

Antimikrobní účinky medů na vybrané grampozitivní bakterie

Bc. Kateřina Swaczynová

Diplomová práce
2021



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Swaczynová**
Osobní číslo: **T19475**
Studijní program: **N0721A210004 Technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Antimikrobní účinky medů na vybrané grampozitivní bakterie**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část:

1. Med a včelí produkty – charakteristické vlastnosti, složení, produkce.
2. Antimikrobní a antioxidační látky vlastností medu a včelích produktů.

II. Praktická část:

1. Stanovení antioxidační kapacity vybraných vzorků medů.
2. Stanovení antimikrobních účinků vzorků medů na vybrané grampozitivní bakterie.
3. Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Cianciosi, D., et al. Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review. *Molecules*, 23: Article Number 2322. 2018
- [2] Javier Leyva-Jimenez, F., et al. Potential antimicrobial activity of honey phenolic compounds against Gram positive and Gram negative bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 101: 236-245, 2019
- Hbini, A: et al. Antimicrobial activity of honey in periodontal disease: a systematic review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75: 807-826. 2020
- [3] Goslinski, M., Nowak, D., Klebukowska, L. Antioxidant properties and antimicrobial activity of manuka honey versus Polish honeys. *Journal of Food Science and Technology*, 57: 1269-1277. 2020
- [4] Grabowski, N.T., Klein, G. Microbiology and foodborne pathogens in honey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57: 1852-1862. 2017
- [5] Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně.

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **31. prosince 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Robert Gál, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 8. února 2021

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou 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);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá antioxidační a antimikrobní aktivitou medů. Cílem bylo stanovení antioxidační aktivity a antimikrobního účinku medů na vybrané grampozitivní bakterie. Skutečnost, že se časem zvyšuje rezistence bakterií na antibiotika, otvírá řadu nových příležitostí, jak využít antioxidačního a antimikrobního účinku medů nejen v medicíně, ale i v konzervaci potravin.

V praktické části diplomové práce byla zkoumána antioxidační aktivita 15 různých vzorků medů spektrofotometricky pomocí metody ABTS, DPPH a pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Následně byl ověřován antimikrobní účinek těchto vzorků medu na vybrané grampozitivní bakterie. Antimikrobní účinek byl stanovován pomocí mikrodiluční metody a výsledky byly vyjádřeny jako minimální inhibiční koncentrace.

Z výsledků vyplývá, že nejcitlivější bakterií byl *Staphylococcus aureus* CCM 3953, kdy minimální inhibiční koncentrace u 7 vzorků medů byla již při koncentraci 125 µg/ml. Zároveň byl potvrzen antimikrobní a antioxidační účinek u všech sledovaných medů.

Klíčová slova: med, antioxidační aktivita, ABTS, DPPH, polyfenoly, antimikrobní účinek, MIC, grampozitivní bakterie

ABSTRACT

This diploma thesis deals with antioxidant and antimicrobial activity. The aim was to determine the antioxidant activity and antimicrobial effect of honey on gram-positive bacteria. The fact that bacterial resistance to antibiotics increases over time opens up a number of new opportunities to use the antioxidant and antimicrobial effect of honey not only in medicine but also in food preservation.

In the practical part of the diploma thesis was investigated spectrophotometrically the antioxidant activity of 15 different honey samples using the ABTS, DPPH method and the Folin-Ciocalteu reagent. Subsequently was verified the antimicrobial effect of these honey

samples on selected gram-positive bacteria. The antimicrobial effect was determined by the microdilution method and the results were expressed as minimum inhibitory concentrations.

The results show that the most sensitive bacterium was *Staphylococcus aureus* CCM 3953, when the minimum inhibitory concentration in 7 honey samples was already at a concentration of 125 µg/ml. At the same time was confirmed the antimicrobial and antioxidant effect of all monitored honeys.

Keywords: honey, antioxidant activity, ABTS, DPPH, polyphenols, antimicrobial effect, MIC, gram-positive bacteria

Touto cestou bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce paní doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za příležitost pracovat na zajímavém tématu a za rady, ochotu, trpělivost a čas, který mi věnovala. Velké díky patří i laborantkám Ing. Olze Vlčkové a Ing. Veronice Kučabové za pomoc v laboratoři, praktické rady a přátelskou atmosféru při realizaci praktické části této práce.

Rovněž bych ráda poděkovala doc. Ing. Daniele Sumczynski, Ph.D. a Ing. Lence Fojtíkové za pomoc v laboratoři na Ústavu analýzy a chemie potravin.

V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat své rodině a blízkým přátelům za podporu a trpělivost během celého mého studia.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 MED A VČELÍ PRODUKTY	13
1.1 DRUHY MEDU	14
1.1.1 Med květový.....	14
1.1.2 Med medovicový.....	15
1.2 PRODUKCE MEDU	16
1.2.1 Produkce.....	17
1.3 VČELÍ PRODUKTY	18
1.3.1 Propolis	18
1.3.2 Mateří kašička	19
1.3.3 Pyl	19
1.3.4 Včelí vosk.....	20
1.3.5 Včelí jed	21
2 FYZIKÁLNĚ – CHEMICKÉ SLOŽENÍ MEDU	22
2.1 CHEMICKÉ SLOŽENÍ MEDU.....	22
2.1.1 Voda	22
2.1.2 Cukry	22
2.1.3 Bílkoviny.....	24
2.1.4 Enzymy	24
2.1.5 Lipidy	25
2.1.6 Organické kyseliny.....	26
2.1.7 Fenolové sloučeniny.....	26
2.1.8 Vitaminy.....	28
2.1.9 Minerální látky	28
2.1.10 Barviva	29
2.1.11 Těkavé látky	29
2.1.12 Toxické látky.....	30
2.1.13 Hydroxymethylfurfural	30
2.2 FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI	31
2.2.1 Viskozita a reologie.....	31
2.2.2 Index lomu	32
2.2.3 Hustota	32
2.2.4 pH.....	32
2.2.5 Hygroskopicitá	33
2.2.6 Optická otáčivost.....	33
2.2.7 Krystalizace.....	33
2.2.8 Barva medu	34
3 ANTIMIKROBNÍ A ANTIOXIDAČNÍ VLASTNOSTI MEDU A VČELÍCH PRODUKTŮ	36
3.1 ANTIMIKROBNÍ LÁTKY V MEDU	36

3.1.1	Vysoká koncentrace cukrů a a_w	36
3.1.2	Peroxid vodíku	37
3.1.3	Methylglyoxal	37
3.1.4	Defensin-1	38
3.1.5	Ostatní faktory.....	39
3.2	ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA	39
3.2.1	Antioxidační látky v medu	40
3.2.2	Metody stanovení antioxidační aktivity	40
II	PRAKTICKÁ ČÁST	42
4	CÍL PRÁCE	43
5	POUŽITÁ ZAŘÍZENÍ A MATERIÁLY	44
5.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	44
5.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	44
5.3	POUŽITÉ VZORKY MEDU	45
5.4	POUŽITÉ MIKROORGANIZMY.....	46
5.5	POUŽITÁ KULTIVAČNÍ MÉDIA	47
6	METODIKA	48
6.1	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU ABTS.....	48
6.1.1	Příprava vzorků	48
6.1.2	Příprava roztoku ABTS.....	48
6.1.3	Příprava roztoku $K_2S_2O_8$	48
6.1.4	Příprava octanového pufru	49
6.1.5	Generování radikálu ABTS•+	49
6.1.6	Příprava reakční směsi	49
6.1.7	Vlastní měření	49
6.2	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU DPPH.....	49
6.2.1	Příprava vzorků	50
6.2.2	Příprava zásobního a pracovního roztoku DPPH.....	50
6.2.3	Vlastní měření	50
6.3	STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU POLYFENOLŮ METODOU FOLIN-CIOCALTEU	50
6.3.1	Příprava vzorků	51
6.3.2	Příprava pracovního roztoku uhličitanu sodného.....	51
6.3.3	Vlastní měření	51
6.4	STANOVENÍ ANTIMIKROBNÍCH ÚČINKŮ VZORKŮ MEDU NA VYBRANÉ GRAMPOZITIVNÍ BAKTERIE	51
6.4.1	Příprava medových roztoků	51
6.4.2	Příprava kultivačního média MH Broth.....	52
6.4.3	Příprava tekuté půdy M17 Broth.....	52
6.4.4	Příprava fyziologického roztoku	52
6.4.5	Resuscitace mikroorganismů a příprava bakteriální suspenze.....	52
6.4.6	Mikrotitrační diluční metoda.....	53

7	VÝSLEDKY	54
7.1	ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA METODOU ABTS.....	54
7.1.1	Kalibrační křivka Troloxu.....	54
7.1.2	Antioxidační aktivita medů.....	54
7.2	ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA METODOU DPPH.....	55
7.2.1	Kalibrační křivka kyseliny askorbové.....	55
7.2.2	Antioxidační aktivita medů.....	56
7.3	CELKOVÝ OBSAH POLYFENOLŮ ZJIŠTĚNÝ METODOU FOLIN-CIOCALTEU.....	57
7.3.1	Kalibrační křivka kyseliny gallové.....	57
7.3.2	Celkový obsah polyfenolů v medu.....	58
7.4	POROVNÁNÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY.....	59
7.5	ANTIMIKROBNÍ ÚČINEK VZORKŮ MEDŮ NA VYBRANÉ GRAMPOZITIVNÍ BAKTERIE.....	60
7.5.1	Vliv vzorků medů na růst <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953.....	60
7.5.2	Vliv vzorků medů na růst <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2020.....	62
7.5.3	Vliv vzorků medů na růst <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2665.....	64
7.5.4	Vliv vzorků medů na růst <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224.....	66
7.5.5	Vliv vzorků medů na růst <i>Enterococcus durans</i> CCDM 437.....	68
7.5.6	Vliv vzorků medu na růst <i>Enterococcus durans</i> CCDM 53.....	70
7.5.7	Vliv vzorků medů na růst <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004.....	72
7.5.8	Vliv vzorků medů na růst <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CCDM 141.....	74
7.5.9	Vliv vzorků medů na růst <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824.....	76
7.5.10	Vliv vzorků medů na růst <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RIBM 2-94.....	78
7.5.11	Vliv vzorků medů na růst <i>Levilactobacillus brevis</i> RIBM 2-98.....	80
7.5.12	Vliv vzorků medu na růst <i>Levilactobacillus brevis</i> RIBM 2-111.....	82
7.5.13	Stanovení minimální inhibiční koncentrace.....	84
8	DISKUZE	86
	ZÁVĚR	91
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	92
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	100
	SEZNAM OBRÁZKŮ	101
	SEZNAM TABULEK	103

ÚVOD

Vznik a rostoucí zdravotní riziko bakterií rezistentních na antibiotika podnítil výzkum nových a účinných řešení. Med je tradiční a cenný baktericidní přípravek s prokázanými baktericidními, fungicidními a virucidními vlastnostmi. Má široké spektrum účinku jak proti grampozitivním, tak i gramnegativním bakteriím.

Uvádí se, že med obsahuje nejméně 181 látek, což je komplexní směs cukrů s malým množstvím dalších složek, jako jsou minerální látky, bílkoviny, vitaminy, aromatické sloučeniny, organické kyseliny, enzymy, fenolové kyseliny, flavonoidy, pigmenty a další. Bylo prokázáno, že některé z těchto složek přítomných v medu mají antioxidační a antimikrobní vlastnosti. Patří sem fenolové kyseliny a flavonoidy, některé enzymy (glukózooxidáza a kataláza), kyselina askorbová, bílkoviny a karotenoidy. Antimikrobní vlastnosti medu souvisí s hladinou peroxidu vodíku a dalších neperoxidových faktorů, jako jsou lysozym, fenolové kyseliny a flavonoidy. Složení medů je proměnlivé, protože se liší nejen jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi, ale také biologickými aktivitami. Rozdíl ve stupních antimikrobních vlastností mezi různými medy přímo souvisí s jejich květinovým zdrojem a geografickým původem květinových zdrojů.

Používání přírodních produktů se stává stále populárnějším přístupem jak při léčbě, tak při konzervování potravin. Nárůst jejich popularity je způsoben jejich dobrými účinky a obecně velmi nízkou toxicitou. Charakterizace fenolických látek a dalších složek v medu, které mohou být odpovědné za jeho antioxidační a antimikrobní účinky, je zásadní pro zlepšení našich znalostí o možných účincích medu na lidské zdraví.

Cílem této závěrečné práce bylo zkoumat antioxidační a antimikrobní vlastnosti některých medů proti vybraným grampozitivním bakteriím. Medy pocházely zejména ze Slovenské republiky.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MED A VČELÍ PRODUKTY

Med je znám již od pradávna, ačkoliv informaci, jak dlouho člověk med zná, nedokážeme odhadnout. Tuto informaci dokládají i zachované kresby našich pradávných předků, kteří zjistili, že včela mu prostřednictvím medu může poskytnout skvělou součást potravy. Nejstarší kreslený doklad je znám z doby paleolitické, což je asi před 15 000 lety. Kresba pochází z Pavoučí jeskyně nacházející se u vesnice Bicorp ve Španělsku. V antickém období byl med uznávaný jako pokrm bohů, a jako takový byl využíván při náboženských obětních obřadech. Je známo, že byl med vkládán do hrodek faraonů a rovněž pomocí něho bylo také tělo mumifikováno. V Egyptských pyramidách byl nalezen med, který byl starý až 3000 let; zajímavostí je, že med sice byl zkrystalizovaný, ale z hygienického hlediska zcela nezávadný. Ve svatyni řeckého boha lékařství je více jak 2000 let napsáno: "Nerozčilovat se – hodně klidu – pít med v mléku – pěstovat divadlo a lehkou gymnastiku." V každém národu i kultuře lze najít důkazy o tom, že med sloužil jako potravina, jako předmět náboženských, kouzelnických a léčitelských obřadů. V dnešní moderní době je med součástí dalších potravin [1].

Jedná se o pozoruhodně složitou přírodní kapalinu, o které se uvádí, že obsahuje nejméně 181 látek. Složení medu je poměrně variabilní a primárně závisí na květinovém zdroji; svoji roli však hrají i určité vnější faktory, například sezónní a environmentální faktory a způsob zpracování. Med je přesycený roztok cukrů, z nichž jsou hlavními přispěvateli fruktóza (38 %) a glukóza (31 %). V medu se nachází široká škála vedlejších složek, u mnohých z nich je známo, že mají antioxidační vlastnosti. Patří sem fenolové kyseliny a flavonoidy, určité enzymy (glukózooxidáza, kataláza), kyselina askorbová, látky podobné karotenoidům, organické kyseliny, produkty Maillardových reakcí, aminokyseliny a proteiny. Antioxidační aktivita fenolových sloučenin může významně přispět k prospěšnosti potravin pro lidské zdraví a nápojů, jako je červené víno a čaj [2].

Definice medu v České republice je dána Vyhláškou č. 76/2003 Sb. Ministerstva zemědělství ČR, kterou se stanovují požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. Podle této vyhlášky je med definován jako potravina přírodního sacharidového charakteru, která je složená převážně z glukózy, fruktózy, organických kyselin, enzymů a pevných částic zachycených při sběru sladkých šťáv květů rostlin (nektar), výměšků hmyzu na povrchu rostlin (medovice), nebo na živých částech rostlin včelami (*Apis mellifera*), které sbírají,

přetvářejí, kombinují se svými specifickými látkami, uskladňují a nechávají dehydratovat a zrát v plástech [3].

1.1 Druhy medu

Všechny látky, které jsou obsažené v medu, mají vliv na jeho konzistenci, barvu, chuť, vůni i vzhled. Rozlišujeme medy: nektarové, medovicové a smíšené. Avšak dle Vyhlášky č. 76/2003 Sb. se medy smíšené nerozlišují. Stanovuje se pouze limit pro medy nektarové a medovicové, které mohou obsahovat vždy i příměs druhé skupiny medu. Dle Vyhlášky č. 76/2003 Sb. je členění medu definováno [1, 3]:

a) podle původu:

1. květový,
2. medovicový.

b) podle způsobu získávání nebo obchodní úpravy:

1. vytočený med,
2. plástečkový med,
3. lisovaný med,
4. vykapaný med,
5. med s plástečky,
6. filtrovaný med,
7. pastový med,
8. pekařský med.

1.1.1 Med květový

Tento med je získáván z nektaru rostlin. V praxi se běžně setkáváme s jednodruhovými a vícedruhovými medy. Včelaři získávají jednodruhové medy pouze při vysoké snůšce z jedné plodiny, např. řepky, akátu a maliny. Tehdy se používá označení podle dominantního zdroje snůšky, např. med řepkový, akátový, malinový, slunečnicový, lipový. Vícedruhové květové medy vznikají postupně z více rostlinných zdrojů; včely je v úlu přenášejí podle potřeby z buňky plástve do buňky a neukládají je odděleně [4, 5, 6].

1.1.2 Med medovicový

Med se získává z medovice, což je hustá sladká tekutina, vylučovaná stejnokřídlým hmyzem (tento hmyz cizopasí na větvích, listech, pupenech listnatých a jehličnatých dřevinách – jsou to mšice, puklice a mery), která stéká po kapkách na rostlinách, čímž dochází k tomu, že se na nich vytváří lepkavé povlaky. Zdrojem medovice je rostlinná šťáva, která proudí v rostlinách, tento hmyz šťávu vysává svými ústními orgány a následně procházejí jejich trávicím traktem. Zde probíhají různé biochemické procesy, které upravují složení cukrů a na jeho konci je vylučována sladká tekutina ve formě medovice ven na listy nebo jehličí, odkud ji včela medonosná sbírá. Čerstvá medovice obsahuje cca 45 % vody, dále ji tvoří cukry, kde je nejvíce zastoupena sacharóza, glukóza, fruktóza, maltóza. Mezi minoritní složky patří melecitóza a rafinóza, ty vznikají v trávicím traktu mšic nespecifickými transglykosidačními reakcemi. Při průchodu trávicím traktem mšice se cukry štěpí invertázou na glukózu a fruktózu, které vedle sacharózy patří mezi hlavní složky medovicového medu. Dále medovice obsahuje minerální látky, vitaminy a barviva. pH medovice se pohybuje kolem 6,7–7,5 [1, 7, 8].

Med se dělí rovněž podle způsobu jeho získávání, kdy drtivá většina medů se v dnešní době získává pomocí vytáčení, kdy dochází k působení odstředivé síly na med v plástech. V USA je velmi populární tzv. med plástečkový, který včely nanosily do jimi vystavěných malých kousků plástu, a ten se pak s těmito plástečky v průhledných obalech prodává. Na včelaře, kteří odebírají med včelstvům z nerozborných úlů, je pamatováno v normě s tzv. lisovaným medem, který je získáván lisováním bezplodových plástů za použití mírného ohřevu o 45 °C nebo bez použití tepla. V normě se uvádí také med vykapaný, který se získává vykápáním odvíčkových bezplodových plástů. Do medu se může vkládat jeden nebo více kusů plástečkového medu, v tomto případě se jedná o tzv. med s plástečky [1, 3].

Ve Vyhlášce se dělí med i podle jejich následných úprav na med filtrovaný, tj. med, který byl po získání upraven odstraněním cizích anorganických nebo organických látek takovým způsobem, že dochází k významnému odstranění pylových zrn, a med pastový, jehož krystalizace byla pomocí technologické úpravy převedena do pastovité konzistence a je tvořen směsí jemných krystalků. Poslední skupinou medu je med pekařský, který je využíván v průmyslu a nelze ho tak považovat za med určený k přímé spotřebě, zejména kvůli zvýšenému obsahu vody [1, 3].

1.2 Produkce medu

Vznik medu je velmi složitý proces, který je závislý na celém včelstvu – kdy totiž jedna včela nemůže z nasátého nektaru nebo medovice sama med vytvořit. Dalším faktorem je i vliv rostlin, které poskytují včelstvu potravu. Včely z nich jsou schopny vytvořit některé včelí produkty přímo (med, pyl, a propolis) – tj. bez transformace pomocí jejich metabolismu. Z tohoto důvodu je složení těchto produktů přímo závislé na složení původního rostlinného zdroje. Včely přenášejí sladké šťávy (nektar, medovice) v medném váčku do úlu, kde je předávají úlovým včelám, ty stojí hlavičkami k sobě a dotýkají se sosáčky, tím se produkt zahušťuje a s výměškem hltanových žláz se štěpí na jednoduché cukry. Po uložení do buněk se začne odpařovat voda, což se urychluje několikerým přenesením. Dochází k opakování tohoto procesu a díky němu se v medu rozbíhá chemicko-fyzikální proces [1]:

1) obohacení o látky pocházející z hltanových a zřejmě i pyskových žláz včel dělnic:

a) enzymy

- invertáza, diastáza a glukózooxidáza. Kyselá fosfatáza a kataláza nacházející se v medu, jsou rostlinného původu.

b) aminokyseliny

- prolin zaujímá největší obsah aminokyselin v medu, který je téměř živočišného původu. Prolin pravděpodobně hraje důležitou roli během spojení roztoku nektarů nebo medovice s roztokem enzymů.

c) a další látky ve stopovém množství – tuky, vitaminy skupiny B.

2) chemické změny: - štěpení disacharidů a vyšších cukrů na monosacharidy a cukry nižší.

3) fyzikální změny: - zahuštění

Zahušťovací proces je nezbytný k vytvoření vysokého osmotického tlaku neboli fyziologického sucha v medu tak, aby došlo k zabránění množení mikroorganismů – tím dojde ke zakonzervování medu na neomezeně dlouhou dobu. Aby došlo k zahuštění, tak úlové včely hlavou směrem nahoru vyvrhují sladinu na sosák, ten však zůstává uložený v sosákové jámě. Jen distální část sosáku se vyklání mimo sosákovou jámu a mezi touto částí sosáku a jeho zbytkem zůstává zachycena kapka. Včela nejprve roztáhne kusadla a přední část sosáku se posune dopředu a dolů. Zároveň se objeví kapka nektaru v předústní krajině. Postupným oddalováním přední části sosáku a jeho přitahováním zpět se objevuje stále více

nektaru, který jako kapka nakonec vyplní oblast mezi bází a koncem ústních ústrojí. Včela pak vtahuje celou kapku zpět do medného volátka. Tuto činnost včela opakuje v průměru po dobu pěti až deseti sekund, a to až do zahuštění na 28–32 % vody, tento proces může trvat až 20 minut. Při této koncentraci včela jen s obtížemi tekutinu protlačí jícnem, a proto ji vkládá do buňky, kde pomocí odvětrávání celého úlu dochází k zahuštění. Kapka částečně již zpracované sladiny je následně pověšena na horní okraj buňky. Při silném přívalu sladiny je tato sladina pověšena ihned do buněk a teprve později zpracovávána. Teprve po náležitém zahuštění je med včelami opět přemísťován, buňky jsou plněny až po okraj a zavíčkované voskovými víčky. Podle toho, že je včelami víčkován, a při trhnutí plástem nevystříkne, se pozná zralý med. Včelstvo díky vysokému počtu dělnic může nasbírat denně při běžné snůšce 1-2 kg nektaru či medovice, při vysoké snůšce až 10 kg a urychleně je zpracovat na med. Při téměř stálé snůšce lze získat až 200 kg medu od včelstva za sezónu, avšak u nás se maximální výnosy pohybují kolem 100 kg [1].

1.2.1 Produkce

Celosvětově je Evropská unie po Číně druhý největší výrobce medu. V evropské osmadvacítce je zhruba 600 tisíc včelařů a 17 milionů úlů, každý rok se vyrobí okolo 250 tisíc tun medu. Ačkoliv se čísla zdají být vysoká, výroba neodpovídá poptávce. V roce 2016 se do Evropské unie dovezlo okolo 200 tisíc tun medu, zejména z Číny, ta zajišťuje přibližně 40 % dovozu do Evropské unie. Kromě Číny mezi hlavní zdroje dovozu medu patří Ukrajina, Argentina a Mexiko. V porovnání se světovou konkurencí čelí včelaři v Evropské unii poměrně vysokým výrobním nákladům a jejich vyvážený med je dražší než ten dovážený. V roce 2016 stál kilogram medu dovezeného do Evropské unie v průměru 2,23 eur, zatímco kilogram medu vyvezeného do třetích zemí přišel na 5,69 eur. Evropská unie v roce 2016 vyvezla okolo 20 tisíc tun medu především do Švýcarska, Saudské Arábie, Japonska, USA a Kanady [9].

S narůstajícím dovozem, zvláště velmi levných medů, u kterých kvalita odpovídá dovozní ceně, může dojít k ohrožení tuzemského chovu včel zavlečením různých nebezpečných nákaz. To platí také pro dovoz vosku, který nepodléhá veterinární kontrole [10].

Tabulka 1 Vývoz přírodního medu a včelího vosku z ČR v tunách v letech 2013–2018 [10]

	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Med přírodní	1526	1184	906	1416	1540	1060
Včelí vosk	0,8	1,3	0,6	0,4	65,0	57,3

Tabulka 2 Dovoz přírodního medu a včelího vosku do ČR v tunách v letech 2013–2018 [10]

	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Med přírodní	2086	2544	2945	1776	3177	2706
Včelí vosk	40,5	41,8	40,6	27,2	118,0	111,4

1.3 Včelí produkty

1.3.1 Propolis

Propolis je přírodní pryskyřičná látka sbíraná včelami z částí rostlin, pupenů a exsudátů. Včely jej používají jako pečetidlo pro své úly, a co je důležitější, k zabránění rozkladu tvorů, které byly zabity včelami po invazi do úlu. Je charakteristický svou lipofilní povahou, za studena je tvrdý a křehký, a za tepla měkký, poddajný a velmi lepkavý. Má příjemnou aromatickou vůni a liší se barvou v závislosti na zdroji a stáří. Propolis je také součástí tradiční medicíny a chemická analýza ukázala na přítomnost nejméně 300 sloučenin v jeho složení. Je složen hlavně z pryskyřice až z 50 %, vosku 30 %, éterických olejů 10 %, pylu 5 % a dalších organických sloučenin 5 %. Mezi těmito organickými sloučeninami můžeme najít fenolové sloučeniny a estery, flavonoidy ve všech jejich formách (flavonoly, flavony, flavonony, dihydroflavonoly a chalkony), terpeny, beta-steroidy, aromatické aldehydy a alkoholy, seskviterpeny a stilbenové terpeny. Stejně jako u medu se jeho složení liší v závislosti na různých faktorech, jako je zdroj exsudátů, podnebí a podmínky prostředí. Fenethylester kyseliny kávové je biologicky aktivní složka propolisu s několika zajímavými biologickými vlastnostmi, včetně apoptózy, metastáz a radiační citlivosti rakovinných buněk. Jednoduchá frakcionace propolisu pro získání sloučenin je obtížná kvůli jeho složitému složení. Obvyklým způsobem byla extrakce frakce rozpustné v alkoholu, která se nazývá „propolisový balzám“, a zanechala tak v alkoholu nerozpustnou nebo voskovou frakci. Ve všech vzorcích propolisu byly identifikovány vitaminy B1, B2, B6, C, E a minerální prvky stříbro, cesium, rtuť, lanthan, antimon, měď, mangan, železo, vápník, hliník, vanad a křemík. Rostlinný původ propolisu studovalo mnoho vědců, prokázali, že složení propolisu je velmi podobné pupenovým exsudátům [11, 12].

1.3.2 Mateří kašička

Mateří kašička je exkluzivním jídlem larvy včelí královny (*Apis mellifera*). Mateří kašička se získává vybíráním nebo odsáváním z matečnicku ve stáří larvy 3–4 dnů, kdy je mateří kašičky v buňce největší množství. Je to bělavá látka se želatinovou konzistencí, často není homogenní díky přítomnosti nerozpuštěných granulí různé velikosti. Má výrazně ostrý zápach a chuť. Je částečně rozpustná ve vodě a vysoce kyselá (pH 3,4–4,5) s hustotou 1,1 g/ml. Chemicky mateří kašička obsahuje vodu 50 % až 60 %, bílkoviny 18 %, sacharidy 15 %, lipidy 3 % až 6 %, minerální soli 1,5 % a vitaminy spolu s velkým počtem bioaktivních látek, jako jsou: kyselina 10-hydroxy-2-decenová s imunomodulačními vlastnostmi, antimikrobní protein, mastné kyseliny a peptidy. Mateří kašička také prokázala významně lepší zotavení z poškození vyvolaného 5-fluorouracilem [12, 13, 14].

1.3.3 Pyl

Včelí pyl obsahuje asi 250 látek včetně aminokyselin, lipidů (triacylglycerolů, fosfolipidů), vitaminů, makro – a mikroživin a flavonoidů. Podle nejnovějších národních údajů činí průměrný obsah hlavních složek ve vzduchu sušeném pylu (při teplotě 40 °C) tyto hodnoty: bílkoviny 32,8 %, včetně esenciálních aminokyselin 11,5 % a redukující cukry 40,7 %, včetně sacharózy 3,7 %, lipidů 12,8 %, vitamínu C 0,19 %, β -karotenu 0,07 % a bioelementů 4,0 %. Množství pylu shromážděného z jedné kolonie během jednoho dne je 50–250 g. Podle národních údajů poskytuje jedna včelstvo 1 až 7 kg pylu ročně [15].

Včelí pyl je surovina, ze které včely produkují „včelí chléb“. Shromažďují pyl z prašníků rostlin, mísí je s malou dávkou sekrece ze slinných žláz nebo nektaru a ukládají je do zvláštních košů, které se nacházejí na holenní kosti jejich zadních nohou, tzv. pylové zátěže. Včely sbírají a transportují včelí pyl do úlu. V úlu je shromážděný pyl, zvlhčený slinami a fragmentovaný nelétavými včelami, zabalen do buněk plástve. Poté je povrch sebraného pylu pokryt tenkou vrstvou medu a vosku. Vytvořenou látkou je včelí chléb, který prochází anaerobní fermentací a je konzervován díky vznikající kyselině mléčné. Včelí chléb představuje základní zdroj bílkovin pro včelstvo. Kromě toho je také zdrojem výživných a minerálních látek pro mateří kašičku produkovanou včelami dělničkými. Včelí pyl se vyskytuje v prašnicích semenných rostlin ve formě zrn o velikosti 2,5–250 μm . Pylová zrna se v závislosti na druhu rostlin liší tvarem, barvou, velikostí a hmotností. Tvary zrn jsou různé: kulaté, válcovité, zvonovité, trojúhelníkové nebo trnité. Jejich váha se rovná tuctu nebo několika desítkám mikrogramů. Barva pylu se mění od jasně žluté po černou. Včelí pyl

se používá při apiterapeutické léčbě, protože vykazuje řadu účinků, jako jsou antifungální, antimikrobní, antivirové, protizánětlivé, imunostimulační a lokální analgetikum a také usnadňuje proces granulace hojení popálenin [15].

1.3.4 Včelí vosk

Vosk je vylučován žláznatým epitelem, nacházejícím se na 3. až 6. sternitu zadečku dělnic, na tzv. voskových zrcátkách. Vosk je velmi tmavá chemicky inertní látka, v ruce lze vosk lehce hníst. Na omak vosk není mastný a nelepí se ani při stisku mezi zuby. Na lomu vytváří charakteristický lasturovitý povrch [16].

Ve včelím vosku se nachází až 284 různých látek. Všechny z nich nebyly identifikovány, ale zhruba 111 z nich jsou těkavé látky. Konečné aroma vosku tvoří přinejmenším 48 látek. Z kvantitativního hlediska mezi nejvýznamnější látky patří nasycené a nenasycené monoestery a diestery nasycených a nenasycených uhlovodíků, volných mastných kyselin a hydroxypolyesterů. Hlavními složkami jsou alkylestery mastných kyselin (asi 72 % zejména myricylester kyseliny palmitové); hlavními kyselinami jsou kyselina cerotová a neocerotová; hlavními alkoholy jsou myricylalkohol a cerylalkohol. Zbylých 44 % vosku jsou tvořeny minoritními komponenty, které se významně podílejí na fyzikálních vlastnostech vosku [16].

Včelí vosk je zdravotně nezávadný pro lidský konzum a je povoleno jeho eventuální aplikace jako příměs do potravin (jako aditivum). Nejznámější formou je plástečkový med, ale v tomto případě se vosk pouze žvýká. Vosk je inertní, tzn., že nedochází k interakci mezi trávicím systémem člověka a voskem, a tak projde zažívacím traktem bez vedlejších účinků. Vosk je zejména inertní látkou, a proto jsou jeho přímé účinky na organismy bezvýznamné. Avšak nepřímé účinky mohou být velmi výrazné – např. vosk má významnou ochrannou funkci, z tohoto důvodu se často používá k peletaci nebo jako ochranný film na povrchu ovoce proti jeho vysychání či lidské pokožce proti alergenům. Žvýkání tmavých plástů i bez medu, plodu či pylu je účinné proti nachlazení. U vosku byly potvrzeny protizánětlivé a antioxidační účinky, ačkoliv velmi slabé. Je doporučeno žvýkat víčka po odvíčkování plástů, zde byly zjištěny antivirální účinky [16].

Vosk se kdysi v potravinářství využíval při balení, různých technikách zpracování a konzervaci potravin. V cukrářství se i používal jako separační médium, v tabákovém průmyslu při výrobě cigaretových filtrů. V současnosti se však majorita těchto aplikací nahradila vosky syntetickými. Včelí vosk se nicméně používá při voskování papírových

spotřebitelských balení džusů či dokonce medů. Závisí však na dané technologii, protože i zde dochází k postupným náhradám [16].

1.3.5 Včelí jed

Včelí jed je průhledná kapalina, která snadno vysychá i při pokojové teplotě, se silným štiplavým zápachem a hořkou chutí. Jedná se o hydrolytickou směs proteinů s kyselým pH (4,5–5,5), kterou včely používají k obraně. Při kontaktu se sliznicemi nebo očima způsobuje značné pálení a podráždění. Včelí jed je rozpustný ve vodě a nerozpustný v alkoholu a síranu amonném. Při kontaktu se vzduchem vytváří šedavě bílé krystaly. Sušený jed získává světle žlutou barvu a některé komerční přípravky jsou hnědé, o nichž se předpokládá, že jsou způsobeny oxidací některých proteinů jedu. Včelí jed obsahuje řadu velmi těkavých sloučenin, které se při sběru snadno ztrácejí, je považován za bohatý zdroj enzymů, peptidů a biogenních aminů, má měrnou hmotnost 1,1331. Včelí jed se využívá k terapii, která využívá aplikaci včelího jedu k léčbě různých nemocí, odpradávná se používá v tradiční medicíně. Včelí jed jako dobře známý farmakologicky aktivní produkt úlu [17].

Použití včelího jedu, také známého jako apotoxin, bylo zdokumentováno pro jeho léčebné účely přibližně před 6000 lety a několik studií prokázalo jeho antimikrobní účinky. Bylo prokázáno, že složka včelího jedu, známá jako melittin (zahrnuje přibližně 50 % celého včelího jedu) má významné účinky na spirochety *Borrelia* při minimální inhibiční koncentraci (MIC) koncentracích 100 µg/ml. Nedávná data ukazují podobné hodnoty MIC pro melittin, pokud se používají k léčbě několika dalších gramnegativních mikroorganismů, jako je *Salmonella enterica* a *Yersinia kristensenii* [18].

2 FYZIKÁLNĚ – CHEMICKÉ SLOŽENÍ MEDU

2.1 Chemické složení medu

2.1.1 Voda

Obsah vody v medu souvisí s různými faktory, jako je botanický a geografický původ nektaru, půdní a klimatické podmínky, roční období sklizně, intenzita toku nektaru, stupeň zrání, manipulace včelaři během období sklizně, stejně jako těžba, podmínky zpracování a skladování. Medy různého botanického původu mohou mít různý obsah vlhkosti. Vlhkost je parametr kvality související s trvanlivostí medu. Obecně platí, že procento vody v medu je vhodné, pokud jsou skladovací buňky zcela zakryty včelím voskem [19].

Vlhkost medu se běžně pohybuje mezi 13–25 %, optimální je asi 17 %. Medy s velmi nízkým obsahem vlhkosti se obtížně zpracovávají. Naopak medy, jejichž vlhkost je vyšší než 18 %, jsou náchylné k fermentaci, protože osmotický tlak cukru není dostatečně silný, aby zabránil množení osmofilních kvasinek. Čím vyšší je vlhkost medu, tím vyšší je počet kvasinek, které způsobují kvašení medu [19].

Obsah vody ovlivňuje některé další vlastnosti medu, jako je barva, krystalizace, viskozita, chuť a hustota. Jelikož je med velmi hygroskopický produkt, je důležité během zpracování a balení medu zabránit absorpci vlhkosti z prostředí. Množství vody dostupné pro mikroorganismy v dané potravíně se označuje jako aktivita vody (a_w). Aktivita vody je definována jako vztah tlaku vodní páry potraviny (p) k tlaku páry čisté vody (p_0) při stejné teplotě. Aktivita vody v čisté vodě je 1 a každé přidání látek fixujících vodu způsobí, že $p < p_0$. Z tohoto důvodu je aktivita vody vždy nižší než 1. V medu se a_w pohybuje od 0,49 do 0,65, ačkoliv u některých medů může dosáhnout hodnoty 0,75. Aktivita vody potřebná pro rozvoj mikroorganismů je asi 0,90 u bakterií, 0,80 u kvasinek a 0,70 u plísní. Hodnoty a_w pod 0,60 inhibují růst osmofilních kvasinek, které způsobují fermentaci medu. Vliv a_w na růst mikroorganismů závisí na faktorech, jako je pH, teplota, koncentrace kyslíku a oxidu uhličitého, a také na přítomnosti inhibičních látek. a_w závisí na složení cukrů, krystalizaci medu a podmínkách prostředí [19].

2.1.2 Cukry

Med je přesycený roztok cukru, kde hlavní složkou tvoří sacharidy, které tvoří asi 95 % sušiny. Monosacharidy představují asi 75 % cukrů v medu, spolu s 10–15 %

disacharidů a malým množstvím dalších cukrů. Cukry přítomné v medu jsou odpovědné za vlastnosti, jako je energetická hodnota, viskozita, hygroskopicitata a granulace. Složení cukru závisí hlavně na botanickém původu medu, zeměpisném původu a je ovlivněno podnebím, zpracováním a skladováním. Koncentrace fruktózy a glukózy, jakož i poměr mezi nimi, jsou užitečnými ukazateli pro klasifikaci monoflorových medů. Téměř u všech druhů medu tvoří fruktóza největší podíle sacharidů, s výjimkou některých medů, jako je řepkový (*Brassica napus*) a pampeliškový (*Taraxacum officinale*), kde podíl glukózy může být vyšší než podíl fruktózy, a tudíž tyto medy obecně mají rychlou krystalizaci [19, 20].

Monosacharidy (hexózy) fruktóza (32–44 %) a glukóza (23–38 %) jsou hlavními medovými cukry. Velmi malý je podíl dalších monosacharidů, jako je galaktóza. V medu bylo detekováno více než 45 di-, tri- a jiných oligo- a polysacharidů v malém množství (5–15 %), jako je maltóza, sacharóza, turanóza, trehalóza, gentiobióza, isomaltóza, laktóza, kojibióza, rafinóza, eróza, melezitóza, maltotrióza, panóza, isomaltotrióza a maltotetraóza, mimo jiné. Maltóza (7 %) a sacharóza (1 %) jsou nejdůležitější medové disacharidy [19, 20].

Množství a typ sacharidů se u vzorků z různých rostlinných zdrojů liší, což je užitečné pro klasifikaci jednodruhových medů. Koncentrace sacharidů mohou být použity k rozlišení květových a medovicových medů, protože ve srovnání s květovými medy obsahují medovicové medy nižší hladiny monosacharidů, vyšší hladiny trisacharidů (hlavně melezitózy, erózy, rafinózy a maltotriózy) a také vyšší hladiny jiných oligosacharidů [19].

Když se med zahřívá nebo skladuje po dlouhou dobu, pentózy a hexózy se rozkládají pomalou enolizací a rychlou β -eliminací tří molekul vody za vzniku nežádoucích sloučenin, jako jsou furany. Hlavní vytvořené furany jsou furfural, který je odvozen od pentóz, a hydroxymethylfurfural (HMF), odvozený od hexóz, jako je glukóza a fruktóza. Jedná se o hlavní produkty rozkladu cukrů a jejich výskyt v potravinách obvykle souvisí s neenzymatickými reakcemi hnědnutí, tj. Maillardovou reakcí, degradací cukru v kyselém prostředí a karamelizací. Ve skutečnosti byly tyto furany používány jako značkovače pro tepelné zpracování potravin. Furfurylalkohol je také indikátorem tepelného zpracování a podmínek skladování. Tyto sloučeniny tedy nejsou považovány za dobré markery květového medu, i když mohou naznačovat možnou ztrátu čerstvosti v důsledku vystavení vysokým teplotám nebo dlouhodobému skladování [20].

2.1.3 Bílkoviny

Obsah bílkovin a aminokyselin v medu je relativně nízký, maximálně 0,7 %. Med obsahuje nejen esenciální, ale dokonce plný počet aminokyselin. Hlavní aminokyselinou je prolin, který je ukazatelem zralosti medu. Obsah prolinu v medech by měl být vyšší než 200 mg/kg. Hodnoty pod 180 mg/kg značí, že med je pravděpodobně znehodnocen přidáním cukru. Existence bílkovin mnohdy způsobuje, že med má nižší povrchové napětí, a proto má výraznou tendenci produkovat pěnu, tvořit špínu a vzduchové bubliny [21, 22, 23].

Veškerý dusík nutně nepatří k proteinovým látkám, ve skutečnosti je pouze 40–80 % celkového dusíku v proteinové frakci a zbytek lze připsat volným aminokyselinám. Většina aminokyselin je přítomna ve vázané formě. Nejsilněji je zastoupen prolin s podílem 50–85 % z celkového obsahu v květovém medu, následovaný fenylalaninem a kyselinou glutamovou. Vzhledem k tomu, že většina aminokyselin je přítomna ve stopovém množství, je do potravinových zákonů Evropské unie pro kvalitativní parametry medu zahrnut pouze obsah prolinu. Množství prolinu lze poté použít k vyjádření celkového obsahu aminokyselin. Aminokyselinový profil lze využít ke stanovení zeměpisného nebo botanického původu medu. Volné aminokyseliny jsou rovněž dobrým indikátorem květového nebo medovicového původu medu. V některých případech je aminokyselinový profil důležitý předurčitel aroma a chuti potravinářských výrobků [22, 23, 24].

2.1.4 Enzymy

Enzymy jsou biologické katalyzátory (známé také jako biokatalyzátory), které urychlují biochemické reakce v živých organismech. Přírodní med obsahuje malé množství enzymů, z nichž nejdůležitější jsou diastáza, invertáza a glukóza-oxidáza [19, 25].

Diastáza (amyláza) je medový enzym s nejlepší odolností proti teplu, proto je široce používán jako indikátor čerstvosti medu a jeho hodnota je regulována v několika právních předpisech. Diastáza hydrolyzuje škrob a dextriny, což vede k nižšímu obsahu sacharidů. Jeho funkce v medu není dobře známá, protože nektar neobsahuje škrob, ale pravděpodobně se podílí na trávení pylu včelami. Kromě živočišného původu (sekrece hypofaryngeálních žláz) má také rostlinný původ (nektar nebo medovka). Z tohoto důvodu závisí aktivita diastázy také na botanickém původu medu [19, 20].

Invertáza (α -glukosidáza) je důležitý enzym z medu, protože přeměňuje nektar a medovinu na med a hydrolyzuje sacharózu na fruktózu a glukózu. Kromě toho transglykosilázová aktivita invertázy produkuje v přechodných krocích některé

oligosacharidy. Aktivita invertázy se udržuje po extrakci medu a během skladování. Invertáza dělá z medu vysoce energetickou potravinu, která zabírá minimální prostor v buňce šestiúhelníkové stěny. Fruktóza byla popsána jako cukr, který inhibuje invertázu, na rozdíl od glukózy. Její aktivita klesá s teplem a během skladování. Invertáza byla navržena jako lepší indikátor kvality medu než diastáza, protože se zdá být citlivější na tepelný proces. Některé nektary vyžadují menší manipulaci včel v úlu, aby se dosáhlo této husté konzistence, takže hladiny invertázy jsou nižší [19].

Glukózooxidáza degraduje glukózu na glukonolakton, který zase poskytuje kyselinu glukonovou, zvyšuje kyselost medu a uvolňuje malé množství peroxidu vodíku, sloučeniny odpovědné za mikrobiální rezistenci medu. Produkce peroxidu vodíku chrání med před bakteriálním rozkladem, dokud nedosáhne dostatečné koncentrace cukru, aby se zabránilo jeho mikrobiálnímu růstu díky jeho osmotickému tlaku. Pokud med není naředěn, obsah kyseliny glukonové snižuje pH, čímž inhibuje enzymatickou aktivitu. Tento enzym je citlivý na světlo, viditelné záření (hlavně od 425 do 525 nm) a tepelné zpracování inaktivované při 60 °C [19, 20].

Dalšími důležitými enzymy přítomnými v medu v menším množství jsou kataláza a kyselá fosfatáza, jejichž původem je hlavně pyl, stejně jako nektar a medovka. Kataláza převádí peroxid vodíku produkovaný glukózooxidázou na vodu a kyslík. Kyselá fosfatáza produkuje anorganický fosfát z organických fosfátů. Může to být indikátor kvašení medu. Aktivita kyselé fosfatázy závisí na pH medu. Čím vyšší je pH, tím vyšší je aktivita kyselé fosfatázy, přičemž optimální rozmezí pH je mezi 4,5–6,5. Aktivita kyselé fosfatázy také klesá během skladování. β -glukosidáza je enzym přidávaný sekretem včel, který hydrolyzuje glykosidické toxiny přijímané včelami a transformuje β -glukany na oligosacharidy a glukózu. V neposlední řadě existují enzymy, jako je proteáza, která hydrolyzuje proteiny a polypeptidy za vzniku peptidů s nižší molekulovou hmotností a esterázy, která štěpí estery [19].

2.1.5 Lipidy

V medu se nachází nepatrné množství lipidových sloučenin (asi 0,04 %), mezi ně patří glyceroly, steroly, fosfolipidy a různé kyseliny, jako je palmitová, olejová, laurová, myristová, stearová a linolová. Vznikají z rostlin, a hlavně ze zbytků vosku [20, 26].

2.1.6 Organické kyseliny

Obsah organických kyselin v medu je přibližně 0,5 %. I přes své malé množství hrají organické kyseliny důležitou roli v mnoha vlastnostech medu, jako jsou organoleptické, fyzikální a chemické. Tyto kyseliny jsou například zodpovědné za speciální příchutě medů. Organické kyseliny lze použít jako indikátory ke zjištění čerstvosti a pravosti medu. Zjistilo se, že organické kyseliny přispívají k antimikrobním a antioxidačním účinkům medu [27, 28].

V medu se nachází organické kyseliny, jako je kyselina octová, citrónová, mravenčí, glutarová, fumarová, jantarová, D-glukonová, šťavelová, D-glukuronová, L-jablečná, propionová, D-chinová, L-vinná a mnoho dalších. Převládající organickou kyselinou v medu je kyselina glukonová. Kyselina glukonová je syntetizována pomocí glukózooxidázy, kterou včely přidávají během procesu zrání a je přítomna ve všech druzích medu. Množství kyseliny glukonové závisí na aktivitě glukózooxidázy. Rovněž i kyselina citrónová byla nalezena ve všech druzích medu. Koncentraci kyseliny citrónové lze použít k rozlišení květového medu od medovice. Obsah kyseliny citrónové v květovém medu je totiž pozoruhodně nižší než v medovicovém medu. Bylo publikováno, že organické kyseliny, jako jsou kyselina šťavelová, mléčná a mravenčí, mohou být použity jako účinná léčba proti ektoparazitickému roztoči (*Varroa*). Tento roztoč je velmi vážný problém včelařství v Evropě a USA. Používání syntetických pesticidů může negativně ovlivnit lidské zdraví, a proto se organické kyseliny používají jako léčba včelstev napadené tímto roztočem. Bylo zjištěno, že koncentrace kyseliny mravenčí v medu může být zvýšena, protože se používá jako léčba proti tomuto ektoparazitickému roztoči [28].

Organické kyseliny lze použít jako indikátory aerobní nebo anaerobní fermentace v medu. Tyto organické kyseliny, které se v medu vyskytují během procesu fermentace, mohou negativně ovlivnit kvalitu medu. Kvalitativní a kvantitativní obsah organických kyselin medu může záviset na mnoha faktorech. Většinou to závisí na botanickém původu, geografických a environmentálních podmínkách. Také doba skladování může mít vliv na obsah organických kyselin [28].

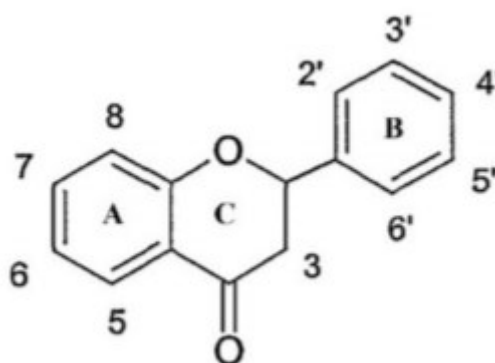
2.1.7 Fenolové sloučeniny

Fenolové sloučeniny jsou chemicky heterogenní skupina, s přibližně 10 000 sloučeninami, které jsou seskupeny do různých tříd podle jejich základní chemické struktury. Lze je rozdělit na neflavonoidy (kyselina fenolová) a flavonoidy (flavony, flavonoly,

flavonony, flavanoly, antokyanidiny, isoflavony a chalkony). Všechny tyto sloučeniny jsou často produktem sekundárního metabolismu rostlin a vyznačují se přítomností několika fenolových skupin, které jsou spojeny s více či méně složitými strukturami. Fenolové složení medu závisí zejména na jeho květinovém původu; ve skutečnosti jej lze použít jako nástroj pro klasifikaci a autentizaci, zejména v případě jednodruhových medů [20, 29].

Tyto látky byly uznány jako hlavní odpovědné za antioxidační aktivitu medu, která je spojena hlavně se schopností zachytávat volné radikály prostřednictvím tvorby stabilnějších a méně toxických molekul. Fenolové sloučeniny stabilizují volné radikály, když uvolňují vodík z jedné ze svých hydroxylových skupin; stupeň aktivity souvisí s počtem jejich hydroxylových skupin [29].

Flavonoidy jsou přírodní chemické sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností a jsou rozpustné ve vodě. Jsou tvořeny dvěma benzenovými kruhy, střídanými lineárním řetězcem tří atomů uhlíku (C6–C3–C6); tato struktura se často pře uspořádává a tvoří tři kruhy s 15 atomy uhlíku zvané A, B a C (Obrázek 1). Obecně tyto sloučeniny mají minimálně dvě fenolové skupiny a jsou často spojovány s cukry, zejména s glukózou, společně s xylózou, galaktózou, ramnózou, arabinózou, rutinosem a glukoramnózou; když flavonoidy nejsou spojeny s cukry, nazývají se aglykony. Flavonoidy lze poté klasifikovat podle stupně oxidace uhlíkového kruhu na: flavanoly, flavony, flavanonoly, flavonoly, flavanony, isoflavony, antokyaniny a antokyanidiny. Nejhojnějšími v medu jsou flavony, flavanoly a flavonoly [29].



Obrázek 1 Základní struktura flavonoidů [29]

Fenolové kyseliny (fenolkarboxylová kyselina) obsahují fenolový kruh a alespoň jednu funkci organické karboxylové kyseliny; lze je rozdělit podle jejich struktury: C6–C3 (např. kyselina p-kumarová, ferulová a kávová), C6–C2 (např. acetofenony a kyseliny fenyloctové) a struktura C6–C1 (např. injekční, vanilková a gallová). Obvykle je většina

těchto sloučenin vázána na strukturní složky rostliny (celulóza, lignin), ale také na jiné typy organických molekul, jako je glukóza, jiné cukry nebo flavonoidy [29].

2.1.8 Vitaminy

Med obsahuje vitaminy, které pocházejí zejména z pylu květů, které včely navštěvují, a také z nektaru nebo medovice. Obsah vitaminů v medu je tak nízký, že ho nelze považovat za dobrý zdroj těchto živin. V medu se nachází zejména vitaminy rozpustné ve vodě, obsah vitaminů rozpustných v tucích je minimální, protože med téměř neobsahuje lipidové látky. Nejdůležitějším vitaminem medu je vitamin C (kyselina askorbová), který má antioxidační účinek. Barevné látky v medu (flavonoidy) chrání kyselinu askorbovou před rozkladem a mnohonásobně zvyšují účinek vitaminů [19, 23].

Vitaminy skupiny B byly také detekovány v různých množstvích. Obsah vitaminu B v medu je srovnatelný se spektrem vitaminů B většiny druhů ovoce a zeleniny. Obsah vitaminů rozpustných ve vodě je silně závislý na druhu medu a podléhá značným výkyvům. V medu můžeme nalézt další zajímavou biologicky aktivní látku zvanou cholin. Jedná se o látku s obdobným účinkem jako vitamin B, jen s tím rozdílem že si ho tělo dokáže syntetizovat samo. Ale pouze za předpokladu přítomnosti methioninu, který není využíván k syntéze bílkovin. Naneštěstí med obsahuje obě tyto látky, a proto může být methionin k dispozici pro další funkce [23].

2.1.9 Minerální látky

Med také obsahuje minerální látky a těžké kovy, které hrají důležitou roli při určování vlastností medu. Obsah minerálních látek se pohybuje v rozmezí od 0,04 % u světlých medů do 0,20 % u tmavších medů. Obsah minerálních látek je sice v malém množství, avšak v širokém spektru. V medu bylo analyzováno až 40 minerálních látek, přičemž největší podíl má draslík. V květových medech je množství minerálních látek nižší než v medech medovicových [30, 31].

Hlavní minerální látky pochází hlavně z půdy a rostlin produkujících nektar, ale mohou také pocházet z antropogenních zdrojů, jako je znečištění životního prostředí. Bylo zjištěno, že mikro – nebo stopové minerální látky pocházející z organických nebo rostlinných zdrojů jsou důležité pro udržení lidského zdraví, zatímco minerální látky pocházející z anorganických nebo kovových zdrojů, jako jsou těžké kovy, mohou být toxické [31].

Tabulka 3 Průměrný obsah některých minerálních látek světlých a tmavých medů [23]

Minerální látka	Květový med (světlý)	Medovicový med (tmavý)
Draslík	205,0 ppm	1676,0 ppm
Sodík	18,0 ppm	76,0 ppm
Vápník	49,0 ppm	51,0 ppm
Hořčík	19,0 ppm	35,0 ppm
Železo	2,4 ppm	9,4 ppm
Mangan	0,3 ppm	0,6 ppm
Měď	0,3 ppm	0,6 ppm

2.1.10 Barviva

Barviva jsou zodpovědná za barvu medu. Nejdůležitější jsou polyfenoly, karotenoidy, xantofyly a antokyany, které lze seskupit do barviv rozpustných ve vodě a v tucích. Dalšími sloučeninami, které mohou přispět k zabarvení medu, jsou cukry, minerální látky a aminokyseliny [19].

Rostlinná barviva patří mezi základní a obsah je mnohdy vyšší, než má odpovídat botanickému původu, jelikož barviva se hromadí v plástech, odkud přechází zpátky do medu. V medu se taky nachází nižší obsah barviv, které pochází z exuvií larev a barviva vzniklá Maillardovou reakcí. Kvercetin a rutin (glykosid kvercetinu) patří mezi poměrně významná barviva. Jedná se o sloučeninu, se schopností snižovat nežádoucí křehkost a propustnost kapilár a společně s rutinem, známý jako P-faktor, potlačující aterosklerózu [1].

2.1.11 Těkavé látky

Vůně a chuť medu souvisí s těkavými látkami, stejně jako s cukry, kyselinami, aminokyselinami, taniny a fenoly. V medech bylo identifikováno více než 600 nízkomolekulárních sloučenin ve velmi nízkých koncentracích jako komplexní směsi různých chemických struktur, jako jsou monoterpeny, terpeny, terpenoidy, norisoprenoidy, fenolové sloučeniny, benzenové deriváty, alkoholy, ketony, aldehydy, estery, mastné kyseliny, kyseliny, uhlovodíky a cyklické sloučeniny. Jejich vliv na vůni medu závisí na jejich koncentracích ve vztahu k jejich prahovým hodnotám vůně [19].

Medové aromatické látky pocházejí z botanického zdroje, fyziologické činnosti včely medonosné a klimatických podmínek. Všeobecně platí, že obsah aromatických látek v medu v průběhu času klesá, bez ohledu na jejich prchavost, jelikož během skladování dochází v medu k různým reakcím, čímž dochází k jejich změně. Některé alkoholy a rozvětvené aldehydy budou pravděpodobně produkovány mikrobiálním metabolizmem, zatímco

deriváty furanu a pyranu jsou meziprodukty Maillardovy reakce, které vznikají při tepelném zpracování a skladování medu. A v neposlední řadě, dalšími aromatickými sloučeninami jsou medové znečišťující látky pocházející z okolního prostředí. Medový aromatický profil, stejně jako identifikace těkavých chemických markerů, se osvědčily při hodnocení botanického a zeměpisného původu medu a při detekci možných falšování [19, 30].

Délka uhlíkových řetězců karboxylových kyselin poskytuje různé příchutě, které se pohybují od kořeněných až po žluklé. Karboxylové kyseliny s krátkým řetězcem, jako je kyselina octová, mají kořeněnou vůni a chuť, zatímco kyselina butanová a kyselina hexanová přítomné v másle poskytují žluklou vůni. Alkoholy jsou velkou a důležitou skupinou sloučenin přítomných v medu. Metylové skupiny s alkoholy, jako je 3-methyl-3-buten-1-ol a 2-methyl-2-buten-1-ol, dodávají medu svěžest [20].

2.1.12 Toxické látky

V medu se mohou nacházet přírodní toxické sloučeniny, ty jsou většinou syntetizovány rostlinami, což je chemický obranný mechanismus proti býložravcům. Hlavními toxickými sloučeninami některých medů jsou pyrrolizidinové alkaloidy a polyhydroxylované cyklické uhlovodíky (diterpenoidy), známé jako grayanotoxiny. Když včely shromažďují nektar a pyl z rostlin syntetizujících toxiny, mohou být toxické sloučeniny přeneseny do včelích produktů [19].

Mezi další toxické látky, které mohou med kontaminovat, patří zbytky léků používaných při léčbě včelstev proti varroóze, dále těžké kovy a zbytky pesticidů používané k ochraně rostlin. Pro med jsou přesně stanovené hodnoty maximálních přípustných množství těchto toxických látek [30].

2.1.13 Hydroxymethylfurfural

HMF nebo také 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd je ve vodě rozpustná heterocyklická organická sloučenina odvozená od cukrů. Jedná se o derivát furanu a má jak aldehydové, tak alkoholové funkční skupiny. Tato furanová sloučenina vzniká degradací cukru, dehydratací hexózu v kyselém prostředí a v menší míře vzniká jako meziprodukt při Maillardových reakcích [19, 32].

HMF se používá jako parametr svěžesti medu, protože v čerstvých medech chybí nebo je přítomný pouze ve stopových množstvích. Vysoké hodnoty HMF se přirozeně vyskytují v medech z teplých klimatických oblastí (tropy a subtropy). Koncentrace HMF se

zvyšuje během zpracování medu tepelným zpracováním a také falšováním s komerčními cukry a během skladování. Obsah HMF je také ovlivněn použitím kovových nádob, pH, druhů včel a botanického zdroje. Vysoká kyselost, obsah vlhkosti, cukry (hlavně fruktóza), aminokyseliny (jako je alanin) a minerální látky (jako je hořčík, mangan, železo a zinek) urychlují produkci HMF [19].

Ačkoli HMF dosud není považován za škodlivou látku, Národní institut pro environmentální zdravotní vědy jmenoval HMF pro testování toxicity na základě potenciálu rozšířené expozice prostřednictvím konzumovaných potravin a důkazů o karcinogenním potenciálu ostatních členů této třídy. Výsledkem je, že mnoho zemí ukládá omezení týkající se maximálních hladin HMF v potravinách a nápojích. Podle *Codex Alimentarius* a norem EU je maximum HMF 40 mg/kg, zatímco med z tropů a směsi s nimi by neměl mít více než 80 mg/kg. Včelařské organizace některých zemí, např. Německo, Itálie, Finsko, Švýcarsko stanovily maximálně 15 mg/kg pro speciálně označené „kvalitní“ nebo „panenské“ medy [21, 32].

2.2 Fyzikální vlastnosti

2.2.1 Viskozita a reologie

Viskozita je důležitou vlastností pro manipulaci, zpracování, skladování a senzoryckou kvalitu. Viskozita medu závisí na botanickém původu, vlhkosti, teplotě, poměru fruktózy a glukózy, granulaci medu a chemickém složení. Obsah vody je jedním z hlavních činitelů spolu s teplotou. Viskozitu medu lze tedy upravit teplotou, mírným zahříváním medu dojde ke snížení jeho vazkosti a tím se docílí, že se s ním bude lépe manipulovat [19, 30].

Také některé sloučeniny medu, jako jsou dextriny, bílkoviny a další koloidní látky, mají tendenci zvyšovat viskozitu medu. Viskozita a povrchové napětí jsou odpovědné za pěnové vlastnosti medu. Viskozita má také vztah k tekutosti částic. Čím viskóznější je tekutina, tím nižší je její tekutost, to může bránit její homogenizaci v přípravcích, což omezuje její použití v potravinářském průmyslu. Z tohoto důvodu se použití medového prášku (suchého medu) stalo atraktivní volbou pro průmysl, zejména pro pekárenský průmysl [19].

Podle viskozity lze drtivou většinu medů popsat jako newtonské, ale některé typy vykazují nenevtonovské chování kvůli přítomnosti vysokomolekulárních sloučenin. Med

Piptadenia moniliformis má chování pseudoplastických tekutin, několik medů *Eucalyptus* a nigerijského medu *Opuntia engelmanni* se vyznačují dilatačním chováním, zejména kvůli přítomnosti vysokomolekulárních dextranů a medů z vřesu lingového (*Calluna vulgaris*), balminu (*Leptospermum scoparium*), pohanky (*Fagopyrum esculentum*) a jetelu bílého (*Trifolium repens*) vykazují kvůli vysokému obsahu bílkovin ztenčení ve smyku a tixotropní chování. Tixotropie propůjčuje medům strukturu podobnou gelu, která ztěžuje jejich extrakci z včelích plástů a manipulaci s nimi. Tato rosolovitá konzistence může být přeměněna na kapalinu mícháním nebo aplikací mechanické energie. Zatímco viskozita medu je poměrně vysoká, povrchové napětí medu je nízké. To způsobuje, že ačkoliv je med hustý, proniká i velmi malými netěsnostmi obalů [19, 30].

2.2.2 Index lomu

Index lomu je optická vlastnost, která se pohybuje mezi 1,504 a 1,4815 a zvyšuje se, když je vysoký obsah pevných látek (nebo nízký obsah vody), v závislosti na teplotě. Měření indexu lomu je nejběžnější metodou pro stanovení obsahu vody v medu [19, 33].

2.2.3 Hustota

Hustota je vlastnost medu, která je silně ovlivněna obsahem cukrů. Hustota je vyjádřena jako měrná hmotnost a hodnoty se vztahují k obsahu vody, teplotě a koncentraci pevných látek. Hustota klesá lineárně, kdežto teplota nebo obsah vody roste, a lineárně roste se zvyšováním obsahu pevných látek. Střední hodnoty relativní hustoty medu při teplotě 20 °C se pohybují od 1,40 do 1,44 g/ml, v závislosti na botanickém původu medu. Kvůli změnám hustoty medu uložených v nádržích lze někdy pozorovat separaci medu na jednotlivé vrstvy, ve kterých má horní vrstva nižší hustotu a vyšší vlhkost, takže je náchylnější k fermentaci [19].

2.2.4 pH

Většina medů je kyselá, což znamená, že hodnota pH je menší než 7. pH květových medů se pohybuje mezi 3,3–4,6. Výjimkou je kaštanový med s relativně vysokou hodnotou pH 5–6. Medovicové medy mají díky vyššímu obsahu minerálních látek vyšší hodnotu pH, která se pohybuje mezi 4,5–6,5. Med je pufr, což znamená, že jeho pH se nemění přidáním malého množství kyselin a zásad. Kapacita pufru je zapříčiněna obsahem fosforečnanů, uhličitanů a dalších minerálních solí [21].

2.2.5 Hygroskopicita

Med je díky své vysoké koncentraci cukrů (zejména fruktózy) silně hygroskopický, což je vlastnost, kdy z okolí absorbuje či zadržuje vlhkost z prostředí v závislosti na teplotě, obsahu vlhkosti ve vzduchu a relativní vlhkosti. Tuto vlastnost je třeba vzít v úvahu při balení, skladování a průmyslovém použití, jelikož s vlhkostí med pohlcuje i okolní pachy. Ke skladování je důležité používat pouze hermeticky uzavíratelné nádoby, nejlépe ze skla, pokud med absorbuje vlhkost, zředí se a je náchylnější k fermentaci. Hygroskopičnost medu je rovněž možné také využít v pozitivním směru, například přídavek medu do perníku (nebo jiných podobných potravin) zvyšuje výrazně jemnost pečiva, a naopak snižuje sklon perníku k vysychání [1, 19, 30].

2.2.6 Optická otáčivost

Med má vlastnost rotace roviny polarizovaného světla opět díky obsahu cukrů. Každý cukr má svůj specifický úhel rotace polarizovaného světla. Některé cukry otáčejí polarizovaným úhlem světla doleva a vykazují tak zápornou hodnotu optické rotace (levotočivé cukry, jako je fruktóza $[\alpha]_{D20} = -92,4^\circ$), zatímco jiné se otáčejí doprava, s pozitivní optickou aktivitou (pravotočivé, například glukóza) $[\alpha]_{D20} = +52,7^\circ$). Celková hodnota optické rotace závisí na koncentraci různých medových cukrů. Nektarové medy, které obvykle vykazují vyšší obsah fruktózy, jsou levotočivé. Na druhé straně některé medovice a jiné medy mohou být pravotočivé kvůli nižšímu obsahu fruktózy a vyššímu hmotnostnímu podílu oligosacharidů, zejména melezitóze ($[\alpha]_{D20} = +88,2^\circ$) a erlóze ($[\alpha]_{D20} = +121,8^\circ$). Některé zfalšované medy také vykazují nízké hodnoty fruktózy a jsou obvykle pravotočivé. Ačkoli někteří vědci určili optickou rotaci, aby botanicky charakterizovali medy, nebylo její měření pro tento účel popsáno jako vhodné [19].

2.2.7 Krystalizace

Krystalizace medu je přirozený a spontánní složitý fyzikální proces. Glukóza, která je méně rozpustná než fruktóza, se odděluje od vody a vysráží se z přesyceného roztoku a při ztrátách vody vznikají krystaly monohydrátu glukózy. Medy bohaté na fruktózu, jako je akátový a šalvějový, mohou zůstat v tekutém stavu po dlouhou dobu, kdežto medy bohaté na glukózu, jako je řepkový nebo pampeliškový, často krystalizují bezprostředně po sklizni nebo někdy již v buňkách plástu [19].

Krystalizace může být pro včelaře nežádoucí, protože někteří spotřebitelé se domnívají, že pokud med vykryštalizuje, byl nějak znehodnocen, např. přidáním řepného cukru. Krystalizace ovlivňuje pouze barvu a texturu medu, chuťové a kvalitativní vlastnosti tekutého medu se zachovávají. Barva krystalického medu je světlejší než barva medu tekutého, je smetanově žlutá až žlutohnědá [19, 30].

Krystalizace medu závisí na řadě faktorů, jako je teplota, viskozita, obsah vody, cukrů, obsah dextrinu, koeficient přesycení glukózy a přítomnost částic, které by mohly působit jako krystalizační jádra (proteiny a jiné koloidy, pylová zrna, prach a další suspendované částice, kvasinky, vosk, propolis nebo vzduchové bubliny) [19].

Teplota 5–7 °C usnadňuje vytváření krystalizačních jader (přičemž optimální teplotní rozsah pro tvorbu krystalů je mezi 10–18 °C). Při příliš nízkých teplotách se krystalizace zpomaluje, protože i přes snížení rozpustnosti cukru (čímž se zvýhodňuje krystalizace) dochází ke zvýšení viskozity medu, která snižuje difúzi glukózy, což ztěžuje pohyb. Naopak teploty vyšší než 25 °C umožňují rozpuštění krystalů glukózy – jedná se tedy o vratný proces. Náhlé teplotní změny vedou k tvorbě krystalů glukózy, které jsou zodpovědné za pohyblivost vzduchových bublin a působí tak jako krystalizační katalyzátory. Totéž se děje i při míchání díky tvorbě vzduchových bublin. Optimálně krystalizují medy s obsahem vlhkosti mezi 15–18 %. Příliš vysoký obsah vody rovněž snižuje rychlost krystalizace, protože tak klesá nasycení cukrem. Glukóza se však může snadno vysrážet a zůstat na povrchu kapaliny. Tento cukr poté váže vodu z prostředí, což zvyšuje riziko fermentace. Čím vyšší je obsah glukózy (více než 28–30 %) a melezitózy (více než 10 %), tím rychlejší je proces krystalizace. Fruktóza a maltóza působí jako inhibitory krystalizace, protože zvyšují rozpustnost glukózy [19, 30].

2.2.8 Barva medu

Barva je fyzická vlastnost, kterou spotřebitelé vnímají jako první. Med se pohybuje od bezbarvých a světle žlutých až po tmavě jantarové nebo téměř černé, někdy se zelenými nebo načervenalými odrazy. Barva souvisí s botanickým původem, podnebím a půdními podmínkami. Někteří autoři uváděli, že pyl, produkty s cukry, karotenoidy, xantofyly, antokyany, minerálními látkami, aminokyselinami a fenolovými sloučeninami, především flavonoidy, ovlivňují barvu medu. U většiny květových medů převažují odstíny žluté barvy, ale existují i výjimky: například med z jedlého kaštanu je tmavohnědý. U medovicových medů převažuje červenohnědá až olivově hnědá barva [19, 30].

Tmavé medy mají vyšší obsah minerálních látek, dextrinů a polyfenolů a vyšší kyselost než světlé medy. Barva tmavých medů silně koreluje s koncentracemi Cd, Fe a Pb, zatímco barva světlých medů s koncentracemi Al a Mg. Kromě toho je tento parametr ovlivněn skladováním, teplem, enzymatickými reakcemi a krystalizací. Krystalizovaný med má tendenci mít světlejší barvu, než když je tekutý, v závislosti na velikosti krystalů. Nejjemnější krystaly vždy dodávají světlejší vzhled (krystaly glukózy jsou bílé barvy). V některých zemích ovlivňuje barva medu i cenu medu, která je závislá na preferencích spotřebitelů. Obecně nejsvětlejší dosahují na trhu vyšších cen, ale existují země jako Německo, Švýcarsko, Řecko a Turecko, kde jsou preferovány medy tmavé barvy [1, 19].

3 ANTIMIKROBNÍ A ANTIOXIDAČNÍ VLASTNOSTI MEDU A VČELÍCH PRODUKTŮ

Již od starověku se med používal k léčbě a prevenci infekcí ran. Do začátku 20. století se med ještě stále zdařile používal jako lék. S objevem antibiotik a sulfonamidových léků však bylo upuštěno od klinické aplikace medu. Avšak u všech tříd antibiotik, se časem celosvětově zvyšuje rezistence, a ještě více zneklidňující je, že se vyvíjí velmi málo nových antibiotik. Silná aktivita medu proti bakteriím rezistentním na antibiotika vedla k obnovení zájmu o jeho aplikaci. Několik medů již bylo schváleno pro klinické použití. Neúplné znalosti o použitých antimikrobních látkách a variabilita antimikrobní aktivity jsou však hlavními bariérami využitelnosti medu v medicíně [30, 34].

Obecně lze biologicky aktivní látky v medu rozdělit do dvou skupin: antimikrobní a antioxidační. Tyto dva faktory se však navzájem ovlivňují a jejich kombinace má za následek vysoké zdraví prospěšné vlastnosti medu. Med vykazuje bakteriostatickou a baktericidní aktivitu proti několika lidským patogenům, zejména grampozitivním bakteriím, jako je *Staphylococcus aureus*, ale také i gramnegativním jako jsou *Escherichia coli* a *Pseudomonas* spp. Jedinečnými antimikrobní iniciátory medu jsou: vysoký obsah cukru, nízká a_w , peroxid vodíku, přítomnost organických kyselin (např. kyselina citronová, mravenčí jablečná či jantarová), flavonoidů a fenolových kyselin, methylglyoxal a včelí defensin-1. Kromě antimikrobní aktivity má med silnou antioxidační aktivitu. Za tuto vlastnost jsou odpovědné následující složky: polyfenolové sloučeniny (fenolové kyseliny a flavonoidy), vitamin C, vitamin E, enzymy (např. kataláza, peroxidáza) a stopové prvky [35].

3.1 Antimikrobní látky v medu

3.1.1 Vysoká koncentrace cukrů a a_w

Zralý med obsahuje až 95 % cukrů a současně obsahuje obvykle méně než 18 % vody. Tato kombinace vysoké koncentrace cukrů a nízkého obsahu vlhkosti způsobuje osmotický stres, který zabraňuje znehodnocení medu mikroorganismy. Pouze mírné zředění medu může již vést k růstu kvasinek, ale obsah cukru v medu je dostatečný k zachování antimikrobní aktivity medu při zředění na přibližně 30–40% roztok. Při vyšších ředěních je antimikrobní aktivita zajištěna jinými látkami než cukrem [21, 34].

3.1.2 Peroxid vodíku

V 60. letech byl H_2O_2 identifikován jako hlavní antimikrobní látka v medu. Vzniká za aerobních podmínek z glukózy působením glukózooxidázy a jeho očekávanou funkcí je prevence znehodnocování nezralého medu. Různé medy však mají podstatnou antimikrobní aktivitu díky neperoxidovým složkám [34].

Během zrání medu je glukózooxidáza inaktivována, ale znovu získává aktivitu při ředění medu. Podíl H_2O_2 na antimikrobní aktivitě medu lze určit účinkem neutralizace této látky přidáním katalázy. Neutralizace H_2O_2 snižuje antimikrobní aktivitu většiny medů, ale po neutralizaci peroxidu vodíku mohou některé medy mít stále antimikrobní aktivitu, což dokazuje, že existují další medové látky s antimikrobními vlastnostmi. Mezi faktory, které ovlivňují akumulaci H_2O_2 , patří inaktivace enzymu glukózooxidázy produkujícího H_2O_2 působením tepla nebo světla nebo degradace H_2O_2 medem [19, 34].

H_2O_2 se běžně používá k dezinfekci a sanitaci. Za tímto účelem je třeba udržovat vysoké koncentrace H_2O_2 v těchto dezinfekčních prostředcích, aby byly přemoženy obranné systémy bakterií. Při vysokých koncentracích v rozmezí 3–30 % byla prokázána jeho baktericidní účinnost proti několika mikroorganismům, včetně druhů *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* a *Bacillus*. Za těchto podmínek je bakteriální buněčná smrt výsledkem akumulace nevratného oxidačního poškození membránových vrstev, proteinů, enzymů a DNA [36].

Obsah H_2O_2 v medu je však asi 900krát nižší. Kromě toho údaje z literatury naznačují, že buněčná smrt kultivovaných savčích, kvasinkových a bakteriálních buněk vyžadovala koncentrace H_2O_2 vyšší než 50 mM a byla spojena s degradací chromozomální DNA, což je stále pětikrát až desítkrát více než u medu. Účinnost H_2O_2 jako oxidačního biocidu souvisí s bakteriální citlivostí na peroxidový stres. Obranné mechanismy proti oxidačnímu stresu se liší mezi bakteriálními druhy, a závisí na růstové fázi (exponenciální versus stacionární fáze růstu) a na adaptivní [36].

3.1.3 Methylglyoxal

Různé medy mají podstatnou neperoxidovou antimikrobní aktivitu. Je známo, že medy Manuka z keřů *Leptospermum scoparium* (původem z Nového Zélandu a Austrálie) obsahují velmi vysoké hladiny methylglyoxalu. Obecně platí, že methylglyoxal vzniká z cukrů během tepelného zpracování nebo dlouhodobého skladování potravin a nápojů obsahujících sacharidy. Vysoké hladiny methylglyoxalu v Manuka medu však vznikají

přeměnou dihydroxyacetonu přítomného ve výjimečně vysokých koncentracích v nektaru květů *L. scoparium*. K této přeměně dochází neenzymaticky pomalou rychlostí během skladování medu. Není známo, jak se dihydroxyaceton vytváří v nektaru a z jakého důvodu je v tak velkém množství přítomen v nektaru stromů Manuka. Byly zjištěny koncentrace methylglyoxalu v různých potravinách v rozmezí 3–47 mg/kg, zatímco med Manuka obsahuje mnohem vyšší koncentrace [v rozmezí 38–1541 mg/kg]. Methylglyoxal byl také nalezen v medech z různých botanických zdrojů, ale jeho koncentrace byly podstatně nižší než u medu Manuka [19, 34].

Antimikrobní aktivita medu Manuka se u různých šarží liší, takže každá šarže medu Manuka musí být analyzována na antimikrobní aktivitu, která je obvykle vyjádřena jako „jedinečný faktor Manuka“. Tento faktor představuje koncentraci roztoku fenolu, která poskytuje podobnou zónu inhibice růstu *Staphylococcus aureus* jako testovaný med, za použití testu radiální difúze. Uvádí se také, že medy Manuka vykazovaly inhibiční účinky proti viru chřipky a zejména methylglyoxal vykazoval účinky proti viru HIV1 [19].

3.1.4 Defensin-1

Defensin-1 (také známý jako royalisin) je peptid vylučovaný hypofaryngální žlázou včel. Nejdříve byl identifikován u hemolymfy včel, v hlavách včel a hrudních žláz a v mateří kašičce, hlavní potravě larev královny. Tento peptid vykazuje silnou antimikrobní aktivitu, ale pouze proti grampozitivním bakteriím, včetně *B. subtilis*, *S. aureus* a *Paenibacillus larvae*. Poslední jmenovaný druh je původcem choroby včelích larev zvaný mor včelího plodu [19, 34].

Bezobratlí se při obraně proti mikroorganismům spoléhají na antimikrobní peptidy jako součást svého přirozeného imunitního systému. U včel jsou v hemolymfě po experimentální infekci *E. coli* produkovány čtyři typy antimikrobních peptidů, tj. hymenoptaecin, včelí defensin-1, apidaecin a skupina abaecinových peptidů. Každý z těchto peptidů má odlišné spektrum antimikrobní aktivity a tyto peptidy společně pokrývají všechny hlavní třídy mikroorganismů [34].

Včely používají k produkci mateří kašičky a medu sekrety hypofaryngální žlázy. Množství včelího defensinu-1 v mateří kašičkách a v medech se silně liší, přičemž některé vzorky tento peptid zcela neobsahují. To znamená, že exprese včelího defensinu-1 v hypofaryngálních žlázách anebo množství přidaných sekrecí žlázy se velmi liší [34].

3.1.5 Ostatní faktory

Uvádí se, že nízké pH (3,3–6,5) a kyselé látky, jako jsou aromatické kyseliny a kyseliny mateří kašičky hrají důležitou roli v antimikrobních účincích medu. Rovněž produkty Maillardovy reakce prokázaly antimikrobní účinky, stejně jako lysozym a kombinace medových fenolových sloučenin. Rovněž se uvádí, že medové flavonoidy mají antifungální aktivitu proti *Candida albicans* [19, 20].

Některé bakterie přítomné v medu produkují po kultivaci *in vitro* antimikrobní látky, jako je bacillomycin F nebo antifungální peptidy. Antimikrobní aktivita medu může být také nepřímá, protože se uvádí, že med vykazuje imunoaktivní, protizánětlivé a prebiotické účinky [19].

3.2 Antioxidační aktivita

Jednou z nejdůležitějších vlastností medu je jeho antioxidační aktivita, která přispívá k prevenci určitých onemocnění a chrání buňky před poškozením oxidačními činidly, jako jsou volné radikály. Ukázalo se, že med rovněž předchází nebo zpomaluje kažení potravin v důsledku oxidačních reakcí, chrání maso před oxidací lipidů a rostlinné produkty před enzymatickým hnědnutím. Med má proto velký potenciál být používán jako přírodní antioxidant pro potraviny. Volné radikály jsou vysoce nestabilní, jedná se o velmi reaktivní částice (atomy či molekuly), které mají ve svém orbitalu jeden nebo více nepárových elektronů. Volné radikály se pokouší spárovat s jinými molekulami, atomy nebo dokonce s jednotlivými elektrony, aby vytvořily stabilní sloučeninu a to tak, že se snaží elektron předat nebo odejmout [19, 37].

Díky tomuto vznikají reaktivní formy kyslíku a volné radikály způsobují molekulární transformace a genové mutace v mnoha typech organismů. Toto nazýváme jako oxidační stres a má se za to, že přispívá k rozvoji chronických a degenerativních onemocnění, jako je rakovina, autoimunitní poruchy, stárnutí, katarakta, revmatoidní artritida a kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění. Reaktivní formy kyslíku vznikají přirozeným metabolismem nebo jsou výsledkem špatných životních podmínek a znečištění životního prostředí [37].

Antioxidanty jsou molekuly schopné zpomalit nebo inhibovat oxidaci jiných molekul, čímž těmto změnám zabrání. Antioxidanty rostlin vykazují velkou bioaktivitu a molekulární rozmanitost a jsou přítomny v medu a dalších včelích produktech. Protože je

med například vyráběn včelami z nektaru nebo rostlinných sekretů, z rostlin se přenášejí různé látky a hromadí se v medu [37].

3.2.1 Antioxidační látky v medu

Rostlinné antioxidanty jsou rostlinami syntetizovány, aby působily proti biotickým (živé) a abiotickým (neživé) stresům a upřednostňují přitažlivost opylovačů, rozptýl semen a alelopatické jevy. Sekundárně ovlivňují zdraví lidí, kteří je konzumují prostřednictvím potravy, včetně včelích produktů vyrobených včelami z květinového nektaru, pylu nebo rostlinných sekretů. Rostlinné antioxidanty jsou vysoce bioaktivní a vykazují velkou molekulární rozmanitost, ale nejhojnější jsou fenolové kyseliny (fenolové kyseliny, flavonoidy), které mají nejvyšší antiradikálovou aktivitu [37]. Fenolové sloučeniny byly již podrobněji popsány v předchozí kapitole 2.1.7.

Bohužel, testy používané ke stanovení antioxidačních látek a antioxidační aktivity identifikují skupiny sloučenin s podobnými chemickými vlastnostmi, a ne jednotlivé účinné látky. Za antioxidační kapacitou fenolů stojí různé mechanismy, jako je vychytávání volných radikálů, donor vodíku, chelatace kovových iontů, hašení singletovým kyslíkem a působení jako substrát pro superoxidové a hydroxylové radikály. Tyto mechanismy jsou striktně spojeny s metabolity a jejich molekulární strukturou, takže počet a poloha hydroxylových skupin ve fenolových sloučeninách jsou rozhodující pro vychytávací schopnost antioxidantů. Antioxidační aktivita vysoce koreluje s fenolovými sloučeninami, ale včelí produkty jsou vícesložkové přírodní látky, a proto obsahují také další látky představující antioxidační aktivitu, včetně minerálních látek, aminokyselin, peptidů, proteinů, organických kyselin a enzymů, avšak v nižších koncentracích než fenoly. Typ a koncentrace jsou primárně ovlivňovány daným včelím produktem, poté botanickým zdrojem, geografickým a entomologickým původem a klimatickými podmínkami [37].

3.2.2 Metody stanovení antioxidační aktivity

Pokud je nám známo, neexistuje žádná oficiální metoda pro stanovení antioxidační aktivity ve vzorcích medu. Mezi běžně používané antioxidační testy patří DPPH (hodnotí eliminaci syntetických stabilních radikálů), FRAP (redukce železa/antioxidační síla), ORAC (hodnotí absorpční kapacitu kyslíkových radikálů) a Troloxu ekvivalentní antioxidační kapacita (TEAC nebo také ABTS). Každý test má své výhody a nevýhody. Uvádí se, že volné radikály DPPH nejsou ovlivněny určitými vedlejšími reakcemi, jako je chelatace kovovými ionty a inhibice enzymů. Med dále obsahuje hojné vychytávače volných radikálů,

které jsou schopné snížit nerovnováhu mezi produkcí volných radikálů a hladinou antioxidantů. Vysoké množství redukujících cukrů, jako je glukóza a fruktóza v medu, by mohlo přispět k vyšší redukční antioxidační síle v metodě FRAP, což by vedlo k pozitivní chybě při stanovení antioxidační aktivity [38].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Základním cílem této diplomové práce bylo stanovení antioxidační kapacity vybraných vzorků medů pomocí různých analytických metod a ověření antimikrobního účinku medů na vybrané grampozitivní bakterie. Tento cíl byl rozdělen do několika dílčích cílů:

- vypracování přehledné literární rešerše obsahující charakterizaci medu a včelích produktů, popis chemického složení medu a jeho fyzikálních vlastností, včetně jeho antimikrobní a antioxidační aktivity,
- stanovení antioxidační aktivity pomocí:
 - metody používající DPPH,
 - metody používající ABTS,
 - metody používající Folin-Ciocalteu činidlo,
- stanovení antimikrobního účinku medů (minimální inhibiční koncentrace – MIC) na vybrané grampozitivní bakterie pomocí mikrodiluční metody,
- vyhodnocení výsledků a formulace závěrů.

5 POUŽITÁ ZAŘÍZENÍ A MATERIÁLY

5.1 Použité přístroje a pomůcky

- Analytické váhy KERN
- 10 mm hranaté kyvety
- Jednopaprskový UV-Vis spektrofotometr Specord 50 PLUS
- PC s vyhodnocovacím programem WinLab Software
- Biohazard box Bio II Advance Telstar
- Autokláv Systec 2540 EL
- Vortex Mixer VX-200
- DENSI-LA-METER
- Biologický termostat Memmert INE 600
- Tecan infinite 200Pro
- Filtr stříkačkový AHLSTROM ReliaPrep™ CA 0.20 µm
- Bakteriologické kličky
- Automatické mikropipety
- Mikrotitrační destičky
- Filtrační papír
- Laboratorní sklo a pomůcky (Petriho misky, kádinky, zkumavky, odměrné válce, zásobní láhve, plastová injekční stříkačka, lžice)

5.2 Použité chemikálie

- Demineralizovaná voda
- NaCl
- Etanol (P. Švec, Chrudim, ČR)
- Methanol (LACHNER s.r.o., ČR)
- DPPH – 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl (Sigma Aldrich, USA)

- ABTS – (2,2.-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)) (Sigma Aldrich, USA)
- K₂S₂O₈ – peroxidisíran draselný (P. Lukeš, Uherský Brod, ČR)
- Trolox – 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina (Sigma Aldrich, USA)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo (Penta, ČR)
- 20% roztok Na₂CO₃ (Penta, ČR)
- Kyselina gallová (Sigma Aldrich, USA)
- Kyselina octová (Penta, ČR)
- Octan sodný trihydrát (Penta, ČR)

5.3 Použité vzorky medu

Pro stanovení antioxidační kapacity a antimikrobního účinku medů bylo celkově použito 15 vzorků medu květového, medovicového i smíšeného (Obrázek 2). Z toho 13 vzorků medů pocházelo od malých a středních včelařů a 2 vzorky byly komerčně dostupné medy zakoupené v obchodních řetězcích. Medy od malých a středních včelařů byly převážně ze Slovenské republiky se zastoupením až 12 vzorků, z České republiky pocházel 1 vzorek medu. U komerčních medů se jednalo o směsi medu pocházejících ze zemí mimo Českou republiku. Přehled lokalit úlů, z nichž vzorek medu pochází, je zobrazen v Tabulce 4.

Tabulka 4 Lokalita úlu přiřazena k číslu vzorku

Č. vzorku	Lokalita úlu	Č. vzorku	Lokalita úlu
1.	Salaš, Nimnica (SR)	9.	Oravská Magura (SR)
2.	Zubák (SR)	10.	Lysá pod Makytou (SR)
3.	Horná Poruba 1 (SR)	11.	Beluša (SR)
4.	Beluša (SR)	12.	Řecko*
5.	Nemšová, Klúčové (SR)	13.	Německo*
6.	Zubák (SR)	14.	Podhorie (SR)
7.	Salaš, Nimnica (SR)	15.	Podhorie (SR)
8.	Polštejn (CZ)		

* vzorky označené zelenou barvou jsou komerční medy zakoupené v obchodních řetězcích



Obrázek 2 Vzorky testovaných medů

5.4 Použité mikroorganismy

Pro tuto diplomovou práci bylo využito 12 kmenů gram pozitivních bakterií. Bakterie byly získány ze sbírky mlékařských kultur Laktoflora (CCDM), z České sbírky mikroorganismů (CCM) a z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze (RIBM).

- *Staphylococcus aureus* CCM 3953
- *Staphylococcus aureus* CCM 2020
- *Enterococcus faecalis* CCM 2665
- *Enterococcus faecalis* CCM 4224
- *Enterococcus durans* CCDM 437
- *Enterococcus durans* CCDM 53
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 141
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824
- *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 2-94
- *Levilactobacillus brevis* RIBM 2-98
- *Levilactobacillus brevis* RIBM 2-111

5.5 Použitá kultivační média

Bakterie byly pomnoženy na pevných půdách Mueller-Hinton Agar (MH; HiMedia) a M17 Agar (HiMedia). Pro stafylokoky a enterokoky byla použita půda MH. Laktokoky a laktobacily (a od nich odvozené rody *Lactiplantibacillus* a *Levilactobacillus*) byly pomnoženy na půdě M17. Samotné stanovení bylo provedeno v příslušných bujonech. K přípravě agarů a bujonů byla využita destilovaná voda. Sterilita kultivačních medií byla zajištěna autoklávem při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Tabulka 5 Složení Mueller-Hinton Broth

Složení	Množství [g/l]
Hovězí masová infuze	300,0
Enzymatický hydrolyzát kaseinu	17,5
Škrob	1,5

* pro přípravu 100 ml agarů je potřeba 1,5 g agarů

Tabulka 6 Složení M17 Broth

Složení	Množství [g/l]
Enzymatický hydrolyzát kaseinu	2,50
Masový pepton	2,50
Sójový pepton	5,00
Kvasničný extrakt	2,50
Hovězí extrakt	5,00
Laktóza	5,00
Kyselina askorbová	0,50
Síran hořečnatý	0,25
B-glycerolfosforečnan (di)sodný	19,00

* pro přípravu 100 ml agarů je potřeba 1,5 g agarů

6 METODIKA

6.1 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Tato metoda je založena na zhášení kation-radikálu $ABTS^{•+}$ (2,2.-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). V reakční směsi se kation-radikál $ABTS^{•+}$ generuje pomocí chemické oxidace ABTS různými sloučeninami, např. peroxodisíranem draselným. Vzorek antioxidantu se může přidat do reakční směsi již při generování radikálu, běžnější však je přidavek k již vytvořenému radikálu. Zhášení radikálu se projeví pomocí změny absorpčního spektra (odbarvení reakční směsi) a sleduje se spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm.

Celková antioxidační aktivita se hodnotí pomocí parametru TEAC, který vyjadřuje antioxidační kapacitu vzorku ekvivalentní definovanému množství syntetického derivátu názvem Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2- karboxylová kyselina). Trolox je analogem vitamínu E, který je rozpustný ve vodě. Pro směsi TEAC udává koncentraci Troloxu v mmol/l, která je rovná antioxidační aktivitě vzorku.

6.1.1 Příprava vzorků

Na analytických vahách bylo naváženo 2 g vzorku medu s přesností na 0,0001 g. Navážka vzorku byla extrahována do 40 ml destilované vody. Každá extrakce probíhala 2 minuty v ultrazvukové lázni. Extrakt byl následně kvantitativně převeden do 50 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou.

6.1.2 Příprava roztoku ABTS

Kation-radikál $ABTS^{•+}$ byl generován reakcí ABTS diamonné soli s peroxodisíranem draselným. Bylo naváženo 0,045 g ABTS a rozpouštěním ve 25 ml destilované vody byl připraven roztok o výsledné koncentraci 3,5 mmol/l.

6.1.3 Příprava roztoku $K_2S_2O_8$

Bylo naváženo 0,162 g $K_2S_2O_8$ a rozpouštěním v 10 ml destilované vody byl připraven roztok o výsledné koncentraci 0,06 mmol/l.

6.1.4 Příprava octanového pufru

Bylo odměřeno 136,5 ml CH_3COOH o koncentraci 0,2 mol/l a 63,5 ml CH_3COONa o koncentraci 0,2 mol/l. Smícháním byl připraven roztok o výsledném pH 4,3. Octanový pufr byl vždy před měřením připraven čerstvý.

6.1.5 Generování radikálu $\text{ABTS}^{\bullet+}$

Roztoky ABTS a $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ byly smíchány v poměru 50:1 ($\text{ABTS}:\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) a vzniklá směs byla nechána po dobu 16 hodin ve tmě při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byla připravena reakční směs smícháním čerstvě připraveného octanového pufru o hodnotě pH 4,3 s vygenerovaným radikálem $\text{ABTS}^{\bullet+}$ v poměru 39:1.

6.1.6 Příprava reakční směsi

Po uplynutí 16 hodin byla připravena reakční směs smícháním čerstvě připraveného octanového pufru o pH 4,3 s vygenerovaným radikálem $\text{ABTS}^{\bullet+}$ v poměru 39:1.

6.1.7 Vlastní měření

Reakční směs o objemu 4 ml byla smíchána v kádince s 50 μl extraktu vzorku medu. Připravený roztok reagoval v temnu po dobu 30 minut při laboratorní teplotě a poté byl spektrofotometricky změřen úbytek absorbance při vlnové délce 734 nm proti octanovému pufru (A_1). Při stejné vlnové délce byla rovněž změřena absorbance reakční směsi proti pufru (A_0) a slouží jako slepý pokus. Úbytek absorbance byl vyjádřen v % podle vztahu:

$$I = \frac{A_0 - A_1}{A_0} * 100$$

Výsledky byly dosazeny do regresní rovnice kalibrační křivky a přepočteny na ekvivalentní množství standardu – Troloxu. Každá extrakce byla provedena ve třech opakováních a každé opakování bylo následně třikrát proměřeno na spektrofotometru.

6.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Metoda DPPH je jednou ze základních metodik pro posouzení antiradikálové aktivity čistých látek i různých směsí. Metoda je založena na reakci vzorku se stabilním volným radikálem DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl). V radikálové formě je DPPH zbarven do tmavě fialové barvy a vykazuje silnou absorpci v UV/VIS spektru. Dochází k redukci DPPH

antioxidantem, což se projevuje odbarvením roztoku. Barevná změna se měří spektrofotometricky při vlnové délce 515 nm.

6.2.1 Příprava vzorků

Na analytických vahách bylo naváženo 2 g vzorku medu s přesností na 0,0001 g. Navážka vzorku byla extrahována s 40 ml destilované vody. Každá extrakce probíhala 2 minuty v ultrazvukové lázni. Extrakt byl následně kvantitativně převeden do 50 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou.

6.2.2 Příprava zásobního a pracovního roztoku DPPH

Pro přípravu zásobního roztoku bylo naváženo 0,024 g DPPH, které bylo rozpuštěno v metanolu ve 100 ml odměrné baňce. Pracovní roztok byl připraven smícháním 10 ml tohoto zásobního roztoku s 45 ml metanolu.

6.2.3 Vlastní měření

Pracovní roztok DPPH o objemu 8,55 ml byl smíchán v kádince s 450 μ l extraktu vzorku medu. Takto připravená směs reagovala v temnu po dobu 60 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí 60 minut byl spektrofotometricky změřen úbytek absorbance (A_1) při vlnové délce 515 nm proti metanolu. Stejným způsobem byla proměřena absorbance pracovního roztoku DPPH (A_0) a slouží jako slepý pokus. Úbytek absorbance byl vyjádřen v % podle vztahu:

$$I = \frac{A_0 - A_1}{A_0} * 100$$

Výsledky byly dosazeny do regresní rovnice kalibrační křivky a přepočteny na ekvivalentní množství standardu – Troloxu. Každá extrakce byla provedena ve třech opakováních a každé opakování bylo následně třikrát proměřeno na spektrofotometru.

6.3 Stanovení celkového obsahu polyfenolů metodou Folin-Ciocalteu

Fenolové sloučeniny jsou v kyselém prostředí oxidovány Folin-Ciocalteuovým činidlem. Toto činidlo je tvořeno směsí kyseliny fosforečno-wolframové a kyseliny fosforečno-molybdenové, která se po oxidaci fenolů redukuje na směs modrých oxidů wolframu a molybdenu. Folin-Ciocalteuovo činidlo nereaguje specificky s fenoly, ale i s většinou redukujících molekul, a proto je výsledek výborně korelován s dalšími testy pro stanovení antioxidační aktivity.

6.3.1 Příprava vzorků

Na analytických vahách bylo naváženo 2 g vzorku medu s přesností na 0,0001 g. Navážka vzorku byla extrahována s 40 ml destilované vody. Každá extrakce probíhala 2 minuty v ultrazvukové lázni. Extrakt byl následně kvantitativně převeden do 50 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou.

6.3.2 Příprava pracovního roztoku uhličitanu sodného

Bylo smícháno 80 hm. % destilované vody s 20 hm. % Na_2CO_3 . Za stálého míchání se nechal ve vodě rozpustit. Následně byl přefiltrován přes filtrační papír.

6.3.3 Vlastní měření

Pro stanovení celkového obsahu polyfenolů byla připravena reakční směs s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Reakční směs byla připravena v 10 ml odměrné baňce smícháním 0,1 ml extraktu vzorku medu s asi 5,0 ml destilované vody, 0,5 ml Folin-Ciocalteuovým činidlem a 1,5 ml 20% Na_2CO_3 . Následně se směs doplnila destilovanou vodou po rysku do objemu 10 ml. Pro stanovení byl rovněž připraven i slepý pokus, který neobsahoval extrakt vzorku medu. Připravené směsi se ve zkumavkách zazátkovaly a následně se protřepaly a nechaly stát ve tmě po dobu 30 minut. Po uplynutí 30 minut se změřila absorbance výluhu oproti slepému vzorku při vlnové délce 750 nm.

Výsledky byly dosazeny do regresní rovnice kalibrační křivky a přepočteny na ekvivalentní množství standardu – kyseliny gallové. Každá extrakce byla provedena ve třech opakováních a každé opakování bylo následně třikrát proměřeno na spektrofotometru.

6.4 Stanovení antimikrobních účinků vzorků medu na vybrané grampozitivní bakterie

6.4.1 Příprava medových roztoků

Roztoky medu byly připraveny z navážky vzorku medu a sterilního živného média (MH, M17) na základní koncentraci 50% (w/v). Takto připravený roztok medu byl přefiltrován přes sterilní stříkačkový filtr o velikosti pórů 0,20 μm (AHLSTROM) a tím jsme zajistili jeho sterilizaci. Následné ředění na nižší koncentrace probíhalo ve zkumavkách geometrickou řadou. Roztoky vzorků medů byly připraveny před každou analýzou čerstvé.

6.4.2 Příprava kultivačního média MH Broth

Bylo naváženo 21,0 g půdy MH Broth a poté bylo přidáno 1000 ml destilované vody a mícháno do úplného rozpuštění. V případě tekutého kultivačního média byl bujón rozpipetován po 3,0 ml do zkumavek, a poté sterilován v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 min. MH agar byl po sterilaci přelit na Petriho misky, které sloužily k uchování mikroorganismů.

6.4.3 Příprava tekuté půdy M17 Broth

Bylo naváženo 42,25 g půdy M17 Broth a poté bylo přidáno 1000 ml destilované vody a mícháno do úplného rozpuštění. V případě tekutého kultivačního média byl bujón rozpipetován po 3,0 ml do zkumavek, a poté sterilován v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 min. M17 agar byl po sterilaci přelit na Petriho misky, které sloužily k uchování mikroorganismů.

6.4.4 Příprava fyziologického roztoku

Fyziologický roztok byl připraven smícháním 8,5 g NaCl a 1000 ml demineralizované vody. Po rozpuštění chloridu sodného byl roztok autoklávován při teplotě 121 °C po dobu 20 min.

6.4.5 Resuscitace mikroorganismů a příprava bakteriální suspenze

Kmeny bakterií byly uchovávány v mrazicím boxu při teplotě -80 °C. Zásobní kultury bakterií byly připraveny přeočkováním zmražených kultur křížovým roztěrem na pevnou agarovou půdu MH, resp. M17 na Petriho miskách. Následně byly bakterie kultivovány v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin.

Bakteriální suspenze byla připravena zaočkováním bakterií sterilní očkovací kličkou z Petriho misek do zkumavek se 3,0 ml sterilního MH, resp. M17 bujónu. Tekuté živné médium MH Broth a M17 Broth sloužilo k pomnožení bakterií. Takto připravená suspenze byla kultivována v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin.

Suspenze bakterií byla po kultivaci v další zkumavce naředěna fyziologickým roztokem na hodnotu zákalu 1,0 dle stupnice McFarlanda.

6.4.6 Mikrotitrační diluční metoda

Diluční metoda se používá ke stanovení MIC, vyjadřuje nejnižší koncentraci antimikrobní látky, která již inhibuje růst testovaného mikroorganismu. Tato metoda se řadí mezi kvantitativní. V této diplomové práci byla použita tzv. mikrodiluční metoda.

Účinek medových roztoků na růst bakterií byl sledován pomocí přístroje TECAN infinite 200 Pro. Růst bakterií byl pozorován v 96 jamkových mikrotitračních destičkách při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin a byl hodnocen jako změna optické denzity suspenze buněk. Nárůst bakterií byl měřen při vlnové délce 600 nm v intervalech 60 minut.

Schéma zaočkování mikrotitrační destičky je znázorněný v Tabulce 7. První řádek sloužil jako kontrola sterility kultivačních médií a kontrola sterility práce, do těchto jamek byl pipetován pouze sterilní bujón bez přídavku bakterií. Poté bylo do každé jamky mikrotitrační destičky napipetován objem 200 µl kultivačního média s příslušnou koncentrací medů. Do každé jamky bylo inokulováno 10µl suspenze bakterií (s výjimkou první řady). Poslední řada jamek zůstala bez přídavku extraktu, pro kontrolu růstu mikroorganismů.

Tabulka 7 Schéma mikrotitrační destičky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KS	KS	KS	KS	KS	KS	KS	KS	KS	KS	KS	KS
B	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
C	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
D	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125
E	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
F	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3
G	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6
H	KR	KR	KR	KR	KR	KR	KR	KR	KR	KR	KR	KR

1 mikroorganismus paralelně ve 2 sloupcích, 1 vzorek medu v dilučním v rozpětí 500 – 15,6 µg/ml

KS – kontrola sterility kultivačních médií a sterility práce

KR – kontrola růstu mikroorganismů bez medu

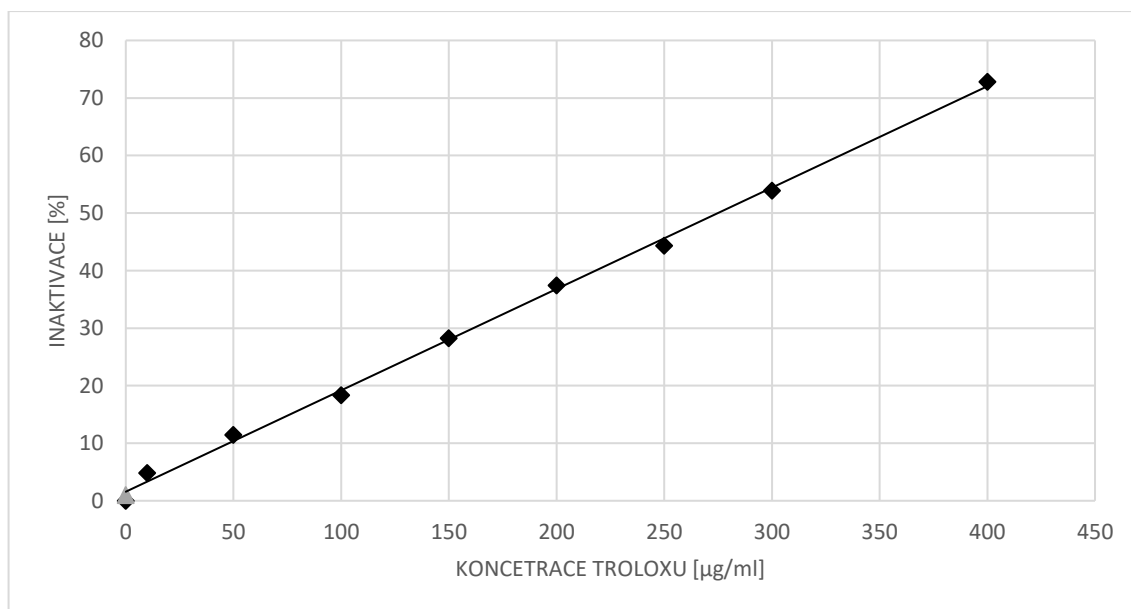
7 VÝSLEDKY

7.1 Antioxidační aktivita metodou ABTS

Pomocí metody ABTS byla spektrofotometricky stanovena antioxidační aktivita u všech 15 vzorků medů. Postup metody byl popsán v kapitole 6.1.

7.1.1 Kalibrační křivka Troloxu

Byla sestavena kalibrační křivka standardu Troloxu. Kalibrační křivka byla sestavena pro koncentrace 10; 50; 100; 150; 200; 250; 300; 400 $\mu\text{g/ml}$. Pro kalibrační křivku standardu Troloxu byl sestrojen graf na Obrázku 3.



Obrázek 3 Kalibrační křivka standardu Troloxu

Regresní rovnice určena z kalibrační křivky má tvar:

$$y = 0,1761x + 1,5789$$

y – inaktivace I [%]

x – koncentrace standardu Troloxu [$\mu\text{g/ml}$]

Hodnota spolehlivosti $R^2 = 0,998$.

7.1.2 Antioxidační aktivita medů

Antioxidační aktivita vzorků medů byla stanovena pomocí metody ABTS spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm. Hodnota inaktivace [%], která byla vypočtena z hodnot absorbance, byla dosazena do regresní rovnice a je vyjádřena jako ekvivalent

redukční účinnosti standardu Troloxu v $\mu\text{g TE/g}$. Výsledky stanovení antioxidační aktivity jsou shrnuty v Tabulce 8.

Tabulka 8 Antioxidační aktivita medů – metoda ABTS

Vzorek	Inaktivace [%]	Antioxidační aktivita [$\mu\text{g TE/g}$] \pm S.D.
1.	36,19	978,1 \pm 43,4
2.	30,04	808,1 \pm 10,8
3.	30,64	822,9 \pm 12,0
4.	24,09	637,4 \pm 23,1
5.	33,60	885,4 \pm 3,0
6.	30,31	808,3 \pm 26,4
7.	36,80	996,9 \pm 14,3
8.	24,43	645,5 \pm 33,8
9.	29,97	804,9 \pm 32,8
10.	32,37	866,6 \pm 65,7
11.	32,57	873,7 \pm 46,3
12.	17,68	456,3 \pm 27,2
13.	17,54	450,8 \pm 24,1
14.	33,36	900,2 \pm 59,1
15.	19,22	496,5 \pm 35,1

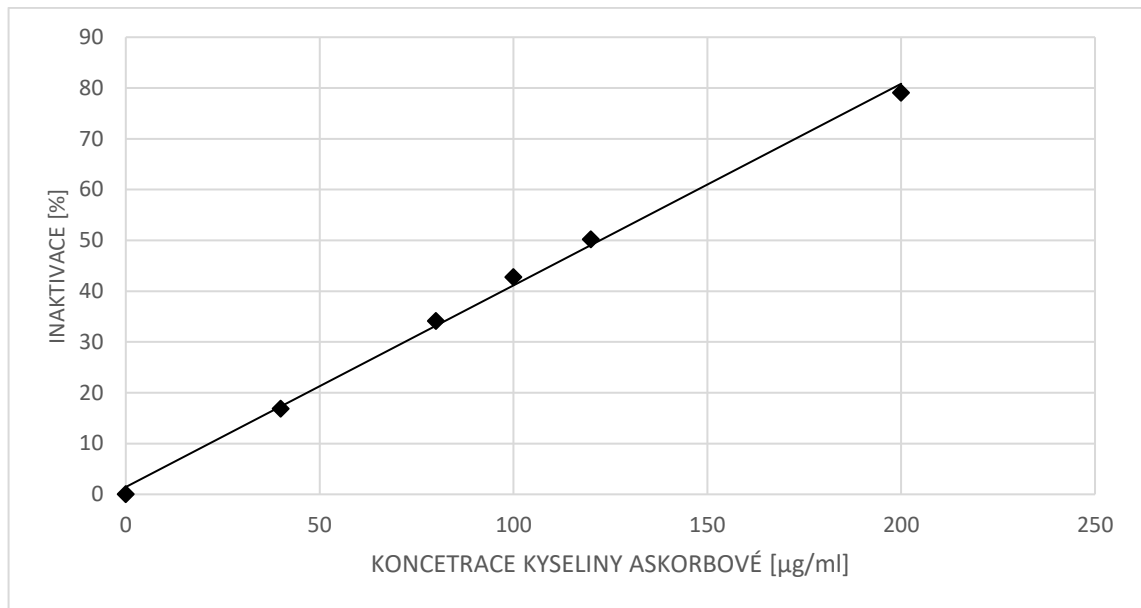
Pomocí metody ABTS byla stanovena antioxidační aktivita u 15 analyzovaných vzorků medů, ta se pohybovala v rozmezí od 450,8 $\mu\text{g TE/g}$ do 996,9 $\mu\text{g TE/g}$ s průměrnou hodnotou 762,1 $\mu\text{g TE/g}$. Nejnižší hodnoty antioxidační aktivity byly stanoveny u komerčně zakoupených medů v obchodních řetězcích č. 12 a č. 13, v průměru 453,6 $\mu\text{g TE/g}$. Výrazně nižší hodnotu měl i med od malých včelařů č. 15 (496,5 $\mu\text{g TE/g}$). U ostatních vzorků medů byly hodnoty antioxidační aktivity vyšší, u medu č. 4 a č. 8, které byly světlejší barvy, byla hodnota antioxidační aktivity v průměru 641,5 $\mu\text{g TE/g}$. Nejvyšší hodnoty byly stanoveny u tmavých medů č. 7, 1, a 14 v rozmezí od 996,9 $\mu\text{g TE/g}$ do 900,2 $\mu\text{g TE/g}$ se stanovenou průměrnou hodnotou 958,4 $\mu\text{g TE/g}$.

7.2 Antioxidační aktivita metodou DPPH

Pomocí metody DPPH byla spektrofotometricky stanovena antioxidační aktivita u 15 vzorků medů. Postup této metody byl popsán v kapitole 6.2.

7.2.1 Kalibrační křivka kyseliny askorbové

Byla sestavena kalibrační křivka kyseliny askorbové. Kalibrační křivka byla sestavena pro koncentrace 40; 80; 100; 120 a 200 $\mu\text{g/ml}$. Pro kalibrační křivku standartu kyseliny askorbové byl sestaven graf na Obrázku 4.



Obrázek 4 Kalibrační křivka standardu kyseliny askorbové

Regresní rovnice určená z kalibrační křivky má tvar:

$$y = 0,397x - 1,4354$$

y – inaktivace I [%]

x – koncentrace standardu kyseliny askorbové [μg/ml]

Hodnota spolehlivosti $R^2 = 0,9973$.

7.2.2 Antioxidační aktivita medů

Antioxidační aktivita všech 15 vzorků medů byla stanovena spektrofotometricky, podle postupu popsaného v kapitole 6.2.3.

Hodnota inaktivace, která byla vypočtena z hodnot absorbance, byla dosazena do regresní rovnice kalibrační křivky kyseliny askorbové. Výsledné hodnoty stanovení antioxidační aktivity jsou shrnuty v Tabulce 9.

Tabulka 9 Antioxidační aktivita medů – metoda DPPH

Vzorek	Inaktivace [%]	Antioxidační aktivita [$\mu\text{g KA/g}$] \pm S.D.
1.	58,43	710,3 \pm 43,6
2.	58,38	714,8 \pm 37,6
3.	61,57	753,8 \pm 11,8
4.	29,91	353,5 \pm 6,4
5.	58,64	719,0 \pm 1,5
6.	50,03	611,8 \pm 1,6
7.	67,43	827,7 \pm 10,0
8.	41,77	506,5 \pm 8,1
9.	36,30	436,8 \pm 7,0
10.	56,81	694,5 \pm 22,4
11.	49,50	599,6 \pm 8,1
12.	31,05	371,5 \pm 7,2
13.	20,08	233,9 \pm 2,9
14.	41,56	504,4 \pm 3,9
15.	23,69	278,9 \pm 8,9

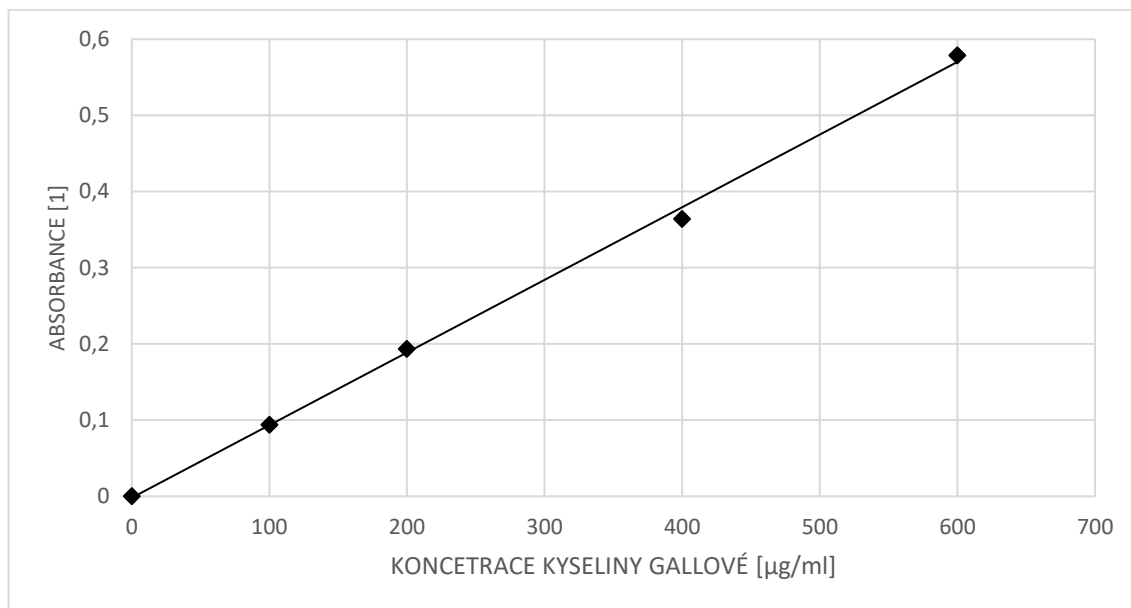
Antioxidační aktivita medů stanovena pomocí metody DPPH se pohybovala v rozmezí hodnot od 233,9 $\mu\text{g KA/g}$ do 827,7 $\mu\text{g KA/g}$, v průměru 554,5 $\mu\text{g KA/g}$. Nejnižší hodnoty antioxidační aktivity byly stanoveny opět u komerčně zakoupeného medu č. 13 a u medu světlejší barvy č. 15, v průměru 256,4 $\mu\text{g KA/g}$. Výrazně nižší hodnoty měly i medy od malých včelařů č. 4 a č. 9 včetně medu komerčně zakoupeného v obchodním řetězci č. 12, s průměrnou hodnotou 387,3 $\mu\text{g KA/g}$. Naopak nejvyšší hodnoty byly stanoveny u tmavých medů č. 7 a č. 3 s průměrnou hodnotou 790,8 $\mu\text{g KA/g}$. U ostatních vzorků medu se hodnoty antioxidační aktivity pohybovaly od 719,0 $\mu\text{g KA/g}$ do 504,4 $\mu\text{g KA/g}$, v průměru 632,6 $\mu\text{g KA/g}$.

7.3 Celkový obsah polyfenolů zjištěný metodou Folin-Ciocalteu

Byl stanoven celkový obsah polyfenolů u 15 vzorků medů pomocí Folin-Ciocalteu činidla. Postup této metody byl popsán v kapitole 6.3.

7.3.1 Kalibrační křivka kyseliny gallové

Byla sestavena kalibrační křivka kyseliny gallové. Kalibrační křivka byla sestavena pro koncentrace 100; 200; 400 a 600 $\mu\text{g/ml}$. Pro kalibrační křivku standartu kyseliny gallové byl sestaven graf na Obrázku 5.



Obrázek 5 Kalibrační křivka standardu kyseliny gallové

Regresní rovnice určena z kalibrační křivky má tvar:

$$y = 0,001x - 0,0019$$

y – absorbance [1]

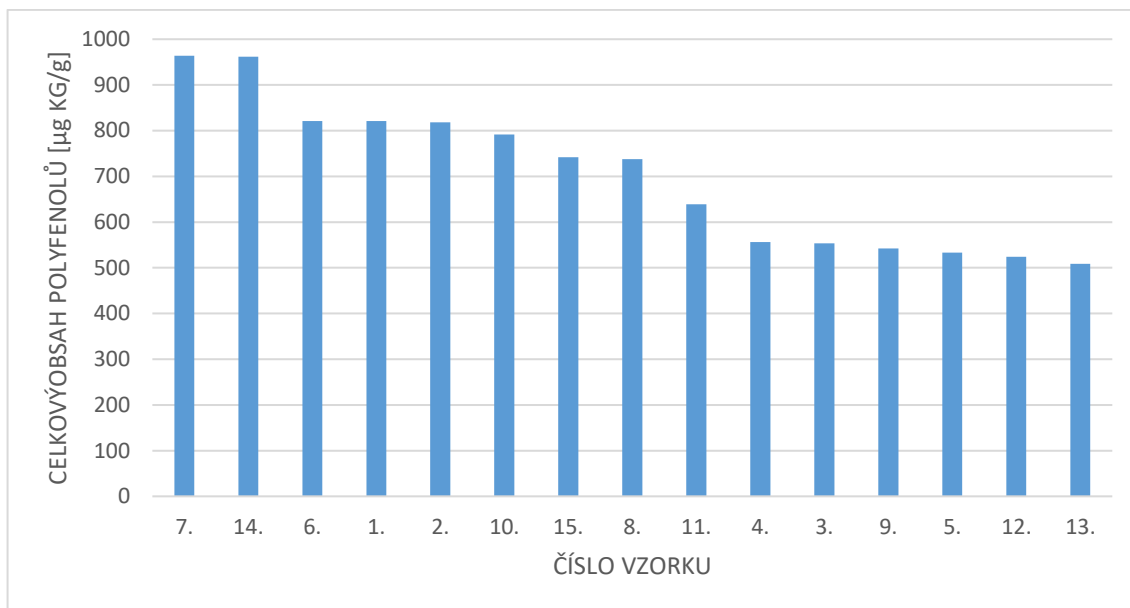
x – koncentrace standardu kyseliny gallové [µg/ml]

Hodnota spolehlivosti $R^2 = 0,9984$.

7.3.2 Celkový obsah polyfenolů v medu

Pomocí Folin-Ciocalteuova činidla byl spektrofotometricky stanoven celkový obsah polyfenolů u 15 vzorků medů. Na Obrázku 6 je sestaven graf celkového obsahu polyfenolů stanovených v medu v sestupném pořadí. Hodnoty absorbance jednotlivých vzorků medu byly dosazeny do regresní rovnice kalibrační křivky kyseliny gallové. Celkový obsah polyfenolů je vyjádřen jako mikrogram ekvivalentu kyseliny gallové na gram vzorku medu.

Pomocí této metody byla u 15 analyzovaných vzorků medů stanovena antioxidační aktivita, ta se pohybovala v rozmezí od 508,6 µg KG/g do 963,7 µg KG/g s průměrnou hodnotou 700,9 µg KG/g. Nejnižší hodnoty antioxidační aktivity byly stanoveny u komerčně zakoupených medů v obchodních řetězcích č. 12 a č. 13, v průměru 516,5 µg KG/g. Nejvyšší hodnoty byly stanoveny opět u medu č. 7 a č. 14, průměrně 962,8 µg KG/g. U ostatních vzorků medu byly hodnoty antioxidační aktivity poněkud nižší, hodnoty antioxidační aktivity se pohybovaly od 821,0 µg KG/g do 533,3 µg KG/g v průměru 686,8 µg KG/g.

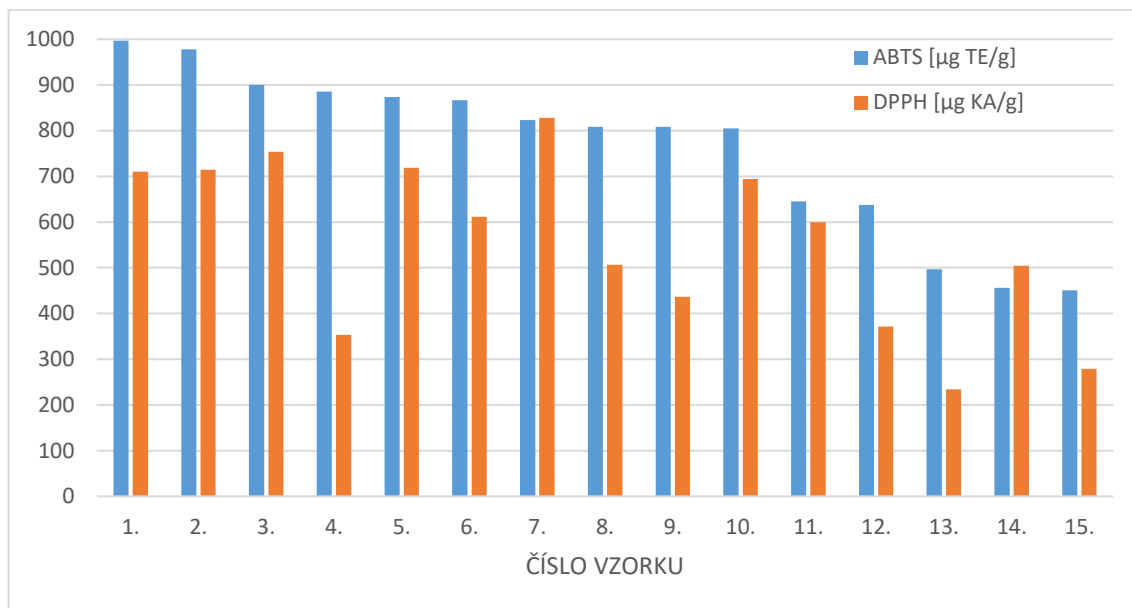


Obrázek 6 Celkový obsah polyfenolů v testovaných vzorcích medů

7.4 Porovnání antioxidační aktivity

Na Obrázku 7 je sestrojen sloupcový graf porovnání antioxidační aktivity v sestupném pořadí stanovené v medech pomocí metody ABTS a DPPH.

Z našich stanovení antioxidační aktivity pomocí metody ABTS a DPPH je zřejmé, že nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity se vyskytovaly u tmavých medovicových medů č. 1, 2, 3 a 7 dále následovaly lesní medy č. 5 a č. 6. Za lesními medy pokračují smíšené medy č. 9, 10 a 11. Nejnižšími hodnotami se vyznačovaly světlé medy, které byly zakoupené v obchodních řetězcích č. 12 a 13.



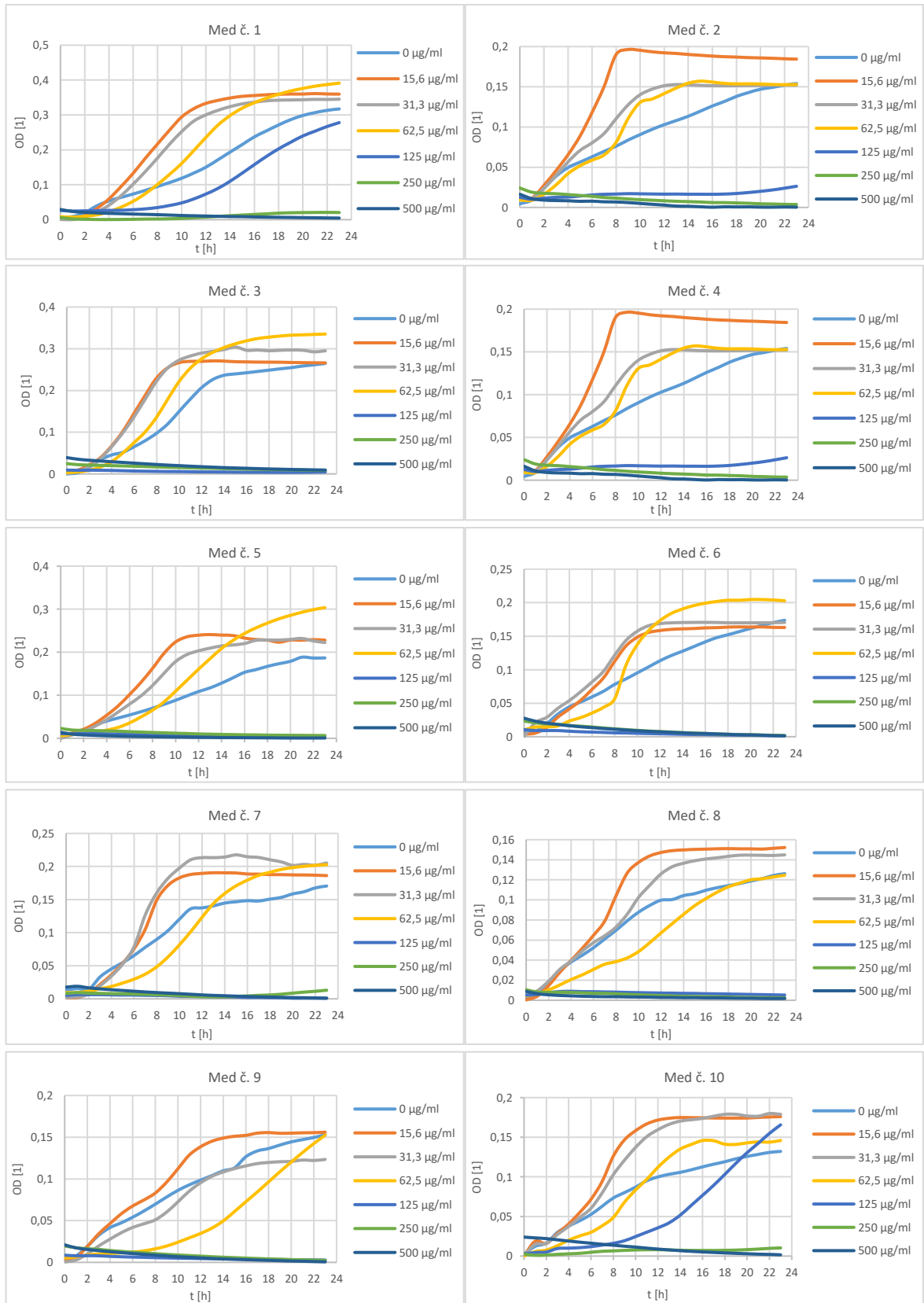
Obrázek 7 Porovnání antioxidační aktivity metodou ABTS a DPPH

7.5 Antimikrobní účinek vzorků medů na vybrané grampozitivní bakterie

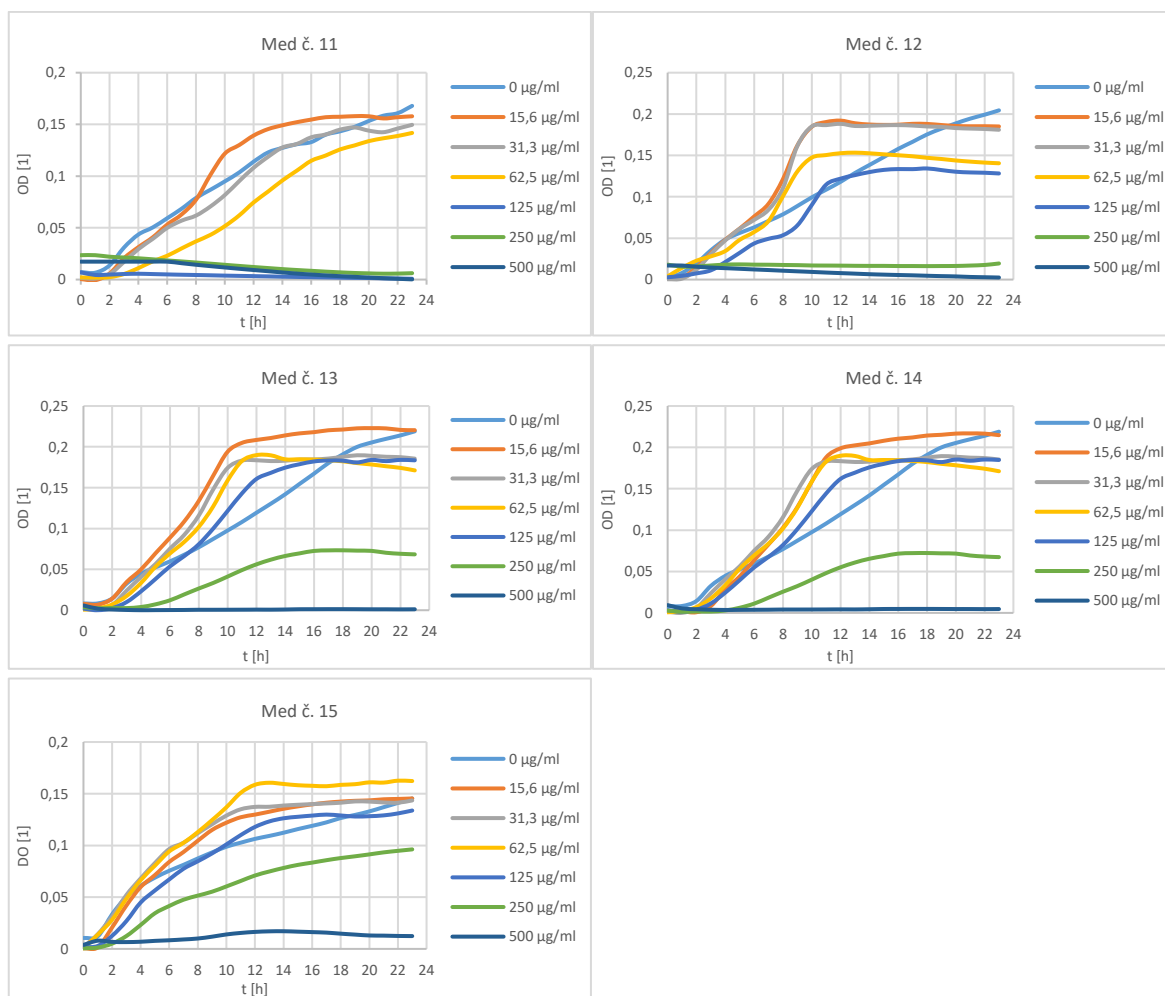
Antimikrobní účinek daného vzorku medu při určité koncentraci byl hodnocen pomocí růstových křivek, měření probíhalo od doby lag-fáze až po fázi stacionární. Růst bakterií byl sledován po dobu 24 hodin a vyhodnocen jako změna optické hustoty buněk v čase při vlnové délce 600 nm. Kontrolou byl růst bakterií v kultivačním médiu bez přítomnosti medu (v grafech světle modrá křivka).

7.5.1 Vliv vzorků medů na růst *Staphylococcus aureus* CCM 3953

Byl sledován inhibiční účinek vzorků medů na bakterii *Staphylococcus aureus* CCM 3953 pomocí mikrodiluční metody. Nejlepší inhibiční účinky vykazovaly medové roztoky při nejvyšších koncentracích 125; 250 a 500 $\mu\text{g/ml}$. U vzorků č. 1 a č. 10 medový roztok o koncentraci 125 $\mu\text{g/ml}$ pouze prodloužil dobu lagu. U vzorků č. 13–15 koncentrace 125 $\mu\text{g/ml}$ růst bakterií neinhibovala a koncentrace 250 $\mu\text{g/ml}$ vedla pouze k prodloužení doby lag-fáze a ke snížení celkového počtu nárůstu *Staphylococcus aureus*. Medové roztoky o nízké koncentraci (15,6 – 62,5 $\mu\text{g/ml}$) růst bakterií naopak ještě podpořily. Výjimku tvořily medy č. 8, 9 a 11, kdy docházelo k mírnému poklesu optické hustoty i při koncentraci 62,5 $\mu\text{g/ml}$. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 8 a 9.



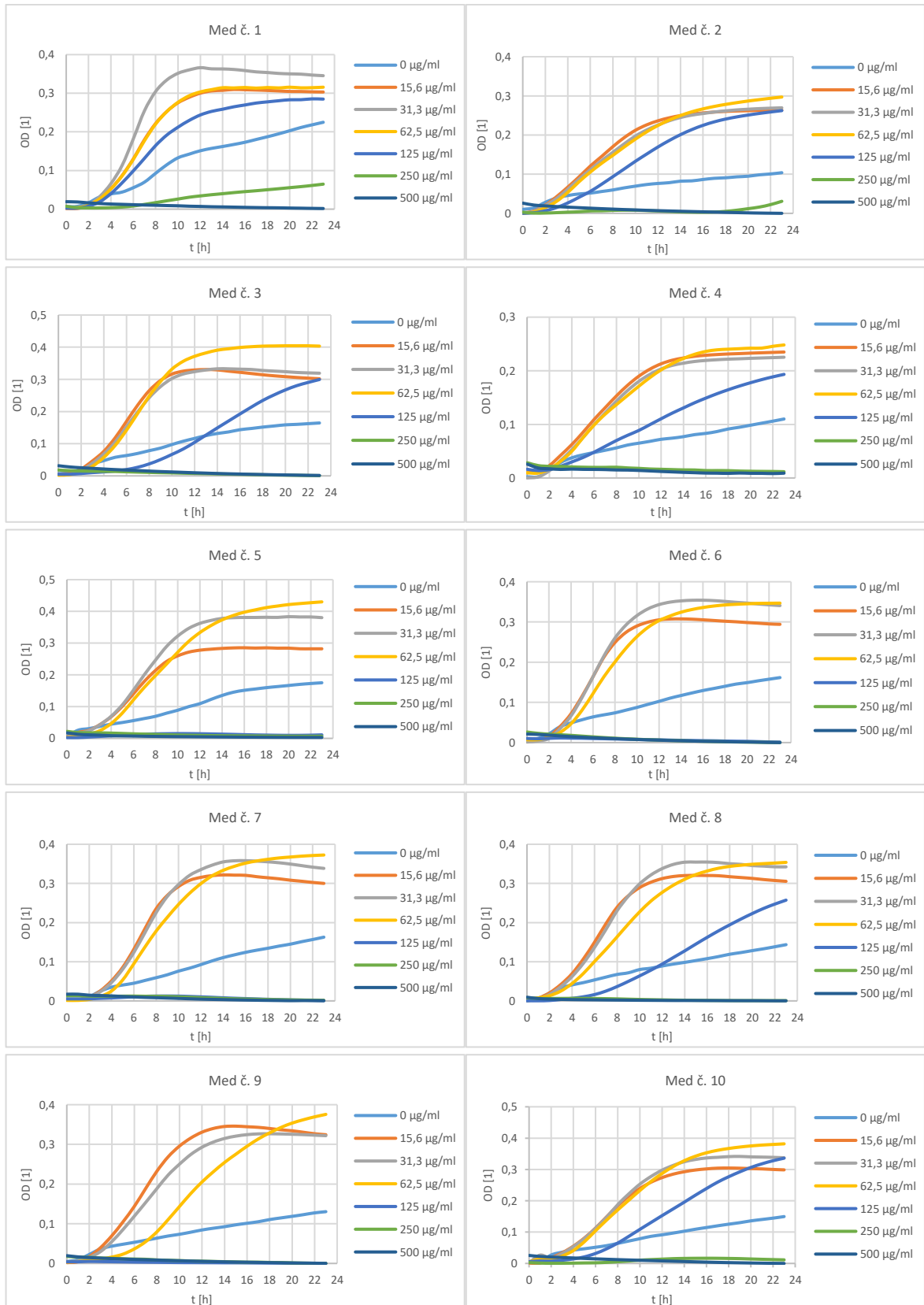
Obrázek 8 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst *Staphylococcus aureus* CCM 3953



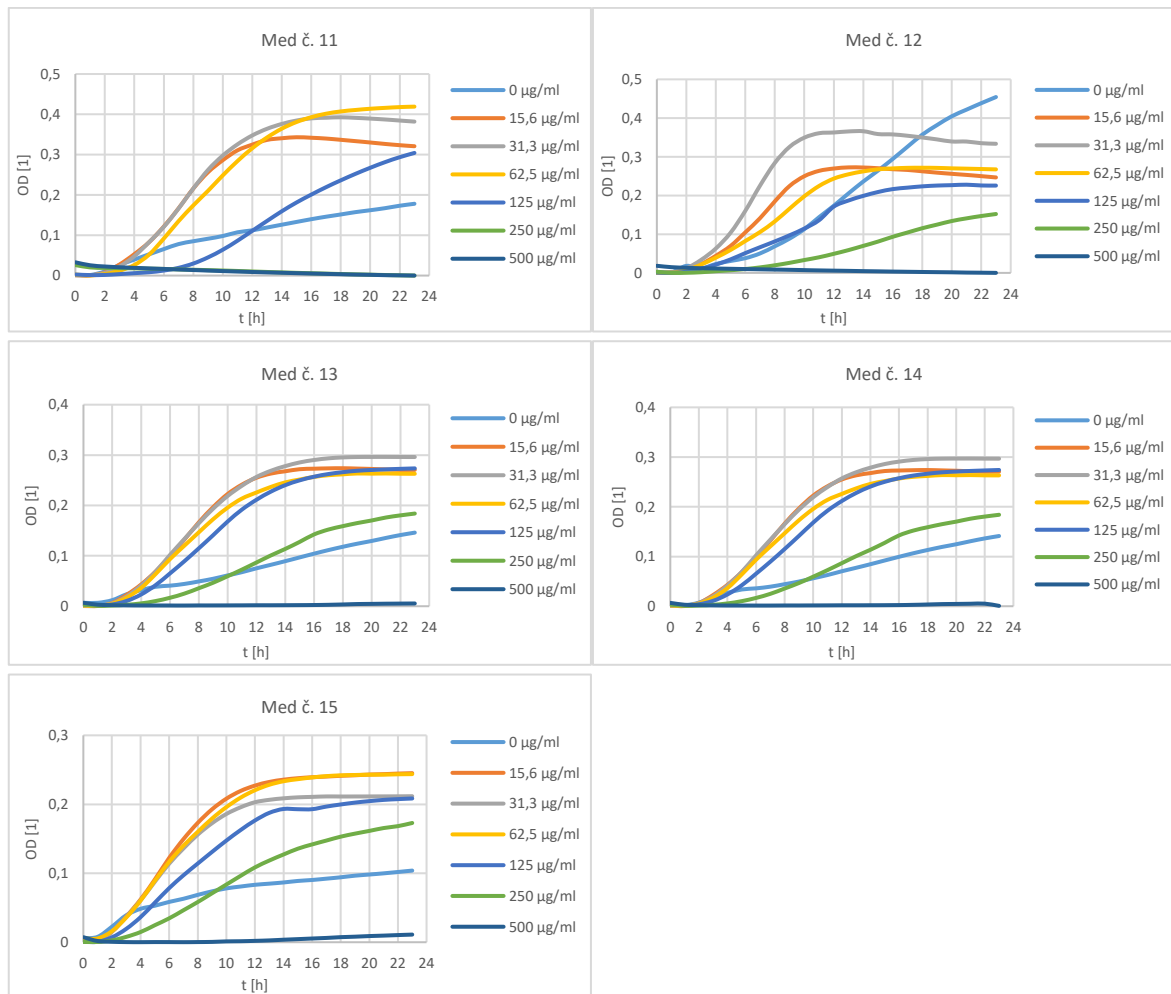
Obrázek 9 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst *Staphylococcus aureus* CCM 3953

7.5.2 Vliv vzorků medů na růst *Staphylococcus aureus* CCM 2020

Dalším zástupcem z rodu *Staphylococcus* byla bakterie *Staphylococcus aureus* CCM 2020. U všech vzorků medů při koncentraci 500 µg/ml došlo k omezení růstu bakterií, vzorky č. 13–15 inhibovaly růst bakterií pouze při této koncentraci a měly tak nejslabší antimikrobní účinek. V případě vzorků č. 1–4, 8, 10 a 11 měly inhibiční účinek i medové roztoky o koncentraci 250 µg/ml. Bakteriostatický účinek měly i medové roztoky č. 5–7 a č. 9 při koncentraci 125 µg/ml, a měly tedy nejsilnější antimikrobní účinek na růst *Staphylococcus aureus* CCM 2020. Velmi nízké koncentrace medových roztoků měly opět podpurný účinek na růst. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 10 a 11.



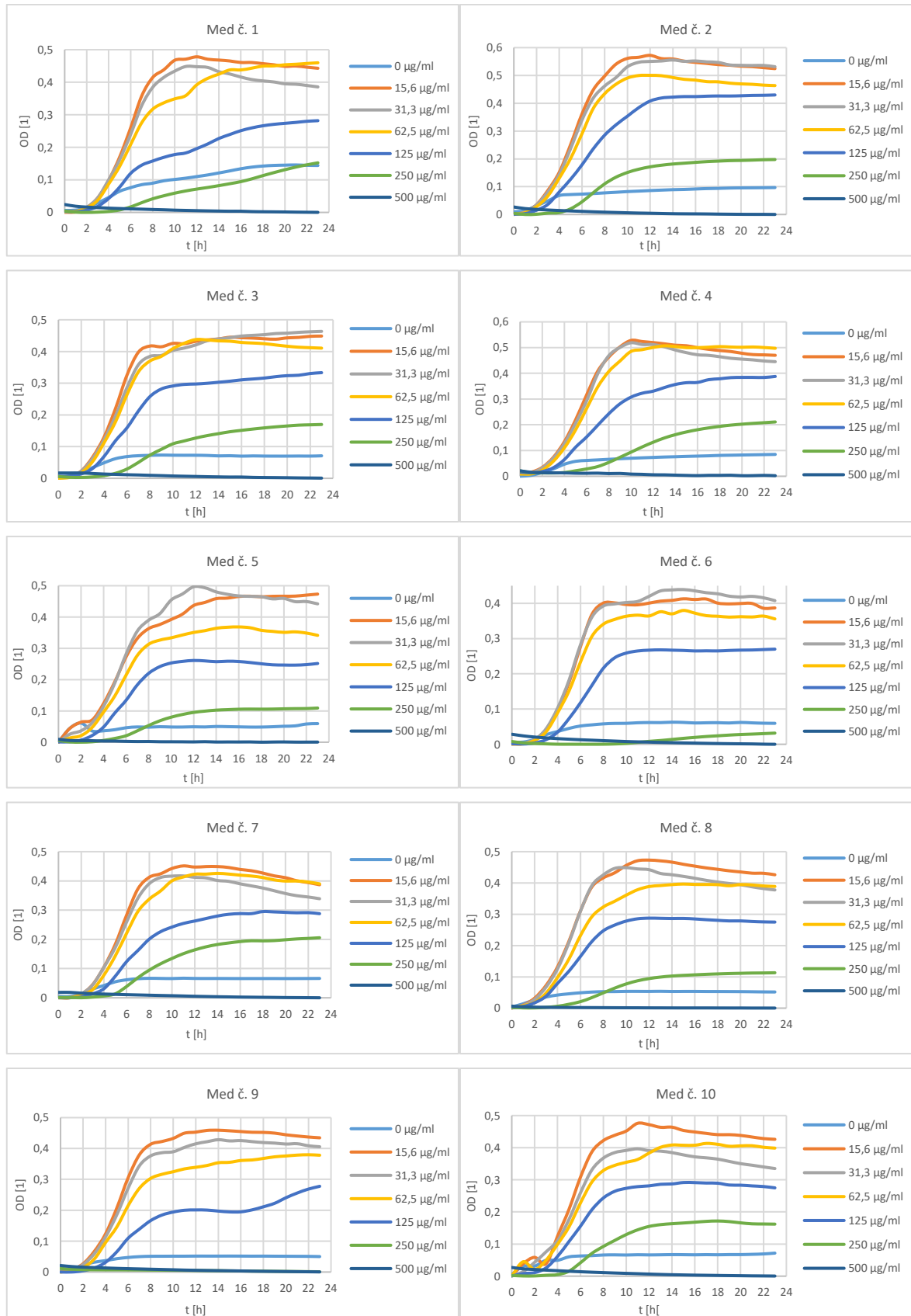
Obrázek 10 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst *Staphylococcus aureus* CCM 2020



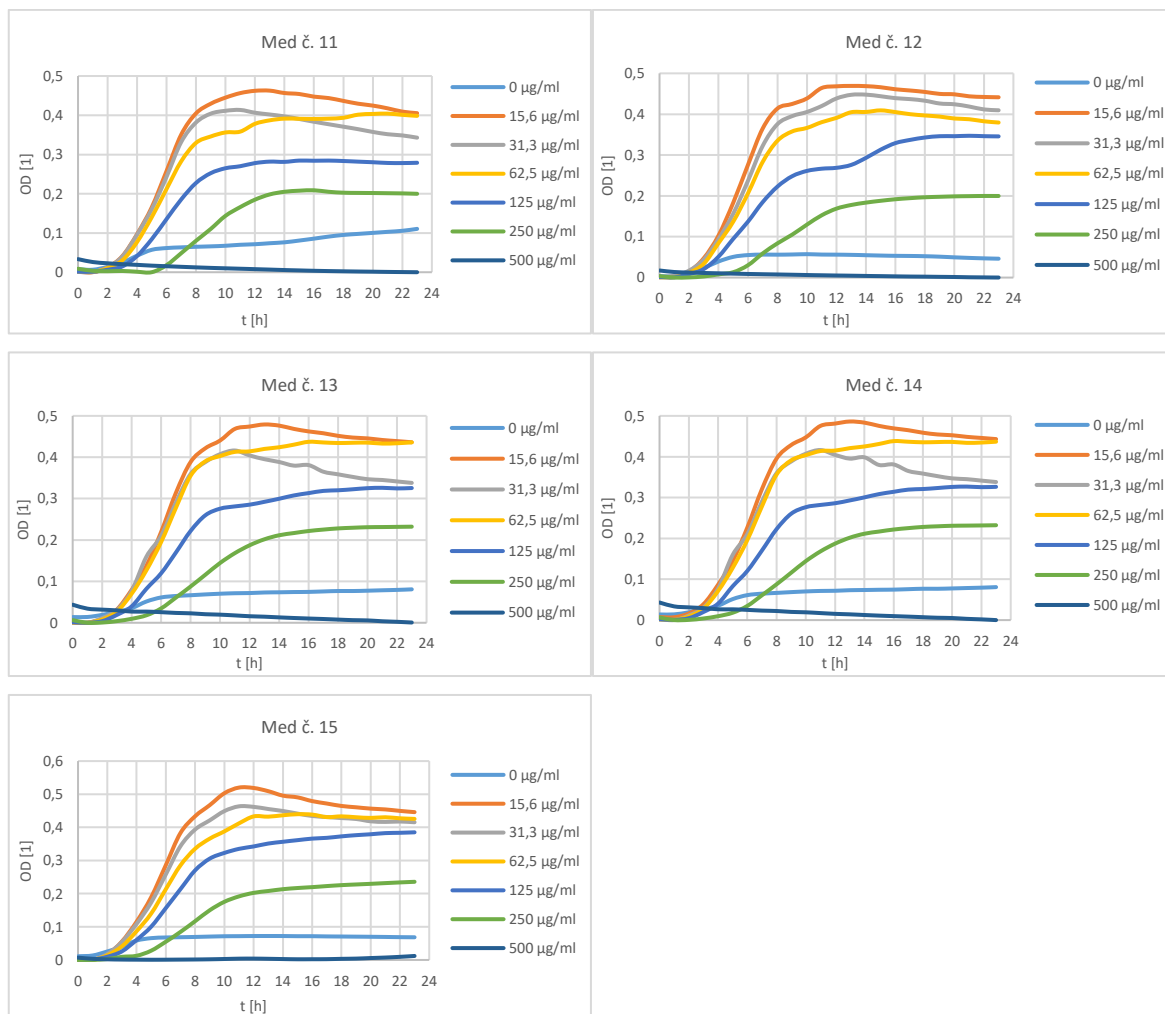
Obrázek 11 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst *Staphylococcus aureus* CCM 2020

7.5.3 Vliv vzorků medů na růst *Enterococcus faecalis* CCM 2665

Druhou skupinou mikroorganismů, na niž byl pozorován antimikrobní účinek medů, byl rod *Enterococcus*. Prvním sledovaným kmenem byl *Enterococcus faecalis* CCM 2665. Při koncentraci 500 µg/ml došlo k inhibici růstu bakterií u všech vzorků medů. Nejsilnější antimikrobní účinek na tento kmen měl med č. 9, který zcela inhiboval růst i při koncentraci 250 µg/ml. Med č. 6 při koncentraci 250 µg/ml rovněž zastavil růst bakterie *Enterococcus*, ale po 14 hodinách se bakterie dále množí. Vzorek medu č. 1 o koncentraci 250 µg/ml způsobil pouze prodloužení lag-fáze. Ostatní medové roztoky o nižší koncentraci podpořily celkový růst bakterie. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 12 a 13.



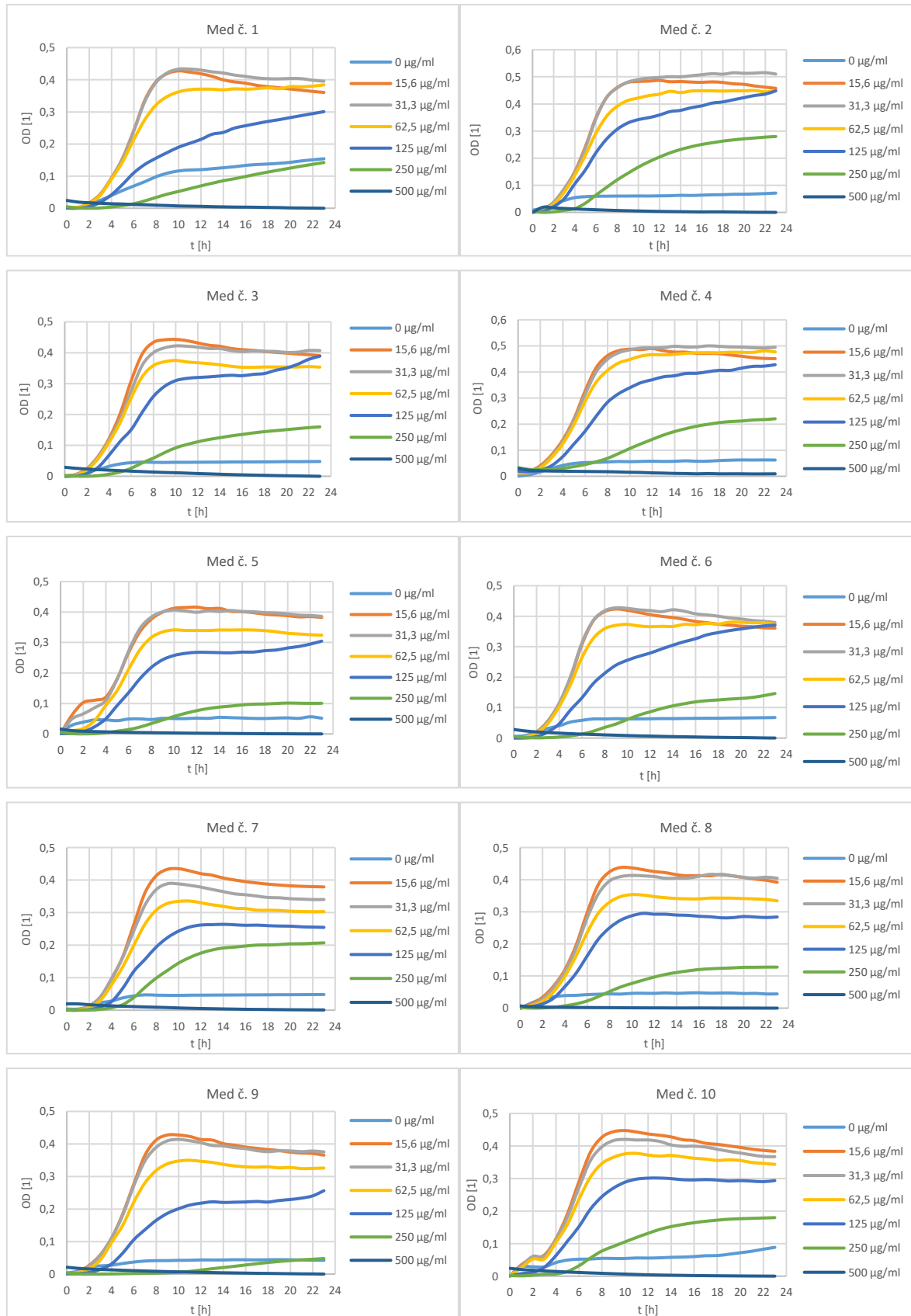
Obrázek 12 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst *Enterococcus faecalis* CCM 2665



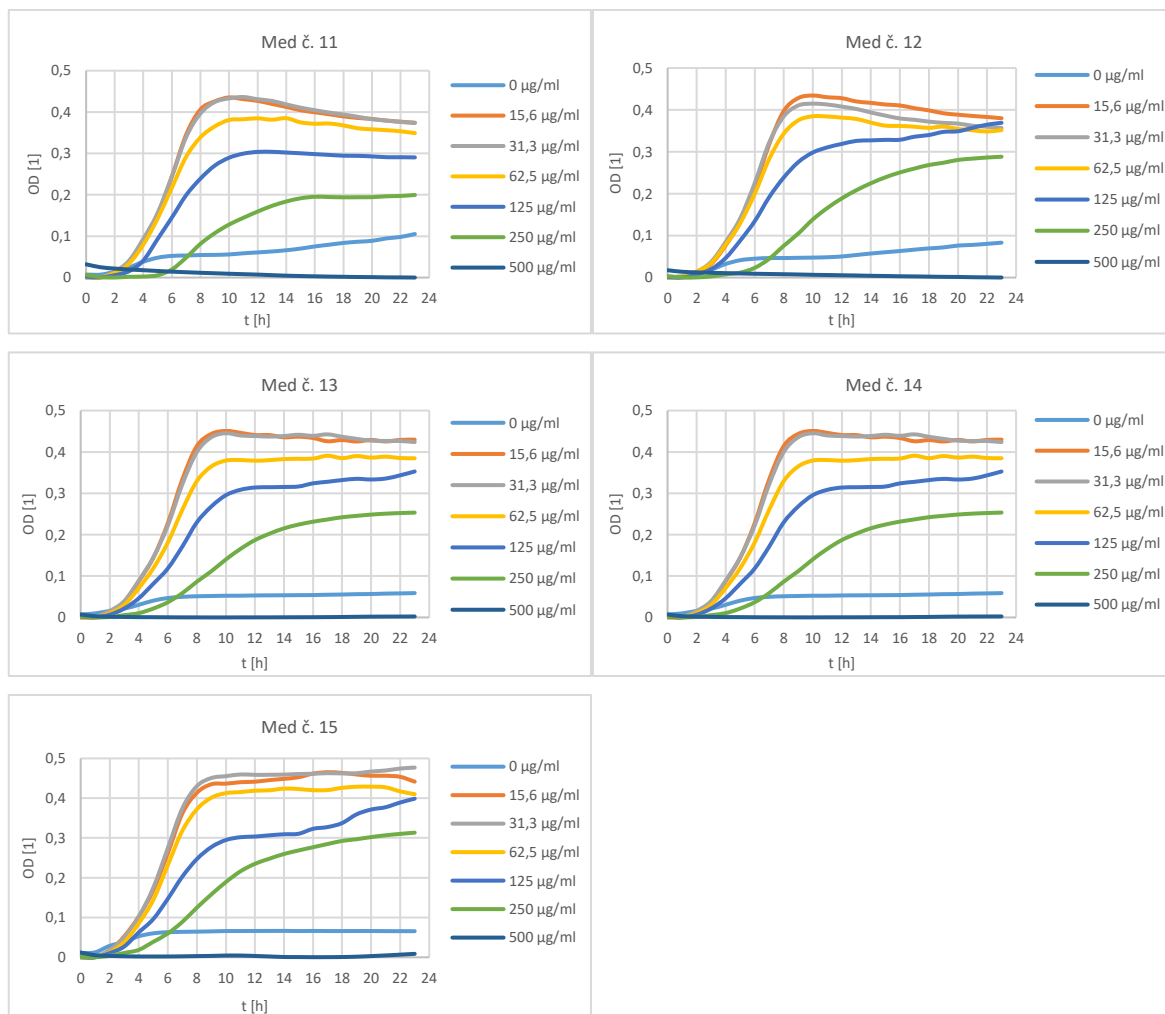
Obrázek 13 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst *Enterococcus faecalis* CCM 2665

7.5.4 Vliv vzorků medů na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224

Dalším sledovanou bakterií z rodu *Enterococcus* byl *Enterococcus faecalis* CCM 4224, tento kmen byl mírně odolnější vůči inhibičním účinkům vybraných medů než *Enterococcus faecalis* CCM 2665. Nicméně všechny vzorky medů při koncentraci 500 µg/ml působily na bakterii bakteriostaticky. Nejsilnější inhibiční účinek měl opět vzorek medu č. 9, který zastavil růst bakterie i při koncentraci 250 µg/ml, ale po 12 hodinách se bakterie dále množily. Druhý nejsilnější antimikrobní účinek vykazoval med č. 1, který prodloužil lag-fázi a snížil růst bakterií. Koncentrace od 15,6 µg/ml do 125 µg/ml růst neinhibovaly, a naopak podpořily jejich růst (kromě vzorku č. 1 a č. 9). Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 14 a 15.



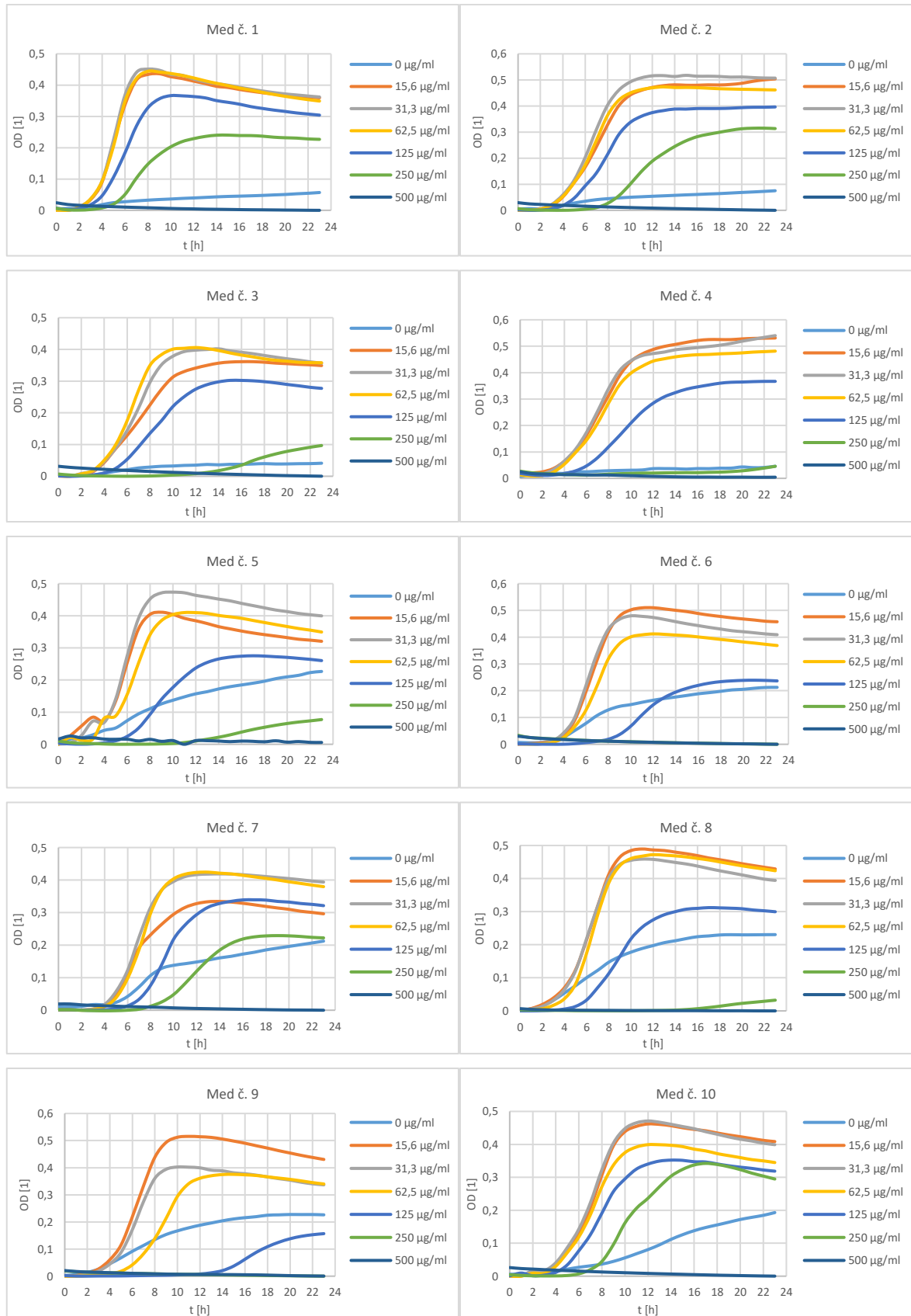
Obrázek 14 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224



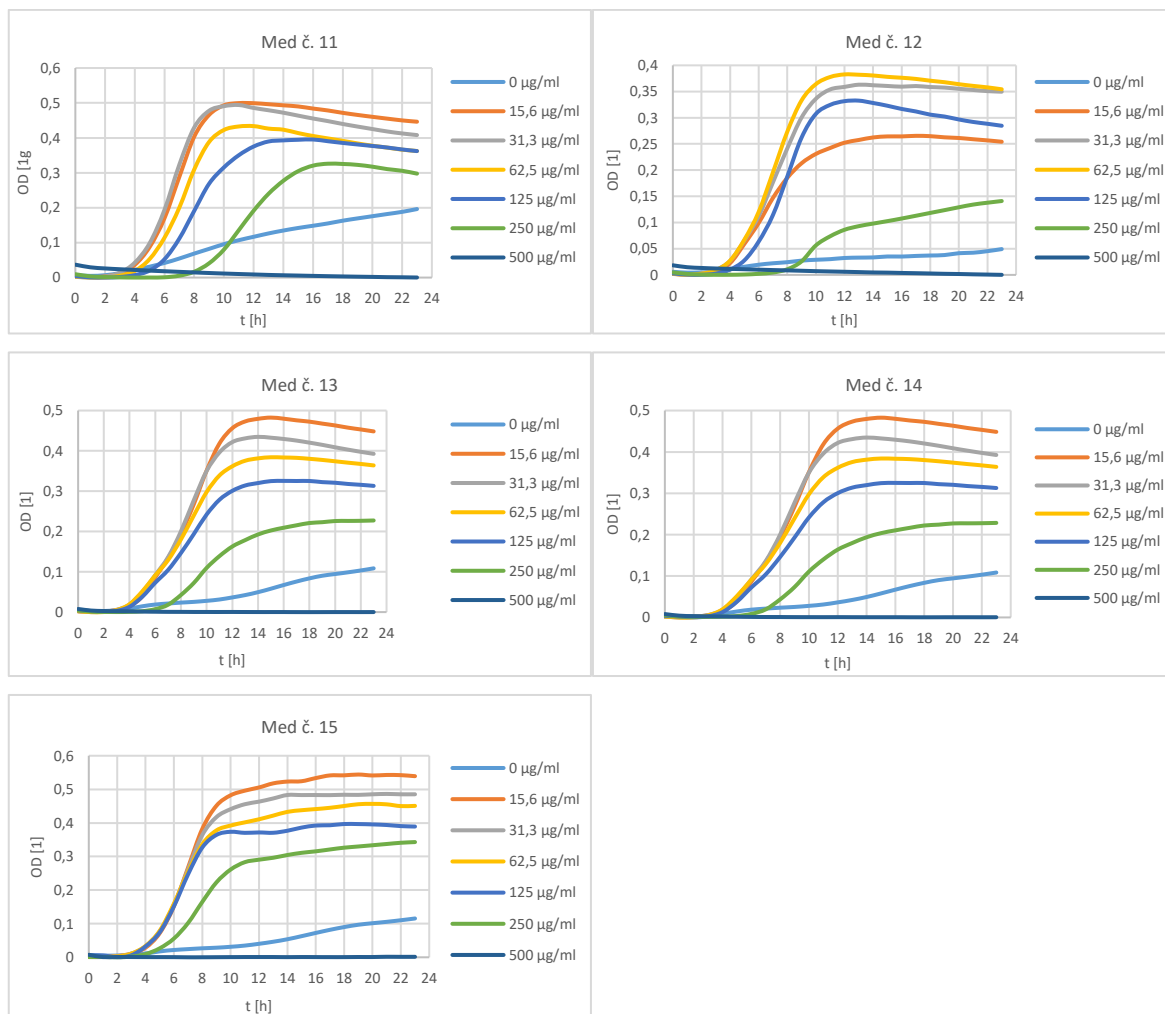
Obrázek 15 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224

7.5.5 Vliv vzorků medů na růst *Enterococcus durans* CCDM 437

Další sledovaný druh bakterie z rodu *Enterococcus* byl *Enterococcus durans* CCDM 437. Nejnižší inhibiční účinek měly vzorky medů č. 1, 2 a č. 10 až 15, kdy došlo k inhibici pouze při nejvyšší koncentraci (500 µg/ml) medového roztoku. Výraznější inhibiční efekt na růst tohoto kmene byl pozorován u medů č. 3 až 8, kdy došlo nejprve k zastavení růstu bakterií i při koncentraci 250 µg/ml, ale po uplynutí několika hodin (10–16 hodin) se bakterie množily, avšak s nižší intenzitou než u kontroly bez přidavku medového roztoku. Výjimkou byl vzorek medu č. 6, který při koncentraci 250 µg/ml inhiboval růst po celou dobu kultivace. Nejsilnější antimikrobní účinek měl med č. 9, který zpomalil růst bakterie i při koncentraci 125 µg/ml na dobu 14 hodin (prodloužená lag fáze), poté však růst bakterie pokračoval dále s nižší intenzitou. Nižší koncentrace medových roztoků růst tohoto kmene pouze posílily. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 16 a 17.



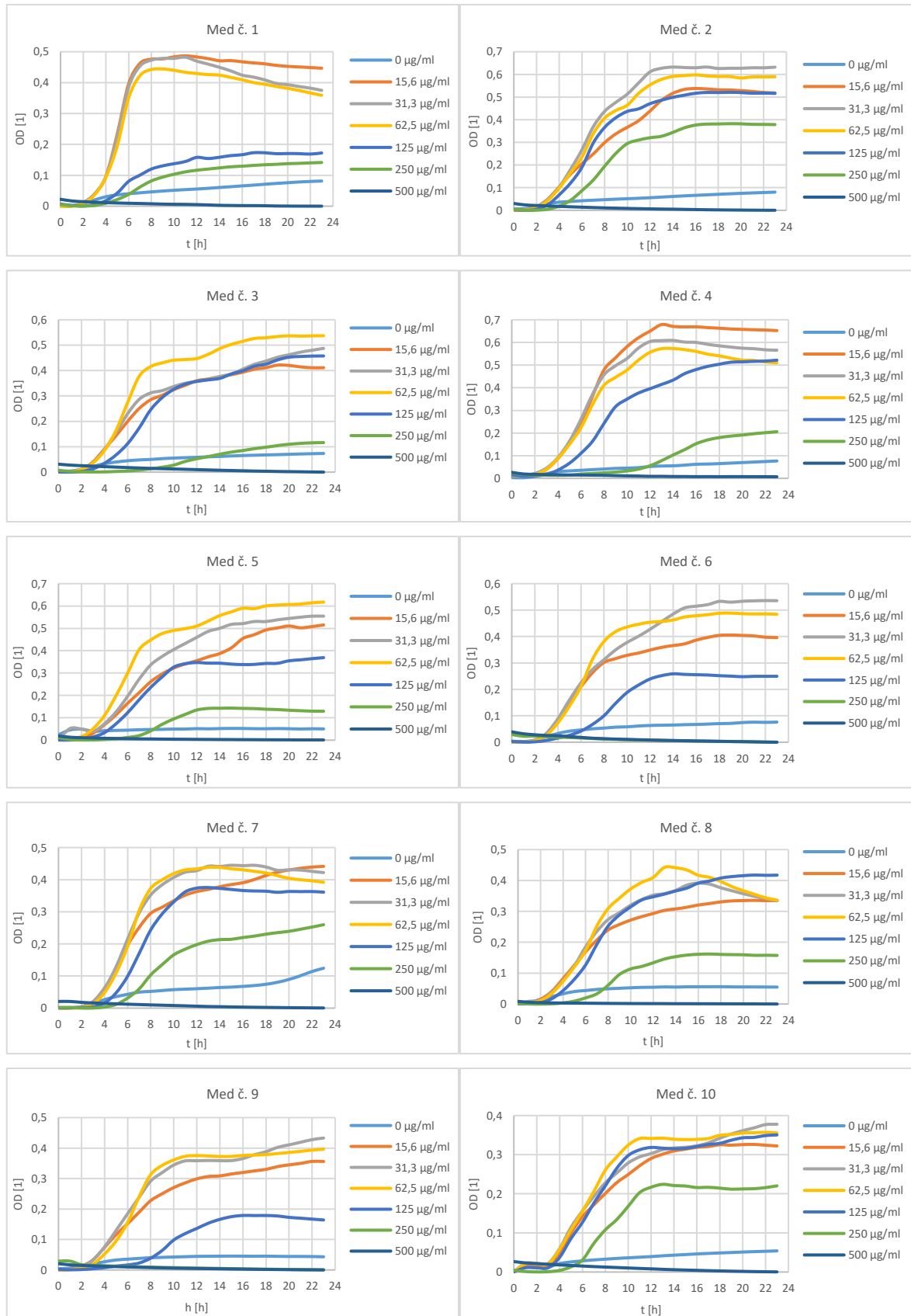
Obrázek 16 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst *Enterococcus durans* CCDM 437



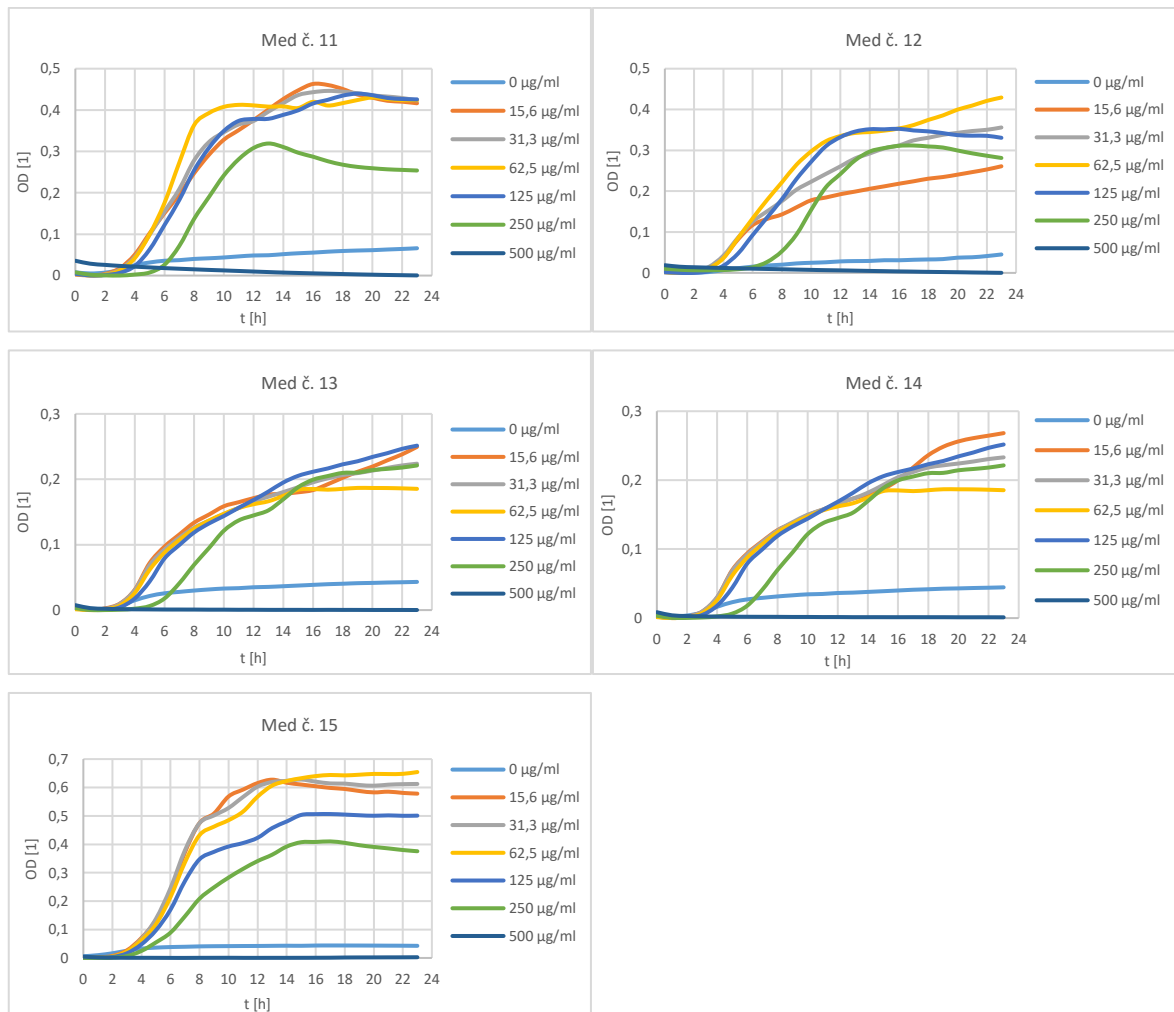
Obrázek 17 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst *Enterococcus durans* CCDM 437

7.5.6 Vliv vzorků medu na růst *Enterococcus durans* CCDM 53

Posledním sledovaným kmenem rodu *Enterococcus* byl *Enterococcus durans* CCDM 53. Medové roztoky působily na tento kmen obdobně jako na předchozí kmen *Enterococcus durans* CCDM 437. Nejslabší antimikrobní efekt měly opět medy č. 1, 2, 10–15 a navíc i medy č. 7 a 8, kdy došlo k poklesu optické denzity výhradně jen při koncentraci 500 µg/ml. Lepší výsledky vykazovaly medy č. 3 až 5, působily bakteriostaticky i při koncentraci 250 µg/ml, nicméně ke konci docházelo ke vzrůstu optické denzity. Nejlepší inhibiční efekt projevíly medy č. 6 a č. 9, které zastavily růst při koncentraci 250 µg/ml po dobu 24 hodin. Medové roztoky s koncentrací od 15,6 µg/ml do 125 µg/ml růst bakterií podporovaly. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 18 a 19.



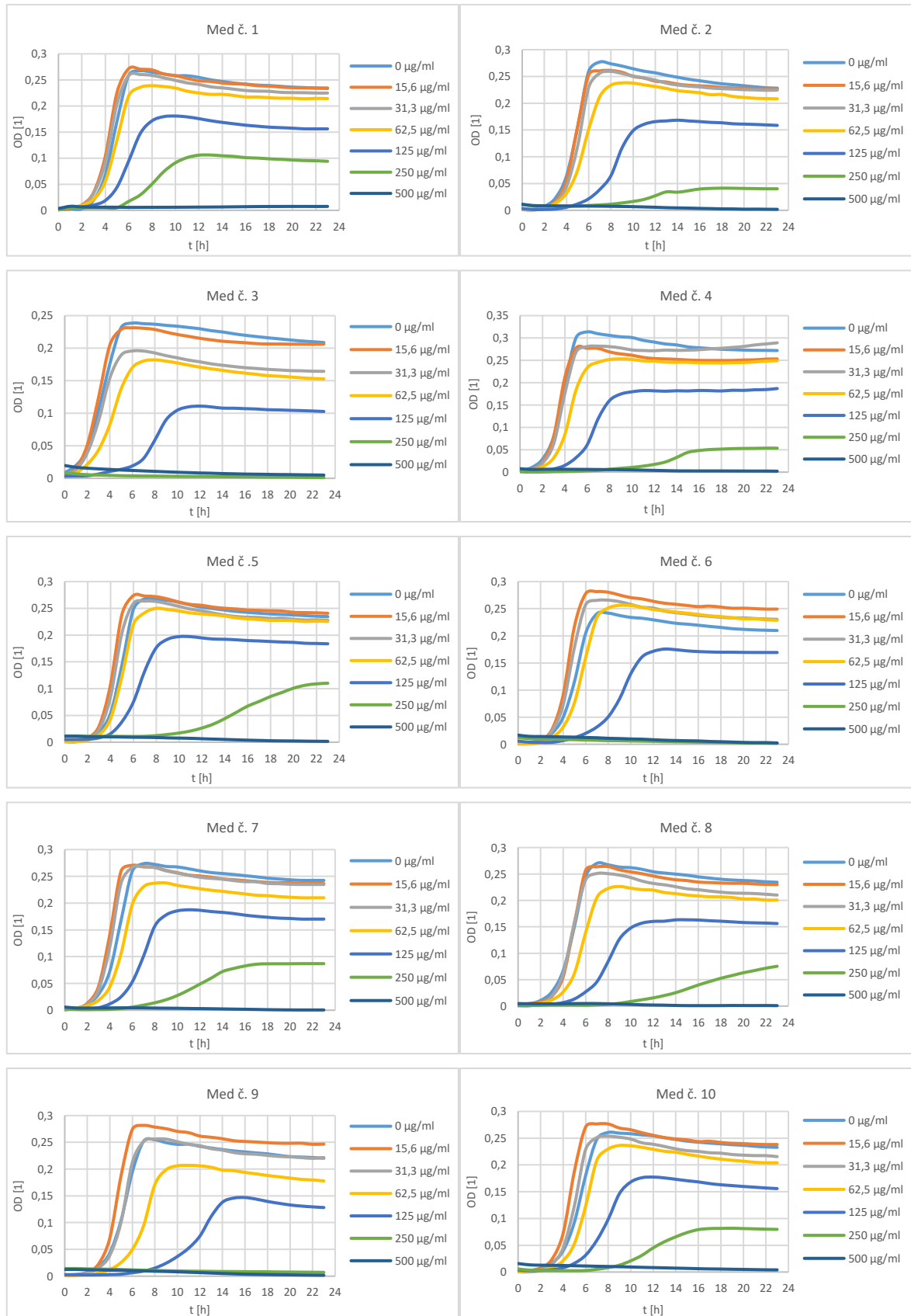
Obrázek 18 Vliv vzorků č. 1–10 medů na růst *Enterococcus durans* CCDM 53



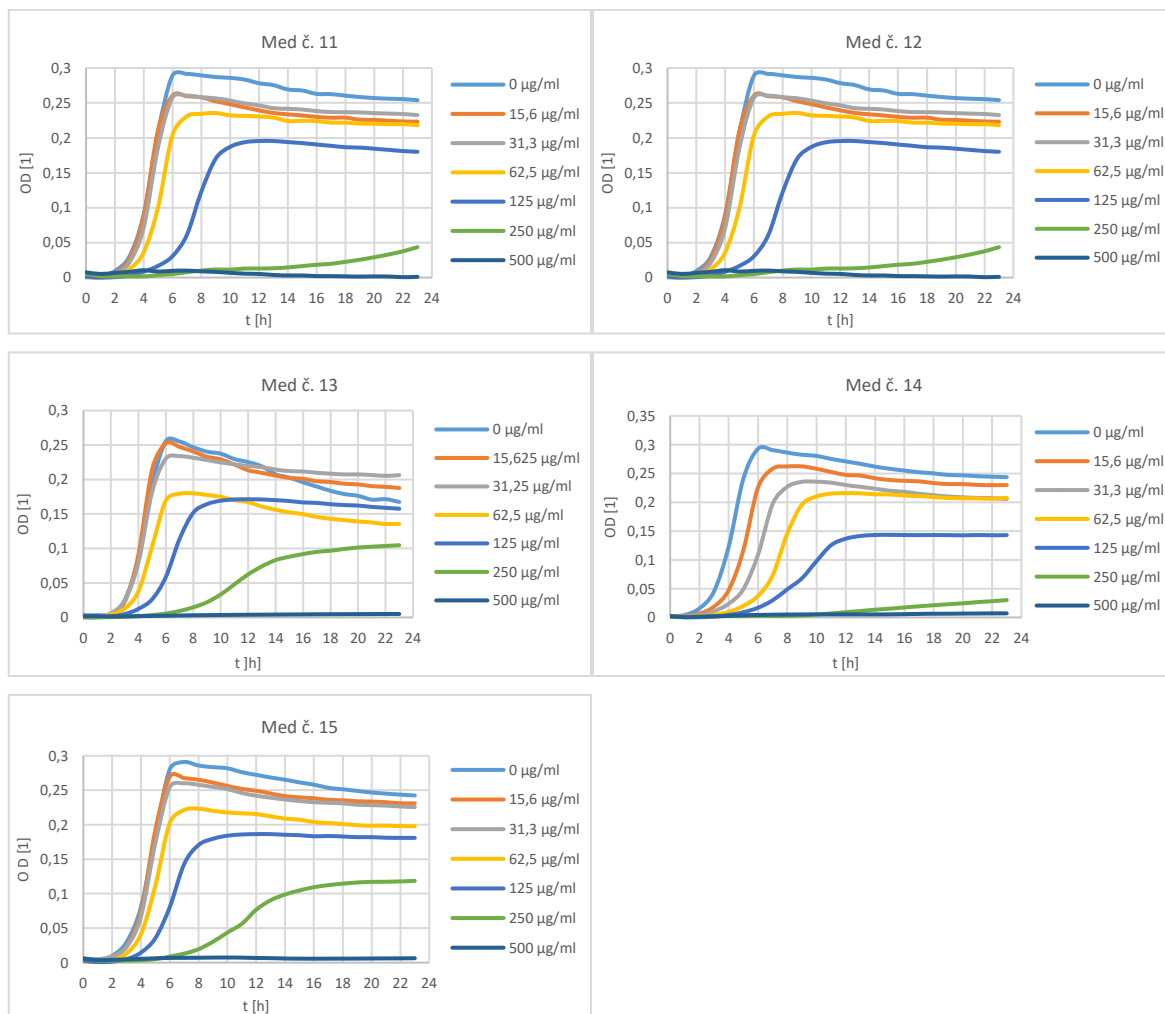
Obrázek 19 Vliv vzorků č. 11–15 medů na růst *Enterococcus durans* CCDM 53

7.5.7 Vliv vzorků medů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

Třetí skupinou mikroorganismů, na níž byl pozorován vliv medů, byl rod *Lactococcus*. Prvním sledovaným zástupcem byl *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004. V případě vzorků č. 1, 2, 4, 5, 7, 8 a 10–15 platilo, že nejvyšší koncentrace medů zcela inhibovala růst bakterií. Jejich nižší koncentrace (250 µg/ml) dokázala růst pozastavit, ale po uplynutí 6 až 9 hodin docházelo k opětovnému množení bakterií. Při koncentraci 125 µg/ml docházelo k prodloužení lagu o 4 hodiny. Výraznější inhibiční účinek měly medy č. 3 a č. 6, kdy došlo k okamžitému a úplnému zastavení množení buněk jak při koncentraci 500 µg/ml, tak i 250 µg/ml, medy o koncentraci 125 µg/ml rovněž prodloužily lag-fázi o 4 hodiny. Nejúčinnější byl vzorek medu č. 9, kdy i koncentrace 62,5 µg/ml dokázala prodloužit lag-fázi až o 4 hodiny. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 20 a 21.



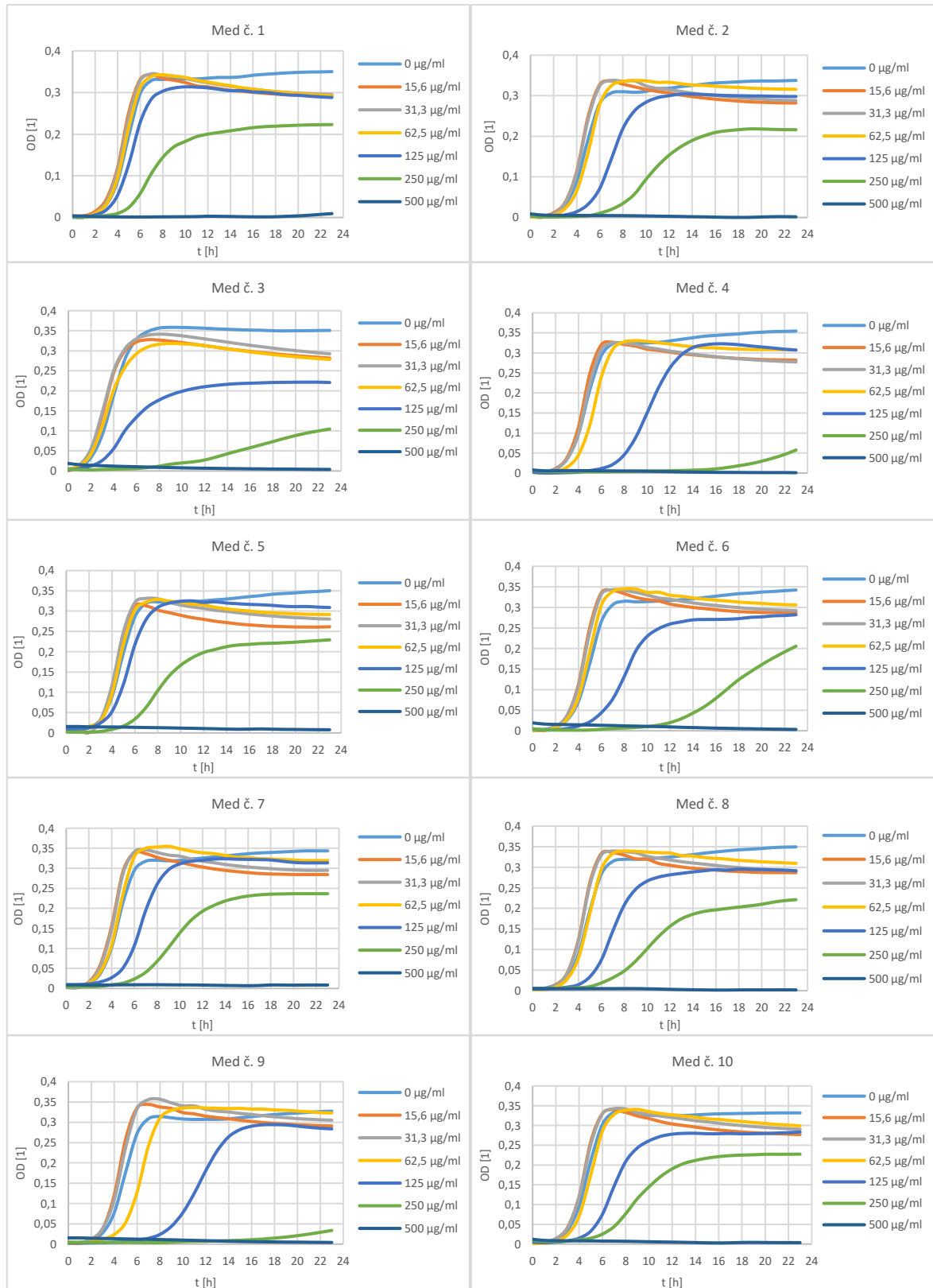
Obrázek 20 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004



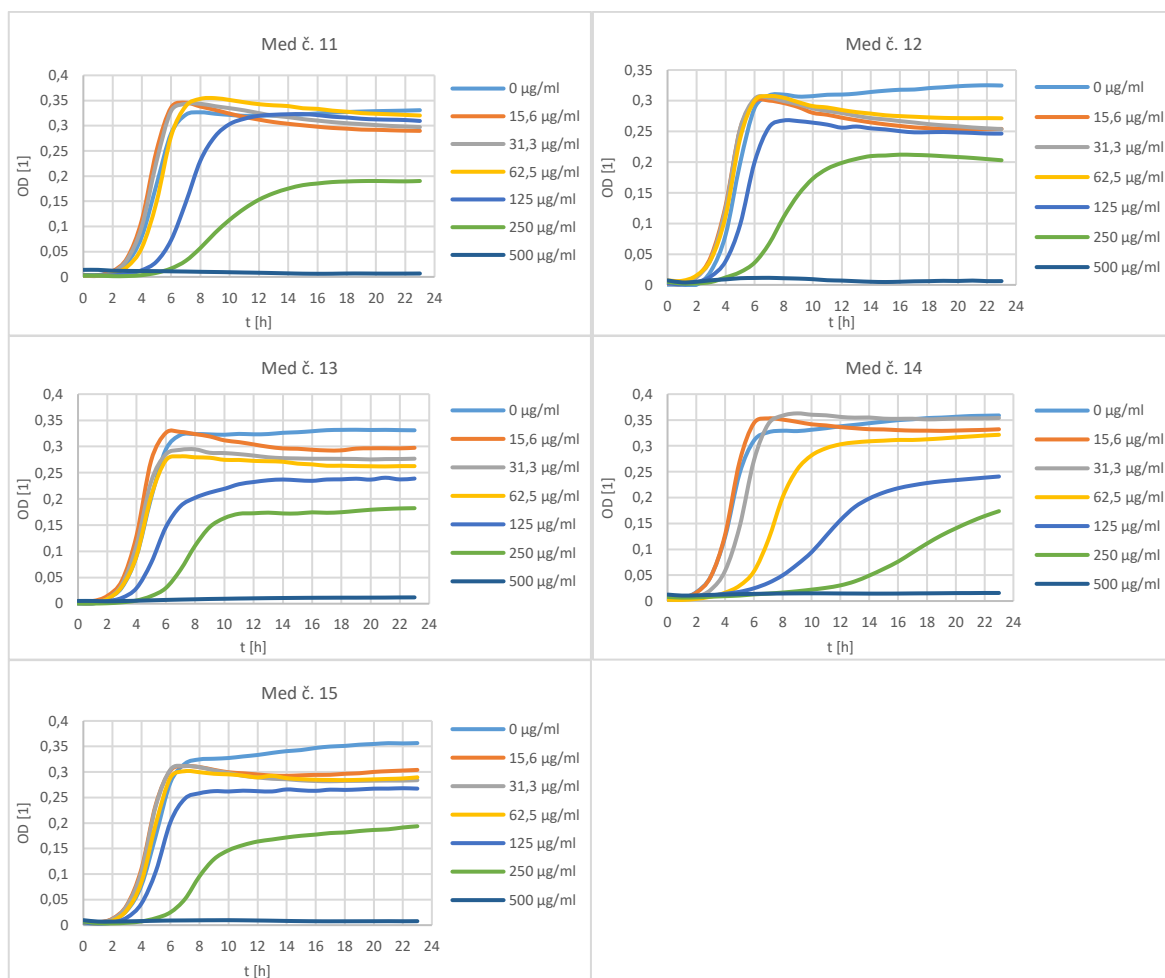
Obrázek 21 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

7.5.8 Vliv vzorků medů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 141

Druhým zástupcem rodu *Lactococcus* byl kmen *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 141. Tento kmen byl mírně odolnější vůči antimikrobním účinkům medů. Při nejvyšší koncentraci (500 µg/ml) u všech vzorků medů došlo k úplnému zastavení množení bakterií. Jejich poloviční koncentrace (250 µg/ml) obvykle pouze prodloužila lag fázi o 4 až 6 hodin a při koncentraci 125 µg/ml docházelo k prodloužení lagu pouze o 2 až 3 hodiny. Nejvýraznější antimikrobní účinek na růst této variety měly vzorky medu č. 9 a č. 14, tyto medy dokázaly prodloužit lag fázi až o 4 hodiny i při koncentraci 62,5 µg/ml. Nízké koncentrace medových roztoků optickou denzitu nijak výrazně nesnížily a ani nezvýšily. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 22 a 23.



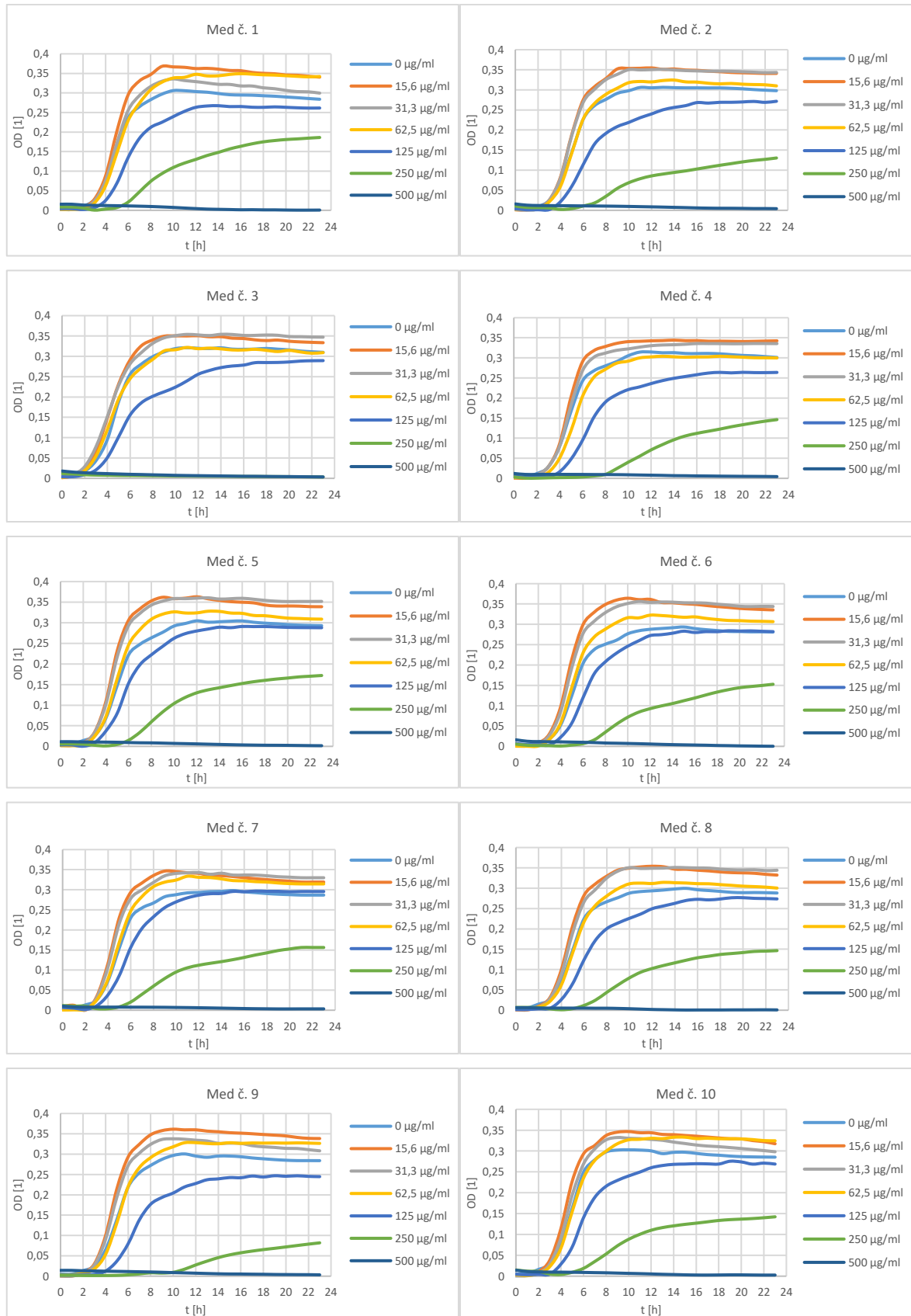
Obrázek 22 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 141



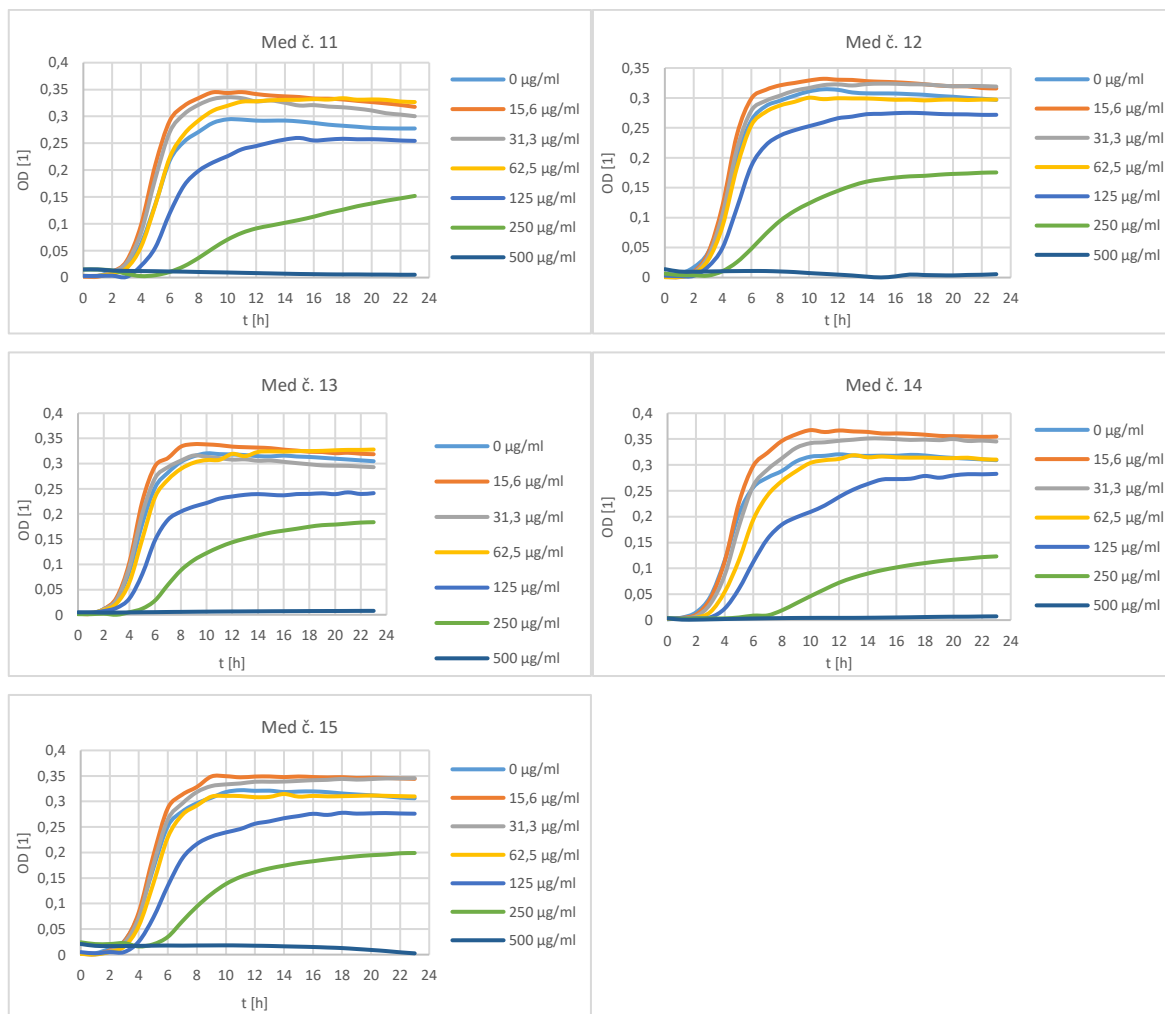
Obrázek 23 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 141

7.5.9 Vliv vzorků medů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

Posledním sledovaným kmenem rodu *Lactococcus* byl kmen *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824. Tento kmen se choval podobně jako kmen *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 141, nicméně jeho odolnost byla mírně slabší. Největší inhibiční účinek byl pozorován u medu č. 3, který dokázal zcela a okamžitě zastavit růst této bakterie jak při koncentraci 500 µg/ml tak i při koncentraci 250 µg/ml, koncentrace 125 µg/ml prodloužila lag fázi o 2 hodiny. Vzorky medů č. 4 a č. 9 dokázaly při koncentraci 125 µg/ml prodloužit délku lagu až o 4 hodiny, ale koncentrace medových roztoků při 250 µg/ml nezastavila růst bakterií po celou dobu a po uplynutí cca 7 hodin se bakterie dále množí. Ostatní vzorky medů působily při nejvyšší koncentraci (500 µg/ml) bakteriostaticky, jejich poloviční koncentrace (250 µg/ml) způsobila prodloužení lag fáze o cca 4 hodiny a při koncentraci 125 µg/ml došlo k prodloužení lagu cca o 3 hodiny a k mírnému snížení konečné optické denzity. Koncentrace medových roztoků od 15,6 µg/ml do 62,5 µg/ml většinou mírně zvyšovala celkový počet mikroorganismů. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 24 a 25.



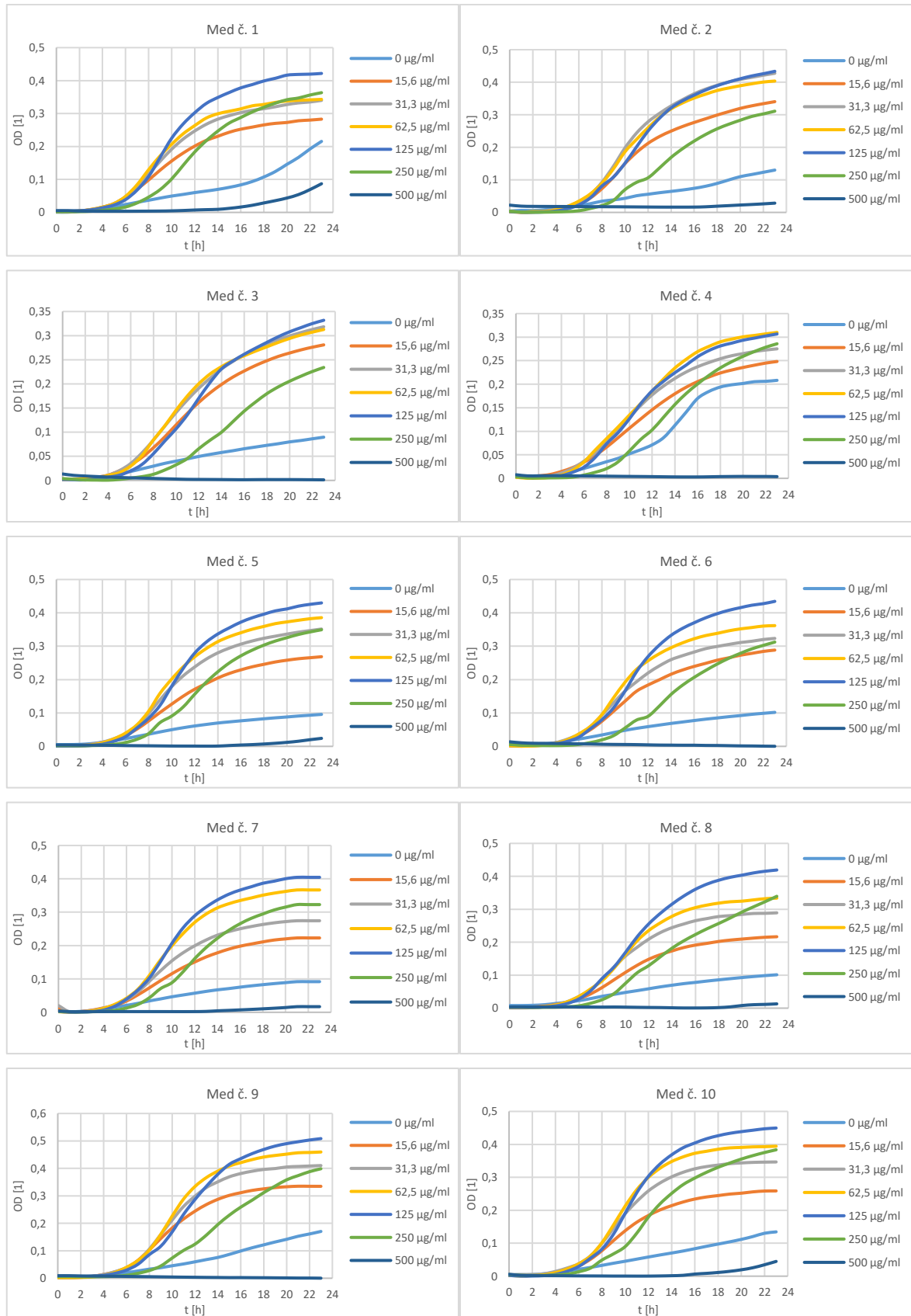
Obrázek 24 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824



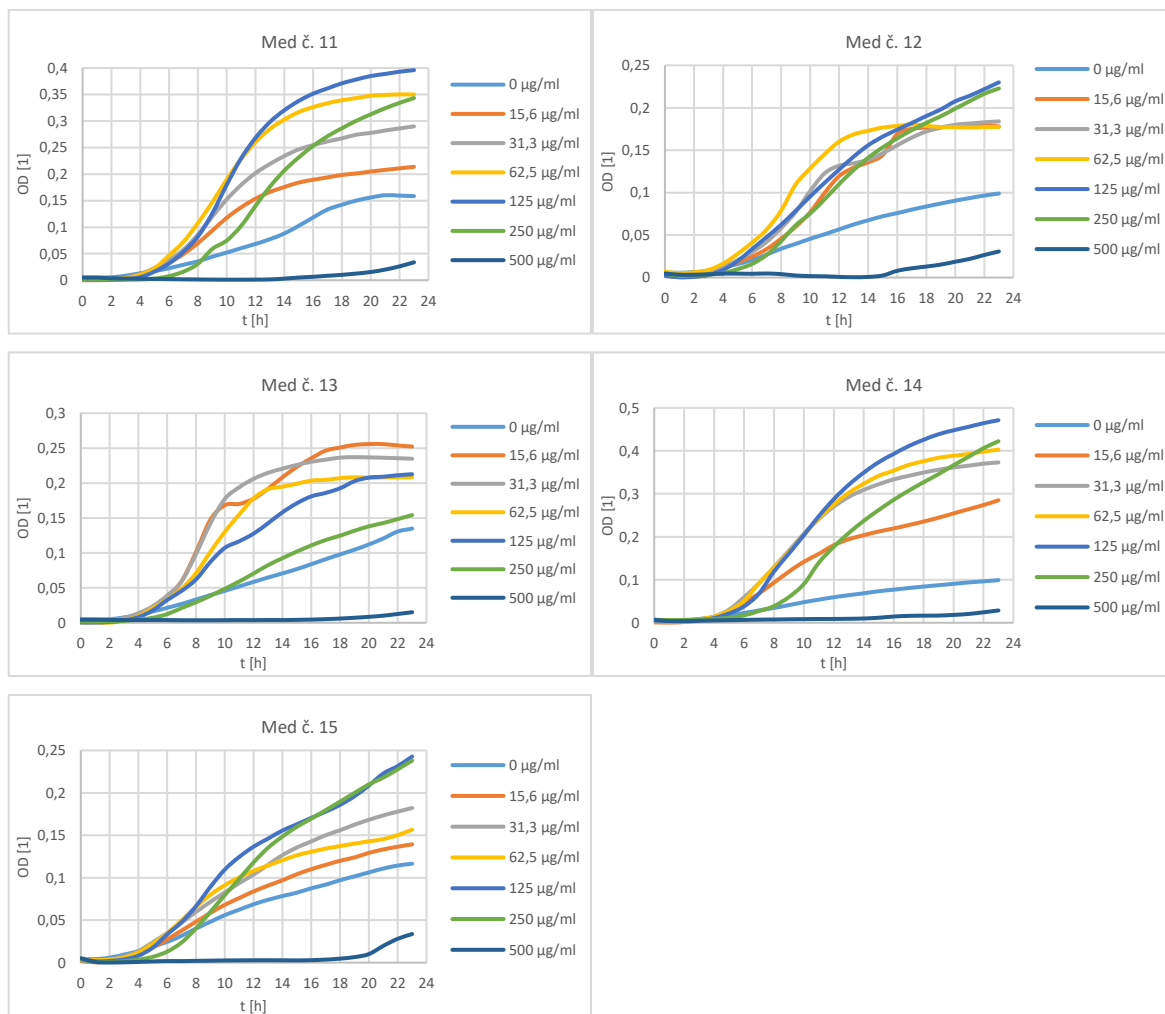
Obrázek 25 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

7.5.10 Vliv vzorků medů na růst *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 2-94

Poslední sledovanou skupinou mikroorganismů byli zástupci, kteří byli dříve řazeni do rodu *Lactobacillus*. Byl sledován antimikrobní účinek medů na kmen *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 2-94. Na rozdíl od ostatních skupin mikroorganismů se tyto kmeny jeví jako nejodolnější vůči inhibičním účinkům medů, jelikož až v 11 případech ani nejvyšší koncentrace (500 µg/ml) medových roztoků nestačila k dostatečné inhibici růstu bakterií. Růst bakterií byl sice ze začátku inhibován, ale po uplynutí několika hodin (14–18 hodin) se bakterie dále množily. Nejlepších inhibičních účinků dosahovaly vzorky medů č. 3, 4, 6 a 9, tyto vzorky totiž dokázaly zcela zastavit růst po celou dobu alespoň při nejvyšší koncentraci 500 µg/ml. Všechny nižší koncentrace od 15,6 µg/ml do 250 µg/ml růst *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 2-94 výrazně podpořily. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 26 a 27.



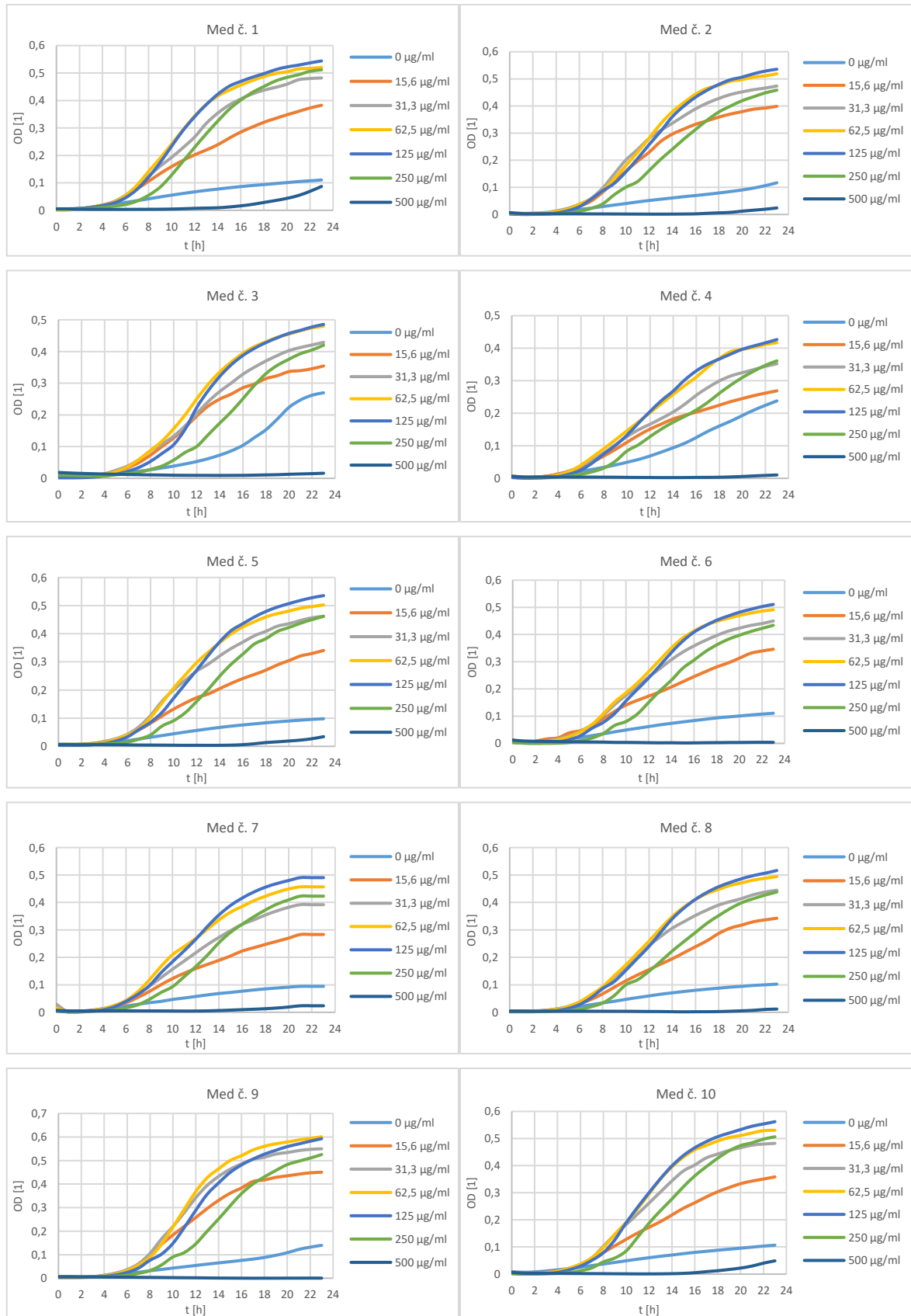
Obrázek 26 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 2-94



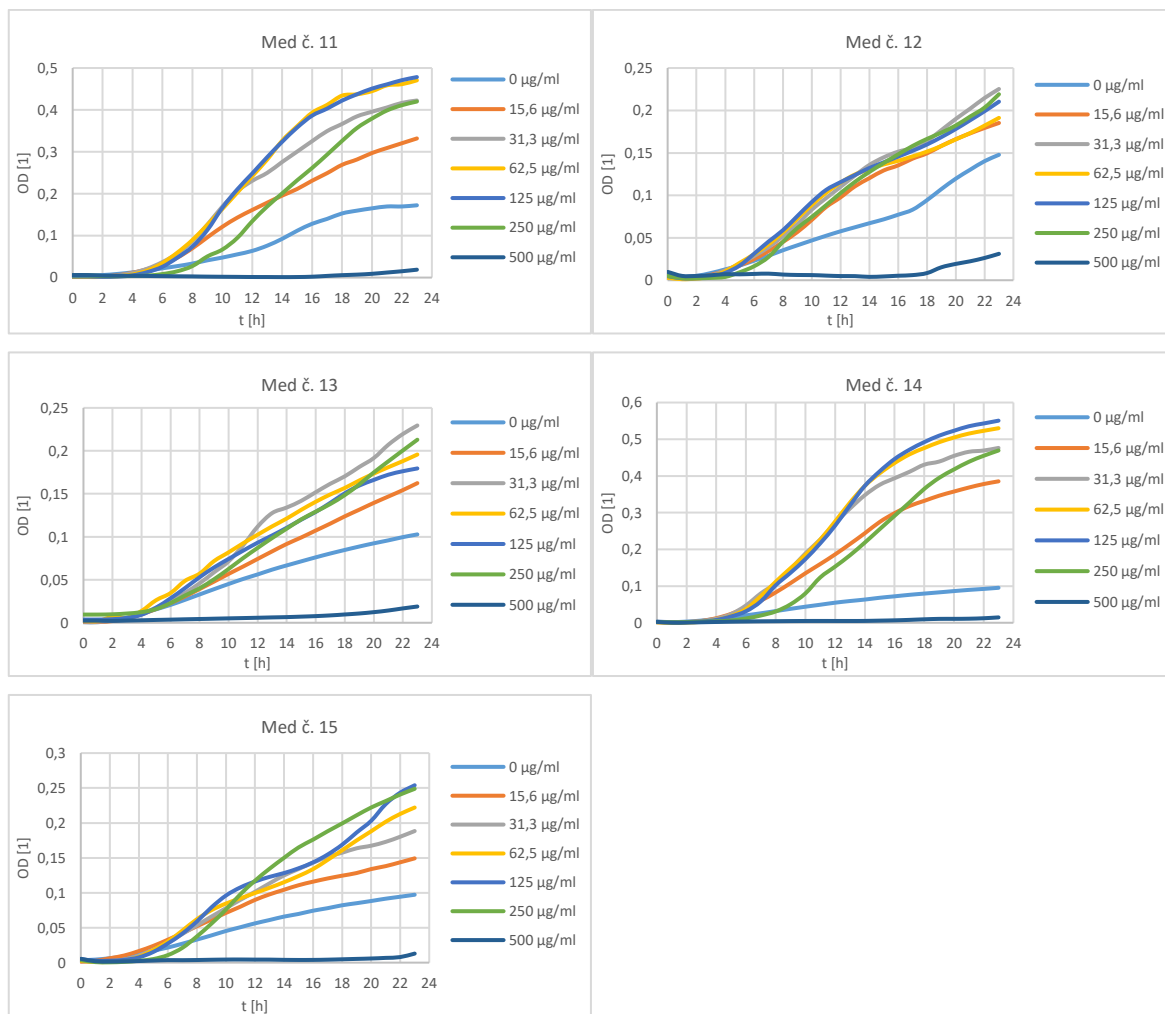
Obrázek 27 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 2-94

7.5.11 Vliv vzorků medů na růst *Levilactobacillus brevis* RIBM 2-98

Dalším testovaným zástupcem této skupiny byl kmen *Levilactobacillus brevis* RIBM 2-98. Z grafů na Obrázku 28 a 29 lze pozorovat, že tento kmen byl odolnější vůči antimikrobním účinkům medů než předchozí kmen *Levilactobacillus plantarum* RIBM 2-94, jelikož až 13 vzorků medu i při nejvyšší koncentraci (500 µg/ml) nedokázalo zcela inhibovat růst bakterií po celou dobu sledování. U medů č. 1, 7, 12 a 13 se opětovně množily bakterie po uplynutí cca 10 až 15 hodin. U vzorků č. 2, 3, 5, 10, 11, 14 a 15 docházelo k růstu optické denzity po uplynutí 16 hodin a u medů č. 4 a č. 8 po uplynutí 20 hodin. Nejsilnější inhibiční efekt na tento kmen měly medy č. 6 a č. 9, které dokázaly zcela a okamžitě zastavit růst bakterií alespoň při jejich nejvyšší testované koncentraci. Ostatní koncentrace medových roztoků růst této bakterie posílil. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 28 a 29.



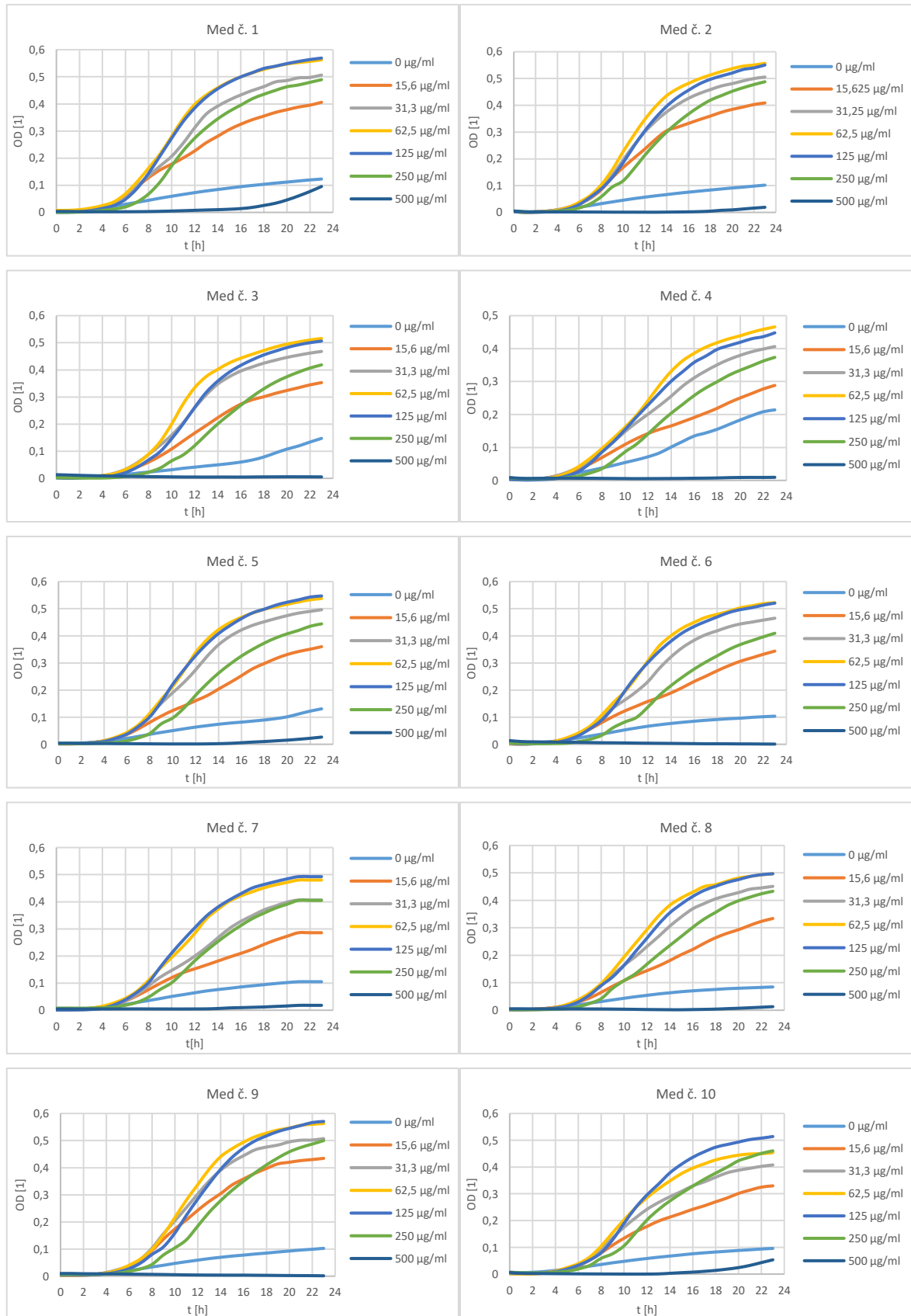
Obrázek 28 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst *Levilactobacillus brevis* RIBM 2-98



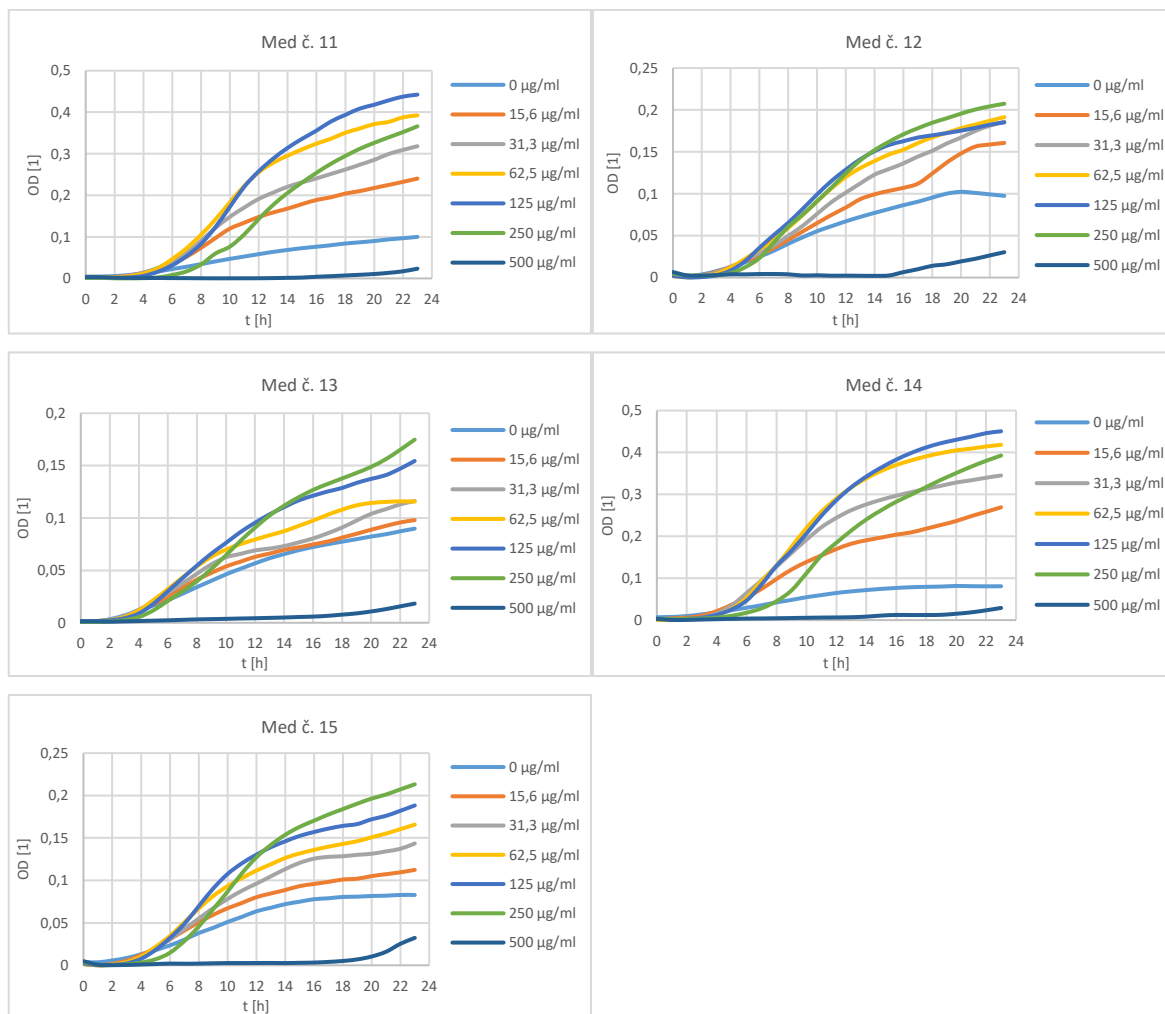
Obrázek 29 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst *Levilactobacillus brevis* RIBM 2-98

7.5.12 Vliv vzorků medu na růst *Levilactobacillus brevis* RIBM 2-111

Posledním sledovaným zástupcem této skupiny byl kmen *Levilactobacillus brevis* RIBM 2-111. Ve 12 případech nejvyšší koncentrace (500 µg/ml) medových roztoků nestačila k dostatečné inhibici růstu *Levilactobacillus brevis* RIBM 2-111 po celých 24 hodin. Nejlepších antimikrobních účinku dosahovaly vzorky medů č. 3, 6 a 9, ty jako jediné dokázaly okamžitě a zcela zastavit množení bakterií alespoň při jejich nejvyšší koncentraci. Naopak nejslabší inhibiční účinek na růst tohoto kmene měly medy č. 1, 13 a 14, tyto vzorky při koncentraci 500 µg/ml zastavily růst, ale jejich antimikrobní účinek nebyl dostatečný, a tak po uplynutí několika hodin se bakterie opět množily. Vzorky č. 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12 a 15 měly silnější inhibiční účinek, kdy došlo k opětovnému množení bakterií po uplynutí cca 15 až 18 hodin. Zbývající koncentrace všech vzorků medů podpořily růst až šestinásobně. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 30 a 31.



Obrázek 30 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst *Levilactobacillus brevis* RIBM 2-111



Obrázek 31 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst *Levilactobacillus brevis* RIBM 2-111

7.5.13 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

V Tabulce 10 jsou zrekapitulovány výsledky působení jednotlivých vzorků medů na testované grampozitivní bakterie. Výsledky jsou prezentovány jako MIC daného vzorku medu.

Z tabulky je zřejmé, že nejcitlivější bakterií vůči testovaným vzorkům medů byl *Staphylococcus aureus* CCM 3953. Až v sedmi případech došlo k inhibici růstu již od začátku kultivace při koncentraci 125 µg/ml. Další nejvíce citlivou bakterií byl kmen *Staphylococcus aureus* CCM 2020, kdy ve 4 případech došlo k zastavení množení bakterie již při koncentraci 125 µg/ml. Naopak nejvíce odolným kmenem byl *Levilactobacillus brevis* RIBM 2-98. Kdy v tomto případě došlo k zastavení růstu pouze u dvou vzorků medu, a to jenom při nejvyšší koncentraci (500 µg/ml). O druhé místo nejodolnějšího mikroorganismu se dělí *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 2-94 a *Levilactobacillus brevis* RIBM 2-111. Zde došlo k téměř úplnému zastavení růstu bakterií pouze u 4 vzorků medu při aplikované

nejvyšší koncentraci (500 µg/ml). Z výsledků kromě toho také vyplývá, že nejsilnější antimikrobní účinek na bakterie měly medy č. 9 a č. 6, zatímco medy č. 13 až 15 měly antimikrobní účinek vůči mikroorganismům nejslabší.

Tabulka 10 Minimální inhibiční koncentrace medů

MO	MIC [µg/ml]														
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.
SA1	250	250	125	250	125	125	125	125	125	250	125	250	500	500	500
SA2	500	250	250	250	125	125	125	250	125	250	250	500	500	500	500
EF1	500	500	500	500	500	250	500	500	250	500	500	500	500	500	500
EF2	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
ED1	500	500	500	250	500	250	500	250	250	500	500	500	500	500	500
ED2	500	500	500	500	500	250	500	500	250	500	500	500	500	500	500
LLL	500	500	250	500	500	250	500	500	250	500	500	500	500	500	500
LLLD	500	500	500	500	500	500	500	500	250	500	500	500	500	500	500
LLC	500	500	250	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
LP	-	-	500	500	-	500	-	-	500	-	-	-	-	-	-
LB1	-	-	-	-	-	500	-	-	500	-	-	-	-	-	-
LB2	-	-	500	500	-	500	-	-	500	-	-	-	-	-	-

Legenda: MO–mikroorganismus, SA1–*Staphylococcus aureus* CCM 3953, SA2–*Staphylococcus aureus* CCM 2020, EF1–*Enterococcus faecalis* CCM 2665, EF2–*Enterococcus faecalis* CCM 4224, ED1–*Enterococcus durans* CCDM 437, ED2–*Enterococcus durans* CCDM 53, LLL–*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004, LLLD–*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 141, LLC–*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, LP–*Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 2-94, LP1–*Levilactobacillus brevis* RIBM 2-98, LB2–*Levilactobacillus brevis* RIBM 2-111

8 DISKUZE

Z dostupných literárních zdrojů bylo patrné, že je problematice antimikrobního účinku medů a jejich antioxidační kapacity věnována zvýšená pozornost.

V posledních letech se zájem o med zvýšil a zaměřil se na jeho bioaktivní sloučeniny a přínosy pro zdraví, včetně antioxidačních, protizánětlivých a antimikrobních účinků. Z těchto vlastností byla zvláštní pozornost věnována zejména jeho antioxidačnímu a antimikrobnímu potenciálu. Jeho antioxidační aktivita silně souvisí s přítomností sloučenin s redukčními anebo vychytávacími vlastnostmi, jako jsou fenolové sloučeniny a minerální látky. Naproti tomu jeho antimikrobní aktivita byla přičítána některým specifickým vlastnostem, jako je kyselost, osmolalita, tvorba peroxidu vodíku a přítomnost fenolových sloučenin, které jsou schopné inhibovat růst bakterií [39].

Skutečná kvalita medu je spojena s přítomností, rozmanitostí a množstvím jeho bioaktivních sloučenin, což opět závisí na geografické a botanické struktuře regionu, ve kterém se vyrábí. Studie ukazují, že velká většina bioaktivních sloučenin v medu se skládá z molekul s fenolovými strukturami, jako jsou fenolové kyseliny, flavonoidy, prokyanidiny a antokyany. Fenolové sloučeniny jsou hlavní funkční složkou medu a mohou významně přispívat k jeho celkové antioxidační aktivitě a blahodárným účinkům na lidské zdraví. Jednou z potenciálních výhod flavonoidů je stabilizace buněčných membrán snížením lipoperoxidace a vychytávání volných radikálů. Ve skutečnosti se určité flavonoidy mohou zabudovat do hydrofobního jádra membránové dvojvrstvy, což způsobí snížení propustnosti membrány a její stability. Tato snížená propustnost membrány může omezit difúzi volných radikálů a zlepšit antioxidační účinnost flavonoidů [40, 41].

Studie na zvířatech i klinické studie v různých částech světa přinášejí velmi slibné výsledky týkající se léčivého potenciálu medu. Například se svou vysokou antimikrobní aktivitou se novozélandský med Manuka používá při léčbě ran a popálenin. Podobně jako u medu Manuka, je také známo, že jiné medy, jako jsou Tualang a Gelam, mají vysokou úroveň biologické aktivity a mají potenciál pro použití v apiterapii. Mnoho studií naznačuje, že antioxidační a antimikrobní účinky vzorků medů korelují s celkovým obsahem fenolu a barevnými pigmenty ve vzorcích [40].

Cílem tohoto experimentu diplomové práce bylo stanovení antioxidační aktivity různých vzorků medů a následné ověření jejich antimikrobního účinku na vybrané

grampozitivní bakterie. Pro stanovení antioxidační aktivity byly použity hned tři různé metody.

První použitou metodou byla metoda ABTS⁺, která je založena na reakci přenosu elektronů, při které se hodnotí schopnost vzorku zhášet kation-radikál ABTS⁺. Škrovánková a kol. ve své studii [42] stanovovali antioxidační aktivitu u 11 vzorků různých druhů medů z České a Slovenské republiky pomocí metody ABTS. Hodnoty antioxidační aktivity v této studii se pohybovaly v rozmezí od 155 $\mu\text{g TE/g}$ do 896 $\mu\text{g TE/g}$. Nejvyšší hodnoty vykazovaly tmavé medovicové medy (592–896 $\mu\text{g TE/g}$), následované vícekvěťmi (66,0 $\mu\text{g TE/g}$) a lesním medem (56,0 $\mu\text{g TE/g}$), pak medy květové (33,0–49,2 $\mu\text{g TE/g}$) a nejnižší hodnoty pro řepkový (19,0 $\mu\text{g TE/g}$) a akátový med (15,5 $\mu\text{g TE/g}$).

V další studii Lachman a kol. [43] rovněž stanovovali antioxidační aktivitu až u 40 vzorků různých druhů medu pomocí metody ABTS. Hodnoty antioxidační aktivity v této studii se pohybovaly v rozmezí od 431 $\mu\text{g TE/g}$ do 102,6 $\mu\text{g TE/g}$. Nejvyšší hodnoty opět vykazovaly tmavé medovicové medy, a naopak nízké hodnoty byly u světlých květových medů. Hodnoty antioxidační aktivity stanovované pomocí metody ABTS v našich vzorcích medů byly v rozmezí od 450,8 $\mu\text{g TE/g}$ do 996,9 $\mu\text{g TE/g}$. Stejně jako v těchto dvou studiích vykazovaly testované tmavé medy nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity a u světlých medů byly hodnoty nejnižší.

Druhou použitou metodou byla metoda DPPH, která je založena na redukci radikálu DPPH. Škrovánková a kol. ve své studii [42] stanovovali antioxidační aktivitu u 11 vzorků různých druhů medu rovněž i pomocí metody DPPH. Antioxidační aktivita se při použití této metody pohybovala od 113 $\mu\text{g KA/g}$ do 1187 $\mu\text{g KA/g}$. Nejvyšší hodnoty byly opět u tmavých medovicových medů (73,1–118,7 $\mu\text{g KA/g}$), následované vícekvěťmi (56,7 $\mu\text{g TE/g}$) a medem lesním (49,1 $\mu\text{g KA/g}$), pak květovými medy (27,8–38,7 $\mu\text{g KA/g}$) a nejnižší hodnoty pro řepkový (28,1 $\mu\text{g KA/g}$) a akátový med (11,3 $\mu\text{g KA/g}$).

Kromě toho i Lachman a kol. [43] stanovovali antioxidační aktivitu pomocí metody redukce DPPH. Hodnoty antioxidační aktivity se pohybovaly v rozmezí od 109 $\mu\text{g KA/g}$ do 442 $\mu\text{g KA/g}$. Hodnoty antioxidační aktivity stanovované pomocí metody DPPH v našich vzorcích medů byly v rozmezí od 233,9 $\mu\text{g KA/g}$ do 827,7 $\mu\text{g KA/g}$.

Poslední použitou metodou bylo stanovení celkového obsahu polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteu činidla, kdy jsou fenolové látky v kyselém prostředí oxidovány. Ve studii od Zehra a kol. [44] byla stanovována antioxidační aktivita u 62 vzorků medů pomocí této

metody. Hladiny celkového obsahu polyfenolů v medu se pohybovaly mezi 160,2 a 1200,4 $\mu\text{g KG/g}$. Další studie od Bobiş [45] uvádí hladiny celkového obsahu polyfenolů mezi 736,6 $\mu\text{g KG/g}$ a 1273,5 $\mu\text{g KG/g}$ u medovicových medů shromážděných z různých oblastí Rumunska. González a kol. [46] ve své studii stanovovali celkový obsah polyfenolů u 8 různých medů ze španělské oblasti Castilla-León nacházející se na severní Pyrenejské plošině, kde byl v roce 2018 nejvyšší počet včelařských podniků ve Španělsku, což představuje 16 % z celkového počtu včelařských podniků této země. Jejich hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 357,2 $\mu\text{g KG/g}$ do 1209,0 $\mu\text{g KG/g}$.

Neupane a kol. [47] stanovovali antioxidační aktivitu až u 90 vzorků různých druhů květových medů ze západní části Nepálu, v této studii použili modifikovaný postup s Folin-Ciocalteuovým činidlem pro stanovení celkového obsahu polyfenolů. Celkový obsah fenolových sloučenin v medech byl v rozmezí od 419,0 $\mu\text{g KG/g}$ do 1,548,7 $\mu\text{g KG/g}$. Také ve výzkumu od Škrovánkové a kol. [43] byl stanovován celkový obsah polyfenolů ve vzorcích medu. Hladina polyfenolů se v tomto výzkumu pohybovala od 540 $\mu\text{g KG/g}$ do 2542 $\mu\text{g KG/g}$. Hodnoty celkového obsahu polyfenolů u vzorků medů v naší práci se pohybovala od 508,6 $\mu\text{g KG/g}$ do 963,7 $\mu\text{g KG/g}$. Nižší hodnoty byly opět stanoveny u světlých medů. Vzhledem k odlišným metodám stanovení a tím nesrovnatelným hodnotám udávaným pro antioxidační kapacitu ve spoustě vědeckých prací nelze ve většině případů porovnat naše výsledky s výsledky jiných autorů.

Druhá část diplomové práce se zabývala stanovením antimikrobního účinku medů na vybrané grampozitivní bakterie. Pro testování citlivosti mikroorganismů existují dvě metody, difúzní a diluční. V tomto experimentu jsme použili mikrodiluční metodu a výsledky byly prezentovány jako MIC.

První testovanou skupinou mikroorganismů byl rod *Staphylococcus*. Ve studii od Moghadam a Khaledi [48], která stanovovala MIC a minimální baktericidní koncentraci u 6 vzorků iránského medu ve srovnání s medem Manuka proti referenčním kmenům, byl i kmen *Staphylococcus aureus*. Všechny vybrané vzorky medů a medu Manuka měly inhibiční vlastnosti a baktericidní aktivitu (kromě vzorku F medu – 12,5 hm. %) proti referenčnímu kmenu *S. aureus* ve 25 hm. % ředění. Rovněž ve studii od Vicá a kol. [49] byla zkoumána antimikrobní aktivita 10 vzorků medů z rumunské Transylvánie na kmen *Staphylococcus aureus*. Ačkoliv v této studii byla použita difúzní metoda, tak nejcitlivější na aktivitu vzorků medu byl kmen *S. aureus* (největší inhibiční zóna 18 mm). V našem experimentu rovněž byl

nejcitlivějším kmenem *Staphylococcus aureus*, který byl jediným kmenem, u něhož došlo k inhibici růstu již při koncentraci 125 µg/ml.

S. aureus způsobuje kožní infekce, u pacientů mohou způsobovat i další závažnější infekce, včetně bakteriémie nebo sepse, pneumonie, endokarditidy, osteomyelitidy. Přestože se med dlouhodobě používá jako lék na rány a pro své antiinfekční vlastnosti, stále se z velké části používají moderní produkty a léčba antibiotiky. Výskyt kmenů rezistentních vůči antibiotikům antibiotickou léčbu ztížil, což vedlo k přeorientování na staré léky. Kmeny rezistentní na antibiotika, jako jsou meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus* rezistentní na vankomycin, mají stejnou citlivost na med jako kmeny stejného druhu citlivé na antibiotika [50].

S. aureus byl použit v různých experimentech studujících antimikrobní vlastnosti medu a bylo experimentálně prokázáno, že med produkuje velké inhibiční zóny proti této bakterii. Med produkuje mnohem větší inhibiční zóny proti *S. aureus*, než jsou zóny dané sulfacetamidovými antibiotiky [51]. Výsledky mnoha studií *in vitro* a *in vivo* [52] potvrdily vysoký antimikrobní potenciál medu, ale i dalších včelích produktů, zejména propolisu, proti některým důležitým patogenům. Vysoká aktivita propolisu ze Středního východu byla zjištěna jak ve vztahu ke grampozitivním (*S. aureus*) tak i gramnegativním (*E. coli*) kmenům.

Další sledovanou skupinou mikroorganismů byly kmeny rodů *Enterococcus* a *Lactococcus*, které bychom mohli zařadit mezi mírně odolné bakterie vůči inhibičnímu účinkům medu. Leyva-Jimenez a kol. [53] ve svém výzkumu testovali antimikrobní aktivitu 33 fenolových extraktů medu proti grampozitivním a gramnegativním kmenům. Cílem této studie bylo poskytnout lepší pochopení vztahu mezi medovými fenolovými sloučeninami a antimikrobní aktivitou. Kmeny bakterií vykazovaly různé rezistentní potence: *Pseudomonas aeruginosa* byl nejodolnější kmen následovaný *Enterococcus faecalis*, *S. aureus* a *Escherichia coli*. Pokud jde o účinek těchto frakcí izolátu, výsledky ukázaly, že většina fenolových extraktů vykazovala hodnoty MIC stejné nebo vyšší než celý med. Pokud jde o *E. faecalis*, fenolové extrakty dvou vzorků vykazovaly inhibici růstu při koncentraci 50 %, zatímco pro dosažení stejné antimikrobní aktivity bylo zapotřebí koncentrací až 100 % celého medu.

Vědecké studie se zabývají zejména antimikrobním účinkem medů na patogenní mikroorganismy, než na bakterie mléčného kvašení jako jsou *Lactococcus* a *Lactobacillus*. Úl včely je stanovištěm řady mikrobusů, včetně mnoha bakterií mléčného kvašení. Například ve studii Aween a kol. [54] bylo izolováno až 32 druhů bakterií mléčného kvašení ze třinácti vzorků medu. Autoři tvrdí, že přítomnost různých druhů těchto bakterií může mít rovněž vliv na různorodý antimikrobní účinek medu.

Antimikrobní vlastnosti medu lze připsat individuálním nebo synergickým účinkům vysoké osmolarity cukru [55], enzymatické tvorbě peroxidu vodíku [56] nebo přítomnosti dalších vedlejších látek [57]. Několik autorů skutečně uvedlo antimikrobní účinek celého medu a jednotlivých sloučenin pomocí dostupných komerčních standardů [58]. Neexistují však studie, ve kterých by se tato prospěšná vlastnost hodnotila jak u celých medů, tak u izolovaných minoritních sloučenin, aby se sama stanovila antimikrobní aktivita fenolové frakce.

I když testované medy vykazují antimikrobní účinek, mnoho studií prokázalo, že ne všechny vzorky medů mají stejný stupeň antimikrobní aktivity. Citlivost našich grampozitivních bakterií proto nelze srovnávat pomocí výsledků z různých studií, protože med použitý ve studiích mohl mít velmi odlišnou antimikrobní aktivitu. Na základě našeho experimentu a mnoha studií můžeme říci, že zkoumání antimikrobní aktivity a s ní související fenolové složení má slibnou budoucnost a velký potenciál pro využití v medicíně, zejména díky zvyšující se rezistenci mikroorganismů vůči antibiotikům.

Rovněž jsme z našich grafů mohli zpozorovat, že nízké koncentrace medových roztoků podporovaly růst bakterií. Med je totiž koncentrovaný roztok cukrů, kdy tedy slouží jako zdroj energie nejen pro člověka, ale rovněž i pro mikroorganismy. Proto, když dojde ke zředění vzorku medu, nemusí být koncentrace cukrů v roztoku již dostatečná pro inhibici růstu mikroorganismů, a naopak přítomnost glukózy a fruktózy využijí ve svůj prospěch.

ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá antioxidačními a antimikrobními vlastnostmi medu. Cílem praktické části bylo stanovení antioxidační aktivity u 15 vzorků medů pomocí různých metod. Součástí také bylo ověření antimikrobních vlastností těchto 15 vzorků medů na vybrané grampozitivní bakterie. Na základě získaných výsledků můžeme říci, že:

- nejvyšší hodnoty celkové antioxidační aktivity měl vzorek medu č. 7, který pocházel ze Slovenské republiky – Salaš, Nimnica,
- nejnižší hodnoty celkové antioxidační aktivity měly komerční vzorky medu č. 12 a 13, které byly zakoupeny v obchodním řetězci a jsou původem z Řecka a Německa,
- nejodolnějším mikroorganizmem byl *Levilactobacillus brevis* RIBM 2-98, kdy pouze dva vzorky medů dokázaly při jejich nejvyšší koncentraci (500 µg/ml) zastavit množení bakterie,
- naopak nejcitlivějším mikroorganizmem byl *Staphylococcus aureus* CCM 3953, kdy sedm vzorků medů dokázalo inhibovat růst bakterie již při koncentraci 125 µg/ml,
- u všech vzorků medů, byla potvrzena antimikrobní aktivita,
- nízké koncentrace medu mohou podpořit růst mikroorganismů,
- nejsilnější antimikrobní účinek na vybrané grampozitivní bakterie, vykazovaly medy č. 6 a č. 9, které dokázaly inhibovat růst všech mikroorganismů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PŘIDAL, Antonín. *Včelí produkty*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 8071577170.
- [2] KHALIL, M. I., S. A. SULAIMAN a L. BOUKRAA. Antioxidant Properties of Honey and Its Role in Preventing Health Disorder. *The Open Nutraceuticals Journal* [online]. 2010, 3(1), 6-16 [cit. 2020-11-02]. ISSN 18763960. Dostupné z: doi:10.2174/18763960010030100006
- [3] 76/2003 Sb. Vyhláška, kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi.... *Zákony pro lidi – Sbírka zákonů ČR v aktuálním konsolidovaném znění* [online]. Copyright © [cit. 2.11.2020]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-76/zneni-20150624>
- [4] VESELÝ, Vladimír. *Včelařství*. Praha: Brázda, 2003. ISBN 80–209–0320–8.
- [5] KAMLER, František, Dalibor TITĚRA a Vladimír VESELÝ. *Získávání a zpracování včelích produktů*. V Praze: Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR, 1999. Živočišná výroba (Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR). ISBN 80–7105–196–9.
- [6] TITĚRA, Dalibor. *Včelí produkty mýtů zbavené: med, vosk, pyl, mateří kašička, propolis, včelí jed*. Praha: Ve spolupráci s Českým svazem včelařů vyd. nakl. Brázda, 2006. ISBN 80–209–0347–x.
- [7] HARAGSIM, Oldřich. *Medovice a včely*. Praha: Ve spolupráci s Českým svazem včelařů vydalo nakl. Brázda, 2005. ISBN 80–209–0332–1.
- [8] HAJDUŠKOVÁ, J. *Včelí produkty očima lékaře*. 2. vyd. Praha: Český svaz včelařů, 2006. 50 s. ISBN 80-903309-2-4
- [9] Evropský trh s medem (infografika) | Zpravodajství | Evropský parlament. [online]. 2018. Dostupné z: <https://www.europarl.europa.eu/news/cs/headlines/economy/20180222STO98435/evropsky-trh-s-medem-infografika>
- [10] MINISTERSTVO ZEMĚDELSTVÍ (2019): *Situační a výhledová zpráva – včely*. MZe, Praha, 29 s. ISBN 978-80-7434-538-8. ISSN 1211-7692.

- [11] MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* [online]. 1995, **26**(2), 83-99 [cit. 2020-11-03]. ISSN 0044-8435. Dostupné z: doi:10.1051/apido:19950202
- [12] VIUDA-MARTOS, M., Y. RUIZ-NAVAJAS, J. FERNÁNDEZ-LÓPEZ a J.A. PÉREZ-ÁLVAREZ. Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *Journal of Food Science* [online]. 2008, **73**(9), R117-R124 [cit. 2020-11-03]. ISSN 00221147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x
- [13] PŘIDAL, Antonín. *Včelí produkty – cvičení*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 80-7157-711-1.
- [14] SABATINI, AG, MARCAZZAN, GL, CABONI, MF. Quality and standardisation of royal jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 1(1): 1-6 (2009). Dostupné z: doi:10.3896/IBRA.4.1.01.04.
- [15] KOMOSINSKA-VASSEV, Katarzyna, Pawel OLCZYK, Justyna KAŹMIERCZAK, Lukasz MENCNER a Krystyna OLCZYK. Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2015, **2015**, 1-6 [cit. 2020-11-03]. ISSN 1741-427X. Dostupné z: doi:10.1155/2015/297425
- [16] *Moderní včelař: nový včelařský časopis*. Rakvice: Vlastimil Protivínský, 2004-. ISSN 1214-5793.
- [17] ALI, MAASM. Studies on bee venom and its medical uses. *Int J Adv Res Technol*, 2012, 1.2: 69-83.
- [18] SOCARRAS, Kayla M., et al. Antimicrobial activity of bee venom and melittin against *Borrelia burgdorferi*. *Antibiotics*, 2017, 6.4: 31.
- [19] MACHADO DE-MELO, Adriane Alexandre, Ligia Bicudo de ALMEIDA-MURADIAN, María Teresa SANCHO a Ana PASCUAL-MATÉ. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research* [online]. 2018, **57**(1), 5-37 [cit. 2021-01-27]. ISSN 0021-8839. Dostupné z: doi:10.1080/00218839.2017.1338444
- [20] DA SILVA, Priscila Missio, Cony GAUCHE, Luciano Valdemiro GONZAGA, Ana Carolina Oliveira COSTA a Roseane FETT. Honey: Chemical composition, stability

- and authenticity. *Food Chemistry* [online]. 2016, **196**, 309-323 [cit. 2021-01-27]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.051
- [21] Bogdanov S. Honey Composition. In: Book of Honey, Chapter 5. *Bee Product Science* [online]. 2009
- [22] CHUA, Lee Suan, Jun You LEE a Giek Far CHAN. Honey protein extraction and determination by mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2013, **405**(10), 3063-3074 [cit. 2021-01-28]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-012-6630-2
- [23] FRANK, Renate. *Zázračný med*. [Líbeznice]: Víkend, 2010. ISBN 978-80-7433-024-7.
- [24] IGLESIAS, M. Teresa, Pedro J. MARTÍN-ÁLVAREZ, M. Carmen POLO, Cristina DE LORENZO, Montserrat GONZÁLEZ a Encarnación PUEYO. Changes in the Free Amino Acid Contents of Honeys During Storage at Ambient Temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2006, **54**(24), 9099-9104 [cit. 2021-01-28]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf061712x
- [25] ROBINSON, Peter K. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry* [online]. 2015, **59**, 1-41 [cit. 2021-01-28]. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:10.1042/bse0590001
- [26] MANNING, Rob. Fatty acids in pollen: a review of their importance for honey bees. *Bee World* [online]. 2015, **82**(2), 60-75 [cit. 2021-01-30]. ISSN 0005-772X. Dostupné z: doi:10.1080/0005772X.2001.11099504
- [27] GEANĂ, Elisabeta-Irina, Corina Teodora CIUCURE, Diana COSTINEL a Roxana Elena IONETE. Evaluation of honey in terms of quality and authenticity based on the general physicochemical pattern, major sugar composition and $\delta^{13}\text{C}$ signature. *Food Control* [online]. 2020, **109** [cit. 2021-01-30]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2019.106919
- [28] KEKE, Anete a Ingmars CINKMANIS. *Determination of organic acids in honey samples from Latvian market by high-performance liquid chromatography* [online]. In: 2019, s. 229-233 [cit. 2021-01-30]. Dostupné z: doi:10.22616/rrd.25.2019.034
- [29] CIANCIOSI, Danila, Tamara FORBES-HERNÁNDEZ, Sadia AFRIN, et al. Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A

- Review. *Molecules* [online]. 2018, **23**(9) [cit. 2021-02-01]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23092322
- [30] ČERMÁKOVÁ, Tatiana, Róbert CHLEBO a Milena HUSÁRIKOVÁ. *Kniha o medu: historie, léčitelství, kosmetika, gastronomie, tradice, produkty*. Bratislava: Eastone, 2010, 278 s. ISBN 9788081091322.
- [31] SOLAYMAN, Md., Md. Asiful ISLAM, Sudip PAUL, Yousuf ALI, Md. Ibrahim KHALIL, Nadia ALAM a Siew Hua GAN. Physicochemical Properties, Minerals, Trace Elements, and Heavy Metals in Honey of Different Origins: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2016, **15**(1), 219-233 [cit. 2021-02-01]. ISSN 15414337. Dostupné z: doi:10.1111/1541-4337.12182
- [32] BASUMALLICK, Lipika; ROHRER, Jeff. Determination of hydroxymethylfurfural in honey and biomass. *Thermo Scientific Dionex Application Note Update*, 2016, 270: 1-6.
- [33] FRINK, Lillian A.; ARMSTRONG, Daniel W. The utilisation of two detectors for the determination of water in honey using headspace gas chromatography. *Food chemistry*, 2016, 205: 23-27.
- [34] KWAKMAN, Paulus H. S. a Sebastian A. J. ZAAT. Antibacterial components of honey. *IUBMB Life* [online]. 2012, **64**(1), 48-55 [cit. 2021-02-17]. ISSN 15216543. Dostupné z: doi:10.1002/iub.578
- [35] DŽUGAN, Małgorzata, Monika TOMCZYK, Patrycja SOWA a Dorota GRABEK-LEJKO. Antioxidant Activity as Biomarker of Honey Variety. *Molecules* [online]. 2018, **23**(8) [cit. 2021-02-17]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23082069
- [36] BRUDZYNSKI, Katrina, Kamal ABUBAKER, Martin LAURENT a Alan CASTLE. Re-Examining the Role of Hydrogen Peroxide in Bacteriostatic and Bactericidal Activities of Honey. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2011, **2** [cit. 2021-02-17]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2011.00213
- [37] MARTINELLO, Marianna a Franco MUTINELLI. Antioxidant Activity in Bee Products: A Review. *Antioxidants* [online]. 2021, **10**(1) [cit. 2021-02-18]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox10010071

- [38] CHUA, Lee Suan, Norul Liza A. RAHAMAN, Nur Ardawati ADNAN a Ti Tjih EDDIE TAN. Antioxidant Activity of Three Honey Samples in relation with Their Biochemical Components. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* [online]. 2013, **2013**, 1-8 [cit. 2021-02-18]. ISSN 2090-8865. Dostupné z: doi:10.1155/2013/313798
- [39] AZEVEDO, Mônia Stremel, Siluana Katia Tischer SERAGLIO, Greici BERGAMO, et al. Physicochemical properties and biological activities of bracatinga honeydew honey from different geographical locations. *Journal of Food Science and Technology* [online]. [cit. 2021-04-02]. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-020-04937-x
- [40] CAN, Zehra, Oktay YILDIZ, Huseyin SAHIN, Emine AKYUZ TURUMTAY, Sibel SILICI a Sevgi KOLAYLI. An investigation of Turkish honeys: Their physicochemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chemistry* [online]. 2015, **180**, 133-141 [cit. 2021-04-02]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.024
- [41] ALVAREZ-SUAREZ, José M., Francesca GIAMPIERI, Ana M. GONZÁLEZ-PARAMÁS, et al. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2012, **50**(5), 1508-1516 [cit. 2021-04-02]. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2012.01.042
- [42] ŠKROVÁNKOVÁ, Soňa, Lukáš SNOPEK, Jiří MLČEK a Eva VOLAŘÍKOVÁ. Bioactive compounds evaluation in different types of Czech and Slovak honeys. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences* [online]. 2019, **13**(1), 94-99 [cit. 2021-04-02]. ISSN 1337-0960. Dostupné z: doi:10.5219/1025
- [43] LACHMAN, Jaromír, Matyáš ORSÁK, Alena HEJTMÁNKOVÁ a Eva KOVÁŘOVÁ. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2010, **43**(1), 52-58 [cit. 2021-04-01]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2009.06.008
- [44] CAN, Zehra, Oktay YILDIZ, Huseyin SAHIN, Emine AKYUZ TURUMTAY, Sibel SILICI a Sevgi KOLAYLI. An investigation of Turkish honeys: Their physicochemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food*

- Chemistry* [online]. 2015, **180**, 133-141 [cit. 2021-04-02]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.024
- [45] BOBIȘ, Otilia, et al. Preliminary studies regarding antioxidant and antimicrobial capacity for different types of Romanian honeys. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 2011, 68.1-2: 91-97.
- [46] GONZÁLEZ-CEBALLOS, Lara, Maria del Mar CAVIA, Miguel A. FERNÁNDEZ-MUIÑO, et al. A simple one-pot determination of both total phenolic content and antioxidant activity of honey by polymer chemosensors. *Food Chemistry* [online]. 2021, **342** [cit. 2021-04-02]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2020.128300
- [47] NEUPANE, Bishnu, Komal MALLA, Atis KAUNDINNYAYANA, Prakash POUDEL, Rashmi THAPA a Sabina SHRESTHA. Antioxidant Properties of Honey from Different Altitudes of Nepal Himalayas. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* [online]. 2015, **65**(2), 87-91 [cit. 2021-04-02]. ISSN 1230-0322. Dostupné z: doi:10.1515/pjfn-2015-0024
- [48] MOGHADAM, Mohadese Naghadian a Elahe Mahmoodi KHALEDI. Antibacterial activity and mechanism of action of some Iranian honeys compared to manuka honey against multidrug-resistant respiratory and urinary infections. *Food Bioscience* [online]. 2021, **41** [cit. 2021-04-03]. ISSN 22124292. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbio.2021.101003
- [49] VICĂ, Mihaela Laura, Mirel GLEVITZKY, Delia Mirela TIT, et al. The antimicrobial activity of honey and propolis extracts from the central region of Romania. *Food Bioscience* [online]. 2021, **41** [cit. 2021-04-03]. ISSN 22124292. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbio.2021.101014
- [50] BOUKRAA, Laid a Siti SULAIMAN. Rediscovering the Antibiotics of the Hive. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* [online]. 2009, **4**(3), 206-213 [cit. 2021-04-03]. ISSN 1574891X. Dostupné z: doi:10.2174/157489109789318505
- [51] TAJIK, Hossien, et al. In vitro evaluation of antimicrobial efficacy of natural honey in comparison with sulfonamide derivatives. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2009, 8.1: 23-25.

- [52] SZWEDA, Piotr. Antimicrobial Activity of Honey. TOLEDO, Vagner de Alencar Arnaut de, ed. *Honey Analysis* [online]. InTech, 2017, 2017-03-15 [cit. 2021-04-03]. ISBN 978-953-51-2879-3. Dostupné z: doi:10.5772/67117
- [53] LEYVA-JIMENEZ, Francisco Javier, Jesus LOZANO-SANCHEZ, Isabel BORRAS-LINARES, María de la Luz CADIZ-GURREA a Elaheh MAHMOODI-KHALEDI. Potential antimicrobial activity of honey phenolic compounds against Gram positive and Gram negative bacteria. *LWT* [online]. 2019, **101**, 236-245 [cit. 2021-04-03]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2018.11.015
- [54] AWEEN, Mohamed Mustafa, Zaiton HASSAN, Belal J. MUHIALDIN, Yossra A. ELJAMEL, Asma Saleh W. AL-MABROK a Mohd Nizam LANI. Antibacterial Activity of Lactobacillus acidophilus Strains Isolated from Honey Marketed in Malaysia against Selected Multiple Antibiotic Resistant (MAR) Gram-Positive Bacteria. *Journal of Food Science* [online]. 2012, **77**(7), M364-M371 [cit. 2021-04-03]. ISSN 00221147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02776.x
- [55] KWAKMAN, Paulus H. S. a Sebastian A. J. ZAAT. Antibacterial components of honey. *IUBMB Life* [online]. 2012, **64**(1), 48-55 [cit. 2021-04-03]. ISSN 15216543. Dostupné z: doi:10.1002/iub.578
- [56] SOUSA, Janaína Maria, Evandro Leite DE SOUZA, Gilmares MARQUES, Bruno MEIRELES, Ângela Tribuzy DE MAGALHÃES CORDEIRO, Beatriz GULLÓN, Maria Manuela PINTADO a Marciane MAGNANI. Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by Meliponini in the Brazilian semiarid region. *Food Research International* [online]. 2016, **84**, 61-68 [cit. 2021-04-03]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2016.03.012
- [57] GÜNEŞ, Mesut Ertan, Saliha ŞAHIN, Cevdet DEMIR, Ebru BORUM a Aycan TOSUNOĞLU. Determination of phenolic compounds profile in chestnut and floral honeys and their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Food Biochemistry* [online]. 2017, **41**(3) [cit. 2021-04-03]. ISSN 01458884. Dostupné z: doi:10.1111/jfbc.12345
- [58] ALVAREZ-SUAREZ, Jose M., Sara TULIPANI, Daimy DÍAZ, et al. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical*

Toxicology [online]. 2010, **48**(8-9), 2490-2499 [cit. 2021-04-03]. ISSN 02786915.
Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2010.06.021

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABTS	2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
a_w	aktivita vody
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
HMF	hydroxymethylfurfural
KA	kyselina askorbová
KG	kyselina gallová
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MH	Mueller-Hinton
p	tlak vodní páry potraviny
p_0	tlak vodní páry čisté vody
TE	Trolox
TEAC	Troloxu ekvivalentní antioxidační kapacita
$[\alpha]_{D20}$	specifická otáčivost
\pm S.D.	směrodatná odchylka

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Základní struktura flavonoidů [29]	27
Obrázek 2 Vzorky testovaných medů	46
Obrázek 3 Kalibrační křivka standartu Troloxu	54
Obrázek 4 Kalibrační křivka standartu kyseliny askorbové	56
Obrázek 5 Kalibrační křivka standartu kyseliny gallové	58
Obrázek 6 Celkový obsah polyfenolů v testovaných vzorcích medů	59
Obrázek 7 Porovnání antioxidační aktivity metodou ABTS a DPPH	60
Obrázek 8 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	61
Obrázek 9 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	62
Obrázek 10 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2020	63
Obrázek 11 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2020	64
Obrázek 12 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2665	65
Obrázek 13 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2665	66
Obrázek 14 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	67
Obrázek 15 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	68
Obrázek 16 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst <i>Enterococcus durans</i> CCDM 437	69
Obrázek 17 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst <i>Enterococcus durans</i> CCDM 437	70
Obrázek 18 Vliv vzorků č. 1–10 medů na růst <i>Enterococcus durans</i> CCDM 53	71
Obrázek 19 Vliv vzorků č. 11–15 medů na růst <i>Enterococcus durans</i> CCDM 53	72
Obrázek 20 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004	73
Obrázek 21 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004	74
Obrázek 22 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CCDM 141	75
Obrázek 23 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CCDM 141	76
Obrázek 24 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824	77
Obrázek 25 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824	78
Obrázek 26 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RIBM 2-94	79
Obrázek 27 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RIBM 2-94	80
Obrázek 28 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst <i>Levilactobacillus brevis</i> RIBM 2-98	81
Obrázek 29 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst <i>Levilactobacillus brevis</i> RIBM 2-98	82

Obrázek 30 Vliv vzorků medů č. 1–10 na růst <i>Levilactobacillus brevis</i> RIBM 2-111	83
Obrázek 31 Vliv vzorků medů č. 11–15 na růst <i>Levilactobacillus brevis</i> RIBM 2-111	84

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Vývoz přírodního medu a včelího vosku z ČR v tunách v letech 2013–2018 [10]	18
Tabulka 2 Dovoz přírodního medu a včelího vosku do ČR v tunách v letech 2013–2018 [10]	18
Tabulka 3 Průměrný obsah některých minerálních látek světlých a tmavých medů [23] ...	29
Tabulka 4 Lokalita úlu přiřazena k číslu vzorku	45
Tabulka 5 Složení Mueller-Hinton Broth	47
Tabulka 6 Složení M17 Broth.....	47
Tabulka 7 Schéma mikrotitrační destičky	53
Tabulka 8 Antioxidační aktivita medů – metoda ABTS.....	55
Tabulka 9 Antioxidační aktivita medů – metoda DPPH.....	57
Tabulka 10 Minimální inhibiční koncentrace medů	85