⁷ |
| log CFU.ml ⁻¹ | 8,46 | 8,39 | 8,29 | 8,08 | 8,03 | 8,00 |



Obr. 8. Závislost CFU *Salmonella typhimurium* na koncentraci CA

Statistické zhodnocení:

Tab. 23. Statistické vyhodnocení antibakteriálního účinku

CA na *S. typhimurium* Kruskal-Wallisovým testem

| Výběry | Výběry | | | | | |
|--------|--------|-------|-----|-------|-----|-----|
| | K | 1,5 % | 2 % | 2,5 % | 3 % | 5 % |
| K | | | | | | |
| 1,5 % | S | | | | | |
| 2 % | S | S | | | | |
| 2,5 % | S | S | S | | | |
| 3 % | S | S | S | S | | |
| 5 % | S | R | S | S | S | |

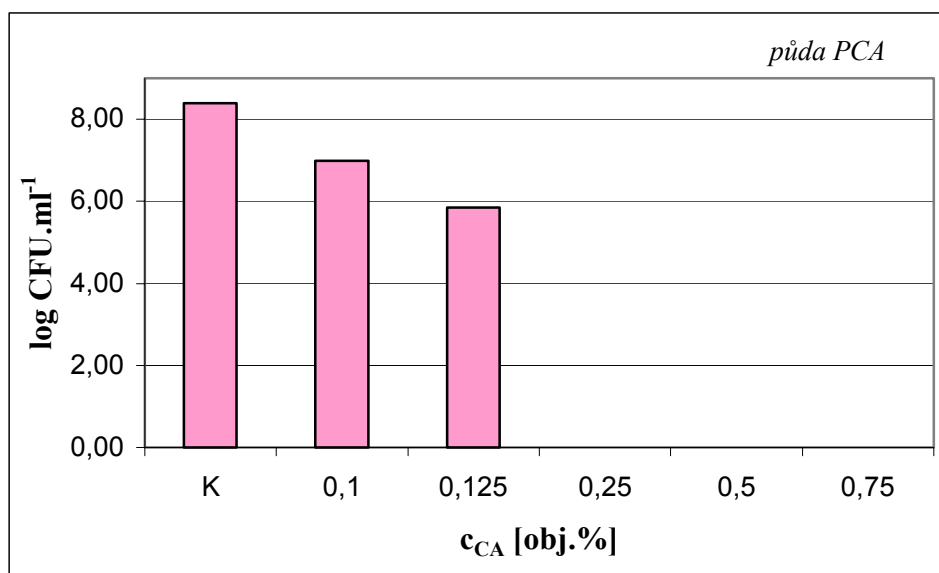
Na hladině významnosti 5 % neexistují statisticky významné rozdíly. Máme na mysli rozdíl mezi kontrolou a příslušnou koncentrací. Rozdíl jen mezi 1,5 % a 5 % koncentrací CA.

Z této studie vyplývá, že ani koncentrace kyseliny kaprylové 5 % nevykazovala významný antibakteriální účinek na bakterii *Salmonella typhimurium*. Při koncentraci 5 % se úbytek počtu kolonií *S. typhimuriumi* nesnížil ani o celý řád.

11.4 Výsledky měření antibakteriálního účinku kyseliny kaprylové na *Salmonella typhimurium* metodou „v bujónu“

Tab. 24. Vyhodnocení CFU *Salmonella typhimurium* na půdě PCA

| c_{CA} [obj.%] | kontrolní vzorek | 0,1 | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 0,75 |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|-----|------|
| CFU.ml ⁻¹ | $2,44 \cdot 10^8$ | $9,85 \cdot 10^6$ | $7,00 \cdot 10^5$ | 0 | 0 | 0 |
| log CFU.ml ⁻¹ | 8,39 | 6,99 | 5,85 | - | - | - |



Obr. 9. Závislost CFU *Salmonella typhimurium* na koncentraci CA

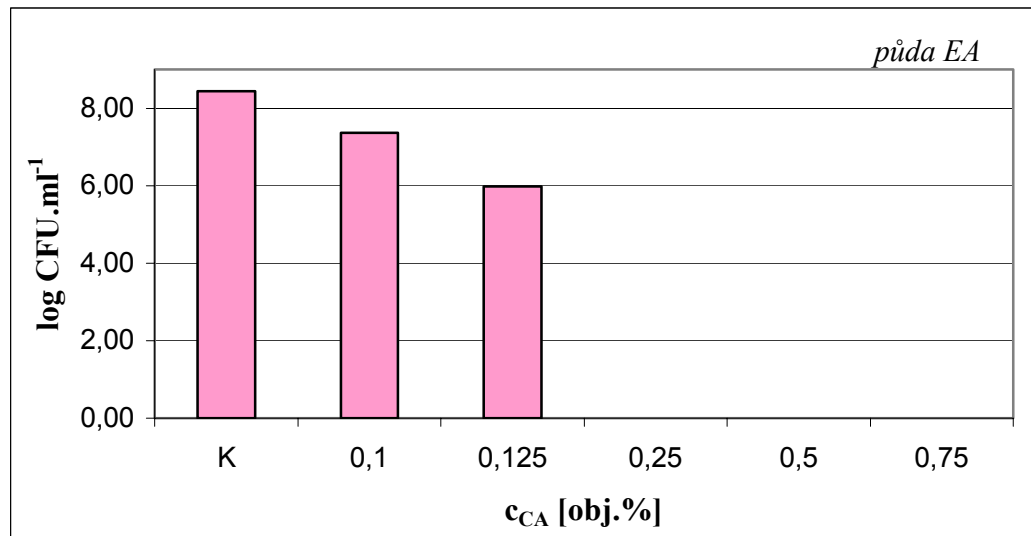
Statistické zhodnocení:*Tab. 25. Statistické vyhodnocení antibakteriálního účinku**CA na S. typhimurium Kruskal-Wallisovým testem*

| Výběry | Výběry | | | | | |
|---------|--------|-------|---------|--------|-------|--------|
| | K | 0,1 % | 0,125 % | 0,25 % | 0,5 % | 0,75 % |
| K | | | | | | |
| 0,1 % | S | | | | | |
| 0,125 % | S | S | | | | |
| 0,25 % | R | R | S | | | |
| 0,5 % | R | R | S | S | | |
| 0,75 % | R | R | S | S | S | |

Byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi kontrolním vzorkem a koncentracemi 0,25 obj.% CA, 0,5 obj.% CA a 0,75 obj.% CA.

Tab. 26. Vyhodnocení CFU Salmonella typhimurium na půdě EA

| c _{CA} [obj.%] | kontrolní vzorek | 0,1 | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 0,75 |
|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------|-----|------|
| CFU.ml ⁻¹ | 2,78.10 ⁸ | 2,30.10 ⁷ | 9,45.10 ⁵ | 0 | 0 | 0 |
| log CFU.ml ⁻¹ | 8,44 | 7,36 | 5,98 | - | - | - |



Obr. 10. Závislost CFU *Salmonella typhimurium* na koncentraci CA

Statistické zhodnocení:

Tab. 27. Statistické vyhodnocení antibakteriálního účinku

CA na *S. typhimurium* Kruskal-Wallisovým testem

| Vyběry | Vyběry | | | | | |
|---------|--------|-------|---------|--------|-------|--------|
| | K | 0,1 % | 0,125 % | 0,25 % | 0,5 % | 0,75 % |
| K | | | | | | |
| 0,1 % | S | | | | | |
| 0,125 % | S | S | | | | |
| 0,25 % | R | R | S | | | |
| 0,5 % | R | R | S | S | | |
| 0,75 % | R | R | S | S | S | |

Na hladině významnosti 5 % existují mezi srovnávanými soubory statisticky významné rozdíly. Jedná se o rozdíl mezi kontrolním vzorkem a koncentrací 0,25 obj.% CA, 0,5 obj.% CA a 0,75 obj.% CA.

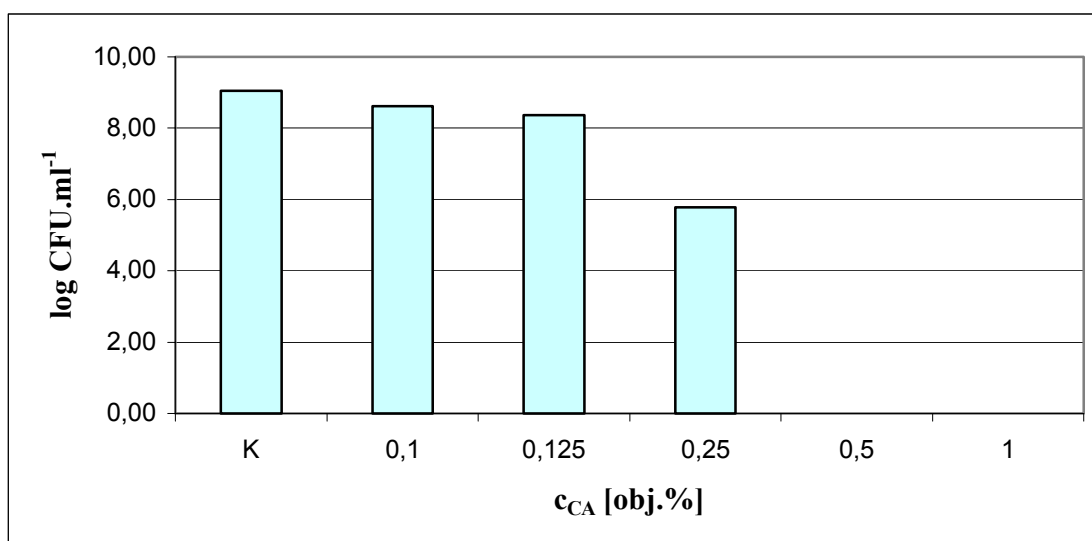
Koncentrace kyseliny kaprylové 0,125 % prokázala mírný antibakteriální účinek na laboratorní kmen *S. typhimurium*. Při aplikaci 0,25 % kyseliny kaprylové je již růst této bakterie zcela potlačen.

Podle grafů by se dalo domnívat, že kyselina kaprylová spolehlivě inhibuje růst salmonel. Je to však pouze zdánlivý dojem. Použit byl totiž laboratorní oslabený kmen *S. typhimurium*, který není tak odolný, jako volně se vyskytující kmeny. Z důvodů nedostatečných laboratorních podmínek nemohl být pro laboratorní experiment použit patogenní kmen rodu *Salmonella*.

11.5 Výsledky měření antibakteriálního účinku kyseliny kaprylové na *Pseudomonas fluorescens* metodou „v bujónu“

Tab. 28. Vyhodnocení CFU *Pseudomonas fluorescens* na půdě PCA

| c_{CA} [obj.%] | kontrolní vzorek | 0,1 | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 1 |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----|---|
| CFU.ml ⁻¹ | $1,10 \cdot 10^9$ | $4,10 \cdot 10^8$ | $2,28 \cdot 10^8$ | $6,10 \cdot 10^5$ | 0 | 0 |
| log CFU.ml ⁻¹ | 9,04 | 8,61 | 8,36 | 5,79 | - | - |



Obr. 11. Závislost CFU *Pseudomonas fluorescens* na koncentraci CA

Statistické zhodnocení:

Tab. 29. Statistické vyhodnocení antibakteriálního

účinku CA na *P. fluorescens* Kruskal-Wallisovým testem

| Výběry | Výběry | | | | | |
|---------|--------|-------|---------|--------|-------|-----|
| | K | 0,1 % | 0,125 % | 0,25 % | 0,5 % | 1 % |
| K | | | | | | |
| 0,1 % | S | | | | | |
| 0,125 % | S | S | | | | |
| 0,25 % | S | S | S | | | |
| 0,5 % | R | S | S | S | | |
| 1 % | R | S | S | S | S | |

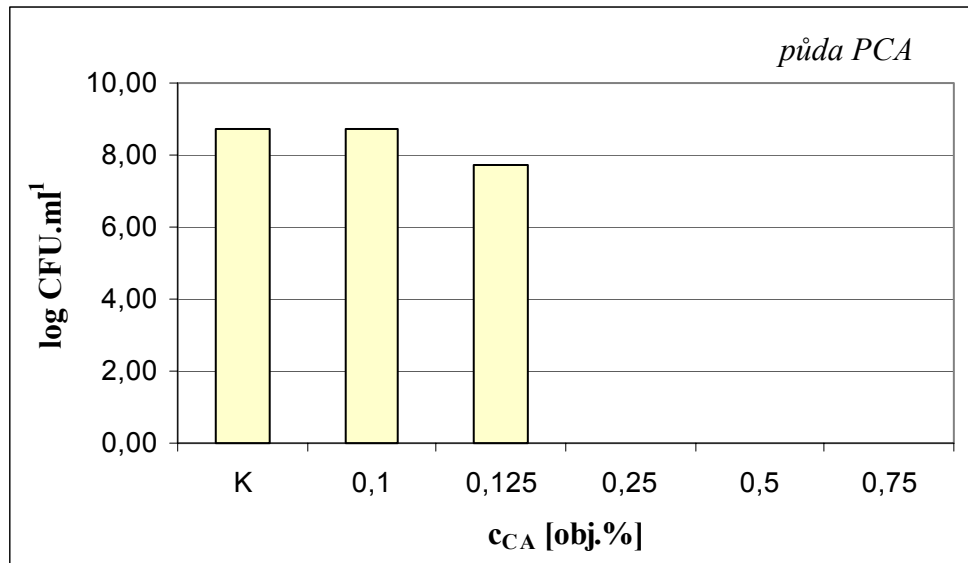
Byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi kontrolním vzorkem a koncentrací CA 0,5 obj.% a mezi kontrolním vzorkem a koncentrací 1 obj.% CA.

Výsledky prokázaly, že kyselina kaprylová má antibakteriální účinek na testovaný kmen bakterie *Pseudomonas fluorescens*. Při aplikaci koncentrace kyseliny kaprylové 0,25 % na *P. fluorescens* byl pokles počtu kolonií skoro poloviční. Při koncentraci 0,5 % byl už zcela prokázán inhibiční účinek na růst této bakterie.

11.6 Výsledky měření antibakteriálního účinku kyseliny kaprylové na *Staphylococcus aureus* metodou „v bujónu“

Tab. 30. Vyhodnocení CFU *Staphylococcus aureus* na půdě PCA

| c_{CA} [obj.%] | kontrolní vzorek | 0,1 | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 0,75 |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|-----|------|
| CFU.ml ⁻¹ | $5,60 \cdot 10^8$ | $5,57 \cdot 10^8$ | $5,30 \cdot 10^7$ | 0 | 0 | 0 |
| log CFU.ml ⁻¹ | 8,75 | 8,75 | 7,72 | - | - | - |



Obr. 12. Závislost CFU *Staphylococcus aureus* na koncentraci CA

Statistické zhodnocení:

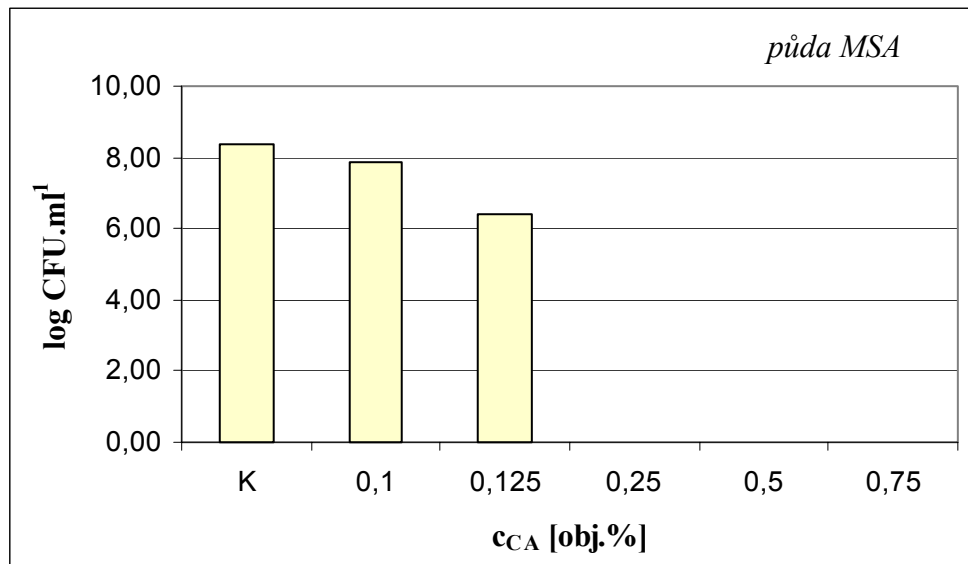
Tab. 31. Statistické vyhodnocení antibakteriálního účinku CA na *S. aureus* Kruskal-Wallisovým testem

| Výběry | Výběry | | | | | |
|---------|--------|-------|---------|--------|-------|--------|
| | K | 0,1 % | 0,125 % | 0,25 % | 0,5 % | 0,75 % |
| K | | | | | | |
| 0,1 % | S | | | | | |
| 0,125 % | S | S | | | | |
| 0,25 % | R | R | S | | | |
| 0,5 % | R | R | S | S | | |
| 0,75 % | R | R | S | S | S | |

Na hladině významnosti 5 % existují mezi srovnávanými soubory statisticky významné rozdíly. Rozdíl byl zjištěn mezi kontrolním vzorkem a koncentracemi 0,25 obj.% CA, 0,5 obj.% CA a 0,75 obj.% CA.

Tab. 32. Vyhodnocení CFU *Staphylococcus aureus* na půdě MSA

| | | | | | | |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|-----|------|
| c_{CA} [obj. %] | kontrolní vzorek | 0,1 | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 0,75 |
| CFU.ml ⁻¹ | $2,29 \cdot 10^8$ | $7,78 \cdot 10^7$ | $2,50 \cdot 10^6$ | 0 | 0 | 0 |
| log CFU.ml ⁻¹ | 8,36 | 7,89 | 6,40 | - | - | - |



Obr. 13. Závislost CFU *Staphylococcus aureus* na koncentraci CA

Statistické zhodnocení:

Tab. 33. Statistické vyhodnocení antibakteriálního účinku CA na *S. aureus* Kruskal-Wallisovým testem

| Vyběry | Vyběry | | | | | |
|---------|--------|-------|---------|--------|-------|--------|
| | K | 0,1 % | 0,125 % | 0,25 % | 0,5 % | 0,75 % |
| K | | | | | | |
| 0,1 % | S | | | | | |
| 0,125 % | S | S | | | | |
| 0,25 % | R | R | S | | | |
| 0,5 % | R | R | S | S | | |
| 0,75 % | R | R | S | S | S | |

Na hladině významnosti 5 % byly zjištěny statisticky významné rozdíly. Rozdíl byl zjištěn mezi kontrolním vzorkem a koncentracemi 0,25 obj.% CA, 0,5 obj.% CA a 0,75 obj.% CA.

Experimentem bylo zjištěno, že *Staphylococcus aureus* je poměrně silně citlivý na kyselinu kaprylovou. Experiment byl původně proveden s koncentracemi 0,25; 0,5; 0,75 a 1 %. K lepšímu znázornění antibakteriálního účinku sledované kyseliny bylo však potřeba zvolit nižší koncentrace. Koncentrace kyseliny kaprylové 0,125 % vykazovala velmi mírný inhibiční účinek na *S. aureus*. Při zvýšení koncentrace této kyseliny na 0,25 % byl již růst kolonií nulový.

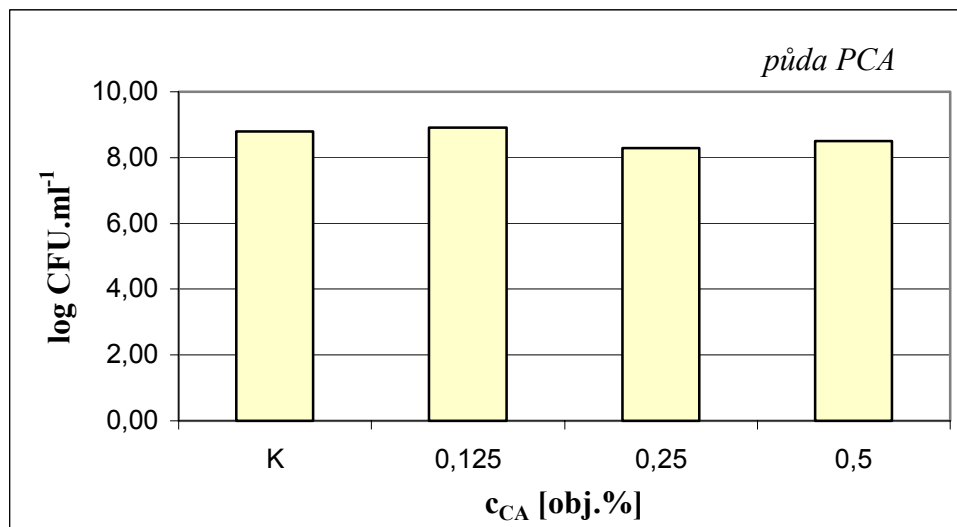
11.7 Výsledky měření antibakteriálního účinku kyseliny kaprylové na *Staphylococcus aureus* metodou „v neutralizovaném bujónu“

Tab. 34. Měření pH bujónů s obsahem kyseliny kaprylové

| koncentrace CA [obj.%] | pH |
|------------------------|------|
| 0,125 | 6,68 |
| 0,25 | 5,57 |
| 0,5 | 5,35 |

Tab. 35. Vyhodnocení CFU *Staphylococcus aureus* na půdě PCA

| c _{CA} [obj.%] | kontrolní vzorek | 0,125 | 0,25 | 0,5 |
|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| CFU.ml ⁻¹ | 6,28.10 ⁸ | 8,06.10 ⁸ | 1,91.10 ⁸ | 3,23.10 ⁸ |
| log CFU.ml ⁻¹ | 8,80 | 8,91 | 8,28 | 8,51 |



Obr. 14. Závislost CFU *Staphylococcus aureus* na koncentraci CA

Statistické zhodnocení:

Na hladině významnosti 5 % neexistují statisticky významné rozdíly. Tato metoda se ukázala jako nevyhovující. Nebyla pozorována prakticky žádná závislost přítomnosti celkového počtu mikroorganismů na koncentraci kyseliny kaprylové. Antimikrobiální účinek CA nebyl tímto testem prokázán.

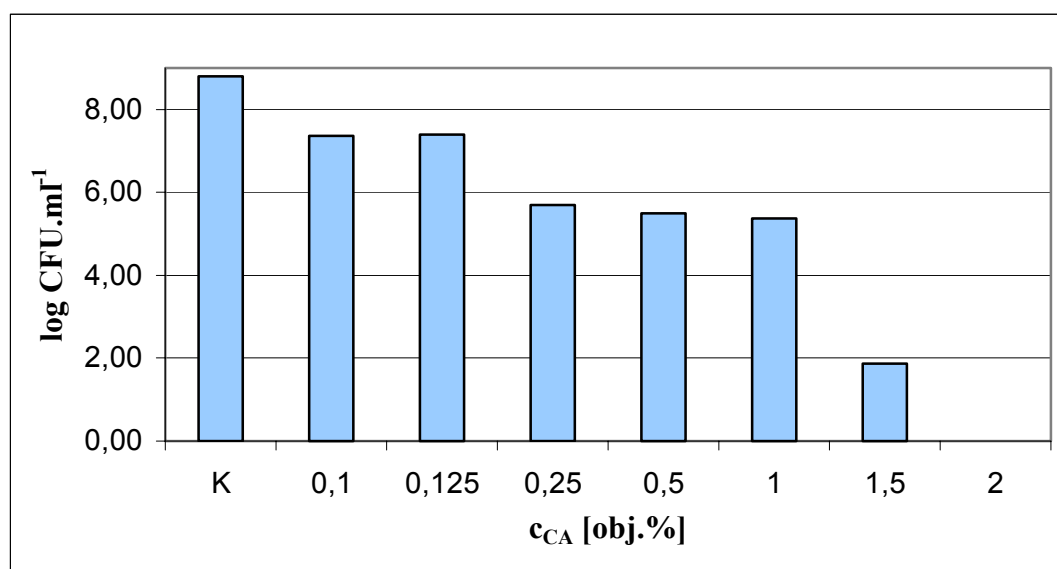
Co se týče měření pH bujónů, které obsahovaly kyselinu kaprylovou, bylo zjištěno, že přidavek této kyseliny sice snižuje pH bujónu, ale rozhodně ne na hodnotu, která by zabraňovala růstu bakterií. Tímto pokusem bylo vlastně ověřeno, že metoda aplikace kyseliny kaprylové „v bujónu“ je vhodná a poměrně spolehlivá.

11.8 Výsledky měření antibakteriálního účinku kyseliny kaprylové na *Serratia marcescens* metodou „v bujónu“

Tab. 36. Vyhodnocení CFU *Serratia marcescens* na půdě PCA

| | | | | | |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| c_{CA} [obj. %] | kontrolní vzorek | 0,1 | 0,125 | 0,25 | 0,5 |
| CFU.ml ⁻¹ | $6,37 \cdot 10^8$ | $2,30 \cdot 10^7$ | $2,46 \cdot 10^7$ | $5,00 \cdot 10^5$ | $3,18 \cdot 10^5$ |
| log CFU.ml ⁻¹ | 8,80 | 7,36 | 7,39 | 5,70 | 5,50 |

| | | | |
|--------------------------|-------------------|------|---|
| c_{CA} [obj. %] | 1 | 1,5 | 2 |
| CFU.ml ⁻¹ | $2,32 \cdot 10^5$ | 74 | 0 |
| log CFU.ml ⁻¹ | 5,37 | 1,87 | - |



Obr. 15. Závislost CFU *Serratia marcescens* na koncentraci CA

Statistické zhodnocení:

Tab. 37. Statistické vyhodnocení antibakteriálního

účinku CA na *S. marcescens* Kruskal-Wallisovým testem

| Výběry | Výběry | | | | | | | |
|---------|--------|-------|---------|--------|-------|-----|-------|-----|
| | K | 0,1 % | 0,125 % | 0,25 % | 0,5 % | 1 % | 1,5 % | 2 % |
| K | | | | | | | | |
| 0,1 % | S | | | | | | | |
| 0,125 % | S | S | | | | | | |
| 0,25 % | R | S | S | | | | | |
| 0,5 % | R | S | S | S | | | | |
| 1 % | R | S | S | S | S | | | |
| 1,5 % | R | R | R | S | S | S | | |
| 2 % | R | R | R | R | S | S | S | |

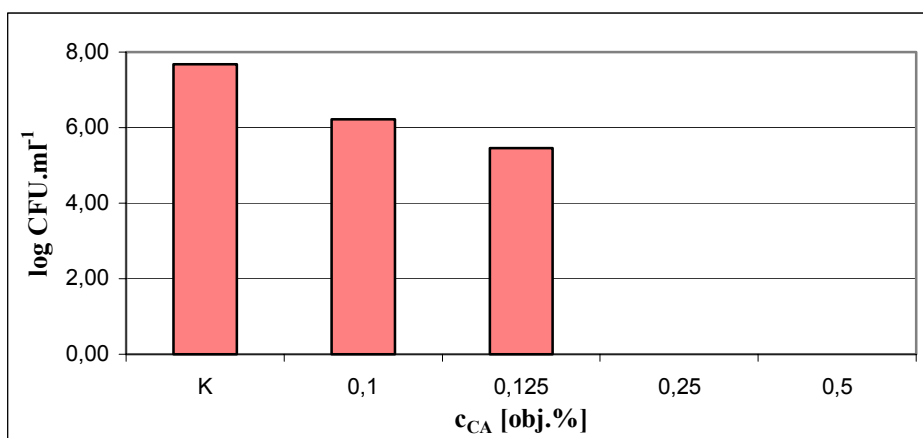
Statisticky nevýznamné jsou pouze rozdíly mezi kontrolním vzorkem a koncentracemi 0,1 obj.% CA a 0,125 obj.% CA. V ostatních případech kyselina kaprylová statisticky významně snižovala počty kolonií *Serratia marcescens*.

Byl pozorován inhibiční účinek kyseliny kaprylové na *Serratia marcescens*. Tato bakterie však jeví známky větší odolnosti vůči kyselině kaprylové, než je tomu v předchozích případech. Proto bylo provedeno měření i s vyššími koncentracemi kyseliny kaprylové, aby bylo možné zjistit, zda je tato kyselina schopná zcela omezit růst této bakterie. Bylo zjištěno, že úplná inhibice růstu nastává při 2 obj.% CA.

11.9 Výsledky měření antibakteriálního účinku kyseliny kaprylové na *Micrococcus luteus* metodou v „bujónu“

Tab. 38. Vyhodnocení CFU *Micrococcus luteus* na půdě PCA

| | | | | | |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|-----|
| c_{CA} [obj.%] | kontrolní vzorek | 0,1 | 0,125 | 0,25 | 0,5 |
| CFU.ml ⁻¹ | $4,68 \cdot 10^7$ | $1,69 \cdot 10^6$ | $2,83 \cdot 10^5$ | 0 | 0 |
| log CFU.ml ⁻¹ | 7,67 | 6,23 | 5,45 | - | - |

Obr. 16. Závislost CFU *Micrococcus luteus* na koncentraci CA**Statistické zhodnocení:**

Tab. 39. Statistické vyhodnocení antibakteriálního účinku CA na *M. luteus* Kruskal-Wallisovým testem

| Vyběry | Vyběry | | | | |
|---------|--------|-------|---------|--------|-------|
| | K | 0,1 % | 0,125 % | 0,25 % | 0,5 % |
| K | | | | | |
| 0,1 % | S | | | | |
| 0,125 % | R | S | | | |
| 0,25 % | R | R | S | | |
| 0,5 % | R | R | S | S | |

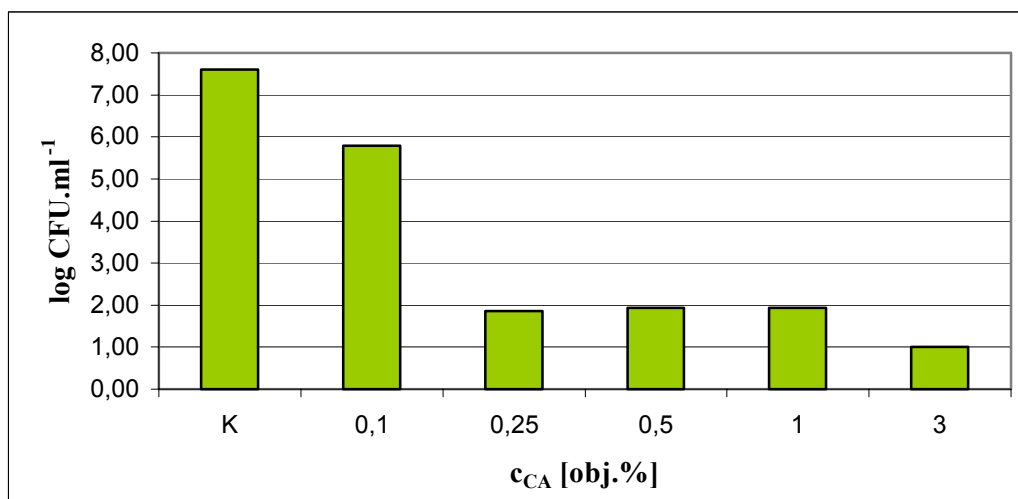
Na hladině významnosti 5 % existují mezi srovnávanými soubory statisticky významné rozdíly. Jmenovitě se jedná o rozdíl mezi kontrolním vzorkem a koncentrací 0,125 obj.%, kontrolním vzorkem a koncentrací 0,25 obj.% a kontrolním vzorkem a koncentrací 0,5 obj.% CA.

Měřením bylo prokázáno, že kyselina kaprylová má antibakteriální účinek i na testovaný kmen bakterie *Micrococcus luteus*. Úplná inhibice růstu této bakterie nastává při koncentraci 0,25 % CA, přičemž při koncentraci 0,125 % byl pokles počtu kolonií *Micrococcus luteus* snížen přibližně o dva řády.

11.10 Výsledky měření antibakteriálního účinku kyseliny kaprylové na *Bacillus cereus* metodou „v bujónu“

Tab. 40. Vyhodnocení CFU *Bacillus cereus* na půdě PCA

| c_{CA} [obj. %] | kontrolní vzorek | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 1 | 3 |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| CFU.ml ⁻¹ | $4,08 \cdot 10^7$ | $6,11 \cdot 10^5$ | $7,13 \cdot 10^1$ | $8,58 \cdot 10^1$ | $8,50 \cdot 10^1$ | $1,00 \cdot 10^1$ |
| log CFU.ml ⁻¹ | 7,61 | 5,79 | 1,85 | 1,93 | 1,93 | 1,00 |



Obr. 17. Závislost CFU *Bacillus cereus* na koncentraci CA

Statistické zhodnocení:

Tab. 41. Statistické vyhodnocení antibakteriálního účinku CA na *B. cereus* Kruskal-Wallisovým testem

| Výběry | Výběry | | | | | |
|--------|--------|-------|--------|-------|-----|-----|
| | K | 0,1 % | 0,25 % | 0,5 % | 1 % | 3 % |
| K | | | | | | |
| 0,1 % | S | | | | | |
| 0,25 % | R | S | | | | |
| 0,5 % | R | S | S | | | |
| 1 % | R | S | S | S | | |
| 3 % | R | R | S | S | S | |

Statisticky významný úbytek bakterií *Bacillus cereus* byl vyhodnocen u všech použitých koncentrací s výjimkou 0,1 obj.% CA.

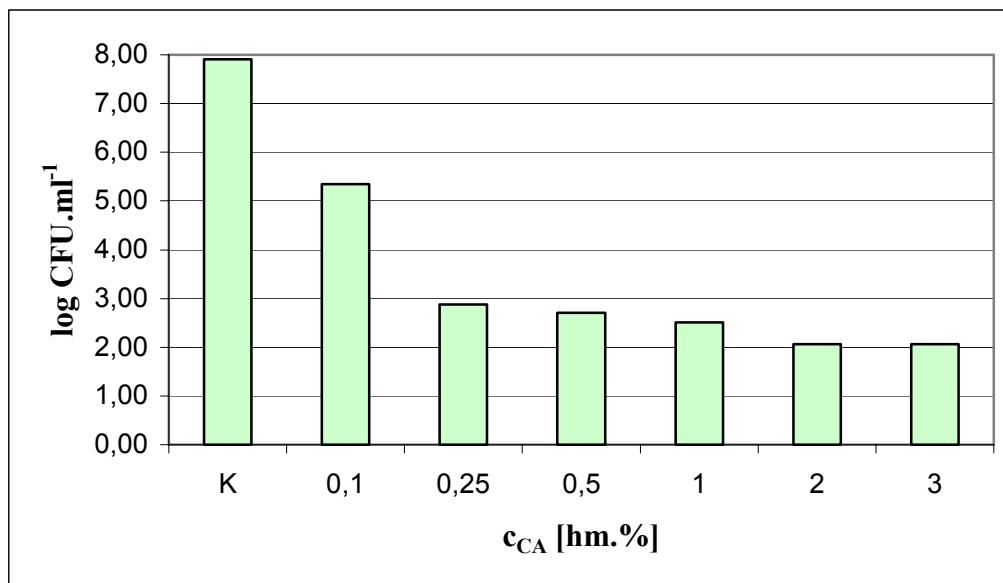
Výsledky ukazují, že inhibiční účinek CA na *Bacillus cereus* není možno zcela prokázat. Při koncentraci 0,25 % CA v bujónu nastal pokles v počtu kolonií o šest řádů. Bohužel, při aplikaci vyšších koncentrací CA již nenastal další inhibiční ani antibakteriální efekt ze strany kyseliny kaprylové. Až aplikací 3 % CA nastal nepatrný pokles počtu kolonií o necelý řád.

11.11 Výsledky měření antibakteriálního účinku kyseliny kaprylové na *Bacillus subtilis* metodou „v bujónu“

Tab. 42. Vyhodnocení CFU *Bacillus subtilis* na půdě PCA

| c_{CA} [obj.%] | kontrolní vzorek | 0,1 | 0,25 | 0,5 |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| CFU.ml ⁻¹ | $8,12 \cdot 10^7$ | $2,20 \cdot 10^5$ | $7,46 \cdot 10^2$ | $5,15 \cdot 10^2$ |
| log CFU.ml ⁻¹ | 7,91 | 5,34 | 2,87 | 2,71 |

| c_{CA} [obj.%] | 1 | 2 | 3 |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| CFU.ml ⁻¹ | $3,22 \cdot 10^2$ | $1,15 \cdot 10^2$ | $1,15 \cdot 10^2$ |
| log CFU.ml ⁻¹ | 2,51 | 2,06 | 2,06 |

Obr. 18. Závislost CFU *Bacillus subtilis* na koncentraci CA**Statistické zhodnocení:**

Tab. 43. Statistické vyhodnocení antibakteriálního

účinku CA na *B. subtilis* Kruskal-Wallisovým testem

| Výběry | Výběry | | | | | | |
|--------|--------|------|-------|------|----|----|----|
| | K | 0,1% | 0,25% | 0,5% | 1% | 2% | 3% |
| K | | | | | | | |
| 0,1 % | S | | | | | | |
| 0,25 % | S | S | | | | | |
| 0,5 % | S | S | S | | | | |
| 1 % | R | S | S | S | | | |
| 2 % | R | R | S | S | S | | |
| 3 % | R | R | S | S | S | S | |

Statisticky významný rozdíl existuje mezi kontrolním vzorkem a koncentracemi 1, 2 a 3 obj.% CA. Statistické zhodnocení bylo provedeno, stejně jako ve všech předchozích případech, Kruskal –Wallisovým testem, srovnáním dvojic pro $\alpha = 0,05$ pro stejné rozsahy výběrů s maximálně 25 porovnáními v jednom výběru pro počet výběrů menších než 11.

Podobně jako v případě bakterie *Bacillus cereus* není možno inhibiční účinek CA zcela prokázat. Při koncentraci kyseliny kaprylové 0,25 % nastal pokles v počtu kolonií o více než polovinu. Od této koncentrace je však možno pozorovat už jen velmi mírný pokles v počtu bakterií *Bacillus subtilis*. Úplný inhibiční efekt kyseliny kaprylové na tuto bakterii tedy nebyl tímto testem prokázán.

11.12 Vyhodnocení ENTERO- a STAPHY- testů

Test č. 1: *Escherichia coli*

| | | H | | G | | F | | E | | D | | C | | B | | A |
|---|--------------|---|---------------|-----|--------------|---|--------------|---|--------------|---|--------------|-----|-------------|---|-------------|---|
| 1 | I N1 D | + | H 2 1 S | - | L Y1 S | + | O R1 N | + | U R1 E | - | A R1 G | +/- | S C I | - | M A L | - |
| 2 | P H2 E | - | O N2 P | +/- | I N2 O | - | A D2 O | - | C E2 L | - | S U2 C | + | T R E | + | M A N | + |
| 3 | V P4 T | - | E S4 L | - | S O4 R | + | R H4 A | + | M L4 B | + | R A4 F | - | D U L | - | G L U | + |

Identifikačním programem TNW Lite 6.5. bylo potvrzeno, že se jedná o bakterii *Escherichia coli*.

Test č. 2: *Serratia marcescens*

| | | H | | G | | F | | E | | D | | C | | B | | A |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|---|-----|
| 1 | I | - | H | - | L | + | O | + | U | - | A | +/- | S | + | M | +/- |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|----|---|-----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|---|---|---|---|
| | N1 | | 2 1 | | Y1 | | R1 | | R1 | | R1 | | C | | A | |
| | D | | S | | S | | N | | E | | G | | I | | L | |
| 2 | P | - | O | + | I | + | A | + | C | - | S | + | T | + | M | + |
| | H2 | | N2 | | N2 | | D2 | | E2 | | U2 | | R | | A | |
| | E | | P | | O | | O | | L | | C | | E | | N | |
| 3 | V | - | E | + | S | + | R | - | M | - | R | - | D | - | G | + |
| | P4 | | S4 | | O4 | | H4 | | L4 | | A4 | | U | | L | |
| | T | | L | | R | | A | | B | | F | | L | | U | |

Identifikačním programem TNW Lite 6.5. bylo potvrzeno, že se jedná o bakterii *Serratia marcescens*.

Test č. 3: *Salmonella typhimurium*

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|----|---|-----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|---|---|---|---|
| | | H | | G | | F | | E | | D | | C | | B | | A |
| 1 | I | - | H | - | L | + | O | + | U | - | A | - | S | + | M | - |
| | N1 | | 2 1 | | Y1 | | R1 | | R1 | | R1 | | C | | A | |
| | D | | S | | S | | N | | E | | G | | I | | L | |
| 2 | P | - | O | - | I | - | A | - | C | - | S | - | T | + | M | + |
| | H2 | | N2 | | N2 | | D2 | | E2 | | U2 | | R | | A | |
| | E | | P | | O | | O | | L | | C | | E | | N | |
| 3 | V | - | E | - | S | + | R | - | M | + | R | - | D | - | G | + |
| | P4 | | S4 | | O4 | | H4 | | L4 | | A4 | | U | | L | |
| | T | | L | | R | | A | | B | | F | | L | | U | |

Identifikačním programem TNW Lite 6.5. bylo potvrzeno, že se jedná o rod *Salmonella*.

Test č. 4: *Staphylococcus aureus*

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | H | G | F | E | D | C | B | A | H | G | F | E | D | C | B | A |
| VPT | URE | ARG | ORN | bGA | GLR | ESL | NIT | PHS | GAL | SUC | TRE | MAN | XYL | MLT | MNS | LAC |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 |
| | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + |

Identifikačním programem TNW Lite 6.5. bylo potvrzeno, že se jedná o bakterii *Staphylococcus aureus*.

Test č. 5: *Micrococcus luteus*

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | H | G | F | E | D | C | B | A | H | G | F | E | D | C | B | A |
| VPT | URE | ARG | ORN | bGA | GLR | ESL | NIT | PHS | GAL | SUC | TRE | MAN | XYL | MLT | MNS | LAC |
| 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 |
| | + | + | - | - | - | - | + | - | +/- | + | + | + | - | + | + | +/- |

Identifikačním programem TNW Lite 6.5. bylo potvrzeno, že se jedná o rod *Micrococcus*.

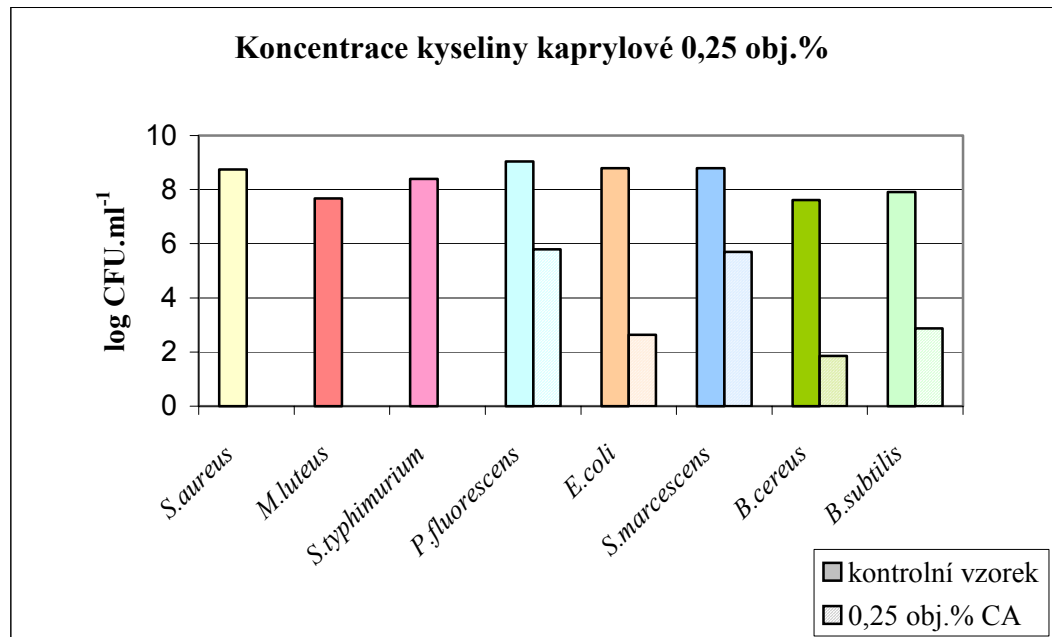
11.13 Celkové shrnutí účinku kyseliny kaprylové na sledované kmeny bakterií

Tab. 44. Srovnání antibakteriálního účinku kyseliny kaprylové na jednotlivé kmeny bakterií

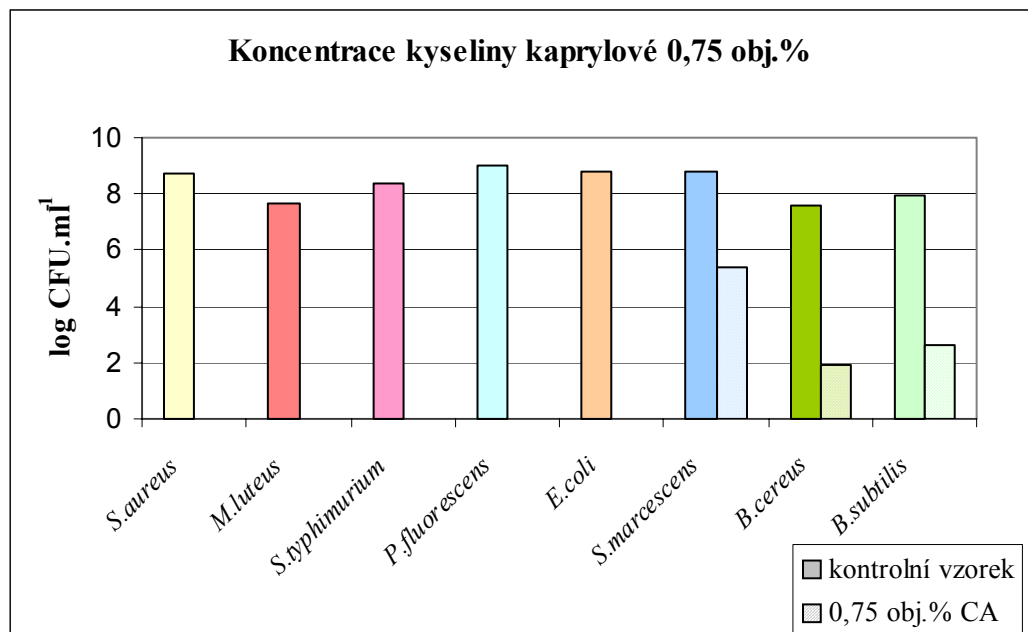
| | | | |
|----------|----------|-------------------|-------------------------|
| Bakterie | Gram +/- | Koncentrace (v/w) | Pořadí od nejcitlivější |
|----------|----------|-------------------|-------------------------|

| | | při které nastala celková inhibice | (1.) po nejodolnější (5) bakterii vůči CA |
|--------------------------------|---|------------------------------------|---|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | + | 0,25 % | 1 |
| <i>Micrococcus luteus</i> | + | 0,25 % | 1 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | - | 0,25 % | 1 (neprůkazné výsledky) |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | - | 0,5 % | 2 |
| <i>Escherichia coli</i> | - | 0,75 % | 3 |
| <i>Serratia marcescens</i> | - | 2 % | 4 |
| <i>Bacillus cereus</i> | + | > 3 % | 5 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | + | > 3 % | 5 |

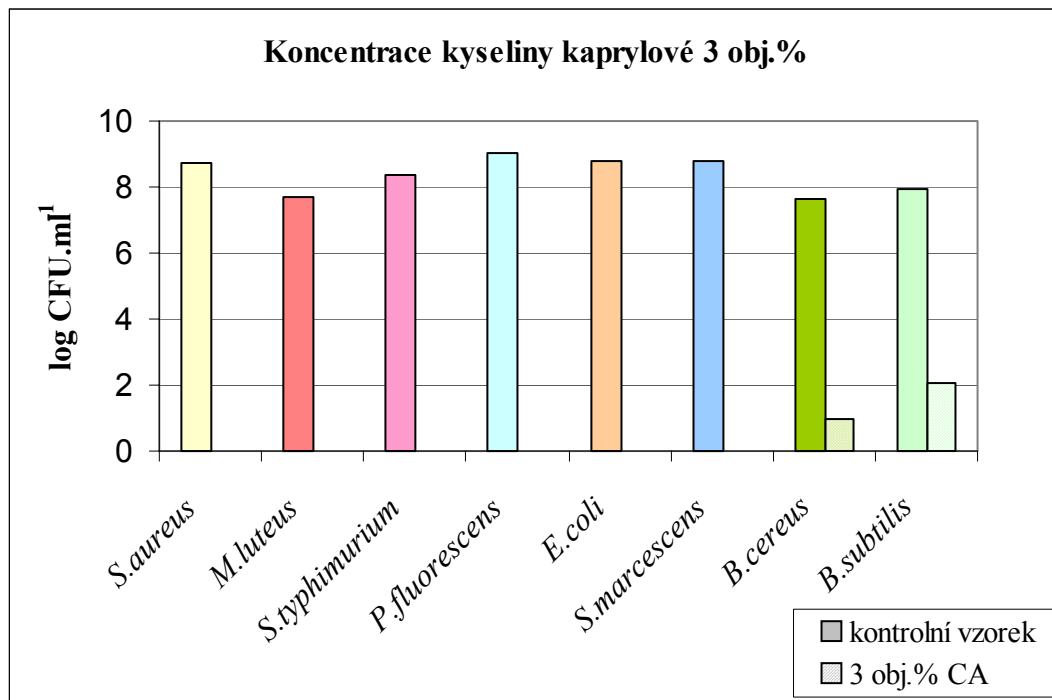
Z celkového pohledu na antibakteriálního účinku kyseliny kaprylové nelze na základě dosažených výsledků konstatovat, že by existoval rozdíl mezi skupinou gramnegativních a grampozitivních bakterií. Jak je uvedeno v souhrnné tabulce (Tab. 44.), nejcitlivější vůči kyselině kaprylové je *Staphylococcus aureus*, nejvíce odolné jsou pravděpodobně bakterie z rodu *Bacillus*. Pro názornější představu byly sestaveny grafy pro vybrané koncentrace kyseliny kaprylové, porovnávající antibakteriální účinek této kyseliny mezi jednotlivými kmeny bakterií.



Obr. 19. Srovnání růstu jednotlivých bakterií s přidavkem kyseliny kaprylové o koncentraci 0,25 %



Obr. 20. Srovnání růstu jednotlivých bakterií s přidavkem kyseliny kaprylové o koncentraci 0,75 obj. %



Obr. 21. Srovnání růstu jednotlivých bakterií s přidavkem kyseliny kaprylové o koncentraci 3 obj.%

Celková inhibice, resp. nulový počet kolonií testovaného bakteriálního kmene byl pozorován u *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* a *Micrococcus luteus* při koncentraci $c_{CA} = 0,25$ obj.%. U bakterie *Pseudomonas fluorescens* bylo nutno zvýšit c_{CA} na 0,5 obj.%, aby bylo dosaženo celkové inhibice růstu této bakterie. Obdobně u *Escherichia coli* to byla koncentrace $c_{CA} = 0,75$ obj.% a u *Serratia marcescens* c_{CA} rovna 2 %. U kmene *Bacillus* (*B. cereus*, *B. subtilis*) nebyl pozorován inhibiční účinek. Byl pouze stanoven statisticky významný úbytek v počtu bakterií v porovnání s kontrolou.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo sledovat účinek kyseliny kaprylové na vybrané kmeny bakterií. V celé práci byly vlastně uplatněny dva různé postupy aplikace kyseliny kaprylové. První metodou byla metoda „roztěrem na půdu“. Tento postup byl proveden s bakteriemi *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium*. Byl učiněn závěr, že přímou aplikací kyseliny kaprylové na povrch půd nedochází k dobré difúzi kyseliny do živného media a tudíž metoda „roztěrem na půdu“ není v tomto směru vhodná.

Statisticky průkaznější výsledky poskytla metoda „v bujónu“. Tato metoda byla použita u všech sledovaných bakterií. Co se týče měření pH bujónů, které obsahovaly kyselinu kaprylovou, bylo zjištěno, že přídavek této kyseliny sice snižuje pH bujónu, ale rozhodně ne na hodnotu, která by zabraňovala růstu bakterií. Tímto pokusem bylo vlastně ověřeno, že metoda aplikace kyseliny kaprylové „v bujónu“ je vhodná a poměrně spolehlivá.

Z celkového pohledu na antibakteriální účinek kyseliny kaprylové nelze říci, že by existoval rozdíl mezi skupinou gramnegativních a grampozitivních bakterií. Ani v jednom z případů také nebylo potvrzeno, že by kyselina kaprylová neměla žádný účinek, ať už v tom pozitivním nebo negativním smyslu na některou z bakterií, a už vůbec nebylo zjištěno, že by byla pro některou z bakterií růstovým faktorem.

Nejcitlivější vůči kyselině kaprylové je *Staphylococcus aureus* a *Micrococcus luteus*, nejvíce odolné jsou dle provedených testů bakterie z rodu *Bacillus*. Celková inhibice, resp. nulový počet kolonií bakterií, byl u *Staphylococcus aureus* zjištěn po aplikaci 0,25 % kyseliny kaprylové, stejně jako u *Salmonella typhimurium* a *Micrococcus luteus*. U *Pseudomonas fluorescens* byla tato hodnota rovna 0,5 %, u *Escherichia coli* 0,75 % a u *Serratia marcescens* 2 %. V případě bacilů nebyla stanovena koncentrace, při které dochází k totální inhibici. Byl stanoven pouze statisticky významný úbytek v počtu bakterií po aplikaci 3 % (v/w) kyseliny kaprylové v porovnání s kontrolou.

Ke zjištěnému antibakteriálnímu účinku kyseliny kaprylové na salmonely je nutné připojit poznámku, že byl použit laboratorně oslabený kmen *Salmonella typhimurium*, který není tak odolný, jako volně se vyskytující kmeny. Z důvodů nedostatečných laboratorních podmínek nemohl být pro laboratorní experiment použit patogenní kmen salmonel.

Onemocnění z potravin způsobená různými patogeny jsou celosvětovým zdravotním problémem. Je zapotřebí hledat různé způsoby antimikrobiálního ošetření. Antimikrobiální

látky lze přitom použít pouze jako součást celkové strategie kontroly patogenů v rámci kompletního výrobního řetězce, nikoli jako náhradu správné hygienické praxe.

Výzkumem provedeným v rámci této práce bylo zjištěno, že kyselina kaprylová vykazuje zmíněné antibakteriální účinky a mohla by být používána přímo na některé druhy potravin. Nevýhodou je organoleptická charakteristika, projevující se mírným typickým zápachem. Praktickému použití tedy musí předcházet ještě sensorické testy, které by zhodnotily vnímání účinných koncentrací této kyseliny v konkrétní potravíně.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) Bakterie. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. 2005, říjen [6. prosince 2005]. Dostupné na WWW: <<http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/mi-eth.txt>>.
- (2) BŘEZINA, Pavel; KOMÁR, Aleš; HRABĚ, Jan. *Technologie, zbožíznalství a hygiena potravin, II. část*. Vyškov : VVŠ PV, 2001. 177 s. ISBN 80-7231-079-8.
- (3) Centrifuged coconut oil. *Wilderness Family Naturals* [online]. 2005 [cit. 20.2.2006]. Dostupné na WWW: <http://www.wildernessfamilynaturals.com/virgin_coconut_oil_centrifuged.htm>
- (4) Čaderský – Envitek, spol. s r.o. *HiMedia* [online]. 2001, [cit. 13. října 2005]. Dostupné na WWW: <<http://www.himedia.cz/>>.
- (5) DAVÍDEK, J. aj. *Chemie potravin*. J. 1. vyd. Praha : SNTL/ALFA, 1983. 632 s. ISBN 04-815-83.
- (6) DOBIÁŠ, Lubomír aj. *Vybrané kapitoly z mikrobiologie*. Ostrava : Ostravská univerzita v Ostravě, 1999. 297 s. ISBN 80-7042-776-0.
- (7) FEHLHABER, K. Alimentární salmonelóza – není lehké zvítězit. *Fleischwirtschaft*. 2001, leden [cit. 7. října 2005]. Dostupné na WWW: <<http://www.vetnet.cz/aktuality/aktuality.htm>>.
- (8) *Food Safety : Report of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on benefits and limitations of antimicrobial treatments for poultry carcasses* [online]. Brusel : Food Safety, 30. října 1998 [cit. 4. února 2006]. Dostupné na WWW: <http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out14_en.html>.
- (9) GRANUM, P. E.; TOMAS, J. M.; ALOUF, J. E. A survey of bacterial toxins involved in food poisoning: a suggestion for bacterial food poisoning toxin nomenclature. *International Journal of Food Microbiology*, 1993, vol. 28, s. 129-144.

- (10) *Greatvista Chemicals* [online]. 2005 [cit. 12. listopadu 2005]. Dostupné na WWW:
<http://www.greatvistachemicals.com/surfactants_and_oleochemicals/caprylic_capric_triglyceride.html>.
- (11) GROSSMANN, Miroslav. *Mikrobiologie v hygieně*. 1. vyd. Vyškov : VVŠ PV, 1999. 175 s. ISBN 80-7231-037-2.
- (12) HALPIN-DOHNALEK, M. I.; MARTH, E. H. Production of extracellular compounds and behaviour in foods. *Journal Food Protect.* 1989, vol. 52, s. 267-282.
- (13) HINTON, Arthur; INGRAM, Kimberly. Use of oleic acid to reduce the population of the bacterial flora of poultry skin. *Journal of Food Protection*, 2000, vol 63, no. 9, s. 1282-1286.
- (14) HOZA, Ignác; KRAMÁŘOVÁ, Daniela. *Potravinářská biochemie*. 1. vyd. Zlín : UTB ve Zlíně, 2005. 168 s. ISBN 80-7318-295-5.
- (15) *Hudong* [online]. 2005 [cit. 12. listopadu 2005]. Dostupné na WWW:
<<http://www.hudongha.com/products/ODO.htm>>.
- (16) *Jarchem industries* [online]. 2005 [cit. 12. listopadu 2005]. Dostupné na WWW: <www.jarchem.com>.
- (17) JUNGBAUEROVÁ, Ludmila. *Úvod do mikrobiologie*. Praha : Karolinum - nakladatelství Univerzity Karlovy, 1998. 87 s. ISBN 382-233-97.
- (18) Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology. *Escherichia coli jako patogen*. *Vetnet* [online]. 1997 [cit. 7. října 2005]. Dostupné na WWW: <<http://www.vetnet.cz/aktuality/aktuality.htm>>.
- (19) KRAMÁŘ, Radim. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 2004, únor [cit. 22. října 2005]. Dostupné na WWW:
<<http://www.cbox.cz/radim.kramar/enterobacteriaceae.htm>>.
- (20) MAHADEO, M. The potential use of nisin to control *Listeria monocytogenes* in poultry. *Letters in applied microbiology*, 1994, s. 323-326.

- (21) MAROUNEK, M.; SKŘIVANOVÁ, E.; RADA, V. Susceptibility of *Escherichia coli* to C₂-C₁₈ Fatty Acids. *Folia Microbiol*, 2003, vol. 48, no.6, s. 731-735.
- (22) MOHAN NAIR, M. K.; JOY, J.; VENKITANARAYANAN, K. S. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula by monocaprylin. *Journal of food protection*, 2004, vol. 67, s. 2815-2819.
- (23) NAIR, M. K. M. et al. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *Journal Dairy Science*, 2005, vol. 88, s. 3488-3495.
- (24) NAIR, M. K. M.; VASUDEVAN, Pradeep; HOAGLAND, Thomas. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in milk by caprylic acid and monocaprylin. *Food microbiology*, 2004, vol. 21, s. 611-616.
- (25) PAEZ, CAMACHO B. et al. Production of structured triglycerides rich in n-3 polyunsaturated fatty acids by the acidolysis of cod liver oil and caprylic acid in a packed-bed reactor: equilibrium and kinetics. *Chemical Engineering Science*, 2002, vol. 57, s. 1237-1249.
- (26) Palm Kernel Oil. *OilsbyNature* [online]. 2006 [cit. 25.2.2006]. Dostupné na WWW:<<http://www.oilsbynature.com/products/palm-kernel-oil-non-hydrogenated-refined.htm>>.
- (27) POKORNÝ, Jan; DUBSKÁ, Ludmila. *Technologie tuků*. Praha : SNTL, 1986. 452 s.
- (28) RŮŽIČKA, Jan, aj. Antimicrobial effects of 1-monoacylglycerols prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids. *Eur Food Res Technol*, 2003, vol. 217, s. 329-331.
- (29) SANCHEZ, O. J. et al. Wet air oxidation of long-chain carboxylic acids. *Chemical Engineering Journal*, 2004, vol. 100, s. 43-50.
- (30) *Serratia marcescens*. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně. 2005, červen [22. října 2005]. Dostupné na WWW:<<http://elanor.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/serr.htm>>.

- (31) SIMEONOVÁ, Jana aj. *Technologie drůbeže, vajec a minoritních živočišných produktů*. 1. vyd. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 1999. 247 s. ISBN 80-7157-405-8.
- (32) SINHAMAHAPATRA, M.; BISWAS, S.; DAS, A. K. Comparative study of different surface decontaminants on chicken quality. *British Poultry Science*, 2004, vol. 45, no.5, s. 624-650.
- (33) SKŘIVANOVÁ, V.; MAROUNEK, M. Effects of caprylic acid on performance nad mortality of growing rabbits. *Acta vet, Brno*, 2002, vol. 71, s. 435-439.
- (34) STIEBING, A. Přežívání EHEC v průběhu zrání fermentovaných salámů. *Fleischwirtschaft*. 1999 [cit. 7. října 2005]. Dostupné na WWW: <<http://www.vetnet.cz/aktuality/aktuality.htm>>.
- (35) ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře*. Praha : SNTL, 1983. 304 s. ISBN 04-824-83.
- (36) ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologické zkoumání potravin*. 1. vyd. Praha : VŠCHT v Čs. redakci VN MON, 1987. 104 s.
- (37) ŠNICKR, J., aj. National programme of Salmonella infection control in pigs herds in the Slovak republic. *International Scientific conference Food Safety and Quality in Transition Countries*. Nitra. 24 –27 března, 2003.
- (38) THIRUNAVUKKARASU-ANNAMALAI, et al. In vitro inactivation of Escherichia coli O157:H7 in bovine rumen fluid by caprylic acid. *Journal of Food Protection*, 2004, vol. 67, s. 884-888.
- (39) TORPDAHL, Mia et al. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. 2005
- (40) University of Wisconsin, Department of Bacteriology. Mechanismy patogenicity bakterií. *Vetnet* [online]. 1998 [cit. 28. října 2005]. Dostupné na WWW: <<http://www.vetnet.cz/aktuality/aktuality.htm>>.

-
- (41) VASUDEVAN, P. et al. In vitro inactivation of *Salmonella enteritidis* in chicken cecal contents by caprylic acid. *Food Microbiology*, 2005.
- (42) Vyhláška 13/2004 Sb., o podmínkách ozařování potravin a surovin o nejvyšší přípustné dávce záření a o způsobu označení ozáření na obalu.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|----------|--|
| AFLP | Polymorfizmus zesílené délky fragmentů |
| CA | Kyselina kaprylová |
| c_{CA} | Koncentrace kyseliny kaprylové |
| CFU | Colonia forming units (kolonie tvořící jednotky) |
| EA | Endo Agar |
| FDA | Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léků) |
| GRAS | Generally recognized as safe |
| HACCP | Hazard Analysis Critical Control Points (Analýza nebezpečí a systém kritických kontrolních bodů) |
| MLST | Multilokální sekvenční typizace |
| MSA | Mannitol Salt Agar |
| NPD | Nejvyšší přípustná dávka (ionizujícího záření) |
| PCA | Plate Count Agar |
| PFGE | Pulzní gelová elektroforéza |
| PUFA | Polynenasycené mastné kyseliny |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| <i>Obr. 1. Biomembrána</i> | 24 |
| <i>Obr. 2. Plod palmy olejně</i> | 32 |
| <i>Obr. 3. Závislost log CFU Escherichia coli na koncentraci CA</i> | 58 |
| <i>Obr. 4. Závislost CFU Escherichia coli na koncentraci CA</i> | 60 |
| <i>Obr. 5. Závislost CFU Escherichia coli na koncentraci CA</i> | 61 |
| <i>Obr. 6. Závislost CFU Escherichia coli na koncentraci CA</i> | 62 |
| <i>Obr. 7. Závislost CFU Salmonella typhimurium na koncentraci CA</i> | 63 |
| <i>Obr. 8. Závislost CFU Salmonella typhimurium na koncentraci CA</i> | 64 |
| <i>Obr. 9. Závislost CFU Salmonella typhimurium na koncentraci CA</i> | 65 |
| <i>Obr. 10. Závislost CFU Salmonella typhimurium na koncentraci CA</i> | 67 |
| <i>Obr. 11. Závislost CFU Pseudomonas fluorescens na koncentraci CA</i> | 68 |
| <i>Obr. 12. Závislost CFU Staphylococcus aureus na koncentraci CA</i> | 70 |
| <i>Obr. 13. Závislost CFU Staphylococcus aureus na koncentraci CA</i> | 71 |
| <i>Obr. 14. Závislost CFU Staphylococcus aureus na koncentraci CA</i> | 73 |
| <i>Obr. 15. Závislost CFU Serratia marcescens na koncentraci CA</i> | 74 |
| <i>Obr. 16. Závislost CFU Micrococcus luteus na koncentraci CA</i> | 76 |
| <i>Obr. 17. Závislost CFU Bacillus cereus na koncentraci CA</i> | 77 |
| <i>Obr. 18. Závislost CFU Bacillus subtilis na koncentraci CA</i> | 79 |
| <i>Obr. 19. Srovnání růstu jednotlivých bakterií s přidavkem kyseliny kaprylové</i> | 84 |
| <i>Obr. 20. Srovnání růstu jednotlivých bakterií s přidavkem kyseliny kaprylové o koncentraci 0,75 obj. %</i> | 84 |
| <i>Obr. 21. Srovnání růstu jednotlivých bakterií s přidavkem kyseliny kaprylové o koncentraci 3 obj.%</i> | 85 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|---|----|
| <i>Tab. 1. Výskyt salmonel v potravinách</i> | 19 |
| <i>Tab. 2. Nasycené mastné kyseliny jedlých tuků</i> | 25 |
| <i>Tab. 3. Složení mastných kyselin některých důležitých tuhých tuků</i> | 27 |
| <i>Tab. 4. Složení kokosového oleje</i> | 32 |
| <i>Tab. 5. Složení palmojadrového oleje</i> | 32 |
| <i>Tab. 6. Průměrný obsah jednotlivých živin v 1 litru kravského mléka</i> | 33 |
| <i>Tab. 7. Některé příklady používaných antimikrobiálních látek</i> | 36 |
| <i>Tab. 8. Složení Endo Agarů</i> | 47 |
| <i>Tab. 9. Složení Mannitol Salt Agarů</i> | 47 |
| <i>Tab. 10. Složení Mueller Hinton Agarů</i> | 48 |
| <i>Tab. 11. Složení Plate Count Agarů</i> | 48 |
| <i>Tab. 12. Složení pomnožovacího bujónu</i> | 49 |
| <i>Tab. 13. Složení masopeptonového agarů</i> | 49 |
| <i>Tab. 14. Vyhodnocení CFU E. coli na půdě PCA</i> | 58 |
| <i>Tab. 15. Statistické vyhodnocení antibakteriálního účinku CA na E. coli Kruskal-Wallisovým testem</i> | 59 |
| <i>Tab. 16. Vyhodnocení CFU E. coli na půdě Endo Agarů</i> | 59 |
| <i>Tab. 17. Vyhodnocení CFU Escherichia coli na půdě PCA</i> | 60 |
| <i>Tab. 18. Statistické vyhodnocení antibakteriálního účinku CA na E. coli Kruskal-Wallisovým testem</i> | 61 |
| <i>Tab. 19. Vyhodnocení CFU Escherichia coli na půdě Endo Agarů</i> | 61 |
| <i>Tab. 20. Statistické vyhodnocení antibakteriálního účinku CA na E. coli Kruskal-Wallisovým testem</i> | 62 |
| <i>Tab. 21. Vyhodnocení CFU Salmonella typhimurium na půdě PCA</i> | 63 |
| <i>Tab. 22. Vyhodnocení CFU Salmonella typhimurium na půdě EA</i> | 64 |
| <i>Tab. 23. Statistické vyhodnocení antibakteriálního účinku CA na S. typhimurium Kruskal-Wallisovým testem</i> | 64 |
| <i>Tab. 24. Vyhodnocení CFU Salmonella typhimurium na půdě PCA</i> | 65 |
| <i>Tab. 25. Statistické vyhodnocení antibakteriálního účinku CA na S. typhimurium Kruskal-Wallisovým testem</i> | 66 |
| <i>Tab. 26. Vyhodnocení CFU Salmonella typhimurium na půdě EA</i> | 66 |

| | |
|---|----|
| Tab. 27. Statistické vyhodnocení antibakteriálního účinku CA na <i>S. typhimurium</i> Kruskal-Wallisovým testem | 67 |
| Tab. 28. Vyhodnocení CFU <i>Pseudomonas fluorescens</i> na půdě PCA..... | 68 |
| Tab. 29. Statistické vyhodnocení antibakteriálního CA na <i>P. fluorescens</i> Kruskal-Wallisovým testem | 69 |
| Tab. 30. Vyhodnocení CFU <i>Staphylococcus aureus</i> na půdě PCA | 69 |
| Tab. 31. Statistické vyhodnocení antibakteriálního CA na <i>S. aureus</i> Kruskal-Wallisovým testem | 70 |
| Tab. 32. Vyhodnocení CFU <i>Staphylococcus aureus</i> na půdě MSA | 70 |
| Tab. 33. Statistické vyhodnocení antibakteriálního CA na <i>S. aureus</i> Kruskal-Wallisovým testem | 71 |
| Tab. 34. Měření pH bujónů s obsahem kyseliny kaprylové | 72 |
| Tab. 35. Vyhodnocení CFU <i>Staphylococcus aureus</i> na půdě PCA | 72 |
| Tab. 36. Vyhodnocení CFU <i>Serratia marcescens</i> na půdě PCA | 73 |
| Tab. 37. Statistické vyhodnocení antibakteriálního CA na <i>S. marcescens</i> Kruskal-Wallisovým testem | 74 |
| Tab. 38. Vyhodnocení CFU <i>Micrococcus luteus</i> na půdě PCA..... | 75 |
| Tab. 39. Statistické vyhodnocení antibakteriálního CA na <i>M. luteus</i> Kruskal-Wallisovým testem | 76 |
| Tab. 40. Vyhodnocení CFU <i>Bacillus cereus</i> na půdě PCA | 77 |
| Tab. 41. Statistické vyhodnocení antibakteriálního CA na <i>B. cereus</i> Kruskal-Wallisovým testem | 77 |
| Tab. 42. Vyhodnocení CFU <i>Bacillus subtilis</i> na půdě PCA | 78 |
| Tab. 43. Statistické vyhodnocení antibakteriálního CA na <i>B. subtilis</i> Kruskal-Wallisovým testem | 79 |
| Tab. 44. Srovnání antibakteriálního účinku kyseliny kaprylové na jednotlivé kmeny bakterií | 82 |

SEZNAM PŘÍLOH

- P I Fotografická dokumentace naměřených výsledků antibakteriálního účinku kyseliny kaprylové na vybrané kmeny bakterií

**PŘÍLOHA P I: FOTOGRAFICKÁ DOKUMENTACE
ANTIBAKTERIÁLNÍHO ÚČINKU KYSELINY KAPRYLOVÉ NA
VYBRANÉ KMENY BAKTERIÍ**

Escherichia coli – metoda roztěrem na půdu PCA



kontrola, ředění 10^{-6}

vzorek 1,5 % CA, ředění 10^{-5}

vzorek 2,5 % CA, ředění 10^{-5}

Escherichia coli – metoda roztěrem na půdu EA



kontrola, ředění 10^{-6}

vzorek 1,5 % CA, ředění 10^{-5}

vzorek 2,5 % CA, ředění 10^{-5}

Escherichia coli – metoda „v bujónu“, kultivace na půdě PCA



kontrola, ředění 10^{-6}

vzorek 0,5 % CA, ředění 10^0

vzorek 1 %, ředění 10^0

Escherichia coli – metoda „v bujónu“, kultivace na půdě EA



kontrola, ředění 10^{-6} vzorek 0,5 % CA, ředění 10^0 vzorek 1 %, ředění 10^0

Salmonella typhimurium – metoda „v bujónu“, kultivace na půdě PCA



kontrola, ředění 10^{-5} vzorek 0,1 % CA, ředění 10^{-4} vzorek 0,25 %, ředění 10^0

Salmonella typhimurium – metoda „v bujónu“, kultivace na půdě EA



kontrola, ředění 10^{-5} vzorek 0,1 % CA, ředění 10^{-4} vzorek 0,25 %, ředění 10^0

Serratia marcescens – metoda „v bujónu“, kultivace na půdě PCA



kontrola, ředění 10^{-4}

vzorek 0,1 % CA, ředění 10^{-4}

vzorek 0,5 %, ředění 10^{-3}

Staphylococcus aureus - metoda „v bujónu“, kultivace na půdě PCA



kontrola, ředění 10^{-5}

vzorek 0,125 % CA, ředění 10^{-5}

vzorek 0,25 %, ředění 10^0

Staphylococcus aureus - metoda „v bujónu“, kultivace na půdě MSA



kontrola, ředění 10^{-6}

vzorek 0,1 % CA, ředění 10^{-6}

vzorek 0,25 %, ředění 10^0

Pseudomonas fluorescens - metoda „v bujónu“, kultivace na půdě PCA



kontrola, ředění 10^{-6}

vzorek 0,25 % CA, ředění 10^{-2}

vzorek 0,5 %, ředění 10^0

Micrococcus luteus - metoda „v bujónu“, kultivace na půdě PCA



kontrola, ředění 10^{-3}

vzorek 0,1 % CA, ředění 10^{-2}

vzorek 0,25 %, ředění 10^0

Bacillus cereus - metoda „v bujónu“, kultivace na půdě PCA



kontrola, ředění 10^{-5}

vzorek 0,1 % CA, ředění 10^{-2}

vzorek 1 %, ředění 10^0

Bacillus subtilis – metoda „v bujónu“, kultivace na půdě PCA



kontrola, ředění 10^{-5}

vzorek 0,25 % CA, ředění 10^{-1}

vzorek 1 %, ředění 10^0

