

Antibakteriální účinky mikroemulzí vybraných monoacylglycerolů

Nikola Mikušová

Bakalářská práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Nikola MIKUŠOVÁ**
Osobní číslo: **T090057**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**

Téma práce: **Antibakteriální účinky mikroemulzí vybraných monoacylglycerolů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. V teoretické části zpracujte literární rešerši zaměřenou na monoacylglyceroly a jejich vliv na růst mikroorganismů
2. Věnujte se dále i problematice přípravy emulzí a mikroemulzí a jejich vlastnostem

II. Praktická část

1. V praktické části připravte mikroemulze obsahující monoacylglyceroly nasycených i nenasycených mastných kyselin s různou délkou uhlíkového řetězce
2. Studujte případné antibakteriální působení mikroemulzí na skupině grampozitivních a gramnegativních bakterií
3. Získané výsledky zpracujte a zhodnoťte vliv studovaných mikroemulzí na růst a množení mikroorganismů

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] McClements, D. J. Food Emulsions. Principles, Practise and Technicques. CRC Press, 1999. ISBN 0-8493-8008-1

[2] Whitehurst, R. J. Emulsifiers in Food Technology. Blackwell Publishing, 2004. ISBN 1-4051-1802-4

[3] Gunstone, F. D. The Chemistry of Oils and Fats. Sources, Composition, Properties and Uses. Blackwell Publishing, 2004. ISBN 1-4051-1626-9

[4] Buňková, L., Buňka, F., Janiš, R., Krejčí, J., Doležálková, I., Pospíšil, Z., Růžička, J., Tremlová, B. Comparison of antibacterial effect of seven 1-monoglycerides on food-borne pathogens or spoilage bacteria. Acta Vet. BRNO. 2011, 80, 29-39.

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Iva Doležálková

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce:

24. února 2012

Termín odevzdání bakalářské práce:

21. května 2012

Ve Zlíně dne 24. února 2012



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan



doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ..MIKUŠOVA' NIKOLA.....

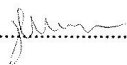
Obor: ..CHTP KK.....

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně ..21.5.2012

.....

³¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

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

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

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

³²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

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

³³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

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

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

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

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá přípravou mikroemulzí s monoacylglyceroly (MAG) a sledováním případných antimikrobních účinků těchto emulzí. Teoretická část je věnována emulzím, mikroemulzím, jejich vlastnostem a přípravě. Dále jsou zde charakterizovány monoacylglyceroly a jejich antimikrobní účinky. Poslední část teoretické části je zaměřena na bakterie, jejich vlastnosti, růst a množení. V praktické části práce byly připraveny mikroemulze a byl sledován jejich vliv na růst vybraných Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií.

Klíčová slova: mikroemulze, monoacylglycerol, antimikrobní účinek, Gram-pozitivní bakterie, Gram-negativní bakterie

ABSTRACT

This thesis work deals with the preparation of microemulsion with monoacylglycerols (MAG) and their antimicrobial activity. In the theoretical part emulsions, microemulsions, their properties and preparation were summarized. Additionally, monoacylglycerols and their antimicrobial effects are characterized. The last part of the theoretical section focuses on bacterial properties, growth and multiplication. The experimental part consists of preparation of microemulsions and determination of their antibacterial effect against selected Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Keywords: microemulsion, monoacylglycerol, antimicrobial effect, Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce, kterou byla Mgr. Iva Hauerlandová PhD., za odborné vedení, poskytnuté rady a vynaložený čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D., která mi umožnila vypracovat bakalářskou práci na toto téma. V neposlední řadě patří poděkování mé rodině a přátelům, bez jejichž podpory a pomoci bych se neobešla.

Prohlášení

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I.TEORETICKÁ ČÁST	11
1 EMULZE	12
1.1 KLASIFIKACE EMULZÍ.....	12
1.2 PŘÍPRAVA EMULZÍ	13
1.3 STABILITA EMULZÍ	14
1.4 EMULGÁTORY	16
1.5 HLB HODNOTA	17
1.6 MIKROEMULZE	17
2 MONOACYLGLYCEROLY	19
2.1 VLASTNOSTI MONOACYLGLYCEROLŮ	20
2.2 VÝROBA MONOACYLGLYCEROLŮ	21
2.2.1 INTERESTERIFIKACE	21
2.2.2 HYDROLÝZA.....	22
2.2.3 ESTERIFIKACE	22
2.2.4 ADICE MASTNÝCH KYSELIN NA GLYCIDOL	23
2.3 PRŮMYSLOVÉ VYUŽITÍ MONOACYLGLYCEROLŮ	23
2.4 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY MONOACLYGLYCEROLŮ.....	24
3 BAKTERIE	26
3.1 BAKTERIÁLNÍ BUŇKA	26
3.2 RŮST A MNOŽENÍ BAKTERIÍ.....	27
3.3 GRAMOVO BARVENÍ.....	28
3.3.1 GRAM-POZITIVNÍ BAKTERIE	30
3.3.1.1 Rod <i>Bacillus</i>	30
3.3.1.2 Rod <i>Enterococcus</i>	31
3.3.1.3 Rod <i>Micrococcus</i>	32
3.3.1.4 Rod <i>Staphylococcus</i>	32
3.3.2 GRAM-NEGATIVNÍ BAKTERIE.....	32
3.3.2.1 Rod <i>Citrobacter</i>	33
3.3.2.2 Rod <i>Escherichia</i>	33
3.3.2.3 Rod <i>Pseudomonas</i>	34
3.3.2.4 Rod <i>Salmonella</i>	34
3.3.2.5 Rod <i>Serratia</i>	35

PRAKTICKÁ ČÁST	35
4 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE	36
4.1 POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE	36
4.2 POUŽITÉ MIKROORGANISMY A KULTIVAČNÍ MÉDIA	36
4.3 POUŽITÉ PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY	37
4.4 DEKONTAMINACE POUŽITÉHO MATERIÁLU	38
4.5 PŘÍPRAVA MIKROEMULZÍ	38
4.6 PŘÍPRAVA BAKTERIÁLNÍ SUSPENZE	40
4.8 PŘÍPRAVA MIKROTITRAČNÍ DESTIČKY	40
5 VÝSLEDKY	41
5.1 VLIV MONOACYLGLYCEROLŮ NA RŮST BAKTERIÍ	41
5.1.1 VLIV MONOACYLGLYCEROLŮ NA GRAM-POZITIVNÍ BAKTERIE	42
5.1.2 VLIV MONOACYLGLYCEROLŮ NA GRAM-NEGATIVNÍ BAKTERIE	47
6 ZÁVĚR	52
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	53
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	58
SEZNAM OBRÁZKŮ	59
SEZNAM TABULEK	60
SEZNAM PŘÍLOH	61

ÚVOD

Emulze jsou heterogenní systémy složené nejméně ze dvou nemísitelných kapalin. Obsahují povrchově aktivní látku (surfaktant), která vytváří na fázovém rozhraní olej/voda ochranný film a snižuje mezipovrchové napětí mezi fázemi. Mikroemulze jsou systémy obsahující směs surfaktantu a ko-surfaktantu, které při přidání do dvoufázové směsi, tvoří stabilní, opticky čistý, izotropní, koloidní systém, který je termodynamicky stabilní. Mikroemulze se od emulzí liší vzhledem. Emulze jsou kalné, zatímco mikroemulze jsou průhledné. Další rozdíl je v přípravě. Pro přípravu emulzí je třeba velké množství energie, zatímco při výrobě mikroemulze jí není potřeba. Emulze jsou na rozdíl od mikroemulzí kineticky stabilní.

Monoacylglyceroly (MAG) jsou přírodní sloučeniny obsahující ve své molekule estericky vázanou mastnou kyselinu s krátkým, středně dlouhým či dlouhým řetězcem. Patří mezi potravinářsky významné lipidické sloučeniny. Kromě potravinářského průmyslu se využívají i v průmyslu kosmetickém, farmaceutickém, plastikářském a textilním. Jsou hojně využívány zejména pro své emulgační, ale také antimikrobní účinky. Předkládaná bakalářská práce je zaměřena na antibakteriální působení těchto látek a jejich možné využití v potravinářském či kosmetickém průmyslu pro zvýšení mikrobiologické kvality a bezpečnosti potravin či kosmetických prostředků.

Bakterie jsou jednobuněčné mikroorganismy, které mají prokaryotický typ buňky. Na rozdíl od eukaryotických buněk, prokaryotické buňky nemají jádro odděleno jadernou membránou od cytoplazmy a jsou asi 10x menší než eukaryotická buňka. Bakteriální buňky mají různý tvar o velikosti řádu mikrometrů. Podle Gramova barvení se bakterie dělí na Gram-pozitivní a Gram-negativní. Bakterie mohou kontaminovat potraviny i kosmetické přípravky a jejich přítomnost a životní pochody mohou vést ke znehodnocení těchto produktů, nebo dokonce i k ohrožení zdraví spotřebitele. Potlačení růstu nežádoucích mikroorganismů je tedy v zájmu jak spotřebitelů, tak i samotných výrobců.

V této práci byly připravovány mikroemulze obsahující monoacylglyceroly a byl zkoumán jejich antimikrobní účinek. Tento účinek byl sledován na vybraných, potravinářsky významných Gram-pozitivních a Gram-negativních bakteriích.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 EMULZE

Emulze jsou heterogenní systémy složené ze dvou nebo více nemísitelných kapalných fází. Cílem emulgace je vytvořit velmi jemné kapičky dispergované fáze tak, aby tyto kapičky byly stabilní a nedocházelo k jejich usazování nebo shlukování. Za emulzi lze tedy pokládat soustavu, ve které je jedna kapalina jemně rozptýlena v druhé kapalině. Vznik a stabilita takového systému je velmi často zajištěna přítomností povrchově aktivní látky - emulgátoru. [1],[2],[3]

Emulzní systémy nachází uplatnění zejména v potravinářském průmyslu (margaríny, máslo, mléko, omáčky apod.). Důležitou roli mají i v průmyslu kosmetickém nebo plastikářském, dále ve farmacii či zemědělství. [4]

1.1 Klasifikace emulzí

Emulze lze rozdělit do dvou velkých skupin: jednoduché emulze a složené emulze. V případě jednoduchých emulzí, jsou kapičky jedné kapalně fáze rozptýlené v jiné nemísitelné kapalně fázi. Složené emulze se skládají ze tří různých oblastí. Je to rozhraní, dispergované částice a dispergované prostředí. Molekuly v emulzi se rozdělují na tyto tři oblasti podle jejich koncentrace a polaritě, kde nepolární molekuly jsou umístěny převážně v olejové fázi, polární molekuly ve vodné fázi a amfifilní na rozhraní.

Běžně používané klasifikace emulzí jsou založeny na polaritě disperzního podílu a prostředí. Téměř ve všech aplikacích je jednou z kapalin voda, zatímco druhá se vyznačuje nízkou dielektrickou konstantou. Obecně je tato druhá kapalina označována jako olej. [1]

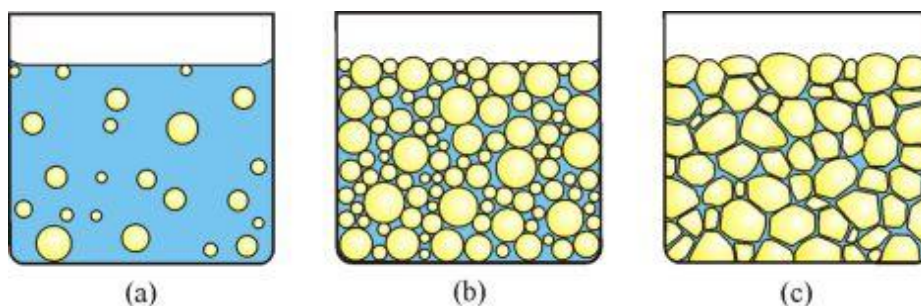
Podle polaritě disperzního podílu a prostředí emulze dále rozdělujeme na:

- a) emulze přímé- které můžeme nazvat jako emulze O/V (olej ve vodě), kde disperzní prostředí tvoří voda, což je polárnější kapalina a jako příklad je možné uvést mléko,
- b) emulze obrácené- nazývané jako emulze V/O (voda v oleji), kde disperzní prostředí tvoří olej, který představuje nepolární kapalinu a jako příklad lze uvést máslo. [5], [6]

Dalším možným hlediskem při klasifikaci emulzí může být koncentrace disperzního podílu nebo také velikost částic emulze.

Podle koncentrace disperzního podílu rozlišujeme emulze na (*Obr. 1.*):

- a) emulze zředěné- kde dispergovaná fáze zaujímá nejvýše 2 % celkového objemu,
- b) emulze koncentrované- kde dispergovaná fáze zaujímá až 74 % a tvar částic je kulovitý,
- c) emulze vysoce koncentrované (gelovité)- kde jsou částice disperzního podílu uloženy tak těsně, že se vzájemně deformují a mají tvar mnohostěnu. Částice jsou od sebe odděleny tenkým filmem. [5]



Obr. 1. Emulze (a) zředěná, (b) koncentrovaná, (c) vysoce koncentrovaná. [7]

Podle velikosti dispergovaných částic dělíme emulze na:

- a) mikroemulze- velikost částic je zde obvykle v rozsahu 10-100 nm, jsou to termodynamicky stabilní a čiré disperze [8],
- b) nanoemulze- velikost částic se pohybuje okolo 50-200 nm a oproti mikroemulzím jsou to kineticky stabilní a průsvitné disperze [9],[10],
- c) makroemulze- jejich velikost částic je v rozsahu 100-1000 nm. Tyto systémy jsou termodynamicky nestabilní a jsou mléčného zbarvení. Makroemulze jsou z hlediska potravinářského nejpoužívanější a nejvýznamnější disperze. [8]

1.2 Příprava emulzí

Příprava emulzí je proces, při kterém dojde k rozptýlení jedné fáze do druhé, nebo-li dojde k dispergaci. Jedna kapalina je pak dispergována v kapalině druhé, kdy jedna z těchto ka-

palin tvoří prostředí spojité a druhá je rozptýlena v podobě malých kapiček. Tento proces můžeme rovněž nazvat emulzifikace. Při emulzifikaci dochází k mechanické dispergaci disperzního podílu v disperzním prostředí za přítomnosti emulgátoru. Dispergované kapaliny se intenzivně míchají a protřepávají pomocí míchadel, mlýnů nebo ultrazvuku. Emulzifikace probíhá obvykle ve dvou stupních. V prvním kroku se provádí primární emulzifikace a výsledkem tohoto procesu je vznik hrubé emulze s velkými částicemi emulgované fáze. Poté se provede sekundární emulzifikace, při které dojde k úpravě velikosti částic. Dále se provádí homogenizace. [11]

Technologické operace při přípravě emulzí lze rozdělit do následujících bodů:

- 1) EMULGACE- smíchání vodné a olejové fáze za vysoké teploty.
- 2) HOMOGENIZACE- zmenšování původně vytvořených částic.
- 3) EGALIZACE- proces míchání, kdy úhel míchadla je jiný než úhel nádoby.

Míchadla mohou být rámcová, prstová, kotvová, křížová nebo speciální, které pracují na principu rotoru, jako jsou například šlehače, turbíny apod. [12]

Důležitým krokem při přípravě emulzního systému je stabilizace. Stabilizace se provádí přidáním emulgátoru, který na povrchu dispergovaných částic vytváří ochrannou vrstvu chránící nově vytvořené rozhraní proti koalescenci (shlukování). Emulgátory zároveň snižují mezipovrchové napětí a usnadňují proces emulzifikace. [11]

1.3 Stabilita emulzí

Stabilita emulze je definována jako jejich schopnost výrazně neměnit své původní vlastnosti. Stabilitu emulze lze posuzovat z termodynamického a kinetického hlediska. Termodynamická stabilita souvisí s pravděpodobností, že dojde k rozpadu emulze. Kinetická stabilita vyjadřuje rychlost rozpadu dané emulze.

Vznik a stabilita emulze jsou ovlivněny pořadím a metodou používanou k promíchání komponent emulze. Je možné rozpustit emulgátor v oleji i ve vodné fázi současně, další možností je rozpustit emulgátor v jedné kapalině a poté přidat kapalinu druhou. Průměrná velikost částic (kapek) emulze závisí na intenzitě a množství energie zavedené do systému, a ta je různá pro konkrétní metody přípravy.

Existuje řada fyzikálně-chemických mechanismů, které mohou být zodpovědné za změny ve vlastnostech emulze a které mohou vést k jejich rozpadu. Mezi tyto mechanismy patří působení gravitačních sil a agregace částic. Při separaci emulze na základě gravitačních sil dochází k tzv. sedimentaci a krémování. K separaci na základě agregace částic dochází při tzv. flokulaci nebo koalescenci.

Uvedené formy nestability spolu často vzájemně souvisí. Destabilizace emulze projde několika po sobě jdoucími a paralelními kroky před konečnou etapou oddělení jednotlivých vrstev. V počáteční fázi se kapičky pohybují díky difuzi (nebo míchání), a jestliže je odpor potenciálu příliš slabý, začnou se hromadit na sobě. Došlo tedy k flokulaci. Jednotlivé kapičky jsou nyní nahrazeny dvojicemi oddělenými tenkou vrstvou. Tloušťka této vrstvy je snížena vzhledem k přitažlivosti Van der Waalsových sil, a když kapka dosáhne kritické hodnoty svého rozměru, film praská a dvě kapky spojí do jediné. Došlo ke srůstání (koalescenci). Koalescence je tedy proces, při kterém se slévá dvě nebo více kapek v jednu větší. Tento proces předpokládá přímý kontakt částic a následné zničení adsorbovaného filmu. Z toho můžeme vyvodit, že koalescence je oproti flokulaci, sedimentaci a krémování závislá na více silách krátkého dosahu.

Paralelně s flokulací a koalescencí, probíhá sedimentace, při které kapky klesnou ke dnu díky rozdílům v hustotě rozptýlené a kontinuální fáze. Při sedimentaci mají kapičky vyšší hustotu, než kapalina, ve které jsou rozptýlené. Opakem sedimentace je krémování, kdy kapičky stoupají směrem vzhůru, k povrchu, protože jejich hustota je nižší než hustota kapaliny, v níž jsou dispergovány. Výsledkem těchto procesů je vysoce koncentrovaná emulze na horní nebo dolní části nádoby a zvýšení počtu kapek na jednotku objemu, což následně zvyšuje rychlost flokulace a koalescence. [13], [14], [15]

Rozhodujícím faktorem pro stabilitu emulze je kvalita ochranného filmu, která je závislá na vlastnostech emulgátoru, který byl použit ke stabilizaci emulze. Emulze nejsou termodynamicky stabilní (výjimkou jsou mikroemulze). Je zřejmé, že kontrola stability emulze je omezena na kinetické řízení separace složek (olej a voda). Za nějakou dobu emulze destabilizují v důsledku stárnutí a celková plocha systému klesá. Nejběžnější metodou k ověření stability emulzí je testování vzniku samostatné fáze při pokojové teplotě zahříváním nebo odstředěním vzorku. Kultivovanější metody spočívají v analýze velikosti částic nebo viskozity v závislosti na čase. [13]

1.4 Emulgátory

Spousta běžných potravin představuje často složité disperzní soustavy a jejich výroba vyžaduje použití látek se specifickými funkčními vlastnostmi. K těmto látkám řadíme i emulgátory. Zavedení emulgátorů do procesu výroby umožnilo mnoha potravinářským oborům zavést nové technologie a výrobky se zlepšenými konzistenčními, nutričními i organoleptickými vlastnostmi. Potravinářské emulgátory lze rozdělit do dvou skupin, na emulgátory přirozené a syntetické.

Emulgátor bývá rovněž nazýván jako tenzid, surfaktant nebo povrchově aktivní látka. Je to látka, která umožňuje vznik a stabilizaci emulze snížením mezifázového napětí. Další vlastností emulgátoru je schopnost zabránit nebo zpomalit zánik kapiček. Emulgátor tedy brání separaci fází vytvářením ochranného filmu nebo bariéry na fázovém rozhraní, která brání kapkám ve flokulaci nebo koalescenci. Vhodnými emulgátory jsou teda látky schopné gelace a asociace ve velké micely (shluky molekul tenzidů dispergované v kapalně fázi). V potravinářství se využívá i dalších vlastností surfaktantů. Jde převážně o to, že vytvářejí komplexy s amylosou, dochází k interakcím s bílkovinami a zadržují vzduch.

Molekula emulgátoru se skládá z lipofilní a hydrofilní části, které se na mezifázovém rozhraní chovají tak, že směřují do prostředí o shodné polaritě. Tato orientace emulgátoru zabraňuje zpětnému spojování dispergované fáze ve větší kapky a tím zvyšuje stabilitu emulze. Polární prostředí tvoří převážně voda a nepolárním prostředím je olej, který je tvořen z organických sloučenin nebo jejich směsí (např. rostlinný olej, vyšší mastné kyseliny atd.). Vhodnost použití emulgátoru určitého typu lze určit podle jeho rozpustnosti v disperzním prostředí. Emulgátor hydrofilní povahy pomáhá vzniku emulze typu olej ve vodě (O/V) a naopak emulgátory s lipofilním charakterem vytvářejí opačnou emulzi, voda v oleji (V/O).

Většinu surfaktantů lze zařadit do některé těchto tří skupin:

- a) asociativní (micelární) koloidy- soli vyšších mastných kyselin, např. mýdla,
- b) makromolekulární koloidy- hydrofilní (proteiny), hydrofóbní (kaučuk),
- c) jemné nerozpustné prášky.

Pro všechny emulgátory platí Bancrofftovo pravidlo, tzn. že ve stabilizované emulzi je spojitě disperzní prostředí tvořeno tou fází, k níž má použitý emulgátor za daných podmínek větší afinitu. [16], [17]

1.5 HLB hodnota

HLB, nebo-li hydrofilně - lipofilní rovnováha (z angl. *hydrophilic - lipophilic balance*), charakterizuje vyváženost obou částí surfaktantu, tedy poměr hydrofobních a hydrofilních funkčních skupin. Její velikost rozhoduje o praktickém využití těchto látek. Surfaktanty s vyšší hodnotou HLB jsou hydrofilní a dobře stabilizují emulze typu olej ve vodě, emulze opačného typu jsou stabilizovány pomocí surfaktantů s nízkou hodnotou HLB.

Rozdělení povrchově aktivních látek podle HLB hodnoty je uvedeno v Tabulce 1. [17]

Tab. 1. Rozdělení povrchově aktivních látek podle HLB hodnoty. [17]

HLB	POVRCHOVĚ AKTIVNÍ LÁTKA
1,5 - 3	ODPĚŇOVAČE
2 - 6	EMULGÁTORY V/O
7 - 9	SMÁČEDLA
8 - 18	EMULGÁTORY O/V
13 - 15	DETERGENTY
10 - 18	SOLUBILIZÁTORY

1.6 Mikroemulze

Mikroemulzní systémy obsahují směs surfaktantu a ko-surfaktantu, která při přidání do dvoufázové (hydrofilní / lipofilní) směsi, tvoří stabilní, opticky čistý, izotropní, koloidní systém zřejmě termodynamicky stabilní s nízkým mezifázovým napětím. Mikrostruktura těchto systémů se skládá z mikrokapiček o velikosti menší než 100 nm. Mikroemulze lze použít v různých aplikacích, například pro optimalizaci vlastností krevních náhrad nebo pro zlepšení transportu orálně podávaných peptidových farmak do tkání. Mezi fyzikální metody umožňující identifikaci a charakterizaci mikroemulzní systémů patří metody založené na rozptylu světla, sedimentaci, centrifugaci, reologii a vodivosti. Pro analýzu mikroemulzí lze rovněž použít nukleární magnetickou rezonanci (NMR), rentgen a elektronovou mikroskopii. [18]

Pojem mikroemulze byl zaveden již v roce 1940 pány Hoarem a Schulmanem, kteří získali čirý jednofázový roztok při titraci mléčné emulze s hexanolem. Mikroemulze jsou tedy definovány jako opticky izotropní, termodynamicky stabilní, kapalné roztoky obsahující vodu, olej a povrchově aktivní látku. Zásadní rozdíl mezi emulzí a mikroemulzí je v jejich stabilitě. Přestože emulze vykazují vynikající kinetickou stabilitu, jsou v zásadě termodynamicky nestabilní a dříve nebo později dochází k separaci fází. Mikroemulze jsou naopak termodynamicky stabilní. Dalším důležitým rozdílem je jejich vzhled, emulze jsou kalné, zatímco mikroemulze jsou čiré a průhledné. Kromě toho existují zřetelné rozdíly ve způsobu jejich přípravy, protože příprava emulze vyžaduje dodání velkého množství energie, za to při výrobě mikroemulze jí není potřeba. [19]

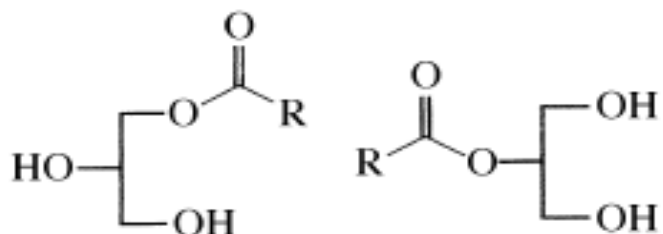
2 MONOACYLGLYCEROLY

První monoacylglyceroly (MAG, monoglyceridy) byly syntetizovány v roce 1853 francouzským chemikem Berthelotem. Díky svým emulgačním účinkům jsou monoacylglyceroly využívány v různých průmyslových odvětvích, především pak v potravinářství. V roce 1936 byly monoacylglyceroly patentovány pro využití při výrobě mléčných mražených krémů a od 30. let jsou MAG hojně využívány v pekárenském průmyslu. V současné době je produkováno přibližně 300 tisíc tun emulgátorů ročně. Asi 70 % světové produkce emulgátorů zahrnuje výroba monoacylglycerolů, diacylglycerolů a jejich derivátů. MAG se dnes využívají především při výrobě chleba a dalších pekárenských výrobků, margarínů zmrzlin a žvýkacích gum. [20]

Kromě potravinářského průmyslu, jsou monoacylglyceroly často využívány i v průmyslu kosmetickém, kde se uplatňují například při výrobě krémů a tělových mlék, anti-perspirantů nebo barev na vlasy. Ve farmaceutickém průmyslu mohou MAG sloužit jako vektory aktivních látek, dále mohou být součástí mikrobicidních gelů pro léčbu slizničních a kožních infekcí. Díky svým lubrikačním, emulgačním a změkčovacím vlastnostem jsou MAG využívány i v textilním a plastikářském průmyslu. [2], [21], [22]

Monoacylglyceroly patří mezi lipidy, což jsou přírodní sloučeniny obsahující ve své molekule estericky vázanou mastnou kyselinu o nejméně 4 atomech uhlíku. Jedná se teda o estery vyšších mastných kyselin. MAG se ještě přesněji řadí mezi tzv. homolipidy (estery vyšších mastných kyselin a alkoholů), což je skupina látek zahrnující jak vosky, tak tuky a oleje. Monoacylglyceroly jsou estery vyšších mastných kyselin a glycerolu a náleží do skupiny tuků a olejů. Kromě monoacylglycerolů lze do skupiny esterů vyšších mastných kyselin a glycerolu zařadit ještě di-acylglyceroly (DAG) a triacylglyceroly (TAG). Tyto látky se vzájemně liší počtem acylových zbytků vázaných na trojsytný alkohol glycerol. Monoacylglyceroly mají pouze jednu hydroxylovou skupinu glycerolu esterifikovanou zbytkem mastné kyseliny, u di- a triacylglycerolů jsou esterifikovány dvě nebo tři alkoholové skupiny. Mono- a diacylglyceroly lze tedy označit jako parciální estery glycerolu. [23], [24]

Vzhledem k tomu, že glycerol je trojsytný alkohol, mohou se monoglyceroly vyskytovat ve dvou izomerních formách, které se liší polohou acylového zbytku. Pro tyto izomerní formy se běžně používá označení 1-monoacylglyceroly a 2-monoacylglyceroly (*Obr. 2.*). [25]



Obr. 2. Dvě izomerní formy monoacylglycerolů: 1-monoacylglycerol (vlevo) a 2-monoacylglycerol (vpravo). [26]

2.1 Vlastnosti monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly jsou pouze parciálními estery glycerolu a mastných kyselin. Molekula MAG je díky tomu amfipatická a tvoří ji polární (hydrofilní) a nepolární (lipofilní) část. V disperzích se molekuly MAG orientují na rozhraní mezi nepolární fází (olej nebo vzduch) a polární fází (voda). Hydrofobní konce molekul, tvořené převážně řetězci mastných kyselin, směřují do hydrofobní fáze, zatímco hydrofilní části molekul směřují do vodné fáze. Tyto vlastnosti jsou podkladem pro emulgační účinky těchto látek, díky kterým jsou MAG hojně využívány v různých odvětvích průmyslu. Monoacylglyceroly dokážou zlepšit vlastnosti emulzí a stabilitu pěn, čímž se například mění reologické vlastnosti těsta a předchází se tak retrogradaci (tvrdnutí) pečiva.

Emulgační účinky monoacylglycerolů jsou známy poměrně dlouhou dobu. V posledních letech je však značná pozornost věnována vlivu těchto látek na růst mikroorganismů. Mnohé monoacylglyceroly jsou schopny inhibovat životní pochody mikrobiálních buněk a potlačit tak růst širokého spektra mikroorganismů. MAG přilákaly i zájem vzhledem k jednoduchosti jejich struktury, snadné dostupnosti, chemické stálosti a hlavně díky jejich biokompatibilitě, biologické rozložitelnosti a absenci dráždivého účinku na lidskou kůži a sliznice. MAG se běžně vyskytují v živočišných produktech, např. v mléce. Jsou také přirozeným produktem metabolismu tuků a lze je tedy obecně považovat za bezpečné. Ve

Spojených státech získaly monoacylglyceroly status GRAS (generally recognised as safe) a jejich použití je povoleno při výrobě potravin, krmiv, ve farmaceutickém průmyslu, v lékařství a také v kosmetice. Dále jsou využívány při výrobě materiálů s antimykotickou úpravou a v mnohých dalších aplikacích. [27]

2.2 Výroba monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly jsou vyráběny několika způsoby:

- a) interesterifikací (alkoholýzou, acidolýou a transesterifikací)
- b) parciální hydrolýzou triacylglycerolů
- c) esterifikací vyšších mastných kyselin s glycerolem
- d) nukleofilní adicí mastné kyseliny na glycidol. [17]

2.2.1 Interesterifikace

Interesterifikace je iontová reakce katalyzována hydroxylovými nebo vodíkovými ionty. Je to přeskupování acylů mezi molekulami nebo v molekulách. Produktem je ester. Interesterifikace probíhá v přítomnosti vhodných katalyzátorů, lze využít i katalýzy enzymatické (např. lipázou). Reakční rychlost závisí na struktuře reaktantů a klesá s jejich rostoucí molekulovou hmotností. [17], [26], [28]

2.2.1.1 Alkoholýza

Alkoholýza patří mezi nejdůležitější interesterifikační reakce. Pokud přidáme alkalické katalyzátory, tato reakce proběhne již při laboratorní teplotě místnosti, případně při teplotě mírně zvýšené. Při použití kyselých katalyzátorů je třeba reakční směs zahřát až na teplotu kolem 100 °C. Podle použitého alkoholu rozlišujeme metanolýzu, etanolýzu a glycerolýzu. Pro výrobu monoacylglycerolů v průmyslovém měřítku se nejčastěji využívá právě glycerolýza přírodních tuků a olejů. Při glycerolýze reagují triacylglyceroly s glycerolem v přítomnosti anorganického katalyzátoru za vysokých reakčních teplot (180 – 220 °C) a dochází k přenosu acylových řetězců mastných kyselin triacylglycerolů na glycerol. Produktem reakce však nejsou pouze monoacylglyceroly, ale směs mono- a di-acylglycerolů, kterou je dále nutné přečistit. [17], [28], [29], [30], [31]

2.2.1.2 Acidolýza

Acidolýza umožňuje nahrazení přírodní mastné kyseliny (MK) jinými, které jsou vhodnější. Bez katalyzátorů jsou nutné teploty až 300 °C, při použití katalyzátoru stačí teploty okolo 100 °C i nižší. Prakticky se provádí u kokosového a palmojadrového tuku. [17], [28]

2.2.1.3 Transesterifikace

Tato reakce bývá také nazývána jako vlastní interesterifikace, nebo-li esterová výměna. Dochází k vzájemné mezimolekulární výměně acylové nebo alkoholové skupiny jednoho esteru za druhý. Využívá se například pro úpravu některých tuků (kakaové máslo). [17], [28], [32]

2.2.2 Hydrolýza

Při hydrolýze přijímají molekuly triacylglycerolů molekulu vody, odštěpí se mastná kyselina a vzniká diacylglycerol. Poté následnou hydrolýzou vzniká monoacylglycerol, až nakonec vznikne volný glycerol. Hydrolýza parciálních esterů probíhá rychleji než hydrolýza triacylglycerolů. Nejběžnějšími katalyzátory, které se při této reakci užívají, jsou oxidy nebo hydroxidy kovů druhé skupiny. Další možností je katalýza enzymatická, při které jsou využívány 1,3 specifické lipázy. Výhodou enzymatické hydrolýzy jsou především mírné reakční podmínky. Reakce probíhá i za laboratorní teploty, při použití alkalických či kyselých katalyzátorů jsou potřebné vysoké teploty a tlak. Nevýhodou hydrolýzy katalyzované enzymaticky je však relativně nízká výtěžnost reakce, časová náročnost a nemalé náklady na použité enzymy. Hydrolýza slouží především k přípravě volných mastných kyselin pro další výroby. [17], [28],[26], [30],[33]

2.2.3 Esterifikace

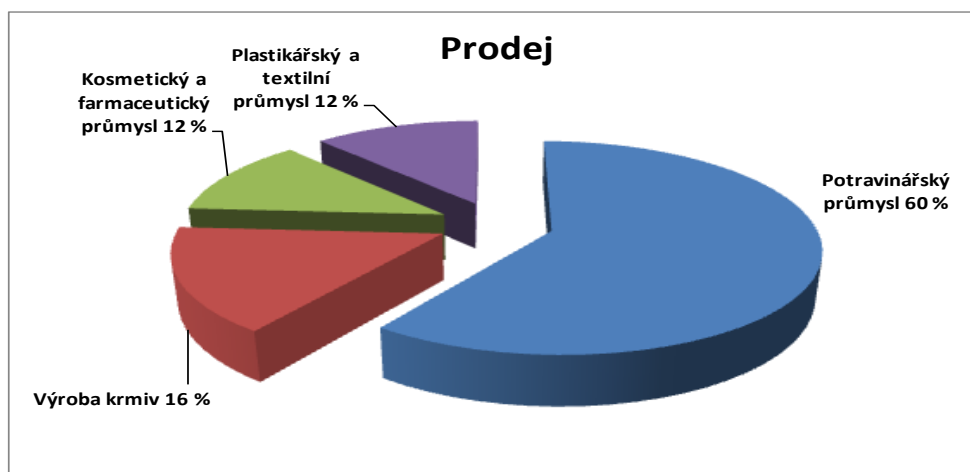
Opakem hydrolýzy je esterifikace. Estery mohou být vyrobeny z kyselin nebo ze stávajících esterů výměnou alkylové nebo acylové skupiny. Je to iontová reakce katalyzována hydroxylovými nebo vodíkovými ionty. Při esterifikaci se nejprve vytvoří monoacylglyceroly, z nichž dalšími reakcemi vznikají di- a triacylglyceroly. Za přítomnosti kyselých (př. kyseliny sírová) nebo zásaditých katalyzátorů (př. alkalické kovy) můžeme reakci urychlit. Reakce probíhá za vysoké teploty i bez katalyzátoru, protože uvolňovaná voda ihned téká z reakční směsi, tudíž reakční rovnováha se neustále posunuje ve prospěch esteru. [17], [28]

2.2.4 Adice mastných kyselin na glycidol

K nejnovějším způsobům syntézy MAG řadíme otevření epoxidového kruhu glycidolu s následnou nukleofilní adicí, kde jako katalyzátory můžeme použít terciární aminy, lanthanoidy, amoniové soli a další sloučeniny. Tato reakce je velice výhodná především díky značné univerzalitě. Katalyzátory pro reakci jsou dostupné, popřípadě snadno připravitelné. K dalším výhodám patří zejména vysoká konverze, rychlost reakce (asi 90 min), nízká reakční teplota (90 °C) a nepřítomnost vedlejších reakčních produktů. Nevýhodou reakce je obsah určitého množství nežádoucích reziduí katalyzátoru a glycidolu, tudíž tento produkt musí být pro farmaceutické a potravinářské účely čištěn. [21], [34], [35]

2.3 Průmyslové využití monoacylglycerolů

Nejdůležitější oblastí využití monoacylglycerolů je potravinářský průmysl, ve kterém se uplatňuje 60 - 72 % z celkové roční produkce monoacylglycerolů. Mezi další průmyslová odvětví, kde se MAG využívají, lze zařadit průmysl kosmetický, farmaceutický, plastikařský a textilní (Obr. 3). [21]



Obr. 3. Využití monoacylglycerolů v průmyslu. [21], [22]

Význam monoacylglycerolů v potravinářství je značný, hlavně díky emulgačním účinkům těchto látek. Monoacylglyceroly se využívají jako emulgátory pro snižování mezipovrchového napětí na rozhraní dvou nemísitelných kapalin s rozdílnou polaritou, čímž pomáhají zlepšit spojování vodné a olejové fáze. Jsou nedílnou součástí výroby pečiva, zmrzlin, tavených sýrů, margarínů, šlehaných krémů atd. Zlepšují vlastnosti výrobků jako je napří-

klad stabilita tukových emulzí, vláčnost těsta a udržují stálost pěny. Zlepšují i fermentační stabilitu těst, tzn. že po vykynutí je těsto odolnější vůči kolapsu způsobenému mechanickým zásahem. V cukrovinkářském průmyslu se MAG používají pro zlepšení konzistence žvýkaček a k omezení lepivosti karamelových bonbónů. Monoacylglyceroly kyseliny palmitové a stearové se přidávají rovněž do čokolád a polev, čímž zabraňují vyvstávání tuku na povrch. Estery MAG s kyselinou citronovou a mléčnou se zužitkovávají v masném průmyslu, kde zvyšují vaznost jednotlivý výrobků, čehož se využívá při výrobě salámů. Monoacylglyceroly s kyselinou citronovou aplikované nástřikem na maso, drůbež, ovoce a zeleninu napomáhají udržovat vlhkost výrobku. [25], [36], [37], [38]

Ve farmaceutickém průmyslu se využívají monoacylglyceroly jako součásti transportních gelů farmak do organismu. Jednou z výhod monoacylglycerolů je, že jsou biokompatibilní, biodegradabilní a nemají iritující účinky. Díky svým emulgačním, lubrikačním a změkčovacím vlastnostem jsou důležitou složkou i v plastikářském a textilním průmyslu. Výhodou MAG dále je, že nejsou nijak škodlivé pro životní prostředí a jsou snadno biologicky odbouratelné. V obuvnickém průmyslu se MAG mohou využívat jako antimikrobní prostředky sloužící k úpravě stélkových a podšívkových materiálů. Dále se MAG s nasycenými mastnými kyselinami hojně užívají v průmyslu kosmetickém, kde se upřednostňují vlastnosti MAG jako je stabilita, chemická netečnost v přítomnosti bioaktivních látek, schopnost penetrace, neiritující účinky na pokožce a sliznici, stabilita vůči oxidaci a bezbarvost. Uplatňují se při výrobě krémů, tělových mlék, barev na vlasy a anti-perspirantů. [36], [38]

2.4 Antimikrobiální účinky monoacylglycerolů

Problematika bezpečnosti a udržitelnosti potravin a surovin, ze kterých se potraviny vyrábějí, je stále v popředí zájmu laické i odborné veřejnosti. Jedním z cílů potravinářské mikrobiologie je nacházet a testovat nové prostředky, které by potlačovaly růst nežádoucích mikroorganismů v potravinách. Antimikrobiální látky by v 21. století měly být nedílnou součástí potravin. Příkladem takových látek by mohly být i monoacylglyceroly. Antimikrobiální účinky volných mastných kyselin jsou známy již dlouho, avšak přesný mechanismus tohoto účinku není doposud objasněn. Podobně jako u mastných kyselin, ani u jejich esterů, monoacylglycerolů, není přesný mechanismus inhibice mikroorganismů znám. Přesto lze konstatovat, že primárním cílem ataku monoacylglycerolů je cytoplazmatická membrána mikrobiálních buněk. Podle jedné z hypotéz monoacylglyceroly, jakožto neionické surfak-

tanty, mají schopnost pronikat a začlenit se do membrány. Tímto způsobem pak MAG můžou narušit základní biologické funkce vázané na cytoplazmatickou membránu, tedy její selektivní propustnost a transport živin. Už mikromolová koncentrace monoacylglycerolů může ovlivnit enzymovou aktivitu v cytoplazmatické membráně, což prokázaly nedávné studie. Další hypotéza předkládá, že mastné kyseliny s krátkým a středně dlouhým řetězcem mohou v nedisociované podobě pronikat do bakteriálních buněk, disociovat ve vnitřním prostředí buňky a zvýšit tak kyselost buněčného obsahu. Snížení hodnoty pH může vést k inaktivaci důležitých intracelulárních enzymů. [27], [36], [40]

V současné době je za nejvýznamnější oblast uplatnění MAG považován potravinářský průmysl, kde se ale tyto látky používají pouze jako emulgační činidla nebo stabilizátory. Vzhledem k faktu, že mnohé monoacylglyceroly dokážou potlačit růst relativně širokého spektra mikroorganismů, je možné uvažovat i o možnosti využití monoacylglycerolů jakožto antimikrobních agens v potravinách. Při takových aplikacích by monoacylglyceroly mohly plnit více funkcí, jednak zlepšovat funkční vlastnosti potravin díky emulgačním účinkům, a také potlačovat růst nežádoucích mikrobiálních kontaminant.

Existují mnohé studie zaměřené na antimikrobní působení monoacylglycerolů. Literární zdroje se shodují na tom, že monoacylglyceroly různých mastných kyselin mají odlišné antimikrobiální schopnosti. [39], [40], [41], [42]

Aktivita monoacylglycerolů je závislá na charakteru jejich molekuly, kde důležitým hlediskem je počet acylových zbytků vázaných na glycerol, délka uhlíkatého řetězce mastné kyseliny a počet a poloha nenasycených vazeb. Antimikrobní účinnost klesá s délkou uhlíkatého řetězce. Inhibiční účinky MAG a vyšších mastných kyselin závisí i na vlastnostech bakteriální buněčné stěny. Gram-negativní bakterie jsou odolnější vůči účinkům monoacylglycerolů než bakterie Gram-pozitivní, protože obsahují větší počet lipopolysacharidů v buněčné struktuře a jsou tak chráněny proti účinkům povrchově aktivních látek (PAL). [43], [44]

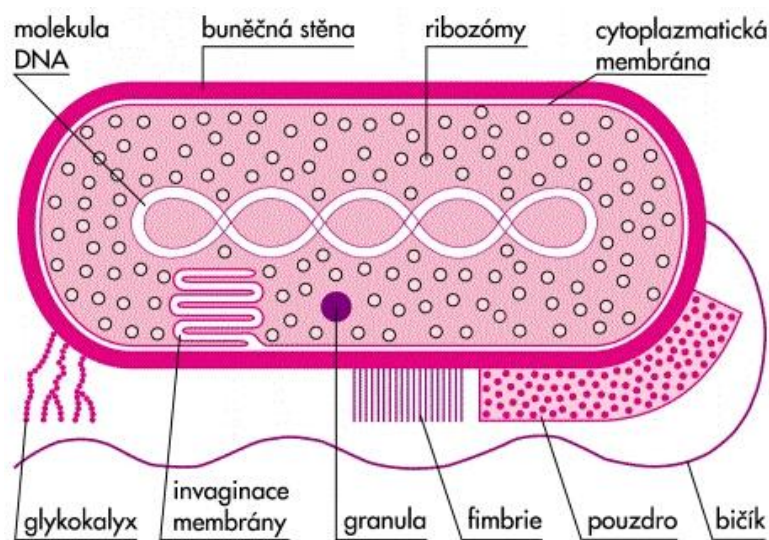
Příkladem monoacylglycerolu s antimikrobní aktivitou může být MAG C_{10:0}, což je monoacylglycerol kyseliny kaprinové, který zabraňuje nebo omezuje růst stafylokoků (a dalších gram-pozitivních koků), bacilů, kvasinek nebo vláknitých hub. [42]

Značné antimikrobiální účinky má i MAG kyseliny laurové (C_{12:0}), který je aktivní vůči růstu gram-pozitivních bakterií a potlačuje i růst plísní a kvasinek. [45]

3 BAKTERIE

3.1 Bakteriální buňka

Bakterie jsou jednobuněčné mikroorganismy s prokaryotickým typem buňky. Od eukaryot se liší tím, že nemají jádro odděleno od cytoplazmy jadernou membránou a jsou asi desetkrát menší (několik μm). I přes malé rozměry má bakteriální buňka velký specifický povrch umožňující intenzivní metabolismus, který pomáhá rychlému rozmnožování a růstu. Bakterie jsou schopny tvořit vysoce rezistentní struktury, spory a obsahují řadu sloučenin, které se v přírodě vyskytují jen ojediněle. Velikost bakteriální buňky se pohybuje v řádu mikrometrů. Z hlediska morfologie jsou základní tvary bakteriálních buněk stafylokoky (shluky koků), diplokoky (deformované koky ve dvojicích), opouzdřené koky, streptokoky (koky v řetězcích), koky v tetradách a v paketách, zahnuté tyčinky, mykobakterie, spirochety a další. Významnou strukturou bakteriální buňky je její stěna, která je tvořena peptidoglykanem. Na základě stavby buněčné stěny se bakterie rozdělují do dvou skupin, na bakterie Gram-pozitivní a Gram-negativní. Bakteriální buňka může být obalena slizem nebo pouzdrem a na povrchu mohou být fimbrie a bičíky. Povrchové struktury bakterií jsou nositeli významných toxických, antigenních, adhezivních a jiných biologických účinků a rovněž se účastní tvorby biofilmů. Vzhled bakteriální buňky je znázorněn na Obr. 4. [46], [47], [48]



Obr. 4. Schéma prokaryontní buňky. [49]

3.2 Růst a množení bakterií

Bakteriální buňka, která se nachází v okolí, kde má vhodné chemické i fyzikální podmínky, roste. Z okolí přijímá energii a živiny, a podle svého genetického programu modulovaného aktuálními podmínkami prostředí syntetizuje sama sebe, všechny části svého těla. Zvětšuje jak svůj objem, tak svoji hmotnost. Když dosáhne určité velikosti, rozdělí se příčně na dvě buňky, ty opět rostou a zvětšují se. Doba mezi dvěma za sebou jdoucími děleními buňky, tedy doba, od vzniku buňky až do jejího rozdělení na dvě buňky dceřinné, se nazývá generační doba. Probíhá-li růst a dělení delší dobu, vzniká z jediné bakteriální buňky populace rostoucích buněk, kultura bakterií. Doba potřebná k tomu, aby se v rostoucí populaci počet buněk zdvojnásobil, se nazývá doba zdvojení a označuje se T . Růst mikroorganismů lze zkoumat z několika hledisek, například z hlediska získání maximální biomasy, z hlediska morfologie a cytologie, z hlediska faktorů působících na tvorbu buněčných komponent a z hlediska odstranění nebo přeměny určitých složek prostředí (médií). [47], [50]

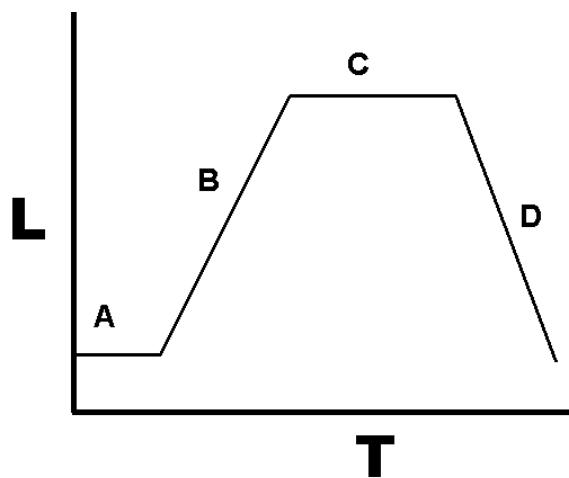
Na životním cyklu individuální bakterie je nejpozoruhodnější schopnost autoreprodukce, nebo-li vytvoření kopie sebe samé. Začátek procesu autoreprodukce je autoreprodukce jádra, které nese informaci o tom, jak bude buňka fungovat a jak má vypadat. V celém procesu replikace bakteriálního jádra rozlišujeme tři děje:

- a) iniciace (zahájení) replikace
- b) elongace (vlastní replikace)
- c) terminace (ukončení replikace).

Jaderné dělení u bakterií spočívá ve zhotovení repliky dvojšroubovice DNA a oddělení od dceřinné buňky. Iniciace replikace DNA nastává pravidelně v intervalech, které se rovnají generační době. Rozdělení chromozomů do dceřiných buněk je uskutečněno lokálním růstem buněčného obalu, na nějž jsou oba chromozomy připojeny. Buněčné dělení spočívá převážně ve vytvoření příčného septa, které dá vzniknout dvěma stejně velkým buňkám. [50]

Rozlišujeme čtyři typické fáze růstu bakteriální struktury. První je klidová fáze, nebo-li tzv. *lag fáze*, při které se bakterie připravují na růst v novém prostředí. Dochází zde k syntéze RNA (ribonukleová kyselina), enzymů a dalších molekul. Druhá fáze se označuje jako exponenciální fáze (*log fáze* – logaritmická fáze). V této fázi se bakterie množí ma-

ximální růstovou rychlostí a růst populace je exponenciální. Tato fáze trvá tak dlouho, do-
ku bakterie nevyčerpají živiny. Další, třetí fází je stacionární fáze, kde se rychlost množení
bakterií zpomaluje až do dosažení stavu, kdy se počet buněk již nemění. Je vyčerpáno živ-
né médium. Poslední fází je fáze odumírání. Počet odumřelých buněk je větší než počet
buněk vzniklých. Během závěrečných fází růstu může docházet k tvorbě spor (tzv. sporu-
lace), které dokážou přežít nepříznivé podmínky. Růstová křivka je znázorněna na *Obr. 5.*
[51]



Obr. 5. Růstová křivka bakteriální populace, kde na ose x je vyneseno čas a na ose y počet bakterií v kolonii. (A - lag fáze, B - log fáze, C - stacionární fáze, D - fáze odumírání) [51]

3.3 Gramovo barvení

Na základě Gramovy reakce se bakterie dělí na Gram-pozitivní a Gram-negativní. Rozdíl mezi těmito skupinami je v tom, že Gram-pozitivní bakterie po usmrcení a odbarvení krystalovou violetí a mořením Lugolovým roztokem (roztok jodidu draselného) zadržují komplex krystalové violeti a jodidu draselného v buněčné stěně a neodbarvují se organickými rozpouštědly jako je například etanol. U skupiny Gram-pozitivních bakterií je tento komplex z buněčné stěny vymyt etanolem nebo acetonem. Pokud bychom dále v odbarvovacím procesu použili další barvivo jako je safranin nebo karbolfuchsin, zbarví se Gram-negativní bakterie do růžova až do červena a Gram-pozitivní zůstávají fialové. Gramovo barvení je základní metodou při určování rodů bakterií. Podkladem pro rozdílný výsledek Gramovy

reakce jsou rozdíly ve složení buněčné stěny u Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií. Mnohé rozdílné vlastnosti bakterií náležících do těchto dvou skupin jsou dány právě odlišnou strukturou buněčné stěny. [47]

3.3.1 Gram-pozitivní bakterie

Buněčná stěna Gram-pozitivních bakterií je silná, přibližně 20 nm, a je tvořena silnou vrstvou peptidoglykanu, kterou pronikají lineární řetězce teikoových kyselin spojené s cytoplazmatickou membránou. Teikoové kyseliny jsou hlavním povrchovým antigenem Gram-pozitivních bakterií. Buněčná stěna těchto bakterií neobsahuje lipidy ani bílkoviny. Výjimkou jsou jen mykobakterie, korynebakterie nebo nokardie, jejichž buněčná stěna může obsahovat mnoho lipidů a vosků. [47], [50]

V následujícím textu jsou blíže charakterizovány Gram-pozitivní bakterie, které byly použity v experimentální části práce pro studium vlivu mikroemulzí obsahujících monoacylglyceroly na růst mikroorganismů.

3.3.1.1 Rod *Bacillus*

Systematické zařazení bakterie- doména *Bacteria*, kmen *Firmicutes*, třída *Bacilli*, řád *Bacillales*, čeleď *Bacillaceae*.

Buňky rodu *Bacillus* mají většinou tvar rovných tyčinek o různé délce, uspořádaných buď ve dvojicích nebo v řetězcích se zakulacenými nebo čtvercovými konci. Pohybují se pomocí peritrichálních bičků. Bacily patří mezi bakterie, které jsou schopny tvořit endospory se značnou odolností k nepříznivým vlivům prostředí. Endospory jsou kulaté nebo oválné, klíčení spor obvykle nevyžaduje specifické aktivační faktory. Jsou to organizmy aerobní nebo fakultativně anaerobní s širokou diverzitou fyziologických schopností. Optimální růstová teplota se pohybuje mezi 15 až 55 °C. Několik druhů je patogenních pro obratlovce a pro bezobratlé nebo způsobuje potravinové otravy. [46], [52]

Bacillus cereus

B. cereus je velice rozšířený v prostředí a způsobuje gastroenteritidy. Netvoří pouzdro a roste ve velkých plstnatých koloniích. Má velkou řadu toxinů a faktorů virulence, produkuje fosfolipázu, hemolyziny a enterotoxiny. Běžně se vyskytuje v prostředí, v půdě,

v prachu, ve střevní mikroflóře, kde vyvolává manifestní onemocnění jen za určitých podmínek. Nejčastějším onemocněním jsou otravy z potravin, k jejichž vzniku je třeba požit značné množství bakterií. Tato bakterie je jedním z významných původců kažení potravin, převážně mléčných výrobků (př. sladké srážení mléka, hořknutí smetany) a vzhledem k produkci termorezistentních spor se podílí na kažení pasterovaných, případně sterilizovaných výrobků. Dále kontaminuje maso a potraviny rostlinného původu jako jsou těstoviny, rýže, zelenina, vařené brambory a další. [46], [52], [53], [54]

Bacillus subtilis

Je velice rozšířený v prostředí a často kontaminuje potraviny. Nezpůsobuje však otravy po požití jídla kontaminovaného touto bakterií a není považován za lidský patogen. Můžeme jej ale považovat za patogen skotu způsobující zánět vemene. Je často využíván jako přídatná látka do pracích prostředků. [53], [55]

3.3.1.2 Rod *Enterococcus*

Zařazení bakterie- doména *Bacteria*, kmen *Firmicutes*, třída *Bacilli*, řád *Lactobacillales*, čeleď *Enterococcaceae*.

Buňky tohoto rodu jsou sférické nebo ovoidní a často se vyskytují po dvou, ve shlucích nebo v krátkých řetězcích. Netvoří endospory ani pouzdra. Jsou fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní s fermentatorním metabolismem, proto vyžadují nutričně bohatá média. Hlavním produktem fermentace je L(+)-kyselina mléčná. Plyn se ale netvoří. Rostou většinou v rozmezí 10 až 45 °C nebo při pH 9,6. Enterokoky jsou široce rozšířeny v prostředí, ve fekáliích obratlovců, v potravinách a klinickém materiálu. Někdy mohou způsobit pyogenní infekce a jsou souhrnně označovány jako „mléčné koky“. Způsobují infekce močových cest a endokarditidy. Tvoří nezbytnou a prospěšnou část střevní mikroflóry a vyskytují se taky ve vagíně, zřídka i v horních dýchacích cestách. [46],[52], [53]

Enterococcus faecalis

Tato bakterie byla izolována z exkrementů (feces) člověka a teplokrevných živočichů. Buňky jsou většinou nehemolytické a vzácně tvoří β-hemolýzu. [56]

3.3.1.3 Rod *Micrococcus*

Zařazení bakterie- doména *Bacteria*, kmen *Actinobacteria*, třída *Actinobacteria*, řád *Actinomycetales*, čeleď *Micrococcaceae*.

Micrococcus luteus

Buňky bakterie mikrokoků jsou sférické a vyskytují se po dvou, ve čtveřicích nebo v nepravidelných shlucích, ale ne v řetízecích. Jsou nepohyblivé, nesporulující a striktně aerobní. Rostou na běžných médiích. Optimální růstová teplota je v rozmezí 25 až 37 °C. Vyskytují se hlavně na kůži savců, v prostředí a v potravinách. Jsou považovány za nepatogenní. Na agarových půdách mohou mikrokoky vytvářet žluté, oranžové až červené kolonie. *Micrococcus luteus* je žlutě pigmentující. [52], [53]

3.3.1.4 Rod *Staphylococcus*

Zařazení bakterie- doména Bacteria, kmen *Firmicutes*, třída *Bacilli*, řád *Bacillales*, čeleď *Staphylococcaceae*.

Buňky jsou sférické, vyskytují se jednotlivě, po dvou a v nepravidelných shlucích, občas v tetradách. Jsou nepohyblivé, nesportující, fakultativně anaerobní a chemoorganotrofní. Kolonie jsou obvykle neprůhledné, taky ale mohou být bílé, krémové nebo až žluté a žlutočervené. Optimální růstová teplota je 30 až 37 °C. Patří mezi všudy přítomné bakterie. [46], [53]

Staphylococcus aureus

Tato bakterie je nejúspěšnějším lidským patogenem s velkým spektrem onemocnění od nejběžnějších hnisavých onemocnění kůže až po sepsi a intoxikaci. Je rovněž komenzálem teplotokrevných živočichů a člověka. Nejčastěji kontaminuje mléčné výrobky, lahůdky, maso, šunky, ryby, pudinky, salátové dresinky a mořské plody. Největší riziko kontaminace je u potravin s vysokým podílem ruční práce. Pomnožuje se v potravinách ponechaných delší dobu při pokojové teplotě. [46], [53], [57]

3.3.2 Gram-negativní bakterie

Stěna Gram-negativních bakterií je sice tenčí než stěna Gram-pozitivních (asi 10 nm), ale na druhou stranu je podstatně složitější. Je tvořena tenkou vrstvou peptidoglykanu, nad níž je membrána se strukturou podobnou jiným biologickým membránám. Označujeme ji jako vnější membránu a skládá se z dvojvrstvy fosfolipidů a bílkovin. Vnější membrána je spojena s peptidoglykanem molekulami lipoproteinu a na povrchu této membrány jsou lokalizovány lipopolysacharidy, které udávají buňce antigenní vlastnosti. Mezi vnější membrá-

nou a peptidoglykanem je tzv. periplazmatický prostor. Obsah lipidů v buněčné stěně je příčinou zvýšené odolnosti k aniontovým povrchově aktivním látkám (např. mýdla). Buněčná stěna je křehčí než u Gram-pozitivních bakterií, ale je odolnější. [47], [50]

V následujícím textu jsou blíže charakterizovány Gram-negativní bakterie, které byly použity v experimentální části práce pro studium vlivu mikroemulzí obsahujících monoacylglyceroly na růst mikroorganismů.

3.3.2.1 Rod *Citrobacter*

Zařazení bakterie- doména *Bacteria*, kmen *Proteobacteria*, třída *Gammaproteobacteria*, řád *Enterobacteriales*, čeleď *Enterobacteriaceae*.

Bakteriální buňka je ve tvaru tyčinek, je buď nepohyblivá nebo pohyblivá pomocí peritrichálních bičičků, netvoří endospory ani cysty. Je fakultativně anaerobní a chemoorganotrofní. Optimální teplota růstu je 37 °C., ale jsou i výjimky bakterií tohoto rodu, které rostou i při nižších teplotách. Nachází se ve stolici člověka a zvířat. Často bývá izolován z klinického materiálu jako patogen. Dále se vyskytuje v půdě, v potravinách a odpadní vodě. Může způsobovat bakteriémie až sepse, meningitidy a mozkové abscesy. [46], [53]

Citrobacter freundii

C. freundii způsobuje celou řadu infekcí, avšak pouze u osob se sníženou imunitu. Jedná se tedy o oportunně patogenní bakterii. Tuto bakterii můžeme nalézt v půdě, ve vodě, v kanalizaci a důležitým úkolem těchto mikroorganismů je redukování dusičnanů na dusitany, což je velmi důležité pro cyklus dusíku. [58]

3.3.2.2 Rod *Escherichia*

Zařazení bakterie- doména *Bacteria*, kmen *Proteobacteria*, třída *Gammaproteobacteria*, řád *Enterobacteriales*, čeleď *Enterobacteriaceae*.

Základní charakteristika rodu *Escherichia* je stejná jako u rodu *Citrobacter*, oba mikroorganismy náleží ke stejné čeledi *Enterobacteriaceae* a mají tak řadu společných znaků. *Escherichie* se vyskytují jako normální flóra v koncové části střevního traktu teplokrevných živočichů. Jsou to fakultativně anaerobní, bičikaté bakterie a zajišťují svému hostiteli

příjem vitamínu K. Některé kmeny escherichií jsou pro člověka patogenní. Způsobují infekce močových cest a trávicího traktu. [46], [53]

Escherichia coli

Některé kmeny *E. coli* mohou produkovat enterotoxiny nebo jiné faktory patogenity a virulence, způsobující průjmová onemocnění. Jsou také původcem onemocnění močových cest. V potravinářství a vodárenství je *E. coli* využívána jako indikátorový mikroorganismus sanitace a dodržování hygienických podmínek. [52], [53]

3.3.2.3 Rod *Pseudomonas*

Zařazení bakterie- doména *Bacteria*, kmen *Proteobacteria*, třída *Gammaproteobacteria*, řád *Pseudomonadales*, čeleď *Pseudomonadaceae*.

Buňky zde mají tvar rovných nebo mírně zakřivených tyček. Mnoho druhů akumuluje poly- β -hydroxybutyrát jako rezervní materiál. Pseudomonády mají polární bičíky, které jsou jen zřídka nepohyblivé. Jsou mikroorganismy chemoorganotrofní a aerobní se striktně respiratorním typem metabolismu, kdy kyslík je konečným akceptorem elektronů. Většina druhů nevyžaduje žádné růstové faktory. [46], [53]

Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa se vyskytuje v půdě, vodě, klinickém materiálu a může být patogenní i pro rostliny. Je u ní také známá řada celulárních i extracelulárních složek působících jako faktory virulence. [53]

3.3.2.4 Rod *Salmonella*

Zařazení bakterie- doména *Bacteria*, kmen *Proteobacteria*, třída *Gammaproteobacteria*, řád *Enterobacteriales*, čeleď *Enterobacteriaceae*.

Bakterii *Salmonella enterica* můžeme zařadit stejně jako bakterie *Citrobacter freundii* a *Escherichia coli* do čeledi *Enterobacteriaceae*. Základní charakteristika je tedy totožná. Všechny salmonely mají určité kultivační, biochemické a sérologické vlastnosti společné, ale nemají stejného hostitele a u lidí způsobují rozdílná onemocnění. Vyskytuje se u člověka, teplokrevných a studenkrevných živočichů, v potravinách a v prostředí. Jsou patogenní pro člověka i pro mnohá zvířata. Jsou to infekční agens tyfu, střevních horeček, gastroenteritid a septikemií. Nejčastěji však salmonely způsobují průjmová onemocnění. [46], [52], [53]

Salmonella enterica

Druh *S. enterica* několik sérovarů vyvolávajících onemocnění s různými klinickými projevy, a to gastroenteritidu, bakteriémií, střevní horečku a asymptomatické bacilonosičství. Druh obsahuje především původce onemocnění zvířat (zoopatogenní salmonely), které kontaminují potraviny živočišného původu a u člověka vyvolávají akutní gastroenteritidy. K nákaze obvykle dojde při konzumaci potravin kontaminovaných infikovanými výkaly nebo při kontaktu s infikovaným zvířetem nebo člověkem. Mezi potraviny, které představují větší riziko, patří maso, drůbež a mléčné a vaječné výrobky. [59]

3.3.2.5 Rod *Serratia*

Zařazení bakterie- doména *Bacteria*, kmen *Proteobacteria*, třída *Gammaproteobacteria*, řád *Enterobacteriales*, čeleď *Enterobacteriaceae*.

Základní vlastnosti serracií jsou totožné s ostatními zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*. Některé druhy tvoří červený pigment. Vyskytují se v humánním klinickém materiálu, na povrchu rostlin, ve vodě, v půdě a v podstatě v celém prostředí. Dále také ve střevním traktu hlodavců a hmyzu. [46], [53]

Serratia marcescens

S. marcescens je významným oportunním patogenem pro hospitalizované pacienty. Způsobuje taky septikémie, infekce močových cest, různé infekce zvířat a je častým původcem nozokomiálních infekcí. [53]

PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE

4.1 Použité materiály a chemikálie

Monoacylglyceroly

Monoacylglyceroly (MAG) byly vyrobeny adicí mastné kyseliny na glycidol za katalytického působení chromitých iontů. Monoacylglyceroly použité v experimentální části bakalářské práce byly připraveny v laboratořích Ústavu Technologie Tuků, Tenzidů a Kosmetiky.

Pro přípravu mikroemulzí byly použity následující MAG:

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

Surfaktant

- Propanol (propan-1-ol) (C₃H₈O)

Kosurfaktant

- Tween 80 (sorbitan monooleát), neionický surfaktant, HLB 15

4.2 Použité mikroorganismy a kultivační média

Pro sledování antimikrobiálních účinků připravených mikroemulzí byly použity následující kmeny bakterií získané z České sbírky mikroorganismů (CCM):

- *Bacillus cereus* CCM 2010
- *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062
- *Citrobacter freundii* CCM 7187
- *Enterococcus faecalis* CCM 4224

- *Escherichia coli* CCM 3954
- *Micrococcus luteus* CCM 732
- *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420
- *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303
- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953

Všechny bakteriální kmeny, které byly použity v experimentální části bakalářské práce, byly uchovávány na masopeptonovém agaru (MPA) při teplotě 4 ± 2 °C. Kultivační médium MPA mělo následující složení:

Beef extract (HiMedia)	3,0 g
Pepton (HiMedia)	5,0 g
Agar.....	15,0 g
NaCl (Lach-Ner)	5,0 g
destilovaná voda	1000 ml
Konečné pH (při 25 °C) bylo upraveno na hodnotu $6,8 \pm 0,2$.	

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

Beef extract (HiMedia)	3,0 g
Pepton (HiMedia)	5,0 g
NaCl (Lach-Ner)	5,0 g
destilovaná voda	1000 ml
Konečné pH (při 25 °C) bylo upraveno na hodnotu $7\pm 0,2$.	

4.3 Použité přístroje, zařízení a pomůcky

- Analytické váhy Sartorius, BA 110
- Vortex Heidolph, Reax top

- Biohazard box EUROFLOW (Clean Air)
- Autokláv Varioklav H+P
- Biologický termostat Memmert INE 600
- Přístroj Microplate Reader Benchmark (Bio-Rad, USA)
- Software Microplate Manager 5.2.1. (Bio-Rad, USA)
- Automatické mikropipety (100-1000 μ l, 0,5-10 μ l)
- Laboratorní sklo (kádinky, zkumavky, pipety)
- Laboratorní plasty (zkumavky, stříkačky, mikrotitrační destičky, očkovací kličky, špičky pro automatické mikropipety)
- Stříkačkové filtry o velikosti pórů 0,22 μ m
- Ostatní běžné laboratorní pomůcky a vybavení.

4.4 Dekontaminace použitého materiálu

Všechno, co bylo použito při laboratorní práci, tzn. veškerý materiál jako plasty, sklo, mikrotitrační destičky, špičky atd., bylo dekontaminováno v autoklávu při 132 °C po dobu 20 minut.

4.5 Příprava mikroemulzí

Mikroemulze, pro testování antibakteriálních účinků, byly připraveny následujícím postupem. Jako alkohol byl použit propanol (propan-1-ol), dále byl použit jako surfaktant Tween 80, který je vhodný pro systémy tvořící emulze typu olej ve vodě O/V, díky své hodnotě HLB 15. Nejprve byl připraven roztok MAG v propanolu navážením 1 g monoacylglycerolu do 5 ml propanolu. Poté se připravil roztok surfaktantu ve vodě. Naváží se 2,25 g Tween 80 a přidá se 20 ml destilované vody. Následně se vzniklý roztok promíchal na vortexu. Po promíchání se roztok tweenu sterilizoval filtrací přes 0,22 μ m sterilní filtr do sterilní plastové zkumavky pro odstranění potenciální mikrobiologické kontaminace. Plastová zkumavka byla předem sterilizována pomocí UV záření po dobu cca 15 minut. Dále se do 20 ml filtrovaného roztoku tweenu ve vodě přidalo 250 μ l roztoku MAG

v propanolu. Po přidání jednotlivých složek byla provedena důkladná homogenizace s použitím vortexu.

Připravena byla také mikroemulze pro slepý pokus, která neobsahovala monoaclyglycerol, ale pouze 250 μ l propanolu, 2,25 g Tween 80 a 20 ml destilované vody.

4.6 Příprava bakteriální suspenze

Bakteriální suspenze byly připraveny zaočkováním tekutého média (MPB) a kultivací bakterií. Pro experiment bylo použito 5 Gram-pozitivních a 5 Gram-negativních druhů bakterií. Pomocí kličky, která byla vysterilizována nad plamenem kahanu, byl odebrán vzorek zásobních bakteriálních kultur na Petriho miskách a ty byly následně zaočkovány do 6 ml MPB ve zkumavkách. Kultivace bakterií probíhala v termostatu při 30 °C po dobu 24 hodin.

4.7 Příprava mikrotitrační destičky

Připravená mikroemulze byla pipetována v daném množství do zkumavek s odpovídajícím množstvím sterilního MPB do celkového objemu roztoku 4 ml. Přesný pipetovaný objem obou komponent a výsledná koncentrace roztoků je uvedena v *Tab. 2*. Dále se takto připravené roztoky pipetovaly do jamek mikrotitrační destičky pomocí mikropipety v objemu 200 μ l a zaočkovávaly se 5 μ l bakteriální suspenze. Vedle sebe byly vždy dvě stejné koncentrace pro jednu suspenzi bakterií, aby každá hodnota byla naměřena dvakrát. Součástí destičky byla i negativní a pozitivní kontrola. Jako pozitivní kontrola sloužil čistý MPB, ve kterém nebyla obsažena mikroemulze s příslušným MAG. Čistý MPB byl pouze zaočkován danou bakteriální suspenzí. U pozitivní kontroly se nepředpokládá žádný inhibiční účinek na růst bakterií. Připravený masopeptonový bujón s mikroemulzemi obsahující MAG bez zaočkování příslušnou bakteriální suspenzí představoval negativní kontrolu. Zde se neočekával žádný bakteriální růst. Takto připravená mikrotitrační destička byla kultivována při laboratorní teplotě po dobu 24 hod v přístroji Microplate Reader Benchmark, pomocí softwaru Microplate Manager 5.2.1. byla ve 30-ti minutových intervalech měřena hodnota optické hustoty při 655 nm (OD_{655}). Před každým měřením se vzorky 10 sekund protřepávaly.

Z naměřených hodnot byly vypočítány průměry a z nich byly sestrojeny růstové křivky. Rozdíly v růstu bakterií v čistém médiu a v médiu s příslušnou koncentrací mikroemulze byly hodnoceny jako index růstu (IR) po 15 hodinách kultivace. Index růstu byl vypočítán podle vztahu dle Blaszyk a Holley (1):

$$IR (\%) = \frac{OD_{655} - OD_{NK}}{OD_{PK}} * 100 \quad (1)$$

Kde:

IR.....index růstu buněk

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

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

OD_{PK}...hodnota zákalu pozitivní kontroly

Tab. 2. Poměry množství mikroemulze a MPB

Roztok	Koncentrace MAG v roztoku [µg/ml]	Množství mikroemulze [ml]	Množství MPB[ml]
1	1500	2,4	1,6
2	1250	2	2
3	1000	1,6	2,4
4	750	1,2	2,8
5	500	0,8	3,2
6	250	0,4	3,6
7	100	0,160	3,840

5 VÝSLEDKY

5.1 Vliv mikroemulzní s monoacylglyceroly na růst bakterií

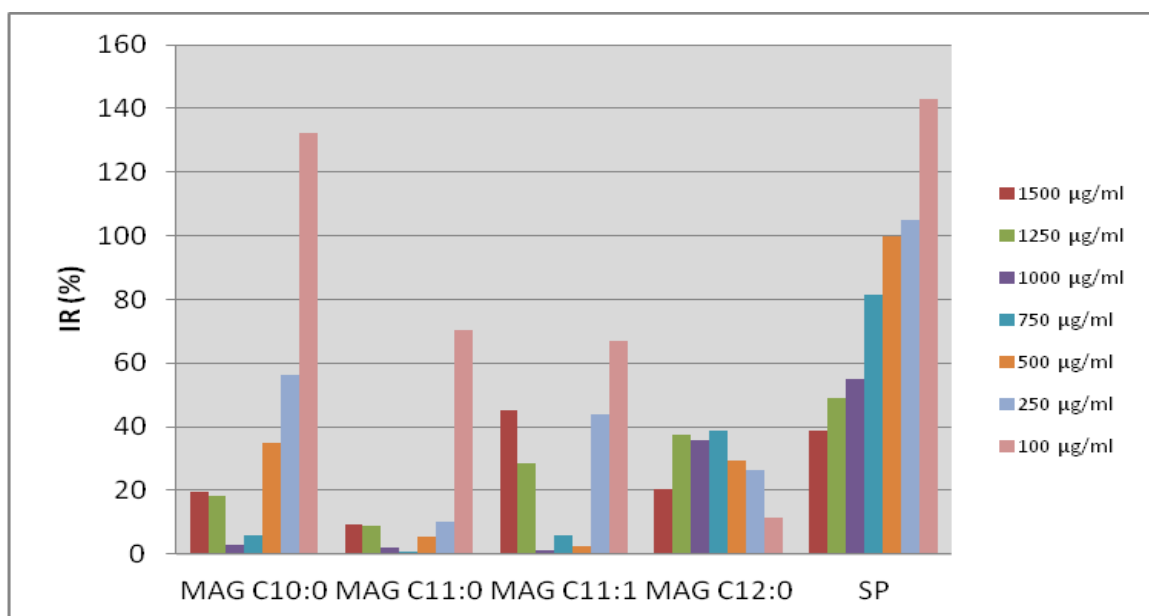
Pro praktickou část bakalářské práce byla vybrána skupina sedmi monoacylglycerolů, které se liší typem navázané mastné kyseliny. Testovány byly MAG nasycených mastných kyselin se sudým počtem uhlíků (MAG kyseliny kaprinové MAG C_{10:0}, MAG kyseliny laurové MAG C_{12:0}), nasycených mastných kyselin s lichým počtem uhlíků (MAG kyseliny undekanové MAG C_{11:0}) a nenasyčených mastných kyselin (MAG kyseliny undecenové MAG C_{11:1}). Těchto pět MAG bylo testováno na deseti bakteriích, pěti Gram-pozitivních a pěti Gram-negativních. Poté byl růst bakterií hodnocen v tekutém médiu jako změna optické denzity suspenze buněk při 655 nm. Dále byly sestrojeny růstové křivky. Všechny růstové křivky jsou znázorněny v přílohovém materiálu. Z vyhodnocených dat byly dále spočítány indexy růstu (IR), jejichž srovnáním byly vyjádřeny antimikrobní účinky monoacylglycerolů, a následně byly graficky znázorněny.

5.1.1 Vliv monoacylglycerolů na Gram-pozitivní bakterie

5.1.1.1 Vliv mikroemulzní s MAG na růst *Bacillus cereus* CCM 2010

Vliv mikroemulzí s monoacylglyceroly na růst bakterií byl sledován v rozmezí koncentrací 100 – 1500 mg/ml. Po 15 hodinách kultivace vykazovaly největší inhibiční účinky mikroemulze s MAG C_{10:0}, MAG C_{11:0} a MAG C_{11:1}. Inhibiční účinek byl výrazný především v koncentracích vyšších než 250 µg/ml (Obr. 6.). U mikroemulze s MAG C_{12:0} a u slepého pokusu (SP), kde nebyl použit žádný monoacylglycerol, byly inhibiční účinky výrazně menší. Nejmenší inhibice byla zaznamenána pro všechny monoacylglyceroly u koncentraci 100 µl/ml, kde se index růstu pohyboval mezi 130 – 140 %.

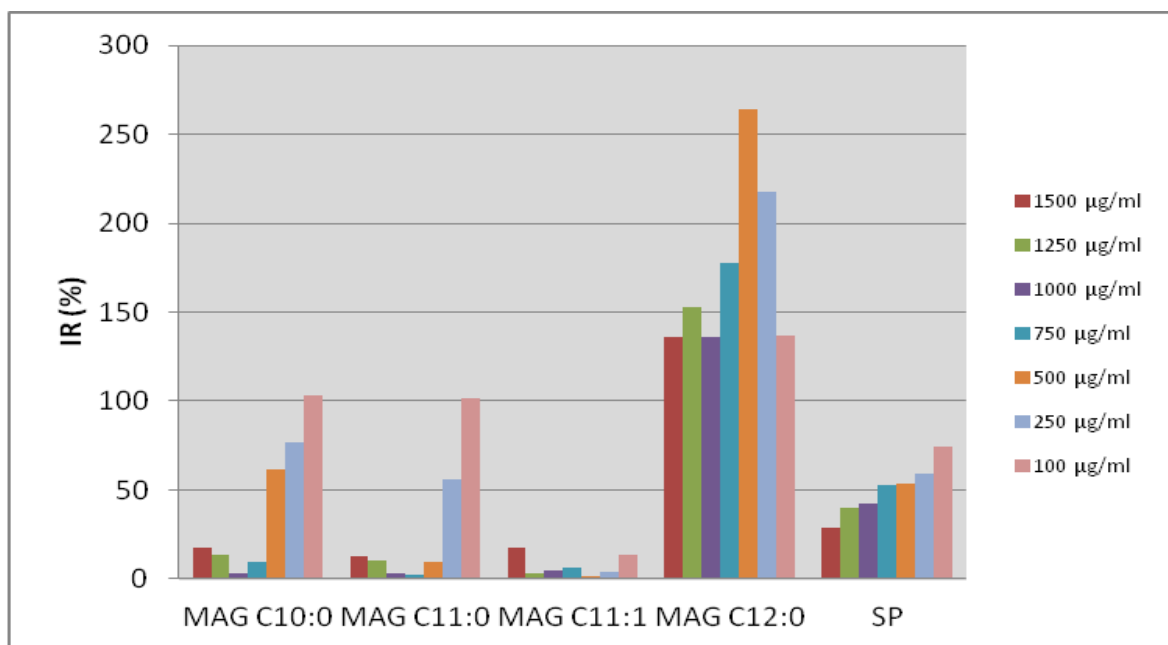
Z grafu je rovněž patné, že i mikroemulze bez přídavku monoacylglycerolu, tedy slepý pokus, má ve vyšších testovaných koncentracích inhibiční vliv na růst mikroorganismů. Lze ale konstatovat, že přidáním MAG do kompozice mikroemulze se inhibiční aktivita zvyšuje. V přítomnosti mikroemulze bez MAG v koncentraci 750 µg/ml dosáhl index růstu *B. cereus* hodnoty 80 %, po přidání MAG C_{10:0} do emulze byl IR pro stejnou koncentraci nižší než 10 %. K podobnému zvýšení antibakteriální aktivity mikroemulze došlo i po přidání MAG C_{11:0} a MAG C_{11:1}. U MAG C_{12:0} nebylo snížení IR tak výrazné.



Obr. 6. Vliv mikroemulzí s monoacylglyceroly na růst buněk *Bacillus cereus* CCM 2010 po 15-ti hodinách kultivace.

5.1.1.2 Vliv mikroemulzí sMAG na růst *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062

Na Obr. 7. můžeme pozorovat, jaký inhibiční účinek vykazovaly jednotlivé mikroemulze s MAG a slepý pokus na *B. subtilis*. Stejně jako u *B. cereus*, měly i na tuto bakterii největší inhibiční vliv mikroemulze s MAG C_{10:0}, MAG C_{11:0} a MAG C_{11:1}. Mikroemulze s MAG C_{11:1} působila inhibičně v celém rozmezí koncentrací a hodnoty indexu růstu při všech testovaných koncentracích nepřesáhly 20 %. Nejméně inhibičně působila mikroemulze s MAG C_{12:0}. V přítomnosti mikroemulze s MAG C_{12:0} byl dokonce index růstu zvýšen oproti kontrolnímu vzorku a zdá se tedy, že tato mikroemulze má na růst *B. subtilis* spíše stimulační vliv. Mikroemulze s tímto monoacylglycerolem měla dokonce horší inhibiční účinky než slepý pokus bez MAG. Toto zjištění je poněkud překvapivé vzhledem k tomu, že samotný MAG C_{12:0} inhibuje růst bakterií rodu *Bacillus*. Úplnou inhibici bacilů monoacylglycerolem mastné kyseliny s 12 uhlíky v řetězci prokázala například Buňková a kol. [40]. Zdá se tedy, že složky mikroemulze potlačují inhibiční působení MAG C_{12:0} na *B. subtilis*.

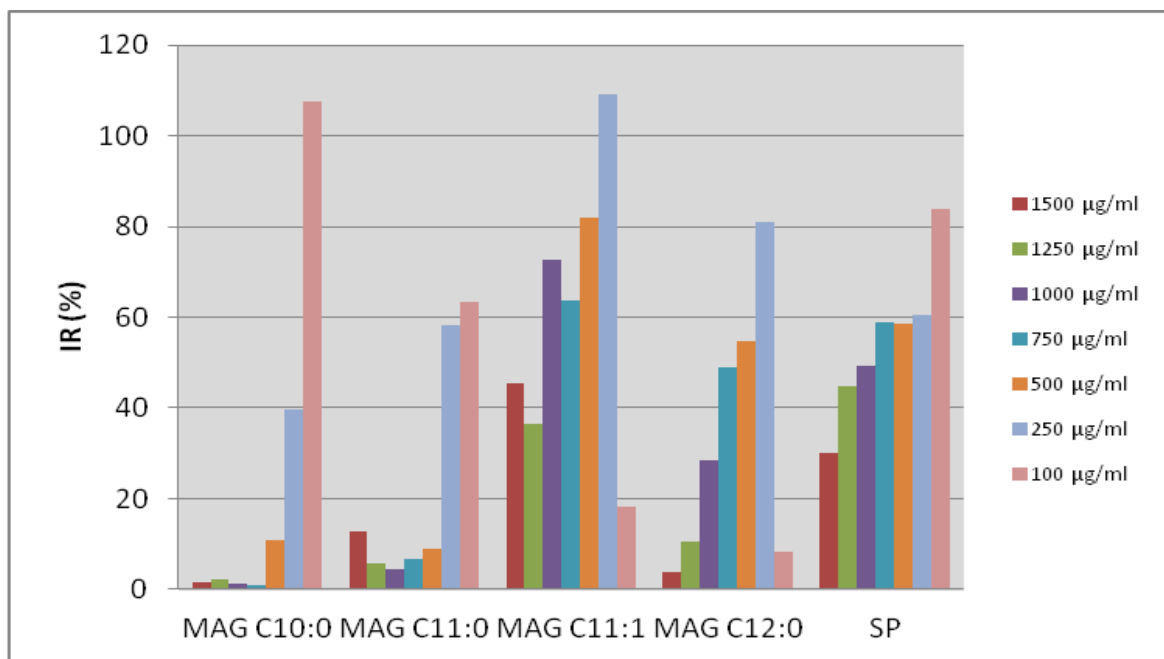


Obr. 7. Vliv mikroemulzí s monoacylglyceroly na růst buněk *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062 po 15-ti hodinách kultivace.

5.1.1.3 Vliv mikroemulzní s MAG na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224

Bakterie *Enterococcus faecalis* je oproti předešlým bakteriím vůči mikroemulzním s MAG odolnější, jak ukazuje i Obr. 8. Enterokoky jsou všeobecně považovány za bakterie se značnou fyziologickou odolností. Rostou v přítomnosti 6,5 % NaCl, při pH 9,6 a v přítomnosti 40 % žluče. Jsou dokonce i odolné vůči zvýšeným teplotám a při teplotě 60 °C přežívají až 30 minut. [60]

Největší inhibiční účinky vykazovala mikroemulze s MAG C_{10:0}, kde se index růstu u koncentrací 750, 1000, 1250 a 1500 µg/ml pohyboval v rozmezí 1 – 2 %. Přijatelnou antibakteriální aktivitu měla i mikroemulze s MAG C_{11:0}, v jejíž přítomnosti klesl index růstu až na přibližně 5 %. Nejvíce odolná byla bakterie k mikroemulzi s MAG C_{11:1}.

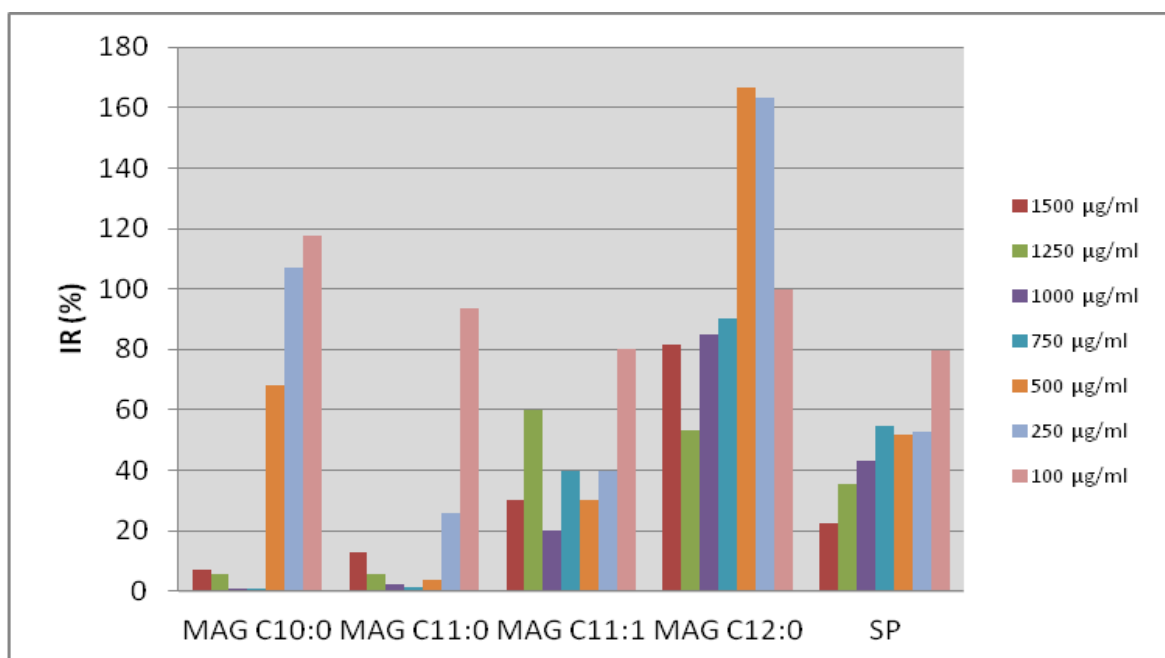


Obr. 8. Vliv mikroemulzí s monoacylglyceroly na růst buněk *Enterococcus faecalis* CCM 4224 po 15-ti hodinách kultivace.

5.1.1.4 Vliv MAG na růst *Micrococcus luteus* CCM 732

Pro studium účinků vybraných monoacylglycerolů na růst *Micrococcus luteus* CCM 732 byla zvolena škála koncentrací MAG 100 – 1500 µg/ml. Hodnoty indexu růstu po 15-ti hodinách jsou znázorněny na Obr.9. S výjimkou mikroemulze s monoacylglycerolem kyseliny laurové (MAG C_{12:0}), která působí inhibičně jen ve vyšších testovaných koncentra-

cích 750 – 1500 $\mu\text{g/ml}$, byly všechny ostatní mikroemulze s MAG účinné v relativně nízkých koncentracích. Nejlépe inhibičně působila mikroemulze s MAG kyseliny s 11 uhlíky v řetězci (MAG C_{11:0}), kdy v koncentraci 750 $\mu\text{g/ml}$ byl index růstu snížen na 1 %. Značná aktivita tohoto MAG byla zjištěna v práci Buňkové a kol. [40]. V této studii způsobil MAG C_{11:0} a MAG C_{12:0} kompletní inhibici růstu už v nejnižší testované koncentraci 25 $\mu\text{g/ml}$

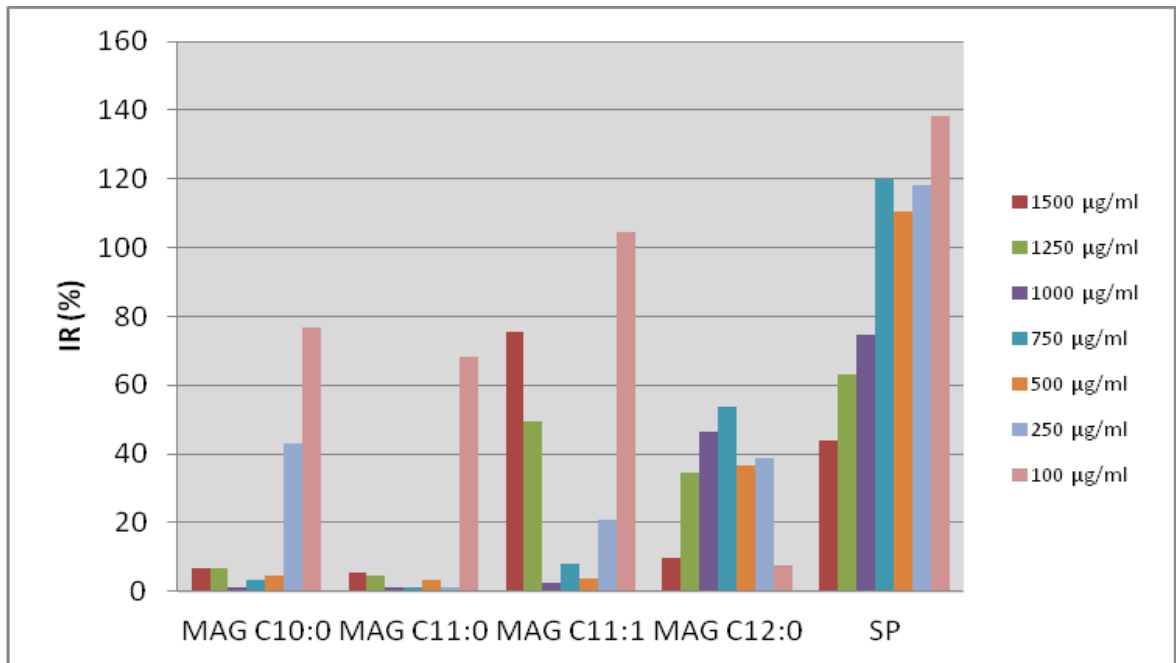


Obr. 9. Vliv mikroemulzí s monoacylglyceroly na růst buněk *Micrococcus luteus* CCM 732 po 15-ti hodinách kultivace.

5.1.1.5 Vliv mikroemulzí s MAG na růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953

Posledním Gram-pozitivním druhem, který byl testován na citlivost k působení monoacylglycerolů, byl *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 a rozmezí testovaných koncentrací bylo 100 -1500 $\mu\text{g/ml}$. Hodnoty indexu růstu jsou zaznamenány na Obr. 6. Bylo zjištěno, že na bakterii *S. aureus* subsp. *aureus* působily inhibičně všechny mikroemulze s MAG, mikroemulze bez přídavku MAG (slepý pokus), snižovala nárůst bakterií až v koncentracích vyšších než 1000 $\mu\text{g/ml}$. Nejnižší index růstu byl zaznamenán u mikroemulze s monoacylglycerolem kyseliny undekanové, 1 %. Schopnost MAG C_{11:0} bránit

růstu *S. aureus* byla prokázána i v práci Buňkové a kol. [40] tato bakterie nerostla v přítomnosti MAG kyseliny undekanové v koncentracích vyšších než 100 µg/ml.

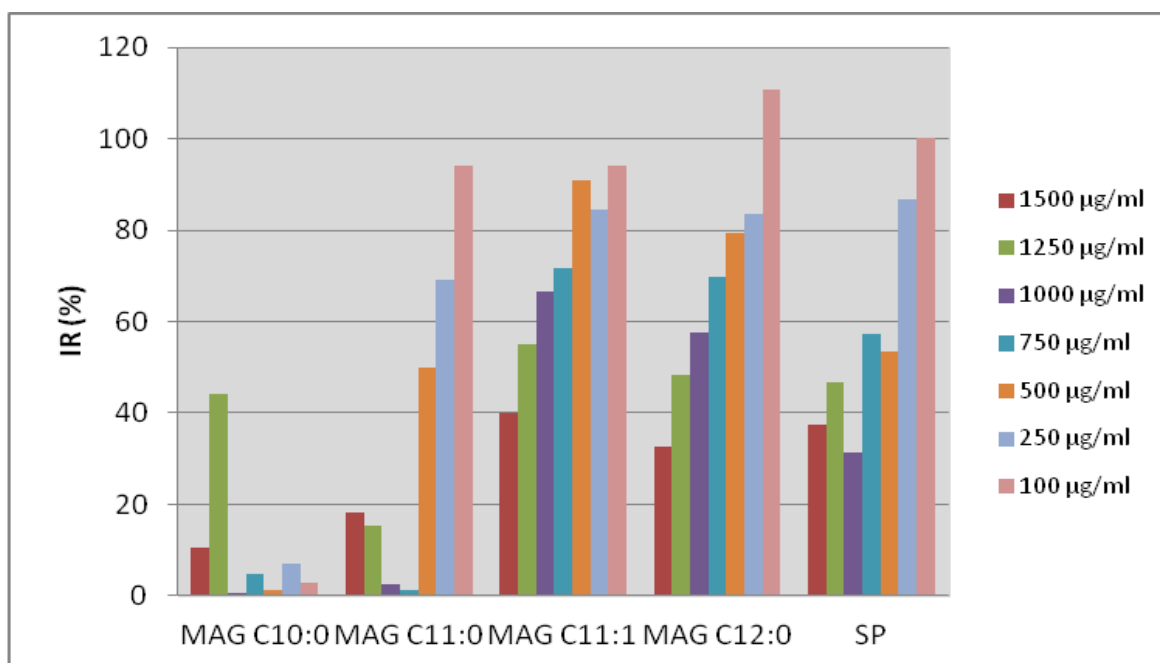


Obr. 10. Vliv mikroemulzí s monoacylglyceroly na růst buněk *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 po 15-ti hodinách kultivace.

5.1.2 Vliv mikroemulzní s monoacylglyceroly na Gram-negativní bakterie

5.1.2.1 Vliv mikroemulzní s MAG na růst *Citrobacter freundii* CCM 7187

V případě vlivu mikroemulzí s MAG na růst bakterie *Citrobacter freundii*, s výjimkou monoacylglycerolu kyseliny kaprinové, která působila inhibičně ve všech koncentracích, a taky částečně mikroemulze s MAG kyseliny undekanové, která má největší inhibiční účinky v koncentracích 750, 1000, 1250 a 1500 $\mu\text{g/ml}$, byly ostatní testované MAG málo účinné. Podobně jako u dalších testovaných bakterií, i u *C. freundii* byly nejslabší antibakteriální účinky zaznamenány pro mikroemulzi s MAG $\text{C}_{12:0}$ index růstu nižší než 50 % byl dosažen až při nejvyšší testované koncentraci 1500 $\mu\text{g/ml}$.

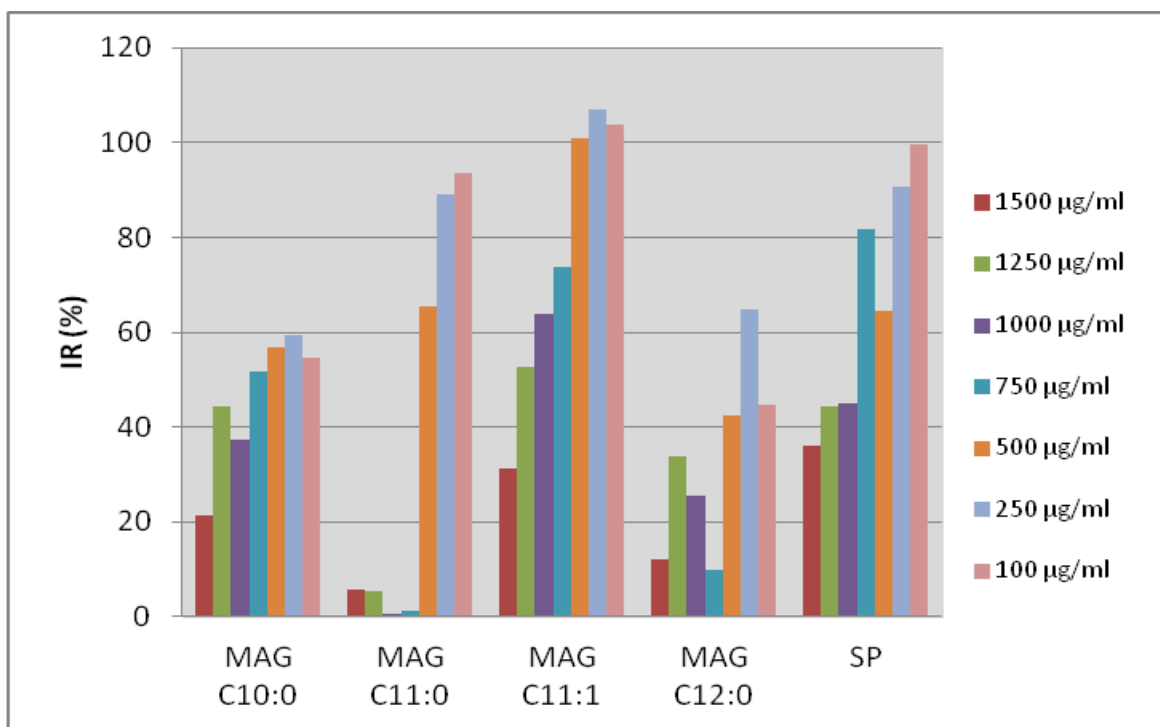


Obr. 11. Vliv mikroemulzí s monoacylglyceroly na růst buněk *Citrobacter freundii* CCM 7187 po 15-ti hodinách kultivace.

5.1.2.2 Vliv mikroemulzní s MAG na růst *Escherichia coli* CCM 3954

Pro sledování účinků mikroemulzí s MAG na růst *Escherichia coli* CCM 3954 byly zvoleny stejné koncentrace MAG jako v případě *Citrobacter freundii*. Výsledky vyjádřené jako index růstu uvádí Obr. 12. Bylo zjištěno, že bakterie *E. coli* je poměrně odolná. Nej-

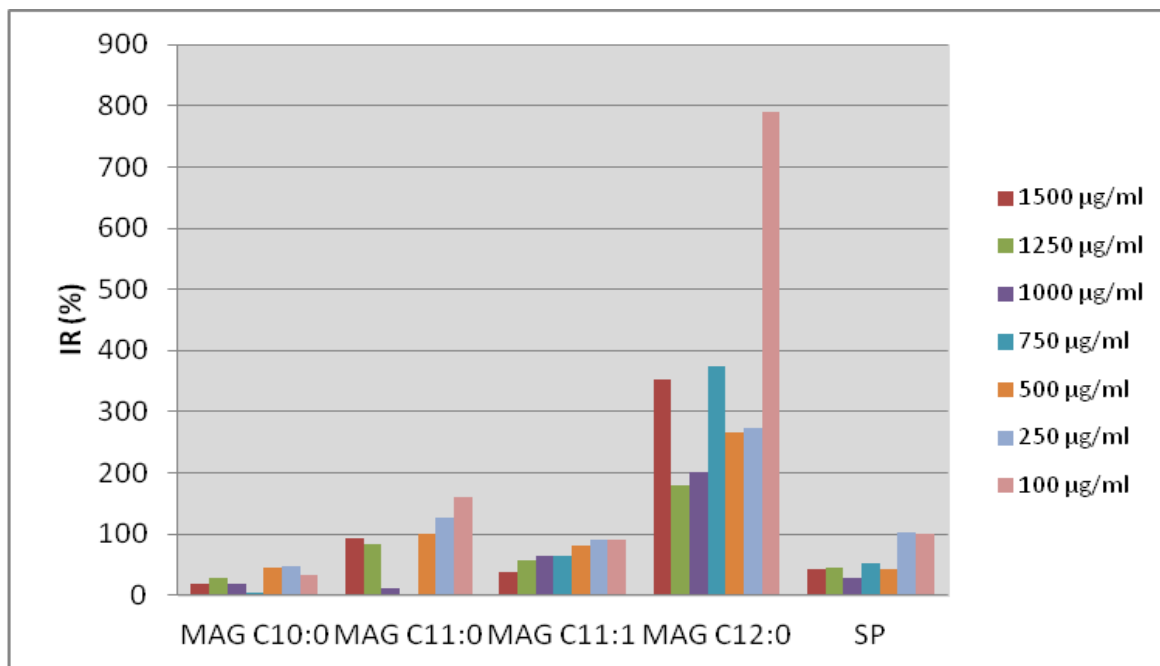
lepších výsledků dosahuje mikroemulze s MAG C_{11:0} v rozmezí koncentrací 750 – 1500 µg/ml. Index růstu se zde snížil až na necelé 1 %. Méně uspokojivé byly výsledky mikroemulze s monoacylglycerolem kyseliny undecenové (MAG C_{11:1}), kde byla prokázána inhibice až ve vyšších koncentracích, kdežto při koncentracích nižších byl index růstu přibližně 100 %.



Obr. 12. Vliv monoacylglycerolů na růst buněk *Escherichia coli* CCM 3954 po 15-ti hodinách kultivace.

5.1.2.3 Vliv mikroemulzní s MAG na růst *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955

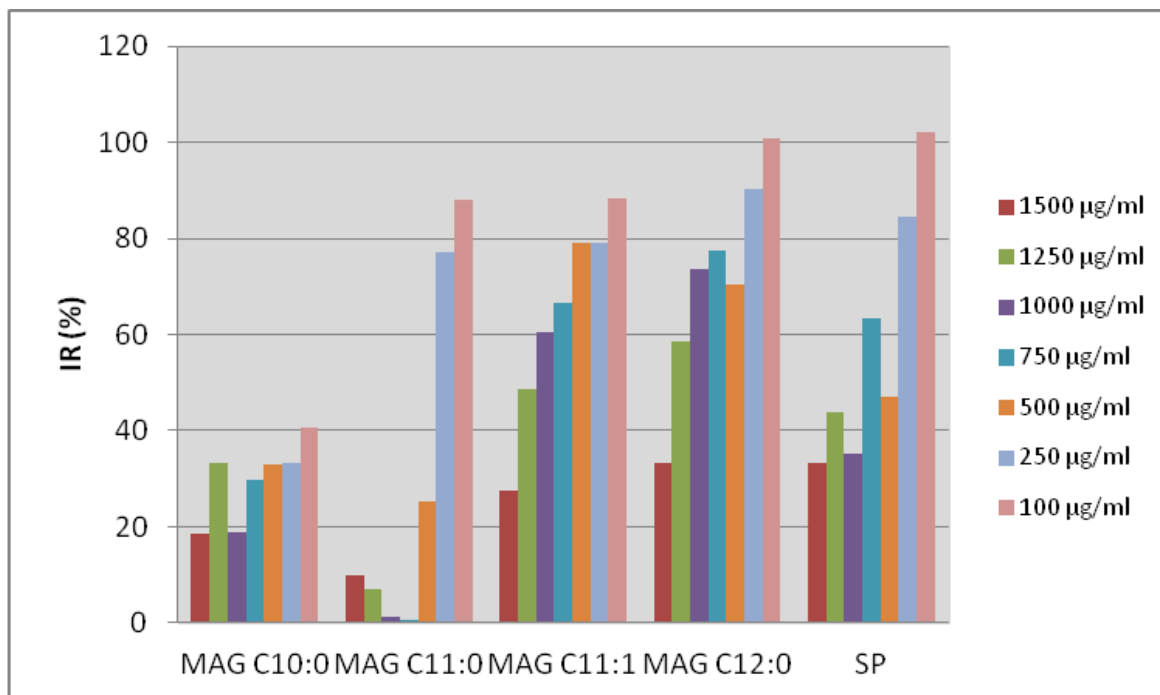
Na Obr. 13. můžeme pozorovat, že bakterie *Pseudomonas aeruginosa* je také odolná vůči mikroemulzím s MAG, podobně jako *E. coli*. Částečná inhibice růstu byla pozorována u všech mikroemulzí s MAG, s výjimkou monoacylglycerolu s 12 uhlíky v řetězci, kde byl ve všech testovaných koncentracích zaznamenán index růstu vyšší než v kontrolním vzorku. Nejmenší indexy růstů měla mikroemulze s MAG C_{10:0}. V koncentraci 750 µg/ml index růstu dosahoval pouhých 4 %.



Obr. 13. Vliv mikroemulzí s monoacylglyceroly na růst buněk *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 po 15-ti hodinách kultivace.

5.1.2.4 Vliv mikroemulzní s MAG na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

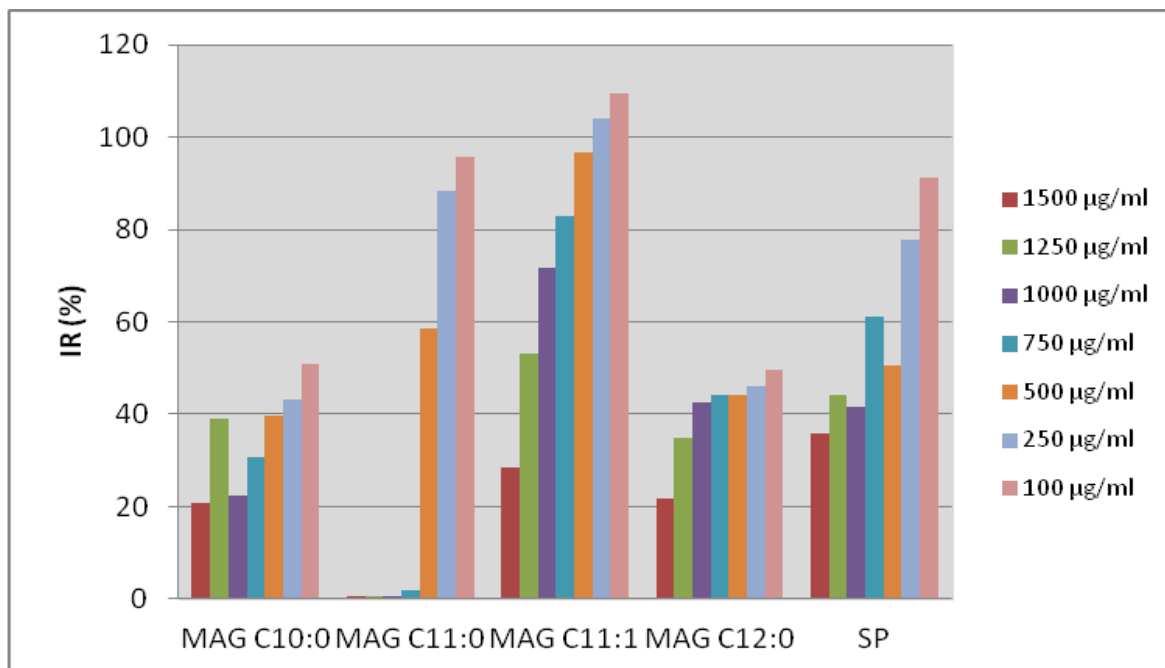
Účinek vybraných monoacylglycerolů v rozmezí koncentrací 100 - 1500 µg/ml byl sledován na buňkách *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 (Obr. 14.). Nejvyšší antibakteriální aktivita byla pozorována u mikroemulzí s MAG C_{11:0} a MAG C_{10:0}. K téměř úplné inhibici růstu studovaného kmene vedla aplikace mikroemulze s MAG kyseliny undekanové při koncentraci 750 a 1000 µg/ml. Index růstu byl 3 %, respektive 11 %.



Obr. 14. Vliv mikroemulzí s monoacylglycerolů na růst buněk *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 po 15-ti hodinách kultivace.

5.1.2.5 Vliv mikroemulzí s MAG na růst *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303

Na Obr. 15 je graficky znázorněn index růstu buněk *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303 po 15-ti hodinách kultivace v přítomnosti testovaných monoacylglycerolů. Tato Gram-negativní bakterie, stejně jako i Gram-negativní druhy, je vůči monoacylglycerolům odolnější než bakterie Gram-positivní. Z grafu lze vyčíst, že mikroemulze s MAG C_{11:1} měla nejmenší inhibiční účinky. U koncentrace 100 µg/ml index růstu dosahuje 110 %. Nejúčinnějším antibakteriálním agens byla mikroemulze s MAG kyseliny s 11 uhlíky v řetězci (MAG C_{11:0}), kdy při koncentraci 1000 µg/ml byl index růstu pouhých 0,4 %. Při nižších testovaných koncentracích (100 - 500 µg/ml) se index růstu pohyboval v rozmezí 60 - 95 %.



Obr. 15. Vliv mikromeulzí s monoacylglyceroly na růst buněk *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303 po 15-ti hodinách kultivace.

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo připravit stabilní mikroemulze monoacylglycerolů, které mají antimikrobní účinky. Tyto účinky byly poté zkoušeny na deseti vybraných bakteriích a dosažené výsledky antimikrobní aktivity mikroemulzí s MAG lze shrnout následovně:

- U všech mikroemulzí obsahujících studované monoacylglyceroly byl zaznamenán pokles hodnoty indexu růstu se stoupající koncentrací mikroemulze s MAG v kulturačním médiu.
- Gram-negativní bakterie byly vůči MAG více odolnější než bakterie Gram-positivní.
- Nejcitlivěji reagovala na přítomnost mikroemulze s MAG Gram-positivní bakterie, *Bacillus cereus*. Nejnižší index růstu byl zjištěn u mikroemulze s MAG C_{11:1}. U mikroemulze s MAG C_{12:0} byl naopak růst nejméně ovlivněn.
- Na růst bakterií působila inhibičně i mikroemulze bez přídavku monoacylglycerolu, antibakteriální aktivita mikroemulze však byla zvýšena přídavkem některých MAG.
- Antimikrobní působení mikroemulzí je značně ovlivněno typem přidaného monoacylglycerolu.
- U Gram-positivních bakterií nejméně antimikrobiálně působila mikroemulze s MAG mastné kyseliny s 12 atomy uhlíku v řetězci (MAG C_{12:0}). Nejlepších výsledků dosáhla mikroemulze s MAG kyseliny undekanové.
- U Gram-negativních bakterií bylo zjištěno, že mikroemulze s MAG C_{11:0} měla nejlepší antimikrobiální účinky, kdežto nejmenší antimikrobiální aktivitu vykazovala mikroemulze s MAG C_{11:1}.

Výsledky této práce ukázaly, že mikroemulze s monoacylglyceroly ovlivňují růst potravinářsky významných bakterií. Tato antibakteriální aktivita by mohla být prakticky využita pro zvýšení mikrobiologické bezpečnosti některých potravin či kosmetických prostředků. Použití mikroemulzí s MAG v potravinách je umožněno i dobrou snášenlivostí těchto látek lidským organismem. Pro případnou aplikaci MAG jako antimikrobních látek v potravinách, lze doporučit zejména monoacylglycerol kyseliny undekanové (MAG C_{11:0}), který měl nejlepší antimikrobiální účinky jak u Gram-positivních, tak i u Gram-negativních bakterií.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PAL, Rajinder. *Rheology of simple and multiple emulsions. Current Opinion in Colloid.* 2011, roč. 16, č. 1, s. 41-60. ISSN 13590294
- [2] WHITEHURST, Robert J. *Emulsifiers in food technology: principles, practice, and techniques.* Ames, Iowa: Blackwell Pub., c2004, 247 s. ISBN 9781405118026
- [3] BRDIČKA, Rudolf. *Základy fyzikální chemie.* Vyd. 2. Praha: Academia, 1977, 849 s. ISBN 104-21-825
- [4] SJÖBLOM, Johan. *Encyclopedic handbook of emulsion technology.* Vyd. 2. New York: Marcel Dekker, c2001, 736 s. ISBN 08-247-0454-1
- [5] VACÍK, J., BARTHOVÁ, J., PACÁK, J., STRAUCH, B., SVOBODOVÁ, M., ZEMÁNEK, F. *Přehled středoškolské chemie.* 1. vyd. Praha: 1996. 368 s. ISBN 80-85937-08-5
- [6] McCLEMENTS, D. J. *Food emulsions.* 2nd Edition, Boca Raton, CRC Press, 2005, 609 p. ISBN 0-8493-2023-2
- [7] *Emulze* [online]. [cit. 2012-03-16]. Dostupný z WWW:
http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/emulze.html
- [8] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2.,* 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902391-4-5
- [9] BINKS, B. P. *Modern aspects of emulsion science,* Royal Society of Chemistry, Cambridge 1998
- [10] HIEMENZ, Paul C. *Principles of Colloid and Surface Chemistry.* 3rd rev. and exp.Ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997, 650 s. ISBN 08-247-9397-8
- [11] ŠEVČÍKOVÁ, P. *Příprava emulzí.* Zlín: UTB ve Zlíně, 2010. Diplomová práce
- [12] *Disperzní soustavy* [online]. [cit. 2012-03-15]. Dostupný z WWW:
http://www.soudom.cz/Ucebnice/Materialy/Treti_rocnik/DISPERZNI_SOUSTAVY.pdf
- [13] CHIARAMONTI, D., M. BONINI a E. FRATINI. *Development of emulsions from biomass pyrolysis liquid and diesel and their use in engines,* Part 1: emulsion production. *Biomass and Bioenergy.* 2003, roč. 25, s. 85-99

- [14] MCCLEMENTS, D. *Food emulsions: principles, practice, and techniques*. Boca Raton: CRC Press, c1999, 378 s. ISBN 08-493-8008-1
- [15] *Emulze* [online]. [cit. 2012-03-16]. Dostupný z WWW:
http://utb-fi-les.cepac.cz/moduly/M0006_chemie_a_technologie_tuku_a_detergentu
- [16] *Emulgátor* [online]. [cit. 2012-03-17]. Dostupný z WWW:
http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/emulgator.html
- [17] POKORNÝ, J. a L. DUBSKÁ. *Technologie tuků*. 1.vydání. Praha: SNTL, 1986
- [18] SARCIAUX, J.M., L. ACAR a P.A. SADO. *Using microemulsion formulations for oral drug delivery of therapeutic peptides. International Journal of Pharmaceutics*. 1995, roč. 120, s. 127-136
- [19] LAWRENCE, M.J. a G.D. REES. *Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. Advanced Drug Delivery Reviews*. 2000, roč. 45, s. 89-121
- [20] PLEVA, P. *Inhibiční vliv monoacylglycerolů na bakterie rodu Lactococcus*. Zlín: UTB ve Zlíně, 2010. Diplomová práce
- [21] MOULOUGUI, Z., RAKOTONDRAZAFY, V., PEYROU, G., GACHEN, Ch., Eychenne, V. *Pure α -monoglycerides for industrial applications. Agro Food Ind. Hi-Tech 9*: 10-14, 2008
- [22] GUNSTONE, F. D., HARWOOD, J. L., PADLEY, F. B. *The Lipid Handbook*. CRC Press, New York, 1994 290-320. Bergsson a kol.,1998
- [23] Homolipidy. [online]. [cit. 2012-03-17]. Dostupný z WWW:
http://utb-files.cepac.cz/moduly/M0007_chemie_a_technologie_tuku
- [24] HOZA, Ignác, Daniela KRAMÁŘOVÁ a Pavel BUDINSKÝ. *Potravinářská biochemie I.: pro studenty kombinované formy studia*. Vyd. 1. Zlín: UTB ve Zlíně, 2006, 160 s. ISBN 978-80-7318-495-7
- [25] *Monoglyceride* [online]. [cit. 2012-03-17]. Dostupný z WWW:
<http://en.wikipedia.org/wiki/Monoacylglycerol>
- [26] GUNSTONE, F, Daniela KRAMÁŘOVÁ a Pavel BUDINSKÝ. *The chemistry of oils and fats: sources, composition, properties, and uses*. Vyd. 1. Boca Raton, FL: CRC Press, 2004, 288 s. ISBN 978-084-9323-737

- [27] DOLEŽALOVÁ, M., JANIŠ, R., SVOBODOVÁ, H., KAŠPÁRKOVÁ, V., HUMPOLÍČEK, P., KREJČÍ, J. Antimicrobial properties of 1-monoacylglycerols prepared from undecanoic (C11: 0) and undecenoic (C11. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2010, roč. 112, č. 10, s. 1106-1114. ISSN 14387697
- [28] *Interesterifikace* [online]. [cit. 2012-03-17]. Dostupný z WWW: http://utb-fi-les.cepac.cz/moduly/M0007_chemie_a_technologie_tuku
- [29] BORNSCHEUER, U. T. *Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols. Enzyme and Microbial Technology* 17: 578-586, 1995
- [30] BOYLE, E. *Monoglycerides in food systems: Current and future uses. Food Technology* 51: 52-59, 1997
- [31] HASENHUETTL, G. L., HARTEL, R. W. *Food Emulsifiers and Their Applications*. Springer, New York. 14-16, 2008
- [32] WEISSERMEL, K., ARPE, H. – J. *Industrial Organic Chemistry*, VCH Verlagsgesellschaft, 1993. p. 396
- [33] BORNSCHEUER, U. T. *Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols. Enzyme and Microbial Technology* 17: 578-586, 1995
- [34] JANIŠ, R., KREJČÍ, J., KLÁSEK, A., *Preparation of 1-monoacylglycerols from glycidol and fatty acid catalyzed by the chromium(III)-fatty acid system, Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2000, p. 351
- [35] SVOBODA, Jiří. *Organická chemie I*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, 291 s. ISBN 80-708-0561-7
- [36] MOULOUNGUI, Z., RAKOTONRDAZAFY, V., PEYROU, G., GACHEN C., EYCHENNE, V. *Pure α -monoglycerides for industrial applications. Agro Food Ind. Hi-Tech* 9: 10-14, 1998
- [37] BUŇKOVÁ, L. *Účinky přídatných látek používaných v potravinářství a kosmetice na růst vybraných bakterií*. Brno, 2008. Rigorózní práce
- [38] DOLEŽÁLKOVÁ, I. *Účinky vybraných monoacylglycerolů na růst bakterií a mikroskopických vláknitých hub*. Brno, 2010. Rigorózní práce
- [39] DAVIDSON, P. M., SOFOS, J. N., BRANEN, A. L. *Antimicrobials in Food*. CRC Press, 2005. 706 p. ISBN 0-8247-4037-8

- [40] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., JANIŠ, R., KREJČÍ, J., DOLEŽÁLKOVÁ, I., POSPÍŠIL, Z., RŮŽIČKA, J., TREMLOVÁ, B. *Comparison of antibacterial effect of seven 1- monoglycerides on food-borne pathogens or spoilage bacteria. Acta Veterinaria Brno.* 2011, vol. 80, p. 29 - 39
- [41] ALTIERI, C., BEVILACQUA, A., CARDILLO, D., SINIGAGLIA, D. *Effectiveness of fatty acids and their monoglycerides against gram-negative pathogens. International Journal of Food Science and Technology.* 2009, vol. 44, p. 359-366
- [42] RŮŽIČKA, J., VELCLOVÁ, K., JANIŠ, R., KREJČÍ, J. *Antimicrobial effects of 1-monoacylglycerols prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids. European Food Research and Technology.* 2003, roč. 217, č. 4, s. 329-331. ISSN 1438-2377
- [43] WANG, L. L., JOHNSON, E. A. *Inhibition of Listeria monocytogenes by fatty acids and monoglycerides. Applied and Environmental Microbiology* 58: 624–629, 1992
- [44] SHEU, A. A., FREESE, E. J. *Lipopolysaccharide Layer Protection of Gram-Negative Bacteria Against Inhibition by Long-Chain Fatty Acids. Journal of Bacteriology,* 115, 1973, p. 869 - 875
- [45] CONLEY, A. J., KABARA, J. J. *Antimicrobial action of esters of polyhydric alcohols. Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 4: 501-506, 1993
- [46] JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie.* 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006, 404 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-1270-4
- [47] BUŇKOVÁ, L., DOLEŽALOVÁ, M. *Obecná mikrobiologie.* Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007, 190 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-80-7318-516-9
- [48] *Potravinářsky významné bakterie* [online]. [cit. 2012-03-28]. Dostupný z WWW: http://utb-files.cepac.cz/moduly/M0010_potravinarska_mikrobiologie
- [49] *Prokaryotní buňka* [online]. [cit. 2012-03-31]. Dostupný z WWW: <http://leccos.com/index.php/clanky/bunka-prokaryotni>
- [50] KAPRÁLEK, František. *Základy bakteriologie.* Praha: Karolinum, 2000, 241 s. ISBN 80-718-4811-5
- [51] *Růst bakteriální populace* [online]. [cit. 2012-05-08]. Dostupný z WWW: http://cs.wikipedia.org/wiki/R%C5%AFst_bakteri%C3%A1ln%C3%AD_populace
- [52] *Gram-pozitivní bakterie* [online]. [cit. 2012-03-28]. Dostupný z WWW: http://utb-files.cepac.cz/moduly/M0010_potravinarska_mikrobiologie

- [53] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9
- [54] *Bacillus cereus* [online]. [cit. 2012-05-12]. Dostupný z WWW: <http://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/bc/bc.html>
- [55] *Bacillus subtilis* [online]. [cit. 2012-05-12]. Dostupný z WWW: http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra009.htm
- [56] *Enterococcus faecalis* [online]. [cit. 2012-05-12]. Dostupný z WWW: http://is.muni.cz/th/175809/prif_b/bakalarka_rcp8f.txt
- [57] *Staphylococcus aureus* [online]. [cit. 2012-05-12]. Dostupný z WWW: <http://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/sa/index.html>
- [58] *Citrobacter freundii* [online]. [cit. 2012-05-12]. Dostupný z WWW: <http://www.citrobacterfreundii.org/>
- [59] *Salmonella enterica* [online]. [cit. 2012-05-12]. Dostupný z WWW: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/salmonella-ent-eng.php>
- [60] GÖRNER F., VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiologie požívatín*. Malé Centrum, Bratislava, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

O/V	Olej ve vodě
V/O	Voda v oleji
HLB	Hydrofilně-lipofilní rovnováha
MAG	Monoacylglycerol
DAG	Diacylglycerol
TAG	Triacylglycerol
MK	Mastná kyselina
PAL	Povrchově aktivní látka
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
MAG C _{10:0}	Monoacylglycerol kyseliny kaprinové
MAG C _{11:0}	Monoacylglycerol kyseliny undekanové
MAG C _{11:1}	Monoacylglycerol kyseliny undecenové
MAG C _{12:0}	Monoacylglycerol kyseliny laurové
NaCl	Chlorid sodný
BE	Beef extract
MPA	Masopeptonový agar
MPB	Masopeptonový bujón
UV	Ultrafialové záření
IR	Index růstu

SEZNAM OBRÁZKŮ

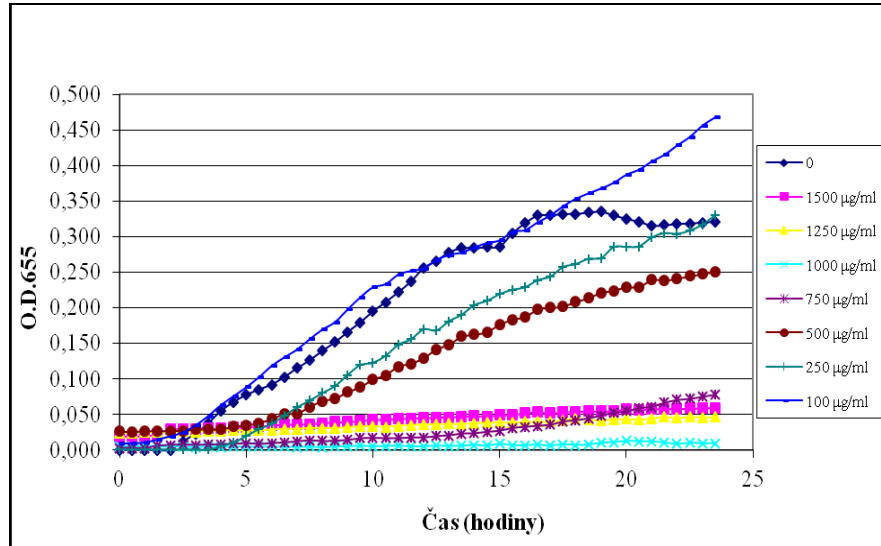
<i>Obr. 1. Emulze (a) zředěná, (b) koncentrovaná, (c) vysoce koncentrovaná.....</i>	13
<i>Obr. 2. Dvě izomerní formy monoacylglycerolů: 1-monoacylglycerol (vlevo) a 2-monoacylglycerol (vpravo).....</i>	20
<i>Obr. 3. Využití monoacylglycerolů v průmyslu.....</i>	23
<i>Obr. 4. Schéma prokaryontní buňky.</i>	26
<i>Obr. 5. Růstová křivka bakteriální populace, kde na ose x je vynesena čas a na ose y počet bakterií v kolonii. (A - lag fáze, B – log fáze, C – stacionární fáze, D – fáze odumírání).....</i>	28
<i>Obr. 6. Vliv mikroemulzí s monoacylglyceroly na růst buněk Bacillus cereus CCM 2010 po 15-ti hodinách kultivace.</i>	42
<i>Obr. 7. Vliv mikroemulzí s monoacylglyceroly na růst buněk Bacillus subtilis subsp. spizizenii CCM 4062 po 15-ti hodinách kultivace.</i>	43
<i>Obr. 8. Vliv mikroemulzí s monoacylglyceroly na růst buněk Enterococcus faecalis CCM 4224 po 15-ti hodinách kultivace.</i>	44
<i>Obr. 9. Vliv mikroemulzí s monoacylglyceroly na růst buněk Micrococcus luteus CCM 732 po 15-ti hodinách kultivace.</i>	45
<i>Obr. 10. Vliv mikroemulzí s monoacylglyceroly na růst buněk Staphylococcus aureus subsp. aureus CCM 3953 po 15-ti hodinách kultivace.</i>	46
<i>Obr. 11. Vliv mikroemulzí s monoacylglyceroly na růst buněk Citrobacter freundii CCM 7187 po 15-ti hodinách kultivace.</i>	47
<i>Obr. 12. Vliv monoacylglycerolů na růst buněk Escherichia coli CCM 3954 po 15-ti hodinách kultivace.....</i>	48
<i>Obr. 13. Vliv mikroemulzí s monoacylglyceroly na růst buněk Pseudomonas aeruginosa CCM 3955 po 15-ti hodinách kultivace.</i>	49
<i>Obr. 14. Vliv mikroemulzí s monoacylglycerolů na růst buněk Salmonella enterica subsp. enterica ser. Enteritidis CCM 4420 po 15-ti hodinách kultivace.</i>	50
<i>Obr. 15. Vliv mikroemulzí s monoacylglyceroly na růst buněk Seratia marcescens subsp. marcescens CCM 303 po 15-ti hodinách kultivace.....</i>	51

SEZNAM TABULEK

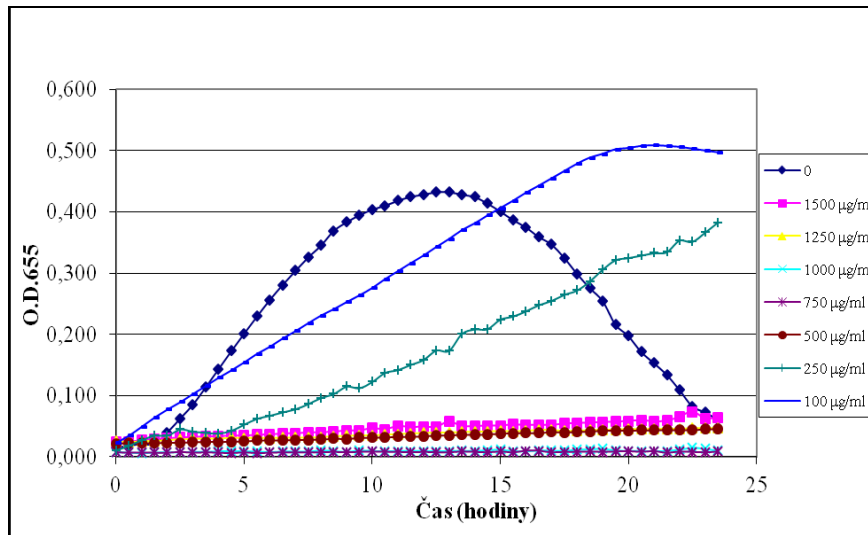
<i>Tab. 1. Rozdělení povrchově aktivních látek podle HLB hodnoty. (pokorný)</i>	17
<i>Tab. 2. Poměry množství mikroemulze a MPB</i>	40

PII: Vliv mikroemulzní s monoacylglyceroly na růst *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062

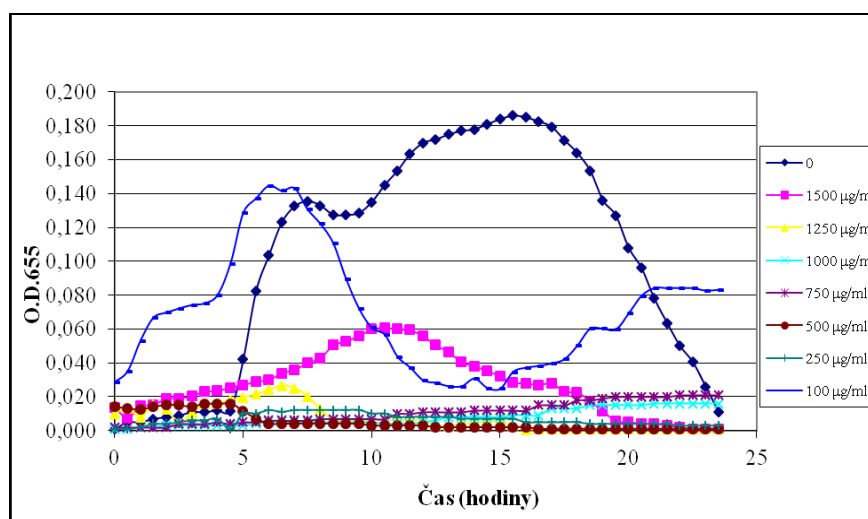
PII A: Vliv mikroemulze s MAG kyseliny kaprinové (MAG C_{10:0}) na růst *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062



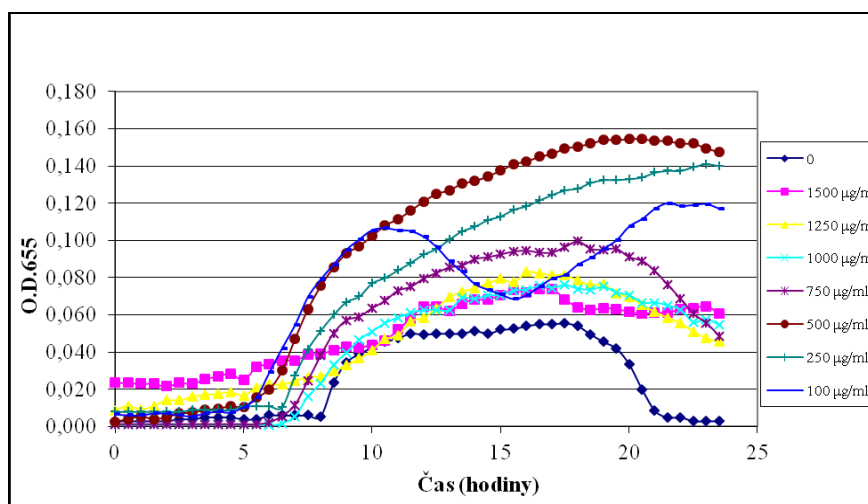
PII B: Vliv mikroemulze s MAG kyseliny undekanové (MAG C_{11:0}) na růst *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062



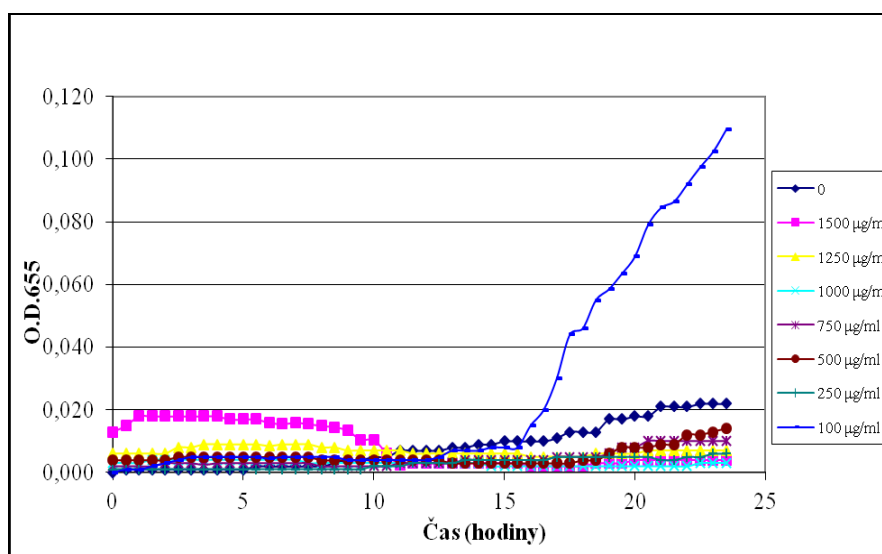
PII C: Vliv mikroemulze s MAG kyseliny undecenové (MAG C_{11:1}) na růst *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062



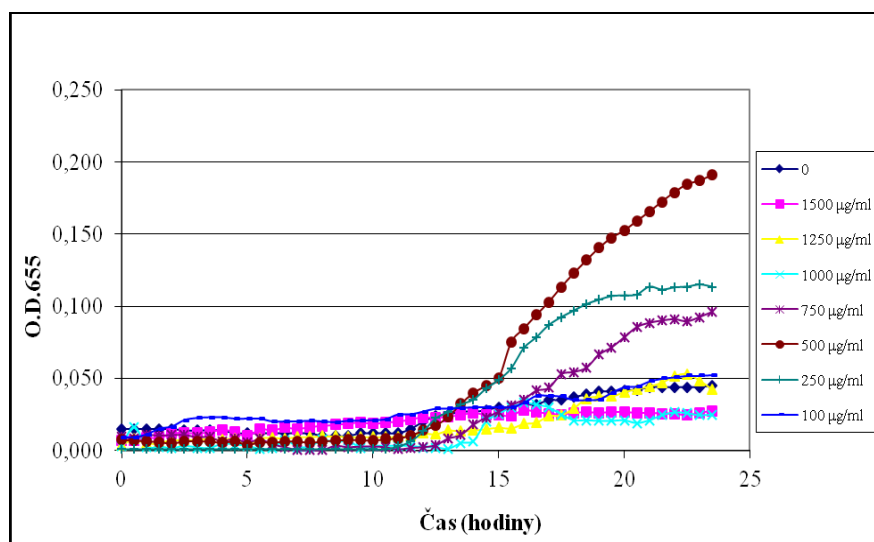
PII D: Vliv mikroemulze s MAG kyseliny laurové (MAG C_{12:0}) na růst *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062



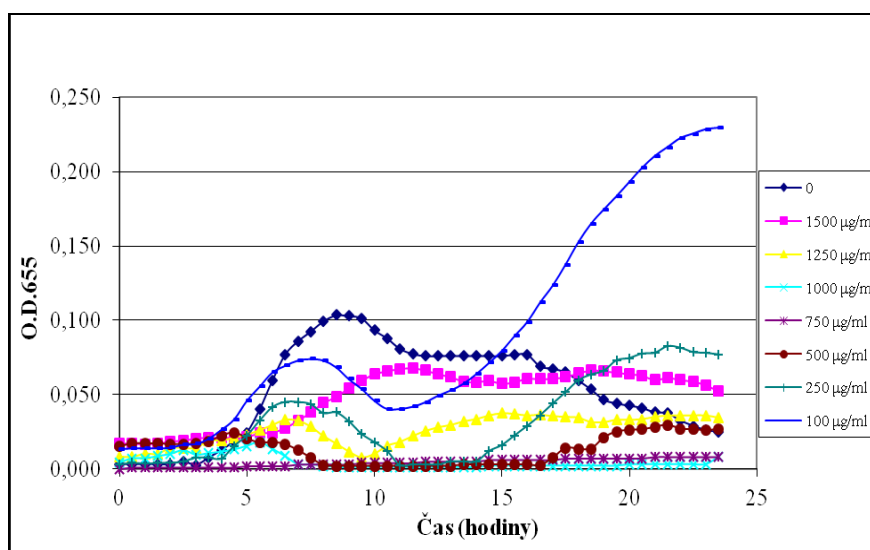
PIV C: Vliv mikroemulze s MAG kyseliny undecenové (MAG C_{11:1}) na růst *Micrococcus luteus* CCM 732



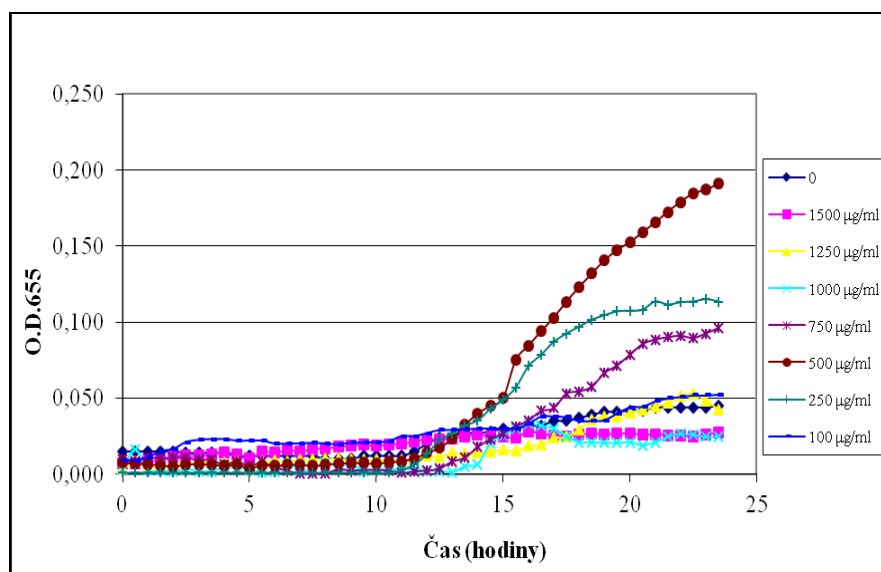
PIV D: Vliv mikroemulze s MAG kyseliny laurové (MAG C_{12:0}) na růst *Micrococcus luteus* CCM 732



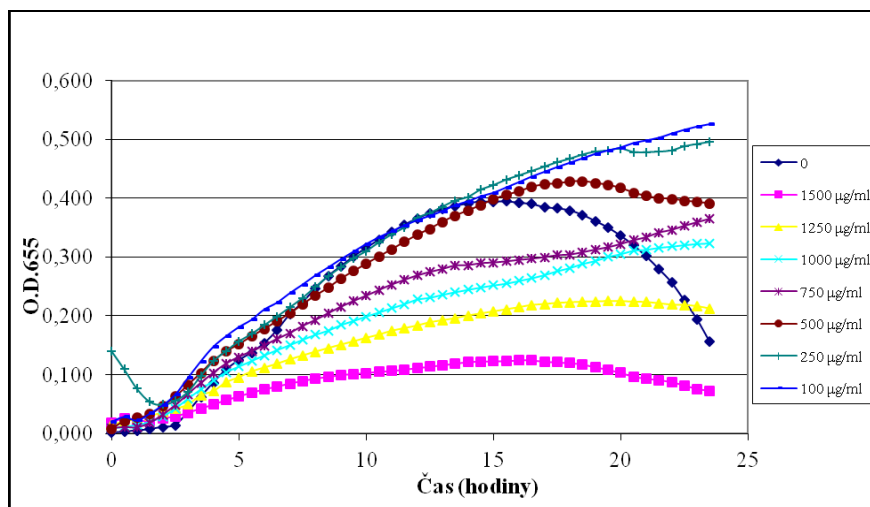
PV C: Vliv mikroemulze s MAG kyseliny undecenové (MAG C_{11:1}) na *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953



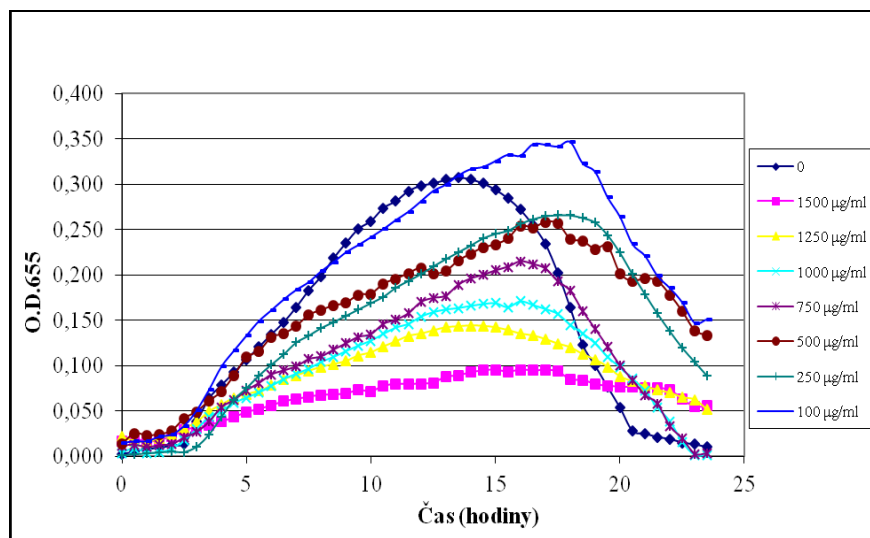
PV D: Vliv mikroemulze s MAG kyseliny laurové (MAG C_{12:0}) na růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953



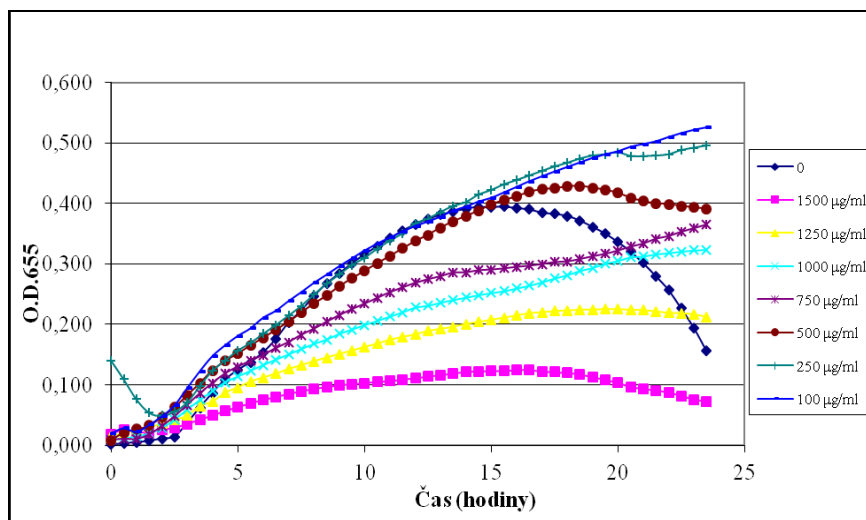
PVI C: Vliv mikroemulze s MAG kyseliny undecenové (MAG C_{11:1}) na růst *Citrobacter freundii* CCM 7187



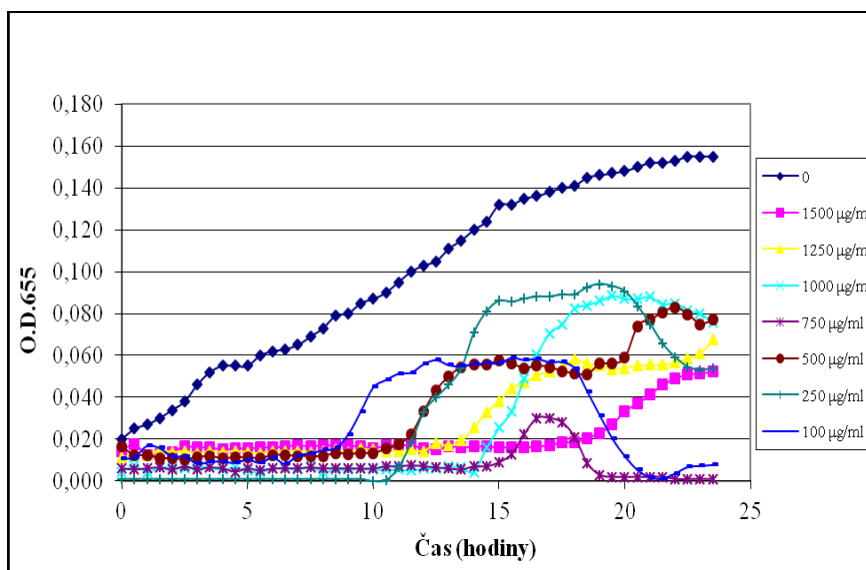
PVI D: Vliv mikroemulze s MAG kyseliny laurové (MAG C_{12:0}) na růst *Citrobacter freundii* CCM 7187



PVII C: Vliv mikroemulze s MAG kyseliny undecenové (MAG C_{11:1}) na růst *Escherichia coli* CCM 3954

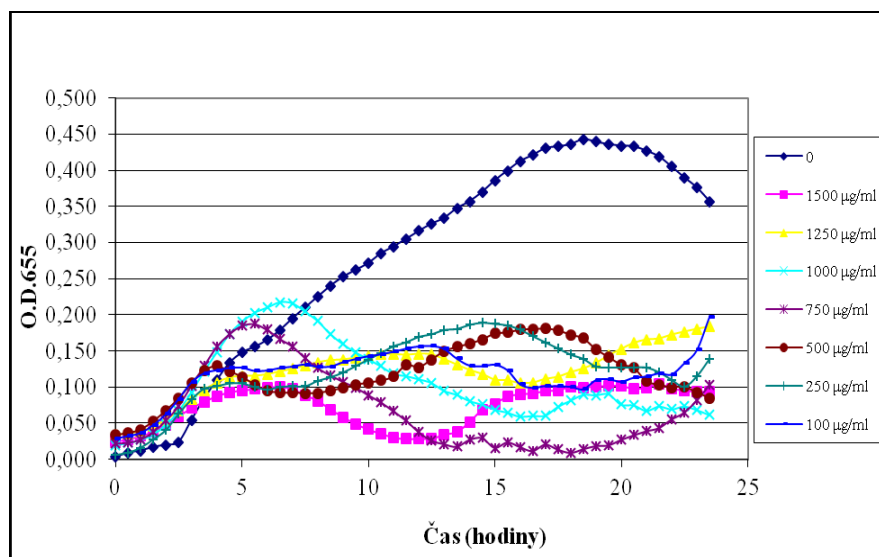


PVII D: Vliv mikroemulze s MAG kyseliny laurové (MAG C_{12:0}) na růst *Escherichia coli* CCM 3954

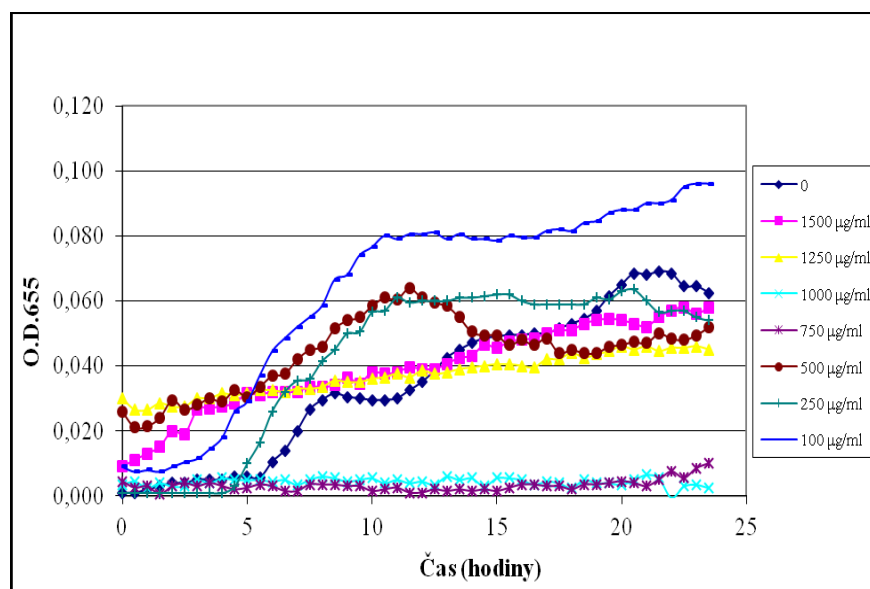


PVIII: Vliv mikroemulzí s monoacylglyceroly na růst *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955

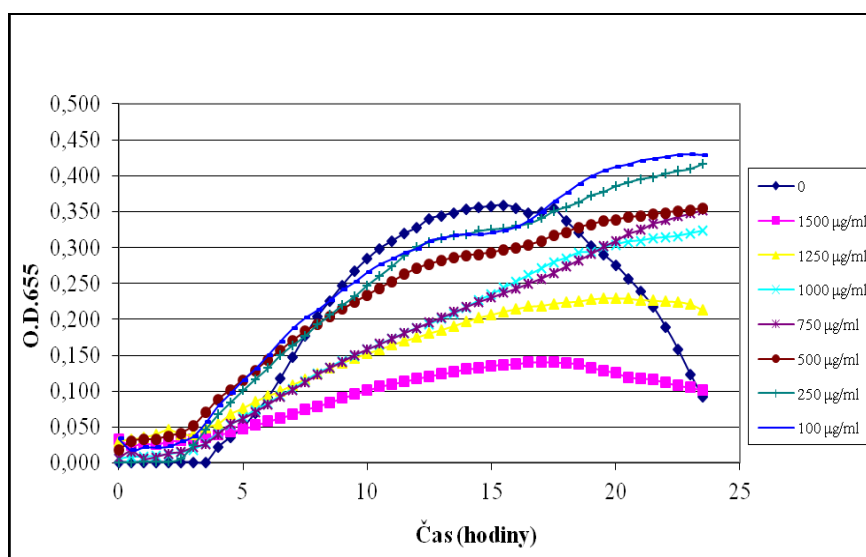
PVIII A: Vliv mikroemulze s MAG kyseliny kaprinové (MAG C_{10:0}) na růst *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955



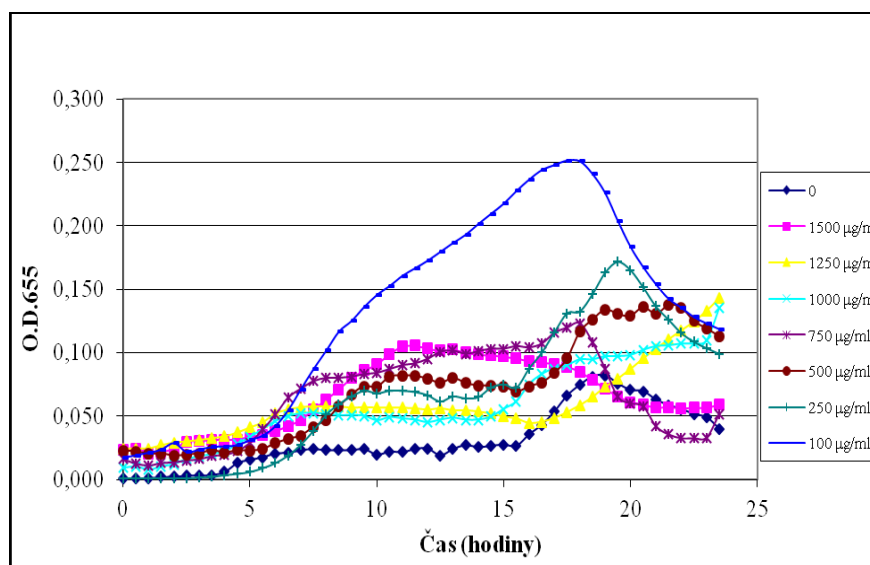
PVIII B: Vliv mikroemulze s MAG kyseliny undekanové (MAG C_{11:0}) na růst *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955



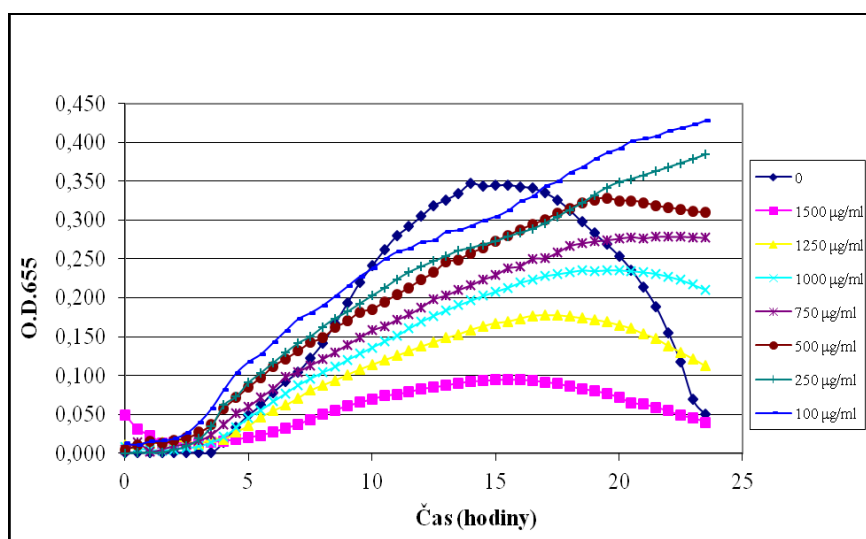
PVIII C: Vliv mikroemulze s MAG kyseliny undecenové (MAG C_{11:1}) na růst *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955



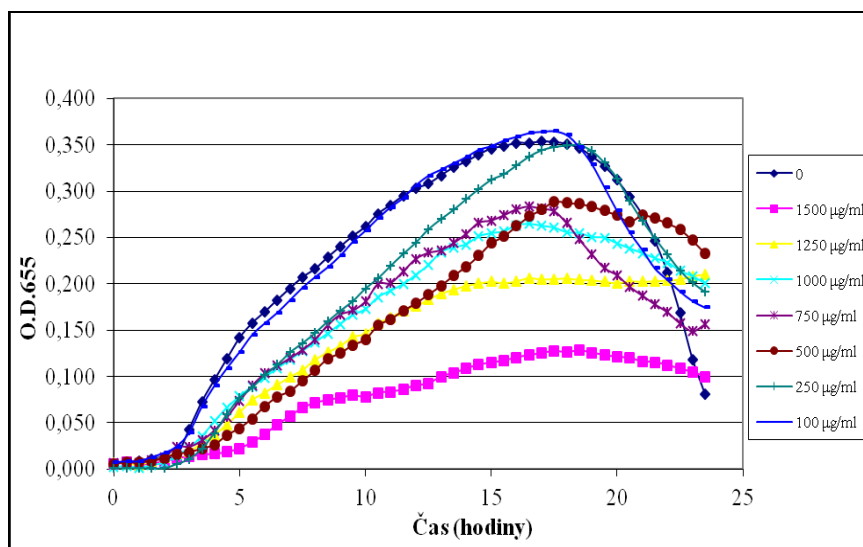
PVIII D: Vliv mikroemulze s MAG kyseliny laurové (MAG C_{12:0}) na růst *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955



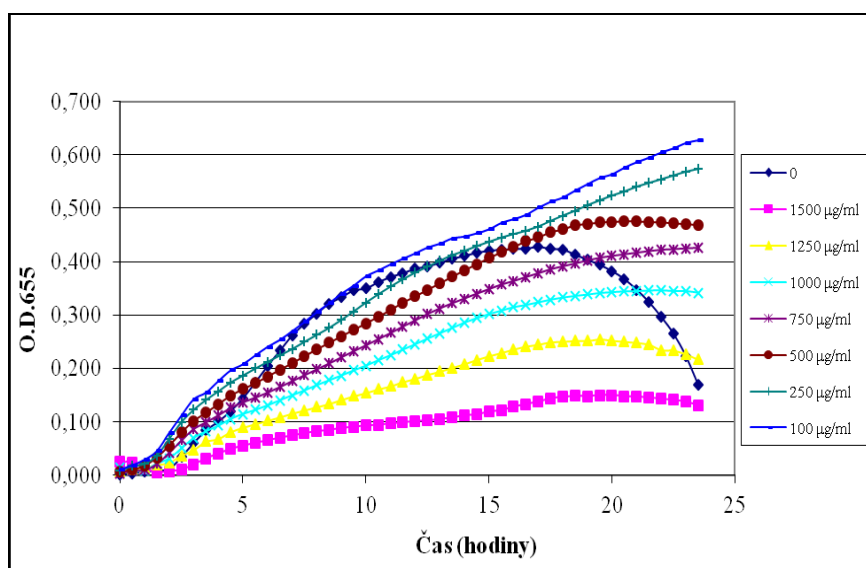
PIX C: Vliv mikroemulze s MAG kyseliny undecenové (MAG C_{11:1}) na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420



PIX D: Vliv mikroemulze s MAG kyseliny laurové (MAG C_{12:0}) na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420



PX C: Vliv mikroemulze s MAG kyseliny undecenové (MAG C_{11:1}) na růst *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303



PX D: Vliv mikroemulze s MAG kyseliny laurové (MAG C_{12:0}) na růst *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303

