

# **Vliv vybraných esenciálních olejů na bakterie s dekarboxylázovou aktivitou**

Bc. Edita Vavrečková

---

Diplomová práce  
2020

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Edita Vavrečková  
Osobní číslo: T170073  
Studijní program: N2901 Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Technologie potravin  
Forma studia: Kombinovaná  
Téma práce: Vliv vybraných esenciálních olejů na bakterie s dekarboxylázovou aktivitou

### Zásady pro vypracování

#### I. Teoretická část

1. Biogenní aminy – charakterizace, vlastnosti, výskyt v potravinách
2. Esenciální oleje – charakterizace, vlastnosti, využití v potravinách
3. Antimikrobní účinky esenciálních olejů

#### II. Praktická část

1. Stanovení minimální inhibiční koncentrace vybraných esenciálních olejů u gram pozitivních a gram negativních bakterií
2. Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů

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

**Seznam doporučené literatury:**

- [1] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009.
- [2] CALO, J.R., CRANDALL, P.G., O'BRYAN, C.A., RICKE, S.C. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. Food Control, 54: 111-119. 2015.
- [3] OZOGUL, F., KACAR, C., HAMED, I. Inhibition effects of carvacrol on biogenic amines formation by common food-borne pathogens in histidine decarboxylase broth. LWT-Food Science and Technology, 64: 50-55. 2015.
- [4] KRÍŽEK, M., DADÁKOVÁ, E., VÁCHA, F., PELIKÁNOVÁ, T., MATĚJKOVÁ, K. The effects of two essential oil and UV-light irradiation treatments on the formation of biogenic amines in vacuum packed fillets of carp (*Cyprinus carpio*). LWT-Food Science and Technology, 95: 268-273. 2018.
- [5] Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Pavel Pleva, PhD.**  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **17. února 2020**  
Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. RNDr. Iva Burešová, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2020

## 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 jens 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 je zaměřena na sledování antimikrobních účinků tymolu, karvakrolu, skořicového aldehydu, eugenolu a linaloolu na bakterie s dekarboxylázovou aktivitou. Tyto látky patří k významným funkčním složkám esenciálních olejů. Pomocí mikrodiluční metody byly stanovovány minimální inhibiční koncentrace bakterií rodu *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Proteus* a *Salmonella*, za použití funkčních složek esenciálních olejů o koncentraci 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 250 a 500 mg/l. Jako nejcitlivější byly stanoveny bakterie rodu *Lactococcus*, které vykazovaly výrazné potlačení růstu v prostředí antimikrobní látky, konkrétně skořicového aldehydu a tymolu již při koncentraci 6,25 mg/l. Minimální inhibiční koncentrace se pro sledované grampozitivní bakterie pohybovala v rozmezí koncentrací 250–500 mg/l. Gramnegativní bakterie rod *Proteus* a *Salmonella* byly citlivé pouze na testovaný skořicový aldehyd a karvakrol v koncentracích nad 500 mg/l. Testované funkční složky esenciálních olejů se osvědčily jako účinné antimikrobní látky.

Klíčová slova: esenciální oleje, dekarboxylázová aktivita, bakterie

## ABSTRACT

The diploma thesis is focused on monitoring of the antimicrobial effects of thymol, carvacrol, cinnamon aldehyde, eugenol and linalool on bacteria with decarboxylase activity. These substances belong to the important functional components of essential oils. The minimum inhibitory concentration of *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Proteus* and *Salmonella* were determined by the microdilution method, using the functional components of the essential oils at a concentration of 6.25; 12.5; 25; 50; 100; 250 to 500 mg / l. Bacteria of the genus *Lactococcus* were determined to be the most sensitive. They showed a significant suppression of growth in the environment of an antimicrobic substance, namely cinnamon aldehyde and thymol, even at a concentration of 6.25 mg / l. The minimum inhibitory concentration for the monitored gram-positive bacteria ranged from 250-500 mg / l. Gram-negative bacteria of the genus *Proteus* and *Salmonella* were sensitive only to the tested cinnamon aldehyde and carvacrol at concentration above 500 mg / l. The tested functional components of essential oils have proven to be effective antimicrobials.

Keywords: essential oils, decarboxylase activity, bacteria

## **Poděkování:**

Mé úpřímné poděkování patří vedoucímu diplomové práce Ing. Pavlu Plevovi, Ph.D za vedení, pomoc, cenné rady, ochotu při měření a zpracování. Dále bych chtěla poděkovat paní doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D za poskytnuté rady a laborantkám Ing. Veronice Kubačové a Ing. Olze Vlčkové za pomoc v laboratoři.

Poděkování patří také kolegům, přátelům a rodině za trpělivost a podporu po celou dobu mého studia.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 BIOGENNÍ AMINY</b> .....	<b>12</b>
1.1 CHARAKTERISTIKA A VLASTNOSTI BIOGENNÍCH AMINŮ .....	12
1.2 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ A JEJICH ÚČINKY NA LIDSKÝ ORGANISMUS .....	13
1.2.1 Histamin .....	13
1.2.2 Tyramin .....	14
1.2.3 Putrescin .....	14
1.2.4 Kadaverin .....	15
1.2.5 Tryptamin .....	15
1.3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITU .....	16
1.4 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH .....	17
1.4.1 Biogenní aminy v rostlinných nápojích .....	18
1.4.2 Biogenní aminy živočišných produktech .....	18
<b>2 ESENCIÁLNÍ OLEJE</b> .....	<b>21</b>
2.1 CHARAKTERISTIKA A VLASTNOSTI ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ .....	21
2.2 VYUŽITÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ V POTRAVINÁŘSTVÍ .....	23
2.3 ANTIMIKROBNÍ ÚČINKY ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ .....	28
<b>3 CHARAKTERISTIKA TESTOVANÝCH MIKROORGANISMŮ S DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITOU</b> .....	<b>30</b>
3.1 ROD <i>LACTOCOCCUS</i> .....	30
3.2 ROD <i>ENTEROCOCCUS</i> .....	31
3.3 ROD <i>SALMONELLA</i> .....	32
3.4 ROD <i>PROTEUS</i> .....	33
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>34</b>
<b>4 CÍL EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE</b> .....	<b>35</b>
<b>5 MATERIÁL A PŘÍSTROJE</b> .....	<b>36</b>
5.1 TESTOVANÉ MIKROORGANISMY .....	36
5.2 POUŽITÉ KULTIVAČNÍ PŮDY DLE ČSN EN ISO 11133 [87] .....	36
5.2.1 Kultivační půda M17 Brothpro zvolené bakteriální kmeny: .....	36
5.2.2 Kultivační půda NB – Nutrient Broth a PCA –Plate CountAgarpro zvolené bakteriální kmeny: .....	37
5.2.3 Funkční složky esenciálních olejů .....	38
5.3 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A POMŮCKY .....	38
<b>6 METODIKA</b> .....	<b>39</b>
6.1 STANOVENÍ MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE MIKRODILUČNÍ METODOU .....	39



<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>41</b>
7.1	VLIV AKTIVNÍCH SLOŽEK ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA BAKTERIE RODU <i>LACTOCOCCUS</i> .....	41
7.2	VLIV AKTIVNÍCH SLOŽEK ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA BAKTERIE RODU <i>ENTEROCOCCUS</i> .....	50
7.3	VLIV AKTIVNÍCH SLOŽEK ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA BAKTERIE RODU <i>SALMONELLA</i> .....	54
7.4	VLIV AKTIVNÍCH SLOŽEK ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA BAKTERIE RODU <i>PROTEUS</i> ....	56
<b>8</b>	<b>DISKUSE.....</b>	<b>57</b>
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>61</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>62</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>77</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>78</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>80</b>

## ÚVOD

Esenciální oleje z aromatických rostlin, nebo jen samotné druhy rostlin se využívají v potravinách, kosmetice, zemědělství již od pradávna. Využívají se převážně v podobě koření. Díky svým antioxidačním a antimikrobním vlastnostem je využití vázáno i v podobě konzervačních látek. Esenciální oleje neobsahují jen jednu látku, ale směs sloučenin, zejména aldehydů, aminů, alkoholů, esterů, epoxidů a terpenů, které jsou ochrannými složkami rostlin před vnější vlivy. K hlavním aktivním složkám esenciálních olejů převážně patří tymol, karvakrol, eugenol, cinnamaldehyd (skořicový aldehyd), linalool aj.

Mikrobiální bezpečnost potravin a bezpečnost pro spotřebitele je stále více diskutovaným tématem. I přes dodržování podmínek v oblasti hygieny výroby potravin, je bezpečnost potravin stále důležitou otázkou v rámci veřejného zdraví. Stále aktuálním a diskutovaným tématem je kontaminace způsobující alimentární infekce či výskyt biogenních aminů. S rostoucí poptávkou po minimálně zpracovaných potravinách, nahrazení používaných syntetických konzervačních látek látkami přírodního charakteru, jsou esenciální oleje stále důležitější vyvíjející se variantou. Ovšem k hlavním omezením v potravinách, je jejich charakteristická aroma doprovázející smyslové změny. K výhodám naopak patří jejich významné antibakteriální a antioxidační účinky, přírodní charakter, možné použití i pro biopotraviny. Nejnovější vývoj v používání esenciálních olejů v potravinářském průmyslu je zapouzdření, začlenění do aktivních obalů nebo jejich kombinace s jinými přírodními sloučeninami za účelem posílení konzervačního účinku a zajištění bezpečnosti potravin.

Biogenní aminy jsou v nízkých koncentracích přirozenou složkou většiny potravin. Z nejvýznamnějších biogenních aminů, které můžeme v potravinách zaznamenat, jsou histamin, tyramin, putrescin, kadaverin a agmatin. Ovšem množství vyskytující se v potravinách závisí na délce, způsobu skladování potravin, úpravě a vlastním složením. Příjem vysokých hodnot biogenních aminů spojených s konzumací potravin na ně bohatých, mohou mít za následek negativní dopad na lidské zdraví. Z tohoto důvodu je kladen důraz na prevenci, která vede k omezení nadměrné akumulace těchto látek v potravinách.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy (BA) jsou látky vznikající dekarboxylací volných mastných aminokyselin pomocí mikrobiálních dekarboxyláz specifických pro daný substrát. Nacházejí se v potravinách i v lidském organismu, jako běžné aktivní složky prekurzorů pro syntézu hormonů, proteinů, alkaloidů, nukleotidů, které zaujímají v organismu důležité fyziologické funkce. Histamin, putrescin, kadaverin, tryptofan, tyramin, spermin, spermidin a  $\beta$  – fenyletylamin spadají k nejdůležitějším BA nacházejících se v potravinách [1].

### 1.1 Charakteristika a vlastnosti biogenních aminů

Biogenní aminy řadíme mezi dusíkaté sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností a organickým charakterem bází. Jsou důležitými sloučeninami dusíku biologického významu v rostlinách, mikrobiálních a živočišných buňkách. Jsou syntetizovány živými organismy pro jejich vlastní potřebu. BA mohou mít svou chemickou strukturu alifatickou (kadaverin, putrescin, spermin a spermidin), aromatickou (tyramin, fenyletylamin) a heterocyklickou (histamin, tryptamin) [2]. Do další skupiny můžeme zařadit polyaminy. Polyaminy se vyznačují tím, že ve své molekule obsahují více než jednu  $-NH_2$  skupinu (agmatin, kadaverin, spermin, spermidin a putrescin).

Primární význam mají BA v potravinách a nápojích kam přecházejí prostřednictvím přísad, nebo vzniknou mikrobiální dekarboxylací. Při malých koncentracích a za normálních podmínek nejsou BA v potravinách či nápojích pro jedince toxické [3].

V těle je množství regulováno pomocí detoxikačního systému složeného z monoamin oxidáz, diamino oxidáz a histidin-methyl-transferáz. Monoaminoxidázy, též flavoproteiny katalyzují skupinu s obsahem dusíku z biogenních řad a monoaminů za vzniku aldehydů, peroxidu vodíku a amoniaku. Problém nastává při vysokém příjmu BA (nad 100mg/kg), nebo při absenci detoxikačního systému. Vysoký obsah BA poté může způsobit intoxikaci s následnými symptomy, mezi nimi můžeme zaznamenat návaly, bolesti hlavy, bušení srdce, zvýšený či snížený krevní tlak aj. Nejdůležitějšími BA, které se nacházejí v potravinách jsou histamin, putrescin, tyramin, fenyletylamin a kadaverin. Je známo, že BA působí jako prekurzory potencionálně karcinogenních nitrosaminů. Ty se mohou vytvářet při reakci sekundárního aminu s dusitanem [3, 4, 5].

## 1.2 Vznik biogenních aminů a jejich účinky na lidský organismus

Produkce biogenních aminů je spojována jak s grampozitivními, gramnegativními bakteriemi, tak i s kvasinkami. Potenciálními producenty biogenních aminů je několik druhů kvasinek – *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia jadinii* nebo *Geotrichum candidum* [4].

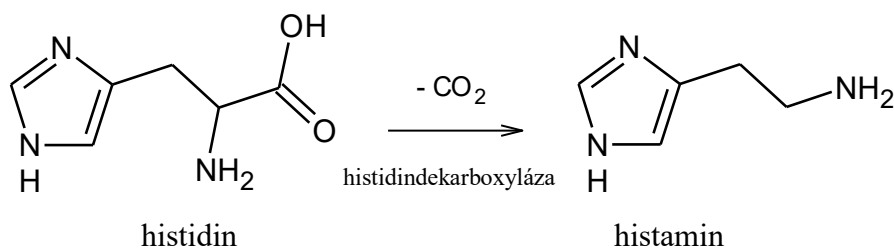
Ovšem převážná část biogenních aminů vzniká mikrobiální dekarboxylací aminokyselin za účasti enzymů, patřících do třídy lyáz nebo oxidoreduktáz, tzv: dekarboxyláz. Při dekarboxylaci dochází k odštěpování aminoskupiny a oxidu uhličitého z příslušného substrátu (karboxylové skupiny) za zvýšené teploty. Mezi další reakce doprovázející vznik biogenních aminů můžeme zařadit aminaci nebo transaminaci aldehydů a ketonů. BA jsou velmi stabilní sloučeniny, odolné vůči vysokým a dlouhodobým teplotám po vytvoření je tedy obtížné jejich [6, 7].

Pro tvorbu BA za pomoci mikroorganismů je důležitá dostupnost volných aminokyselin, přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou a vhodné podmínky umožňující růst daných mikroorganismů [7].

### 1.2.1 Histamin

Patří k nejvýznamnějším biogenním aminům. Vznik histaminu je ovlivněn dekarboxylací aminoskupiny z histidinu, za přítomnosti enzymu histidindekarboxylázy (Obrázek 1) [8].

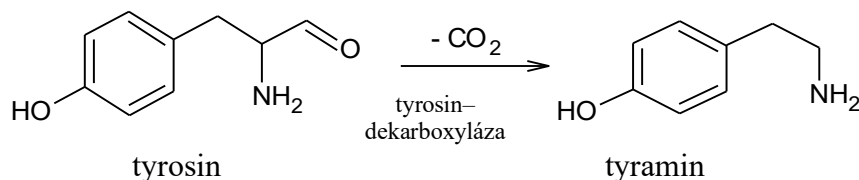
Ve významném množství se nachází u ryb z čeledi makrelovitých. K takovým rybám patří sledě, tuňáci, makrely. Otrava histaminem může nastat při konzumaci takovýchto potravin, pokud přijímané koncentrace přítomných BA budou vyšší než 500 ppm. Otrava se vyznačuje dýchacími potížemi, svěděním, zvracením, vyrážkou, horečkou a hypertenzí a reakcí alergenového typu. V malých množstvích ovšem působí tento amin jako hormon, neurotransmitter a nachází se téměř ve všech tkáních, kůži i krvinkách, kterými je navíc i nejvíce produkován, takže samotný histamin při nízké koncentraci nemůže způsobit toxicitu na nízké úrovni. Ovšem přítomností dalších biogenních aminů, převážně putrescinu (kapitola 1.2.3) a kadaverinu (kapitola 1.2.4), zvyšuje toxicitu histaminu [9, 10].



Obrázek 1: Schéma vzniku histaminu [8]

### 1.2.2 Tyramin

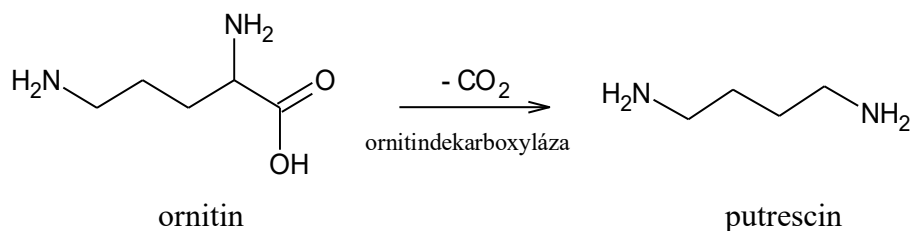
Tyramin a jeho účinky jsou známé pod pojmem sýrová reakce. Toxicita na tento amin byla pozorována již od počátků po konzumaci sýrů s vysokým obsahem BA, fermentovaných potravin a nápojů. Účinky a toxicita tyraminu se vyznačuje migrénou, nevolností, respiračními poruchami, zvýšenou hladinou glukózy v krvi a zvýšeným krevním tlakem, v důsledku něho může dojít k selhání srdce nebo krvácení do mozku. Kromě těchto účinků působí tyramin i na střevní mikrobiom a umožňuje přilnavost některých patogenů na střevní sliznici. Na tvorbě tyraminu se dekarboxylací tyrosinu (Obrázek 2) často podílejí bakterie *Lactobacillus* a *Enterococcus* [11].



Obrázek 2: Schéma vzniku tyraminu [12]

### 1.2.3 Putrescin

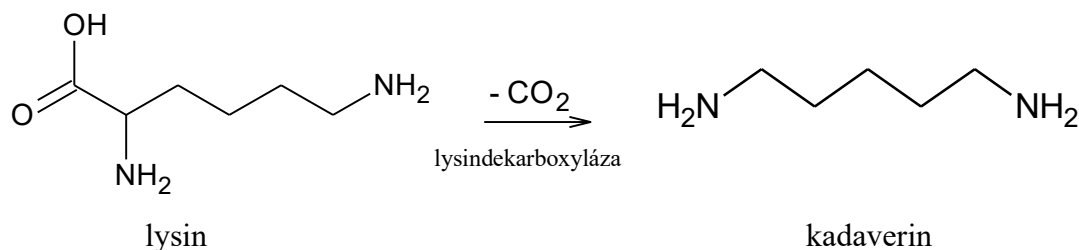
Putrescin patří k nejjednodušším polyamidům. V přirozeném množství působí jako růstový faktor podílející se na dělení buněk. Zdravými živými buňkami je putrescin v malém množství syntetizován působením ornitindekarboxylázy (Obrázek 3). S největší pravděpodobností má specifickou funkci i na roli fyziologii kůže. Vznik putrescinu je vázán na prekurzor lysin a ornitin. Tento biogenní amin je při vysokých koncentracích považován spolu s kadaverinem (kapitola 1.2.4) za indikátor rozkladu aminokyselin v živých i mrtvých organismech. Přítomnost putrescinu spolu s kadaverinem má do značné míry za následek zápach hnilobných rozkladů [13].



Obrázek 3: Schéma vzniku putrescinu [14]

#### 1.2.4 Kadaverin

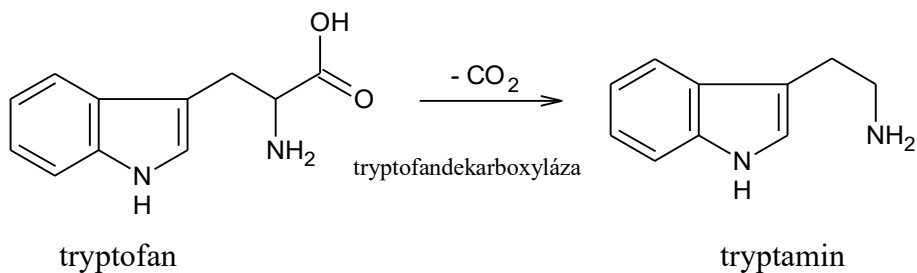
Kadaverin je přírodní polyamid podílející se na regulaci rostlinných procesů, jako je růst a vývoj rostlin, buněčná signalizace, ochrana proti hmyzu. Kadaverin hraje také důležitou roli v přežití buněk při kyselém pH a chrání buňky s nedostatkem anorganického fosfátu při anaerobních podmínkách. Vznik kadaverinu je vázán na prekurzor aminokyseliny lysin za účasti enzymu lysindekarboxylázy (Obrázek 4). K nejdůležitějším producentům tohoto biogenního aminu můžeme zařadit gramnegativní bakterie, především čeleď *Enterobacteriaceae*. Sám o sobě kadaverin nevykazuje vysokou toxicitu, ovšem v jeho přítomnosti se zvyšují toxické účinky jiných biogenních aminů [15].



Obrázek 4: Schéma vzniku kadaverinu [16]

#### 1.2.5 Tryptamin

Tryptamin patří mezi přírodní alkaloidy přirozeně se vyskytující v houbách. Vzniká dekarboxylací tryptofanu (Obrázek 5) za přítomnosti pyridoxalfosfátu a je následným předchůdcem neurotransmiteru, serotoninu, který působí na centrální nervový systém a GIT. Tryptamin můžeme najít v ovoci, zelenině, masu, sýrech, nápojích alkoholických i nealkoholických, čokoládě a v některých fermentovaných výrobcích [17, 18].



Obrázek 5: Schéma vzniku tryptaminu [19]

### 1.3 Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu

Bakterie, kvasinky a houby jsou nejčastějšími původci mikrobiální kontaminace potravinářských výrobků. Velká většina těchto mikroorganismů má za následek nežádoucí reakce zhoršující chuť, vůni, barvu a texturní vlastnosti. Růst mikroorganismů v potravinách je ovlivněn řadou vnitřních faktorů, jako je pH, aktivita vody a přítomnost kyslíku, tak i řadou faktorů vnějších, které jsou spojené s podmínkami skladování, včetně teploty, času a relativní vlhkosti [20].

V potravinách za určitých podmínek dochází ke vzniku biogenních aminů. Aby došlo k produkci BA v potravinách, jsou nezbytné následující podmínky:

Hlavní faktory ovlivňující vznik BA můžeme rozdělit do 3. skupin [20]:

- suroviny – složení, pH iontová síla aj.
- přítomnost dekarboxyláza aktivních mikroorganismů
- podmínky skladování a zpracování – čerstvá, fermentovaná, chlazená aj.

Tyto faktory působí kombinovaně a významně ovlivňují rychlost akumulace BA. Důležitým krokem je výběr vhodné, kvalitní vstupní suroviny k omezení přítomnosti BA v konečném produktu. Přítomnost zkvasitelných cukrů v rozmezí (0,5 – 2 %) podporuje intenzitu růstu mikroorganismů a tím i jejich dekarboxylázovou aktivitu. Při hodnotách větších jak 3 % dochází k inaktivaci mikroorganismů a jejich dekarboxylázové aktivity. Podobně tomu je i se zvyšující se koncentrací solí. Zejména u gramnegativních bakterií. Dalším důležitým faktorem je pH prostředí. V kyselém prostředí při hodnotách pH 4,5 je dekarboxylázová aktivita u většiny mikroorganismů nejvyšší. Bakterie v tomto prostředí produkují enzymy jako důsledek obranného mechanismu proti okyselení. Podmínky skladování finálních produktů jsou kritickými při tvorbě BA. Při nízkých mrazících teplotách dochází k inhibici mikroorganismů i biogenních aminů. Pokud jsou teploty



skladování vyšší než 5 °C, dochází k postupné produkci BA. Kyslík při skladování může výrazně ovlivnit produkci BA. Pokud se koncentrace kyslíku sníží, aplikací ochranné atmosféry nebo vakuového balení, zabrání se růst některých mikroorganismů, které mohou mít vliv na produkci BA [21, 22].

Kombinace těchto faktorů, spolu s aromatickými přísadami, zvyšuje překážkový systém v potravinách a z velké části snižuje množství mikroorganismů v dané potravine. Antibakteriální aktivita eugenolu, který se přirozeně nachází v hřebíčku, by při aplikaci na ryby, mohla mít pozitivní dopad na zabránění tvorby BA produkovaného bakterií *Enterobacter aerogenes*. Obecně se antimikrobní účinek esenciálních olejů zvyšuje se snižujícím se pH potraviny. To může být zapříčiněno tím, že v kyselém prostředí se hydrofobnost esenciálních olejů zvyšuje, což umožňuje v lipidech snadnější rozpouštění buněčné membrány daných mikroorganismů. U oregana a tymiánu se účinnost zvyšuje, zvýšením procenta cukrů na hodnotu 2,3 % [23].

#### 1.4 Výskyt biogenních aminů v potravinách

Tvorba biogenních aminů v potravinách a jejich zvyšující se obsah je úzce spjat s mikrobiální aktivitou a jejich množství lze použít jako možný ukazatel kažení nebo čerstvosti. V nízkých koncentracích se BA přirozeně vyskytují v čerstvých potravinách, ovšem vysoké koncentrace BA obsažených v potravinách můžou měnit chuť výrobku a mohou naznačovat problémy s bezpečností potravin. Nejčastějšími zástupci vyskytujících se v potravinách jsou tyramin a histamin, které se navíc považují za nejvíce nebezpečné. Při časté konzumaci potravin s vysokým obsahem těchto aminů může docházet k poškození nervového, kardiovaskulárního systému člověka [24]. Častý výskyt je především v potravinách získaných ze surovin s vysokým obsahem bílkovin (viz Tabulka 1). Mezi takové potraviny můžeme zařadit ryby, rybí výrobky, fermentované potraviny, jako jsou sýry, salámy, suché klobásy a mléčné výrobky. Z rostlinných produktů je důraz kladen na víno, pivo, ovoce, zeleninu a ořechy [25].

Přestože přítomnost BA v potravinách je častým tématem a představují pro lidské zdraví hrozby, jsou stanoveny maximální zákonné limity pouze pro některé. Legislativní limit pro histamin, který je dle Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (The European Food Safety Authority, EFSA) považovaný za jeden z nejvíce nebezpečných je stanoven maximální limit u ryb z čeledi makrelovitých 200 mg/kg a rybích produktů 400 mg/kg. Pro tyramin jsou navrženy pouze doporučené limity [26].

### 1.4.1 Biogenní aminy v rostlinných nápojích

BA jsou přirozeně přítomny ve všech druzích vín a jejich koncentrace se pohybuje od několika miligramů na litr až po 50 mg na litr. Variabilitu obsahu BA lze posoudit různými faktory, jako je obsah dusíku v hroznech, kvalita surovin, obsah aminokyselin v počáteční a konečné fázi alkoholového kvašení, doba kontaktu vína s kvasinkami nebo vinifikační proces. Z mikroorganismů se na produkci biogenních aminů podílejí *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Oneococcus*, který významně přispívá k celkovému množství BA [27, 28]. V pivu množství biogenních aminů závisí na kvalitě vstupních surovin, technologickém postupu, mikrobiální kontaminaci během kvašení a podmínkách skladování. Vysoké koncentrace agmatinu, putrescinu, sperminu a spermidinu jsou přítomné ve sladu, spolu s malým množstvím histaminu, tryptaminu a kadaverinu. Během fermentace dochází k další produkci BA a to převážně z důsledku kontaminace mladiny bakteriemi mléčného kvašení, především bakteriemi *Pediococcus* spp. a *Lactobacillus brevis* [29].

V nealkoholických nápojích je obsah biogenní aminů nad určitými hodnotami jednoznačným ukazatelem kvality potravin, čerstvosti a bezpečnosti daného produktu. Mikroorganismy se tedy v nápojích mohou vyskytovat kvůli nedostatečným hygienickým podmínkám jako kontaminanty. Ovšem existují výjimky. V nápojích se přítomnost BA nemusí nutně připisovat nežádoucí aktivitě mikroorganismů. BA vznikají v nápojích také pomocí proteolytických enzymů konkrétní, přirozeně přítomné mikrobiální flóry použitých surovin nebo pomocí startovacích kultur. K nejčastějším BA přirozeně se vyskytujících v nápojích patří endogenní polyaminy. U nealkoholických nápojů z ovoce/zeleniny jsou přítomné např: spermiové a spermidinové polyaminy, které jsou součástí rostlin spolu s prekursorem putrescinu [30].

### 1.4.2 Biogenní aminy živočišných produktech

Vznik biogenních aminů v rybách je druhově specifický. Vyšší množství lze očekávat u ryb bohatých na histidin, ryby s tmavou svalovinou. U těchto ryb se jako indikátor kvality/kažení využívá množství BA histaminu. Množství je stanoveno Nařízením komise (EU) č. 1019/2013 ze dne 23. října 2013, kterým se mění příloha I nařízení (ES) č. 2073/2005 [31], pokud jde o histamin v produktech rybolovu. U ryb se světlou svalovinou, měkkýšů a fermentovaných výrobků z mořských plodů se jako indikátor kvality/kažení využívá

převážně množství putrescinu a kadaverinu. Ryby, ve kterých se nachází nejvíce BA, patří převážně do čeledi makrelovitých dalších druhů dále sardinky, sardely, sledě aj. Čerstvé ryby obsahují méně než 0,1 mg/kg histaminu, což je zanedbatelné množství [32, 33].

Koncentrace biogenních aminů závisí převážně na mikrobiálním růstu, okyselení a proteolýze. V návaznosti jsou i konečné podmínky během zpracování, hodnota pH, aktivita vody nebo teplota, které mohou podpořit růst bakterií a aktivitu mikrobiálních dekarboxyláz. K nejčastějším biogenním aminům, které se v maso a masných výrobcích nacházejí, můžeme zařadit kadaverin, putrescin, tyramin i histamin. V závislosti na daném výrobku je koncentrace těchto aminů různorodá. Například maso má kvantitativně nižší koncentraci histaminu, než je tomu u ryb. Z koncentrace biogenních aminů lze poznat, v jaké fázi se maso nachází. Koncentrace BA sperminu a spermidinu se během skladování snižuje, zatímco tyramin, kadaverin, putrescin se s délkou skladování a mikrobiálních změn zvyšuje. Při vysoké koncentraci kadaverinu je již jisté, že dochází ke kažení výrobku [34].

Sýry spolu s dalšími mléčnými výrobky patří k důležitým potravinám v rámci výživy. Bohužel i tyto potraviny podléhají vysoké akumulaci biogenních aminů. Převážně sýry v sobě mohou BA kumulovat nad koncentrace vyšší než 1000 mg/kg. Z tohoto důvodu je důležité snižování těchto látek v sýrech a mléčných výrobcích [35]. K hlavním bakteriím produkující BA v sýrech patří zejména grampozitivní bakterie mléčného kvašení podílející se na produkci histaminu a tyraminu. Některé kmeny bakterií rodu *Eterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Streptococcus* jsou popsány jako producenti biogenních aminů. Ve výrobcích se tyto bakterie nacházejí z několika různých příčin. Mohou být přítomny v původní surovině, nebo se mohou do výrobku dostat jako kontaminanty před zpracováním nebo během zpracování. Vybrané kmeny mohou tvořit součást startérových či doplňkových kultur pro výrobu požadovaného výrobku. Z kontaminující mikroflóry lze produkci biogenních aminů, převážně putrescinu a kadaverinu připisovat gramnegativním bakteriím, zejména čeledi *Enterobacteriaceae*. Důležitým krokem ke snížení možných biogenních aminů je i výběr kvalitní vstupní suroviny. Vstupní surovina obsahující velké množství enterokoků může vést k nadměrné produkci tyraminu v sýru. Dalším důležitým faktorem v produkci BA je proteolýza probíhající během zrání sýrů. Při ní dochází k uvolňování aminokyselin a tím vzniká další substrát pro vznik BA. K nejúčinnějším krokům v možném snížení biogenních aminů lze zařadit řízení teploty skladování, přidání NaCl do vstupní suroviny [35, 36].

Tabulka 1: Dekarboxyláza pozitivní MO v potravinách v [37]

Potravina/ nápoj	Biogenní amin	Mikroorganismy
Ryby	histamin, tyramin, kadaverin, spermidin	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Serratia fonticola</i> , <i>Citobacter freundii</i> , <i>Clostridium</i> sp., <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Sýry	histamin, tyramin, tryptamin, putrescin	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>L. curvatus</i>
Maso	histamin, tyramin, tryptamin, putrescin, kadaverin	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. sakei</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>
Víno	kadaverin, histamin, tyramin, putrescin	<i>Oenococcus oeni</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. zaeae</i> , <i>Pediococcus parvulus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Enterococcus faecium</i> ,
Pivo	histamin, tyramin	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. brevis</i> ,

## 2 ESENCIÁLNÍ OLEJE

Esenciální oleje (EO) jsou známé svými antibakteriálními, antivirovými, antimykotickými, antioxidačními a insekticidními vlastnostmi již dlouhou dobu. Díky těmto vlastnostem jsou využívány jak v medicíně, tak i v potravinářském průmyslu, kde vykazují slibné účinky proti patogenům vyskytujících se v potravinách [38].

### 2.1 Charakteristika a vlastnosti esenciálních olejů

Esenciální oleje patří k těkavým aromatickým kapalinám, získávaných z rostlinného materiálu. Složky olejů vykazují rozmanitou skupinu organických sloučenin s velkými rozdíly ve své antimikrobiální aktivitě a nízkou molekulovou hmotností. Dobře se rozpouštějí v alkoholu, etheru, ve vodě rozpustné nejsou. V rostlinách se nacházejí v buňkách listů nebo stoncích. Obvykle se ale tyto látky koncentrují jen v jedné, konkrétní části, jako kůra, listy, květ nebo plod – ovoce. Z rostlin se získávají destilací vodní parou nebo mechanickými procesy [38, 39].

Způsob získávání a druh materiálů použitého pro výrobu esenciálního oleje může ovlivnit výsledné složení daného oleje a jeho množství. Tyto parametry jsou rozhodující v následných biologických a charakteristických vlastnostech. Esenciální oleje mohou tvořit až 100 různých sekundárních metabolitů, zařazujících se do několika chemických tříd. Dle struktury je možné je rozdělit do 4 skupin: terpenoidy, fenypropeny, terpeny a „ostatní“. Skořicový aldehyd, citral, karvakrol, tymol nebo eugenol patří k EO obsahující ve své molekule jako hlavní složku fenoly nebo aldehydy. Tyto EO vykazují nejlepší antibakteriální účinnost. Esenciální oleje obsahující ve své molekule terpenové alkoholy mají antibakteriální účinek nižší, ale ne zanedbatelný. Účinky se dále snižují se skupinou ketonu nebo esteru. K takovým patří například  $\beta$ -myrcen,  $\alpha$ -thujon nebo geranylacetát. Oleje obsahující terpenové uhlovodíky, bývají obvykle neaktivní [38,40].

Významným znakem je, že v některých případech má hlavní molekula lepší aktivitu než esenciální olej. Tento znak je možné pozorovat u karvakrolu, eugenolu získaného z oleje hřebíčku, nebo terpin-4-olu nacházejícího se v oleji čajovníku vykazují vyšší účinnost než konkrétní olej. Těchto účinků dosahují esenciální oleje díky různým terpenoidním složkám, které mezi sebou interagují za účelem snížení nebo naopak zvýšení antimikrobiálních činností. Celkově můžeme interakce mezi sebou vést ke čtyřem typům účinku: aditivní, antagonistický, indiferentní a synergický [41].

- Aditivní účinek nastává v případě, kdy součet jednotlivých efektů je roven kombinovanému účinku.
- Antagonistický účinek vzniká v případě, kdy účinek jedné nebo více sloučenin je menší, než by tomu bylo při aplikaci každé látky zvlášť.
- U indiference dochází k absenci interakce.
- Synergický účinek nastává v případě, kdy součet jednotlivých účinků je menší než účinek kombinovaný.

Tymol a karvakrol vykazují silné antioxidační účinky. Antioxidanty se vyznačují schopností vylučovat volné radikály. Tvorba volných radikálů je způsobena oxidačním stresem vedoucí např. k buněčné nerovnováze. Antioxidační účinky vykazují fenolické složky, terpenoidy a flavonoidy. Pořadí účinnosti antioxidační kapacity mezi různými esenciálními oleji z koření, můžeme seřadit v pořadí: hřebíček > tymián > skořice > bazalka > oregáno. Díky svým antioxidačním vlastnostem může být během zpracování potravin tohle koření využito i k řízené oxidaci lipidů [42].

Eugenol je přibližně z 85 % hlavní složkou hřebíčkového oleje. Patří k důležitým bioaktivním fytochemikáliím s různými farmakologickými účinky. Eugenol se využívá v potravinářství, farmacii a kosmetice. Při konzervaci potravin bývá využíván kvůli své širokospektrální antibakteriální aktivitě. Ovšem použití samotného eugenolu se významně omezuje z důvodu vysoké těkavosti a citlivosti na přítomnost světla, kyslíku a tepla. Metodou pro kontrolu těchto problémů je např. využití antibakteriálního filmu při balení, kdy dochází k začlenění eugenolu do polymerní matrice [43].

Linalool patří k hlavní složce několika aromatických esenciálních olejů. K nejvýznamnějším patří olej z oregana, levandule, bazalky a koriandru. Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority – EFSA) byl uznán jako aromatická látka, která může být využívána v potravinách. Výhodou je stabilita při vyšších teplotách. Potenciál se jeví v začlenění linaloolu do polymerů s následným využitím jako antimikrobní látka v obalovém materiálu [38, 44].

Skořice patří k celosvětově používanému koření. Získává se z kůry stromů rodu *Cinnamomum* a obsahuje z hlavních složek kyselinu skořicovou a cinnamaldehyd neboli skořicový aldehyd, který je převážně hlavní složkou skořicového oleje. Spolu se skořicovým aldehydem se v oleji nacházejí i látky eugenol, linalool a 1,8–cineol.

Skořicový aldehyd se vyznačuje fungicidními a antibakteriálními účinky. Inhibuje tedy růst grampozitivních, gramnegativních bakterií i hub [45, 46].

## 2.2 Využití esenciálních olejů v potravinářství

S rostoucím zájmem o potravinářské přírodní látky a obavy spotřebitelů z chemických konzervačních látek, vedlo k tomu, že esenciální oleje v potravinářském průmyslu nacházejí čím dál větší uplatnění. V této souvislosti se uplatňují ve formě aromatických či biokonzervačních látek, k prodloužení trvanlivosti potravin [23].

Díky svým funkčním vlastnostem snižují či odstraňují patogenní bakterie a dále omezují oxidaci lipidů. Tím zvyšují kvalitu potravinářských výrobků. Použití esenciálních olejů v potravinářství, je ovšem limitováno množstvím a formou. Vysoká těkavost, nízká rozpustnost ve vodě, citlivost na kyslík, světlo, teplo a interakce čistých esenciálních olejů s matricí potravin, ztěžuje využití těchto látek v jejich čisté formě. I přesto, že jsou celosvětově uznávané jako bezpečné (Generally Recognized as Safe, GRAS), z důvodu svých příchutí a pachů mohou vést k překročení přijatelné organoleptické úrovně, která by měla dopadnout na změnu přirozené chuti potravin. Z tohoto důvodu je v posledních letech poptávka o znalostech jejich minimální inhibiční koncentraci (MIC). Znalost MIC nám umožňuje stanovit rovnováhu mezi množstvím použitého oleje v potravině a smyslovou přijatelností [47].

Antimikrobiální účinek esenciálních olejů závisí na bakteriální zátěži. V potravinářských výrobcích s nižší úrovní bakteriální kontaminace se může ukázat jako účinnější. Esenciální oleje mohou být využity společně s dalšími konzervačními postupy, jako prostředek ke zvýšení překážky ve výrobcích. Nejslibněji se jeví kombinace esenciálních olejů s vysokým tlakem, chemickými konzervanty nebo tepelným ošetřením. Studie v posledních letech ukázaly, že rostlinné extrakty, konkrétněji tymiánový olej a hřebíček, mají příznivé dopady na redukci patogenu *Listeria monocytogenes*. Jedná se o důležitý potravinářský patogen, který je v přírodě všudypřítomný. Nachází se ve vodě, půdě a je hlavním možným problémem při křížové kontaminaci v masném průmyslu. V potravinách je tento patogen schopný růst v širokém rozmezí teplot, pH, aktivitě vody nižší než 0,93 a v přítomnosti soli. Nejvýznamnější odlišnost od jiných potravinářských patogenů, jako *Salmonella* spp. a *Escherichia coli* O157:H7 je ve vysoké úmrtnosti a velmi nízké infekční dávce [48].

Senzorický práh přijatelnosti je relativně vysoký u kořenitých jídel. Z tohoto důvodu je nejsnadnější metodou začlenění EO do potravin spolu s bylinkami nebo kořením. V této kombinaci může dojít k synergismu a požadovaný biologický účinek vyvolaný koncentrací, nezpůsobí nežádoucí změny v příchuti. Z průmyslových aplikací se s největším potenciálem jeví používání majoránkového oleje pro zvýšení trvanlivosti potravin. Ten v dané publikaci pro přidavek majoránky do čerstvých klobás vykazoval bakteriostatický účinek při koncentracích nižších než nejvyšší MIC. Inhibiční účinek byl s nejvyšší pravděpodobností způsoben sloučeninou terpin-4-ol. Bakteriocidního účinku bylo dosaženo při koncentracích vyšších než daná MIC a potravina byla doprovázena změnami chuti. Vyváženého výrobku s vyhovujícími antimikrobními i chuťovými vlastnostmi by bylo možné dosáhnout snížením koncentrace koření během formování [49].

Esenciální oleje jako přídatné látky se osvědčily díky svým antioxidačním vlastnostem při aplikaci na maso a masné výrobky s vyšším obsahem lipidů. Pozoruhodný účinek vykazují oleje z bazalky, černého pepře, hřebíčku, majoránky, oregána, šalvěže, tymiánu a zázvoru. Antioxidační kapacita je připisována eugenolu, karvakrolu a tymolu, což jsou fenolické složky daných olejů [50].

Z antimikrobních vlastností pro prodloužení doby skladování drůbežního masa, se jeví jako vhodná metoda marinování masa s obsahem účinných látek tymolu a karvakrolu v marinádě. Z předchozích studií se pro zvýšení účinků marinád pro aplikaci na maso a rybí výrobky využívaly EO skořice, oregána a tymiánu. Kombinací přijatelného množství (0,2–0,6 %) EO spolu dalšími konzervačními metodami, jako je balení s modifikovanou atmosférou nebo vakuové balení při nízkých teplotách lze zpomalit růst bakterií a prodloužit dobu skladování marinovaných výrobků. U EO skořice se zaznamenala schopnost inhibice plísní na mase a rybách [51, 52].

V posledních letech bylo zjištěno, že by dosavadní konzervační látky jako benzoát sodný mohl být nahrazen tymolem a karvakrolem, převážně v sójových omáčkách. Vysoká koncentrace NaCl, nízké pH a další složky nacházejících se v sójových omáčkách působí synergicky s tymolem a karvakrolem. Synergický účinek má za následek zvýšení antibakteriální aktivity a také zvýšení prodloužení trvanlivosti. Možná příchut' EO nebo aktivních složek tymolu a karvakrolu by v tomto případě mohla být s největší pravděpodobností maskována přirozenou chutí sójové omáčky [53].

Koření svými vlastnostmi ovlivňuje i produkci BA v potravinách. Tvorba těchto aminů může být značně zpomalena při aplikaci karvakrolu do potravin, v závislosti na



koncentraci a předpokládaného druhu bakterie. Karvakrol působí převážně na bakterie přenášené potravinami, včetně *E. coli*, *E. faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* a rod *Salmonella*. Při použití tymiánové rostliny *Zataria multiflora*, patřící do čeledi *Lamiaceae*, obsahující jako hlavní složkou karvakrol a tymol, přímo do tvarohu pro výrobu sýru Gouda, může dojít k významnému snížení obsahu BA tyraminu a histaminu v konečném produktu. Tato rostlina se využívá i při výrobě aromatických jogurtů a díky výborným antioxidačním a antibakteriálním vlastnostem je vhodná jako bylina pro kulinární úpravu v potravinářském průmyslu [54, 55].

Ochucené měkké sýry na bázi smetanového sýra s obsahem oreganového a rozmarýnového esenciálního oleje vykazují lepší antioxidační vlastnosti a fermentační stabilitu. Přidáním těchto olejů se prodlužuje trvanlivost výrobku. Množství 0,2 g EO na 100 g sýra může mít vliv na přijatelnost produktu pro spotřebitele [56].

Z dalších významných možností je aplikace kmínu, buď v práškové formě, nebo jako éterický olej. Pro svou specifickou, silnou charakteristickou chuť se využívá v potravinářství po celém světě, pro ochucení potravin, nápojů a likérů. Koření kmínů a jeho éterické oleje jsou používány jako konzervační látky. Svými antioxidačními a antimikrobními vlastnostmi přispívají ke zlepšení, prodloužení trvanlivosti potravin a jsou využívány také jako bezpečnější alternativa k syntetickým antioxidantům. Aplikace zabezpečuje minimalizaci oxidačního žluknutí potravin v důsledku přítomnosti významných antioxidačních látek, k nimž patří monoterpenové alkoholy, linalool, karvakrol, flavonoidy a dalších polyfenolické sloučeniny. Bylo prokázáno, že EO z kmínu snižuje posklizňový rozpad jahod a má 100% účinek na inhibici plísňového napadení skladovaného hrachu. Inhibice *Aspergillus flavus* a *Aspergillus niger* vykazuje výhody aplikace kmínového oleje jako konzervačního prostředku [57].

Esenciální oleje z různých druhů koření na bázi ovoce, jsou klíčovými složkami koncentrátů pro výrobu nealkoholických nápojů. Pro výrobu se využívají EO především z těchto aromatických rostlin: rudodřev koka (*Erythroxylum coca*); skořicovník (*Cinnamomum*); muškátovník pravý (*Myristica fragrans*); koriandr setý (*Coriandrum sativum*); neroli – pomerančovník hořký (*Citrus aurantium*); citron – citrus limonový (*Citrus limon*); sladká limeta – citrusová limeta (*Citrus limetta*); pomerančovník čínský (*Citrus sinensis*); a vanilka – vanilovník plocholistý (*Vanilla planifolia*). Citrusový olej je souhrnný název pro oleje citronové, limetkové, pomerančové a neroli. V průmyslu jsou EO

začleněny do koncentrátů, které se přivádějí během výroby. Koncentrát Cola obsahuje EO z listů koky, skořice, muškátového oříšku, semen koriandru, neroli, citronové kůry, limetové kůry, pomerančové kůry a vanilky. Koncentráty citronovo – limetové obsahují EO z citrusových plodů. V případě citronovo – limetkové sody včetně neroli. Pomerančová limonáda obsahuje jako hlavní složku pomerančový olej. Ten může být ve směsi spolu se složkami citronových a limetových olejů nebo bez nich [58].

Pro využití koření, EO nebo jejich funkčních složek, nikoli jako přísad do samotných produktů, se jeví jedna z možností využití v aktivních obalech. Aktivní obaly vznikly s cílem pro uspokojení požadavků spotřebitelů na minimálně zpracované potraviny, přísnější požadavky na bezpečnost potravin a zdraví spotřebitelů. Podstatou je zabudování esenciálního oleje v jedlých polymerech či biologicky rozložitelných sáčcích, povlacích. Ty zajišťují pozvolné uvolňování zaobalených EO napovrch potraviny, nebo do volné části obalů. Výhodou takového použití je udržení účinné látky v prostoru dlouhou dobu. Biologicky rozložitelná obalová fólie na bázi biopolymeru funkcionizované o esenciální oleje jsou vhodnou ekologickou, udržitelnou a nákladově efektivní alternativou k tradičním plastovým obalovým materiálům [59]. Pro mnoho aplikací se jeví jeden z důležitých a nejpoužívanějších olejů právě skořicový esenciální olej, olej z hřebíčku a tymiánu. Zapouzdření EO v materiálů zlepšuje účinnost v daném systému pro balení potravin. Životaschopnou možností pro enkapsulaci např: skořicového oleje jsou nanočástice, chitosanové mikrokapsle nebo cyklodextriny. Po zapouzdření EO nebo jiných těkavých látek zlepšují jejich rozpustnost ve vodě. Další výhodou je, že nejsou toxické a některé jsou schválené jako nové potraviny či potravinářské přídatné látky [60, 61].

Pro minimalizaci možných organoleptických vlastností jsou vyvíjeny dále nové technologie. Novou, platnou a účinnou strategií k překonání všech překážek vykazují nanokapsle s EO na bázi polymeru. Tyto nanosystémy jsou potencionálními možnostmi pro potravinářský průmysl. Při prevenci šíření nemocí přenášené potravinami by mohli představovat alternativu k chemickým konzervačním metodám. Tato technika by měla snížit těkavost, interakci se složkami potravin a zlepšit biologickou dostupnost EO. Nanokapsle působí jako rezervoár s řízeným systémem uvolňování do bakteriální buňky [62].

Tabulka 2: Přehled EO a jejich složek v obalových systémech [63]

Antimikrobní látka	Obalový materiál a proces	Druh potraviny
karvakrol	začlenění do kopolymeru	sýr
	přímé začlenění a rozpuštění ve filmech	balené pečené kuře
	začlenění mikrenkapsulovaných účinných látek v biaxitálně orientovaných polyesterových fóliích	chlazené čerstvé ryby a maso
skořicový aldehyd	přímé začlenění rozpuštěním v chitosanu	maso
	přímé začlenění rozpuštěním ve filmech na bázi sójového proteinu	olivový olej
skořice	začlenění do polypropylenu	pekařské produkty
kůra, listy skořice	začlenění do povlaku aktivního papíru na bázi parafinu	cherry rajčata
skořicový EO	povlak papírového obalu	jahody, broskve
hřebíčkový olej	přímé začlenění rozpuštěním v rybí želatině	ryby
	začlenění do povlaku aktivního papíru na bázi parafinu	cherry rajčata
oregano	přímé začlenění rozpuštěním v jedlých filmech ze sójových bílkovin	čerstvé mleté hovězí placky
	začlenění do povlaku z aktivního papíru na bázi parafinu	cherry rajčata
linalool	začlenění do kopolymeru	tvrdý sýr, čedar
tymol	začlenění mikroenkapsulovaných činidel ve fóliích	chlazené čerstvé ryby a maso
	přímé začlenění rozpuštěním ve filmech na bázi sójového proteinu	olivový olej

### 2.3 Antimikrobní účinky esenciálních olejů

K nejkvalitnějším a neúčinnějším druhům esenciálních olejů s antimikrobními vlastnostmi se řadí tymián, oregano, čajovník, skořice, citronová tráva, hřebíček a olej z růžového dřeva. Tyto oleje jsou aktivní při koncentracích  $<1\%$  obj. K inhibici růstu *Escherichia coli* jsou vhodnými oleji hřebíček, citronová tráva, oregano, tymián. Pro *Staphylococcus aureus* je vhodné použití koncentrace  $<0,05\%$  tymián, bobkový olej, hřebíček, citronová tráva. Bazalka a eukalyptový olej inhibují *Staphylococcus aureus* při použití  $1\%$  koncentrace. Esenciální oleje z rostlin vykazují inhibiční aktivitu ke grampozitivním i gramnegativním bakteriálním patogenům. U některých olejů a mikroorganismů se antibakteriální účinek může ale značně lišit. K olejům mající vysokou aktivitu jen ke grampozitivním bakteriím můžeme zařadit olej z manuky, získaných z nektaru *Leptospermum scoparium*, olej vetiver nebo santalové dřevo [40].

I přesto že esenciální oleje vykazují antibakteriální účinek jak ke grampozitivním, tak i ke gramnegativním bakteriím, je důležité zmínit, že ke grampozitivním bakteriím je jejich působení aktivnější. To je způsobeno s největší pravděpodobností díky peptidoglykanu, spolu s kyselinou teikovou a proteiny, které jsou součástí buněčné stěny. EO se svým převážně hydrofobním charakterem interagují s membránou a snadněji procházejí do cytoplazmy. Gramnegativní bakterie jsou méně citlivé na působení olejů z důvodu nabitému hydrofilnímu lipopolysacharidu, který omezuje difúzi hydrofobních sloučenin. Lipopolysacharidová membrána nacházející se na vnější straně buněčné stěny a tenká vrstva peptidoglykanu ve vnitřní straně se spojují pomocí Braunových lipoproteinů. Přítomnost vnější membrány je jeden z rozdílů mezi grampozitivními a gramnegativními bakteriemi. Lipopolysacharidy tvořené z lipidu A, jaderného polysacharidu, O – řetězce (O – antigenu) poskytují ochranu bakterií proti přírodním extraktům, antibiotikům aj [38, 64].

Účinek esenciálního oleje na mikroorganismus spočívá v destabilizaci membrány. V buňce dochází k reakci EO s mastnými kyselinami, polysacharidy a fosfolipidy. Interakce vede k tomu, že se membrána stane propustnější a začne docházet ke ztrátě iontů, redukcí potenciálu tím kolapsu iontové pumpy s následným vyčerpáním ATP. Z dalších možných způsobů je denaturace proteinů, inaktivace buněčných enzymů a následné smrti buněk. V eukaryotických buňkách působí esenciální oleje nebo jeho funkční složky na mitochondriální membrány. Její destabilizaci ovlivňují  $\text{Ca}^{2+}$  ionty. Vnitřní pH buňky sepoté snižuje, tím dochází k ovlivňování protonové pumpy a vyčerpávání ATP. V takto

narušené membráně dochází až k abnormální propustnosti a úniku radikálů, cytochromu,  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a proteinů ven z buňky. Tyto jevy způsobují apoptózu, nekrózu a smrt buněk. Mimo to může docházet k poškození lipidů, proteinů a koagulaci cytoplazmy [65].

Pokud nejsou pozorovány žádné účinky na buněčnou stěnu a membránu, může být místo působení intracelulární. Místem působení jsou v tomto případě enzymy, proteiny nebo procesy biosyntézy. Některé sloučeniny mají více míst působení a je někdy obtížné zjistit, která je odpovědná za buněčnou smrt. Sloučenina ovlivňující propustnost membrány, může ovlivňovat i membránový potenciál a tím i energii buněčného dýchání. U tohoto příkladu je obtížné rozlišit účinek přímý (tvorba energie) od nepřímého (účinky membrány) [66].

### 3 CHARAKTERISTIKA TESTOVANÝCH MIKROORGANISMŮ S DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITOU

#### 3.1 Rod *Lactococcus*

Bakterie rodu *Lactococcus* jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní, nesporulující, mezofilní bakterie mléčného kvašení. Buňky tvoří koky, spojující se do krátkých řetízků (Obrázek 6) sférického nebo vejčitého tvaru s délkou 1,0 – 1,5  $\mu\text{m}$ . Taxonomická klasifikace dle fenotypových vlastností je založena na rozdílu růstové teploty, snášenlivosti solí a využití argininu. *L. lactis* subsp. *lactis* je schopný růst ve 4 % NaCl, při teplotě 40 °C a pH 9,2. Dále má schopnost degradovat arginin, narozdíl od *L. lactis* subsp. *cremoris* který tyto funkce nesdílí [67, 68].

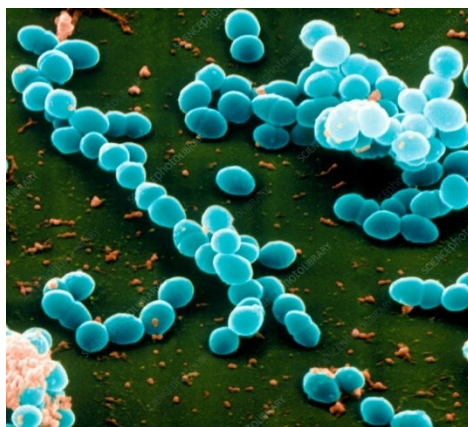


Obrázek 6: *Lactococcus* [69]

*L. lactis* je jeden z nejznámějších laktokokových druhů, nejvíce používaný v mlékárenských průmyslech. Kmeny těchto poddruhů jsou hlavními složkami směsí pro výrobu kysaných mléčných produktů, převážně sýrů. Hlavní znakem těchto kmenů je produkce kyseliny mléčné, degradace mléčného kaseinu, což má za následkem specifickou chuť, strukturu konečného výrobku. *L. lactis* je vzhledem k potravinářství zapojen do mikrobiální bezpečnosti. Kromě vysoké produkce kyseliny mléčné produkuje i antimikrobiální látky tzv. bakteriociny. Bakteriociny mohou být využity jako konzervační látky. Působí negativně na kmeny způsobující kažení potravin a jiných patogenů. Tím zlepšují mikrobiální bezpečnost fermentovaných mléčných produktů [70, 71].

### 3.2 Rod *Enterococcus*

Rod *Enterococcus* patří ke grampozitivním, fakultativně anaerobním bakteriím vyskytující se samostatně, v párech, nebo mohou tvořit krátké řetízky či skupiny (Obrázek 7). Přirozeně se vyskytují ve střevním mikrobiomu lidí i zvířat. Objevují se i nové druhy, které lze získat jak z vody, půdy i rostlin [72].



Obrázek 7: *Enterococcus* [73]

Rod *Enterococcus* zahrnuje několik druhů, z nichž *E. faecalis* a *E. faecium* jsou považovány za indikátory fekálního znečištění. Několik kmenů je příčinou různých infekcí močových cest, meningitidy a endokarditidy [74]

*Enterococcus durans* ve střevním mikrobiomu zaujímá část menší. V potravinářských produktech se vyskytuje zejména v mléce a sýrech. Ve fermentovaných potravinách je původcem BA tyraminu, který vzniká jako odpověď organismu na nepříznivé podmínky, převážně kyselé prostředí [75].

Rod *Enterococcus* jsou rezistentní vůči většině antibiotik. Pokud jde o riziko přenosu antibiotických vlastností, není tento rod považován za zcela bezpečný. Několik kmenů *Enterococcus* se staly znepokojivými kvůli možným nozokomiálním nákazám a rostoucí obavě o bezpečnost kmenů vhodných pro potraviny. Všechny kmeny ovšem nejsou škodlivé. Specifické kmeny *E. faecium* a *E. faecalis* patří ke kmenům, které jsou využívány jako doplňkové látky nebo probatika [76].

Enterokoky zaujímají důležitou část při výrobě potravin, ovšem výběr enterokoků pro potraviny je obtížný. Při výrobě sýrů, jako složky startovacích kultur byly použity kvůli

schopnosti přežít nepříznivé podmínky a mohou urychlit proteolýzu, lipolýzu a zrání sýrů. Mají za následek rozpad citrátu a tvorbu aromatických látek, tím dochází ke zlepšení chuti a vůně výrobku. Některé druhy enterokoků pro výrobu mléčných výrobků mají schopnost produkce bakteriocinů (enterocinů) stejně jako rod *Lactococcus*. Bakteriociny enterokoků inhibují rozvoj patogenních bakterií, z nichž nejvýznamnější jsou *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* a *Vibrio cholerae*. Kromě toho mají některé kmeny enterokoků probiotické vlastnosti a tím příznivé účinky na lidský organismus [77, 78].

### 3.3 Rod *Salmonella*

Salmonely jsou gramnegativní bakterie ve tvaru tyčinek, patřící do čeledi *Enterobacteriaceae* (Obrázek 8). Jsou to fakultativně anaerobní, bičíkovité mikroorganismy s délkou 2 – 5 $\mu$ m a velikostí průměru 0,7 – 1,5 $\mu$ m. Salmonely jsou všudypřítomné lidské i zvířecí patogeny vyvolávající onemocnění, salmonelózu [79].



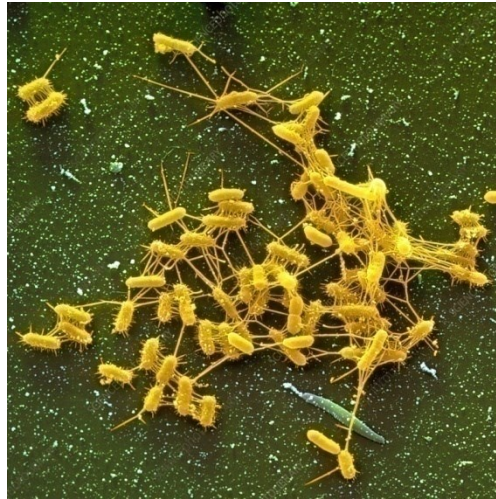
Obrázek 8: *Salmonella* [80]

Zdrojem infekce bývá maso, vejce, syrové nepasterizované mléko nebo produkty z tohoto mléka vyrobené. Mimo jiné se tento potravinový patogen nachází i v bylinách a koření, které je důležitým zdrojem salmonelózy. Jedná se především o koření dovážené. Značné zdravotní riziko představuje výskyt bakterie *Salmonella* v koření. Kvůli schopnosti přežít v sušených výrobcích dlouhou dobu, a přitom zůstat infekční [81, 82]



### 3.4 Rod *Proteus*

*Proteus* patřící do čeledi *Enterobacteriaceae* je pohyblivá, gramnegativní, fakultativně anaerobní bakterie s bičíky po celém těle (Obrázek 9). Charakteristickou vlastností jsou jeho výrazné proteolytické a heterotrofní účinky. Optimální teplota pro růst je 34–37 °C [83].



Obrázek 9: *Proteus* [84]

*Proteus* spp. je nejvíce znám jako oportunní lidský patogen, způsobující převážně infekci močových cest a ran. Ve střevech je možné tuto bakterii u jedinců nalézt jako součást přirozené mikroflóry, ale ve většině případů je přítomnost bakterie *Proteus* ve střevech nežádoucí s následnými průjmy. Tyto bakterie se vyznačují vyjímečnými metabolickými vlastnostmi. Ty jim umožňují adaptaci na různé podmínky prostředí, proto je možné detekovat *Proteus* i např: ve slané vodě [85].

V posledních letech bylo zaznamenáno po konzumaci kontaminovaných potravin, masa, zeleniny, mořských plodů několik desítek případů otravy jídlem způsobené bakterií *Proteus mirabilis* [86].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 CÍL EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo:

- v experimentální části otestovat 5 vybraných, hlavních funkčních složek esenciálních olejů, z důvodu že většinou vykazují vyšší aktivitu než samotný esenciální olej,
- stanovit minimální inhibiční koncentracie vybraných látek u gram pozitivních a gram negativních bakterií s dekarboxylázovou aktivitou,
- vyhodnotit výsledky s následnou diskuzí a formulací závěru.

## 5 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

### 5.1 Testované mikroorganismy

V diplomové práci byl testován vliv jednotlivých aktivních složek nacházejících se v esenciálních olejích na vybrané grampozitivní a gramnegativní bakterie. Deset zvolených bakterií byly již dříve označeny za dekarboxyláza pozitivní, tedy produkující biogenní aminy [35].

Testované bakterie byly získány ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora a z České sbírky mikroorganismů.

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

*Enterococcus durans* CCDM 53

*Enterococcus faecalis* CCM 2665

*Enterococcus faecalis* CCM 4224

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

*Proteus mirabilis* CCM 7188

### 5.2 Použité kultivační půdy dle ČSN EN ISO 11133 [87]

#### 5.2.1 Kultivační půda M17 Broth pro zvolené bakteriální kmeny:

- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, CCDM 141, CCDM 1004
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, CCDM 946
- *Enterococcus durans* CCDM 53

- *Enterococcus faecalis* CCM 2665, CCM 4224

Připravená půda M17 Broth (HiMedia) dle normy ČSN EN ISO 11133 byla pipetována o objemu 4 ml do připravených zkumavek a následně uzavřena a autoklávována 20 minut při teplotě 121 °C.

Pro přípravu pevné půdy byla použita půda M17 Broth (HiMedia) spolu s agarem (Agar Agar Type I; HiMedia) pro zajištění ztuhnutí. Rozpuštěná připravená půda dle normy ČSN EN ISO 11133 byla autoklávována 20 minut při teplotě 121 °C. Sterilní půda byla poté rozlita do připravených sterilních Petriho misek

Připravené půdy byly využity na kultivaci daných bakterií. Pro rod *Lactococcus* byla zvolena teplota 30 °C. Pro rod *Enterococcus* 37 °C.

### **5.2.2 Kultivační půda NB – Nutrient Broth a PCA –Plate Count Agar pro zvolené bakteriální kmeny:**

- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420
- *Proteus mirabilis* CCM 7188

Půda NB – Nutrient Broth (HiMedia) byla připravena dle normy ČSN EN ISO 11133 a dále pipetována o objemu 4 ml do připravených zkumavek. Připravené zkumavky byly uzavřeny a sterilovány 20 minut při teplotě 121 °C.

PCA – Plate Count Agar (HiMedia) byl připraven podle normy ČSN EN ISO 11133. Připravený roztok byl autoklávován 20 minut při teplotě 121 °C. Sterilní půda byla poté rozlita do připravených sterilních Petriho misek.

Připravené půdy byly využity na kultivaci daných bakterií při teplotě 37 °C.

### 5.2.3 Funkční složky esenciálních olejů

- **Tymol** (MERCK, Německo) – Hlavní fenolová sloučenina esenciálního oleje extrahovaného z léčivé rostliny *Thymus vulgaris*.
- **Karvakrol** (MERCK, Německo) – Jedná se o hlavní složku, která se běžně vyskytuje ve frakcích esenciálního oleje oregana a tymiánu. Jedná se o monoterpenický fenol se štiplavým zápachem. Tato složka může hrát roli antimikrobiální látky.
- **Eugenol** (MERCK, Německo) – Hlavní složka hřebíčkového oleje se sloučeninou fenolu. Působí jako antibakteriální a fungicidní látka.
- **Linalool** (MERCK, Německo) – Základní monoterpenová složka přítomná v mnoha aromatických druzích esenciálních olejů.
- **Cinnamaldehyd– skořicový aldehyd** (MERCK, Německo) – Nenasycený aromatický aldehyd. Jedná se o hlavní aromatickou složku skořicového oleje.

Pro experimentální část bylo použito pět zásobních roztoků vybraných složek esenciálních olejů o koncentraci 5 %. Každá složka byla testována o koncentracích 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 250; 500 mg/l. Pro přípravu požadované koncentrace bylo do kultivační půdy přidáno příslušné množství 5% zásobního roztoku funkční složky v etanolu. 5% zásobní roztok byl připraven smícháním 0,5g příslušné složky EO s 9,5ml etanolu.

### 5.3 Přístrojové vybavení a pomůcky

- Analytické váhy A&D GH–200 BC
- Termostat Memmert
- Biohazard box Telstar třídy II
- Autokláv Systec 2540EL, Varioklav H+P
- Spektrofotometr Tecan Sunrise TW/TC
- Dávkovací nástavec Disp – X Bottle Dispenser
- Mikropipety, sterilní špičky, sterilní kličky, mikrotitrační destičky pro 96 jamek Vekron, fólie, laboratorní sklo, Petriho misky skleněné/plastové, zkumavky
- kahan

## 6 METODIKA

### 6.1 Stanovení minimální inhibiční koncentrace mikrodiluční metodou

Před zahájením práce byla připravena suspenze. Mikroorganismy byly zaočkovány do příslušných bujónů a po dobu 24 hodin inkubovány. Narostené mikroorganismy byly 100x zředěny. Do 2,7ml bujónu bylo nepipetováno 0,3ml bujónu s mikroorganismy. Takto naředěný roztok s kulturou se dále používal pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC).

Stanovení MIC bylo provedeno pomocí mikrotitrační destičky. Pro každou funkční složku esenciálního oleje bylo použito 10 bakterií s dekarboxylázovou aktivitou. Mikrotitrační destička s 96-ti jamkami (Vekron) byla zaočkována způsobem uvedeným v tabulce 4. Kromě pozitivní a negativní kontroly byl způsob zaočkování následující. Do každé jamky bylo napipetováno 200  $\mu$ l bujónu s příslušnou koncentrací účinné látky a 5  $\mu$ l suspenze s bakteriemi. V destičce obsahující 96 jamek bylo sledováno 5 různých bakterií a jedna funkční složka EO při koncentracích 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 250; 500 mg/l (w/v). Každá bakterie byla testována 2x na jednu koncentraci.

Tabulka 3: Jednotlivé vzorky v 96-ti jamkové mikrotitrační destičce

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NK	NK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK
B	NK	NK	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25
C	NK	NK	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
D	NK	NK	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
E	NK	NK	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
F	NK	NK	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
G	NK	NK	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
H	NK	NK	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500

Negativní kontrola (NK) – ve sloupci 1 a 2 byla nechána na kontrolu sterility půdy. Do jednotlivých jamek bylo nepipetováno 200  $\mu$ l bujónu obohaceného o příslušné koncentrace jednotlivých testovaných látek, bez bakterií.

Pozitivní kontrola (PK) – do každé jamky A3 – A12 bylo nepipetováno 200  $\mu$ l bujónu a 5  $\mu$ l dané bakterie. Kontrola pro zjištění růstu bakterií.

U takto připravené destičky byla sledována optická denzita (OD) pomocí fotometru TECAN Sunrise TW/TC testovaných bakterií při vlnové délce 600 nm v časech 0, 24, 48 hodin. Mezi jednotlivými časy byla destička s bakteriemi kultivována v termostatu při 30 °C a 37 °C, dle druhu kultivované bakterie a před každým měřením protřepána.

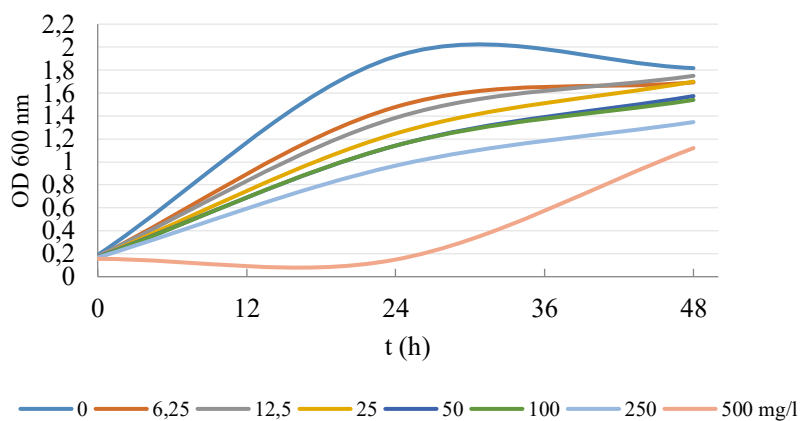


## 7 VÝSLEDKY

### 7.1 Vliv aktivních složek esenciálních olejů na bakterie rodu

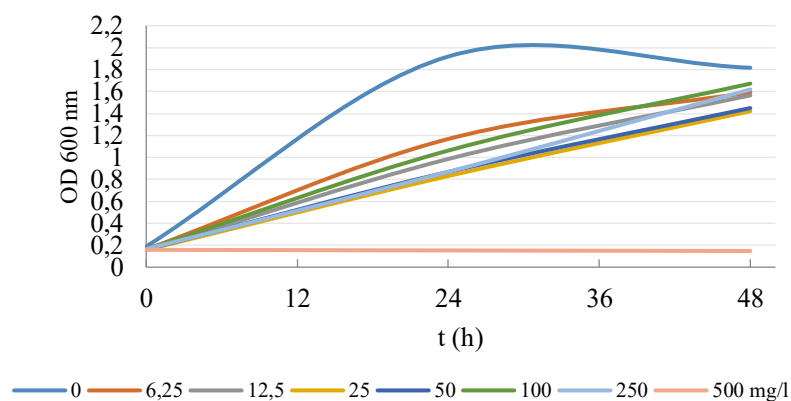
#### *Lactococcus*

U bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, Obrázek 10, bylo zjištěno, že nejvyšší testovaná koncentrace 500 mg/l výrazně prodloužila lag fázi testované bakterie. Z grafu je také patrné že při širokém rozmezí (ale i nízkých) koncentracích (6,5–250 mg/l) jsou laktotoky inhibovány. Koncentrace 500 mg/l vykazovala po 24. hodinovém testování jednoznačný inhibiční účinek



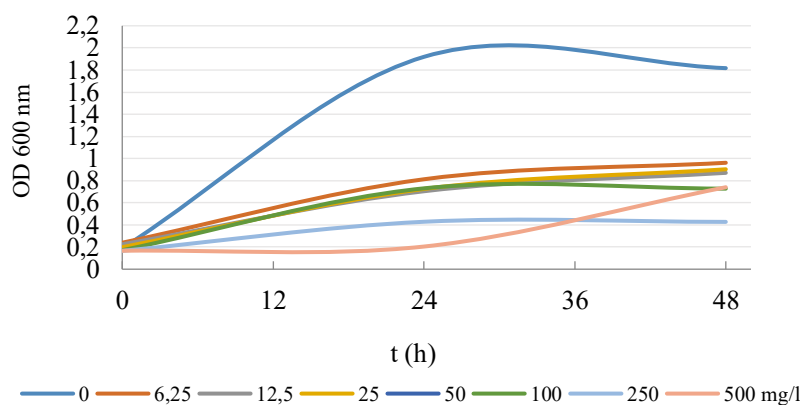
Obrázek 10: Vliv karvakrolu na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

U bakteriálního kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 byla stanovena minimální inhibiční koncentrace tymolu 500 mg/l, Obrázek 11, hlavní složky esenciálního oleje z oregana. Z grafu lze vidět, že i nejnižší koncentrace 6,25 mg/l ztlačila růst laktokoků v prvních dnech. Po 48. hodinách již rozmezí koncentrací 6,25–250 mg/l ztlačila růst laktokoků.



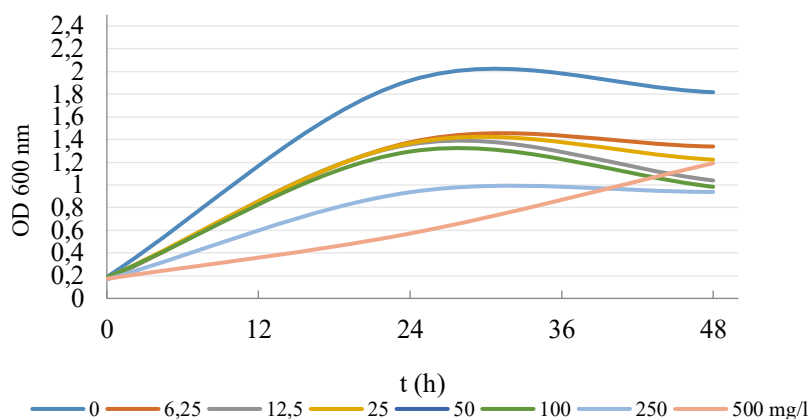
Obrázek 11: Vliv tymolu na *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 48

Z obrázku 12 bylo zjištěno, že skořicový aldehyd při koncentraci 500 mg/l, prodloužil dobu lagu u bakterie *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 48 o zhruba 20 hodin. Koncentrace 250 mg/l měla výrazné inhibiční účinky již v prvních hodinách. Všechny testované koncentrace skořicového aldehydu výrazně zpomalily růst bakterie a po 24. hodinové kultivaci byl jednoznačný inhibiční účinek na *Lactococcus lactis* CCDM 48 i při nejnižší koncentraci 6,25 mg/l.



Obrázek 12: Vliv skořicového aldehydu na *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 48

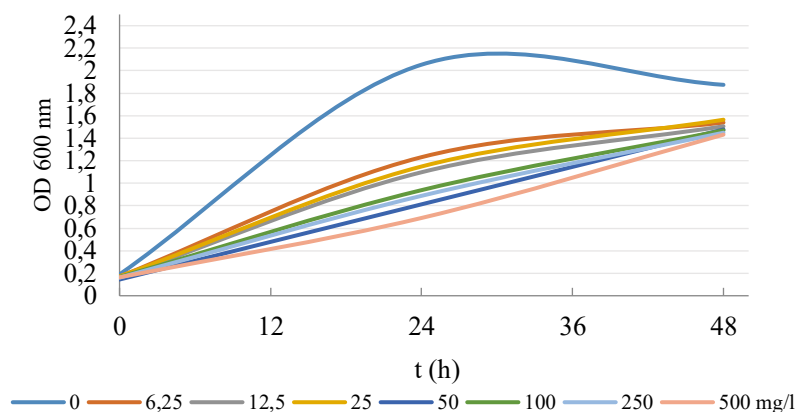
U bakterie *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 48, na obrázku 13, nebyla stanovena minimální inhibiční koncentrace pro eugenol. Nejvyšší testovaná koncentrace 500 mg/l prodloužila adaptaci dané bakterie na nové prostředí v řádu hodin. Koncentrace 250 mg/l snížila bakteriální populaci o polovinu oproti prostředí bez inhibiční látky.



Obrázek 13: Vliv eugenolu na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

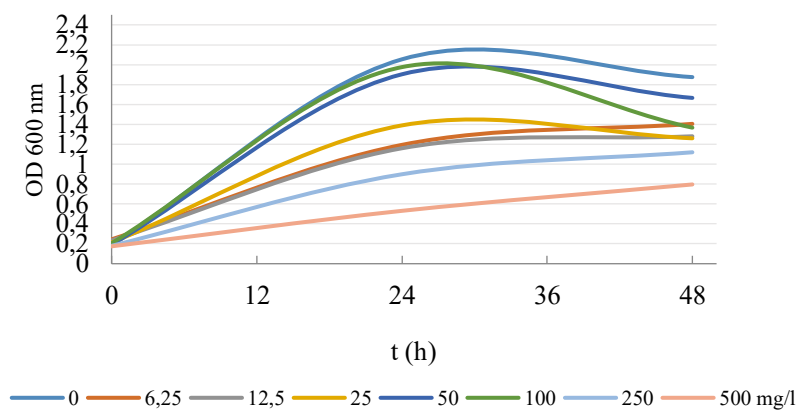
Testovaný mikroorganismus *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 byl nejvíce vnímavý na skořicový aldehyd, který je hlavní složkou skořicového EO. Koncentrace 250 mg/l měla výrazný inhibiční účinek. MIC 500 mg/l bylo dosaženo při použití tymolu. Karvakrol v koncentraci 500 mg/l vykazoval inhibiční účinek v prvních 24. hodinách. Eugenol působil na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 v omezené míře. Pouze koncentrace 500 mg/l prodloužila dobu lag fáze v řádu hodin. Minimální inhibiční koncentrace nebylo dosaženo u linaloolu. Pro inhibiční účinky linaloolu jsou potřebné vyšší koncentrace [96].

Z obrázku 14 je patrné, že tymol ve všech koncentracích výrazně působil v prvních 24 hodinách na zpomalení růstu *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141. Při použití nevyšší koncentrace 500 mg/l byl růst zpomalen o 65 % oproti testování bez přidané antimikrobní látky. Po 48. hodinové kultivaci byl zaznamenán exponenciální nárůst laktokoků. Pro zjištění zcela inhibičních koncentrací, je třeba vyšších koncentrací tymolu.



Obrázek 14: Vliv tymolu na *Lactococcus lactis subsp. lactis*  
CCDM 141

Při použití skořicového aldehydu na bakterii *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 141 nebyla zjištěna minimální inhibiční koncentrace (Obrázek 15). Ovšem nejvyšší testovaná koncentrace potlačila růst v prvních 24. hodinách o přibližně 75 % oproti testování bez přidané látky. Koncentrace 250 mg/l zbrzdila růst laktokoků o polovinu v první fázi měření.

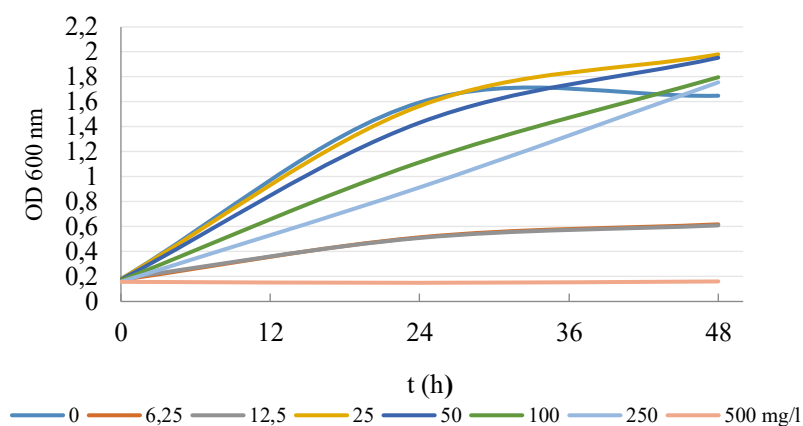


Obrázek 15: Vliv skořicového aldehydu na *Lactococcus lactis*  
*subsp. lactis* CCDM 141

Mikrodiluční metodou nebyla stanovena minimální inhibiční koncentrace pro bakterii *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 141 u testovaných látek. Skořicový aldehyd a tymol v prvních 24. hodinách vykazovaly výrazné omezení růstu.

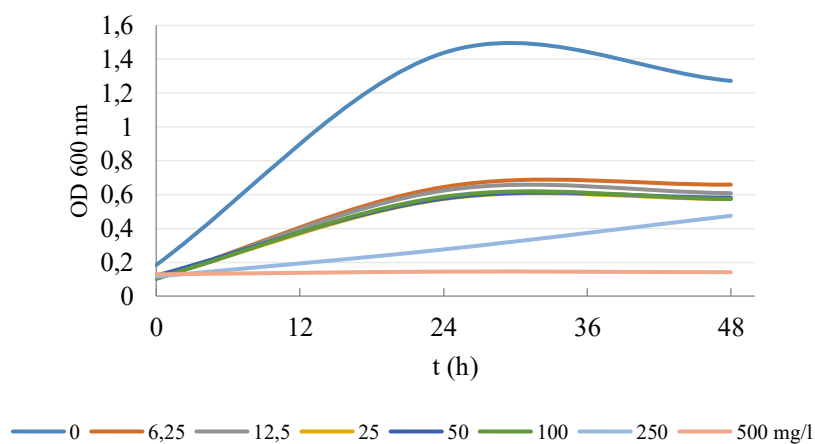
U bakterie *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 1004, na obrázku 16, byla stanovena minimální inhibiční koncentrace karvakrolu při koncentraci 500 mg/l. U druhé nejvyšší

testované koncentraci 250 mg/l je vidět, že inhibice bylo dosaženo po 24. hodinovém působení. Po 48. hodinách nebyl zaznamenán žádný nárůst *Lactococcus lactis* CCDM 1004. Zbylé testované koncentrace působily v prvních hodinách ke zpomalení růstu, ale s následným exponenciálním růstem bylo po 48. hodinách dosaženo stejného účinku jako v prostředí bez použití karvakrolu.



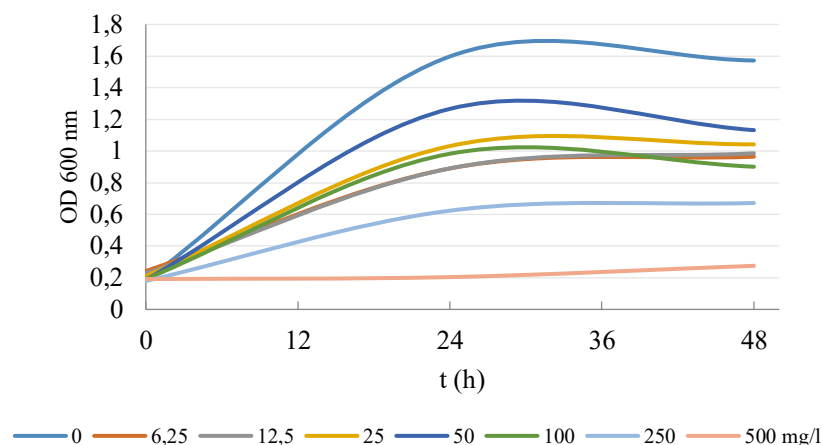
Obrázek 16: Vliv karvakrolu na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

Z obrázku 17 vyplývá, že inhibičního účinku na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 bylo docíleno použitím tymolu v nejvyšší testované koncentraci 500 mg/l. Koncentrace 250 mg/l výrazně zpomalila růst dané bakterie ve 24. hodinách. Všechny koncentrace 6,25–100 mg/l přispěly k výraznému snížení množení *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 s následnou inhibicí po 24. hodinové kultivaci.



Obrázek 17: Vliv tymolu na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

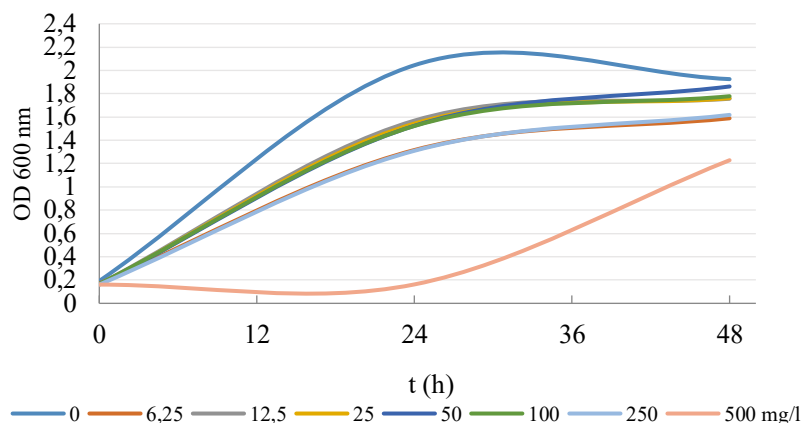
Podle obrázku 18, byla zjištěna inhibiční koncentrace skořicového aldehydu pro *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004. MIC byla v nejvyšší testované koncentraci 500 mg/l. Koncentrace 250 mg/l přispěla ke zpomalenému množení *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 o zhruba 60 % oproti kultivaci bez inhibiční látky. Každá koncentrace alespoň v nějaké míře omezila růst.



Obrázek 18: Vliv skořicového aldehydu na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

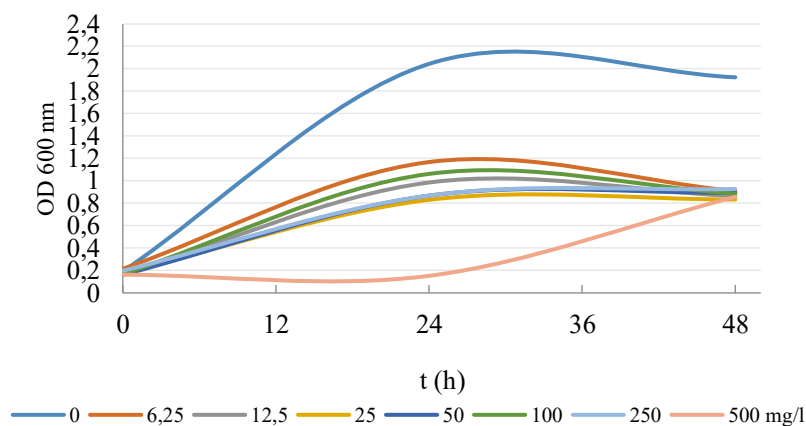
Mikroorganismus *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 vykazoval největší citlivost na testované látky. Karvakrol, tymol a skořicový aldehyd při koncentraci 250 mg/l výrazně zpomalily růst a adaptaci na dané prostředí. U tymolu byla zaznamenána výrazná aktivita omezení růstu i při nejnižší koncentraci 6,25 mg/l. Při koncentraci 500 mg/l byla stanovena MIC karvakrolu, tymolu i skořicového aldehydu. Již v prvních hodinách byl znatelný inhibiční účinek.

Při použití karvakrolu o koncentraci 500 mg/l (Obrázek 19), mělo za následek výrazného inhibičního účinku karvakrolu na *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 po dobu 24 hodin. Zbylé koncentrace karvakrolu ovlivnily růst *Lactococcus lactis* CCDM 824 jen z části. Po 48. hodinách byla populace laktokoků srovnatelná mezi použitými koncentracemi 6,25–250 mg/l.



Obrázek 19: Vliv karvakrolu na *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

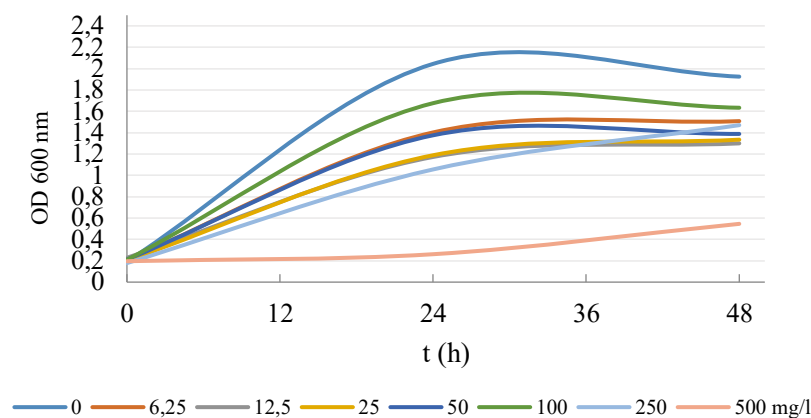
Z názornění na obrázku 20 je pomocí tymolu o koncentraci 500 mg/l dosaženo podobného účinku na *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 jako při aplikaci karvakrolu. V prvních 24 hodinách působil tymol bakteriostaticky. Všechny testované koncentrace výrazně zpomalily růst dané bakterie. Již nejnižší koncentrace 6,25 mg/l zpomalila růst o zhruba 45 % oproti růstu bez použití tymolu. Po 24. hodinové kultivaci byl zaznamenán bakteriostatický účinek tymolu v koncentracích 6,25 – 100 mg/l.



Obrázek 20: Vliv tymolu na *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

Z obrázku 21 je patrné, že v prvním dni bylo dosaženo inhibičního účinku při použití skořicového aldehydu v koncentraci 500 mg/l. Druhý den byl zaznamenán mírný růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, ale stále přetrvával výrazný inhibiční účinek. Z grafu je patrné, že při použití skořicového aldehydu o koncentraci 6,25 mg/l měl

za následek ovlivnění růstu po celou dobu testování o přibližně čtvrtinu ve srovnání s bakteriálním růstem bez inhibiční látky.

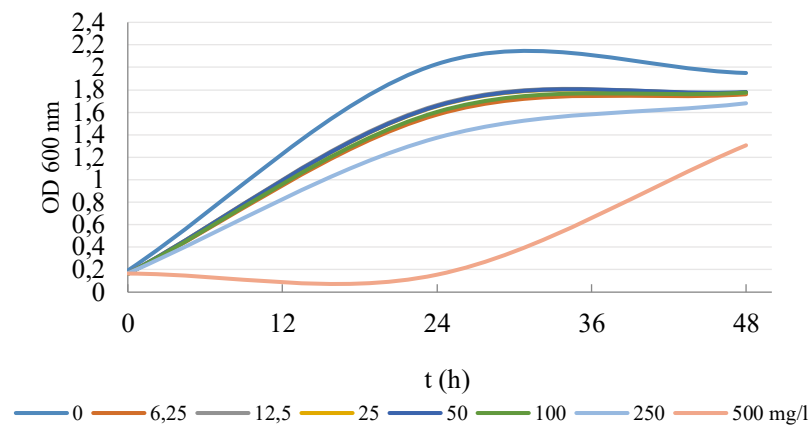


Obrázek 21: Vliv skořicového aldehydu na *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

Růst testovaného mikroorganismu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 byl potačen karvakrolem, tymolem a skořicovým aldehydem při koncentraci 500 mg/l v prvních 24. hodinách testování. Druhý den byl růst z větší části potlačen v přítomnosti skořicového aldehydu. Naopak u karvakrolu a tymolu, byl již zaznamenán růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824. V práci Inouye, S, (2003) byl testován linalool na grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* se zjištěnou MIC 3200 mg/l [96]. Je pravděpodobné, že při použití 5x vyšší koncentraci v této práci by mohla být inhibice ovlivněna.

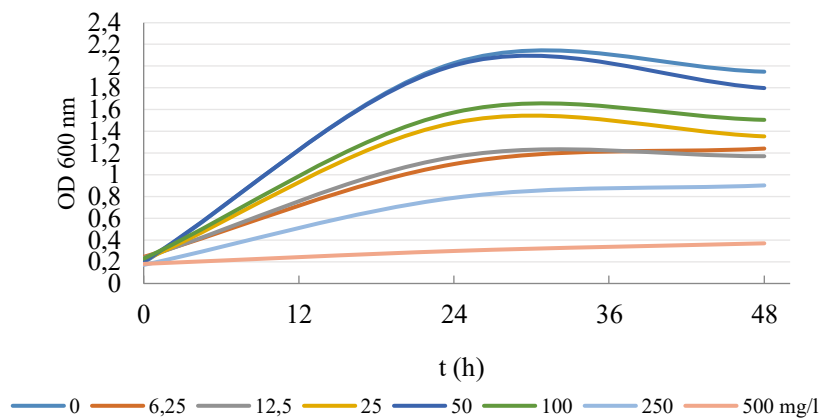
V následujícím obrázku č. 22 je zřejmé, že významného účinku karvakrolu na *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 se dosáhlo až při koncentraci 500 mg/l. Prvních 24 hodin byl mikroorganismus ovlivněn nejvíce a nedocházelo k žádnému růstu.





Obrázek 22: Vliv karvakrolu na *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

Z následujícího grafu č.23 je zřejmý inhibiční účinek skořicového aldehydu. MIC byla stanovena při nejvyšší testované koncentraci. Koncentrace 250 mg/l po prvních 24. hodinách již zpomalila růst bakteriálního kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 na nezjistitelnou úroveň. Ve srovnání s prostředím bez skořicového aldehydu bylo dosaženo 60% omezení růstu.



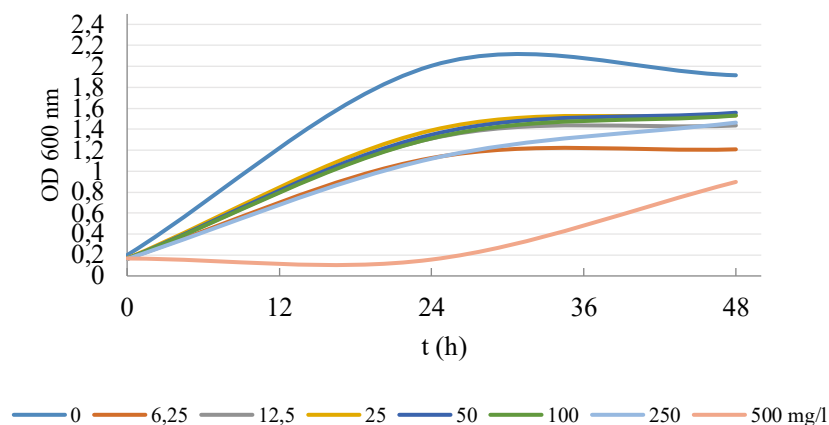
Obrázek 23: Vliv skořicového aldehydu na *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

Diluční metodou byla sledována inhibice u *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946. Při použití koncentrace 500 mg/l skořicového aldehydu doslo k inhibičnímu účinku zcela okamžitě. Druhá nejvyšší koncentrace zastavila růst po 24. hodinách. Koncentrace 500 mg/l karvakrolu působila inhibičně již od začátku.

## 7.2 Vliv aktivních složek esenciálních olejů na bakterie rodu

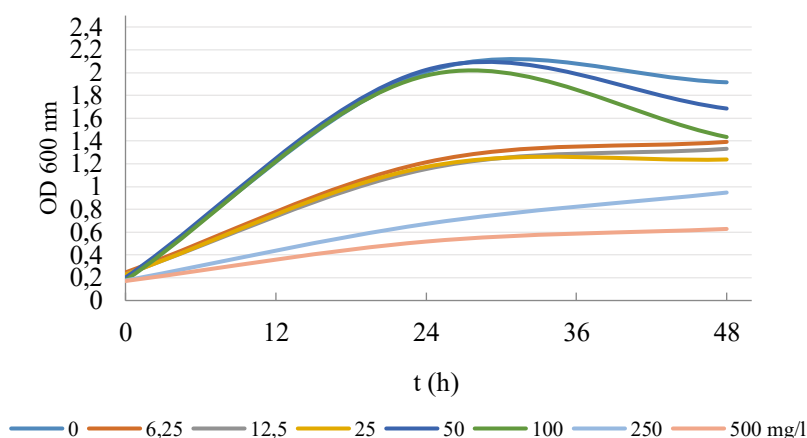
### *Enterococcus*

Inhibiční účinek na *Enterococcus durans* CCDM 53 (Obrázek 24) byl prokázán v první části testování při přidání karvakrolu o koncentraci 500 mg/l do živného média. Použitím koncentrace 25 mg/l byl růst omezen zhruba o třetinu.



Obrázek 24: Vliv karvakrolu na *Enterococcus durans* CCDM 53

Výrazného potlačení růstu *Enterococcus durans* CCDM 53 (Obrázek 25) bylo docíleno při použití skořicového aldehydu o koncentraci 250 mg/l, při níž byl *E. durans* omezen v růstu o 66 %. Koncentrace 500 mg/l vykazovala viditelnou inhibici po 24. hodinách. Ke snížení došlo o 73 % oproti růstu v samotném bujónu.

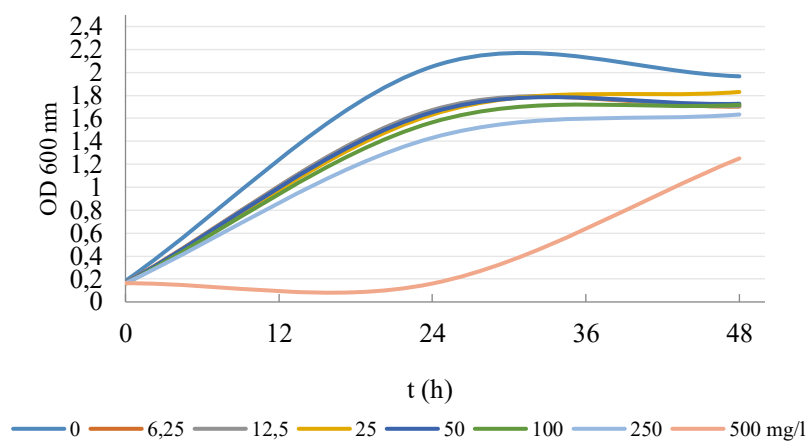


Obrázek 25: Vliv skořicového aldehydu na *Enterococcus durans* CCDM 53

Významného inhibičního účinku u *Enterococcus durans* CCDM 53 bylo docíleno použitím karvakrolu o nejvyšší testované koncentraci 500 mg/l. Při této koncentraci došlo k inhibici

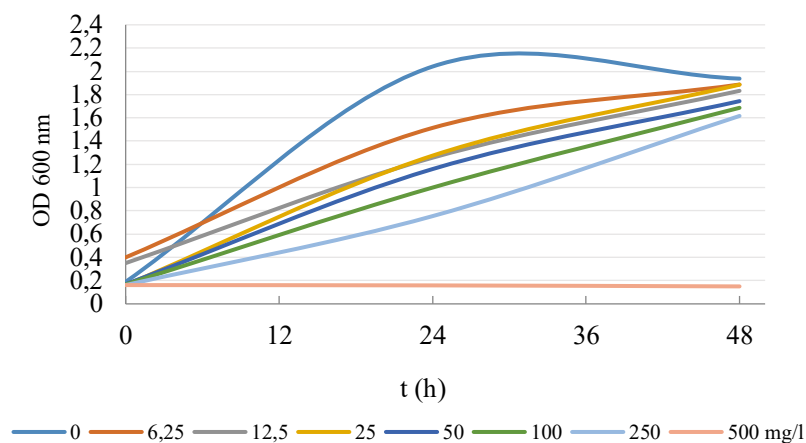
růstu v prvních 24 hodinách testování. Skořicový aldehyd v koncentraci 250–500 mg/l potlačil růst o více než 50 % oproti růstu bez použití aktivní složky ze skořicového esenciálního oleje. Inhibiční účinek nebyl pozorován u eugenolu a linaloolu. Koncentrace potřebné pro inhibiční účinek linaloolu a eugenolu jsou vyšší než 500 mg/l, nebo je dle Garcia, Rebeca a kol. (2019), možné snížit koncentraci pomocí synergického účinku funkčních složek (viz diskuze).

Z obrázku 26 je zřejmé, že použité množství karvakrolu o koncentraci 500 mg/l ovlivnilo a potlačilo růst bakteriální populace *Enterococcus faecalis* CCM 2665 pouze v prvních 24. hodinách testování. Po 48. hodinách byl zaznamenán exponenciální růst. Ostatní testované koncentrace neměly významný vliv na omezení růstu. V testovaných koncentracích bylo po 48. hodinách zjištěno srovnatelné množství *E. faecalis* jako v bujónu samotném.



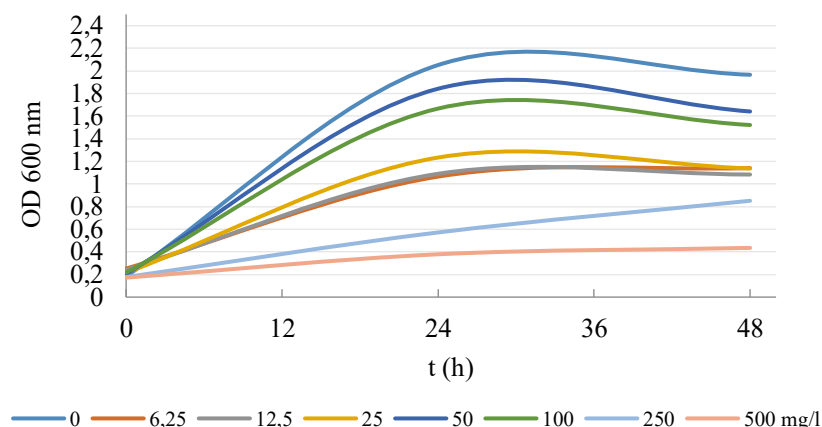
Obrázek 26: Vliv karvakrolu na *Enterococcus faecalis* CCM 2665

U bakterie *Enterococcus faecalis* CCM 2665 byla stanovena MIC pro tymol 500 mg/l (Obrázek 27). Inhibice byla dosažena od začátku. Koncentrace 250 mg/l zpomalila růst dané bakterie v prvních 24 hodinách o 60 % oproti kultivaci bez funkční složky EO. Po 48. hodinách byl index růstu bakterií srovnatelný s prostředím bez obsahu tymolu.



Obrázek 27: Vliv tymolu na *Enterococcus faecalis* CCM 2665

Skořicový aldehyd o koncentraci 500 mg/l působil inhibičně na testovaný kmen *Enterococcus faecalis* CCM 2665 již od začátku (obrázek 28). Nejnižší testovaná koncentrace 6,25 mg/l neměla významný vliv na potlačení růstu testované bakterie. Koncentrace 250 mg/l potlačila růst o 70 % oproti koncentraci 6,25 mg/l.

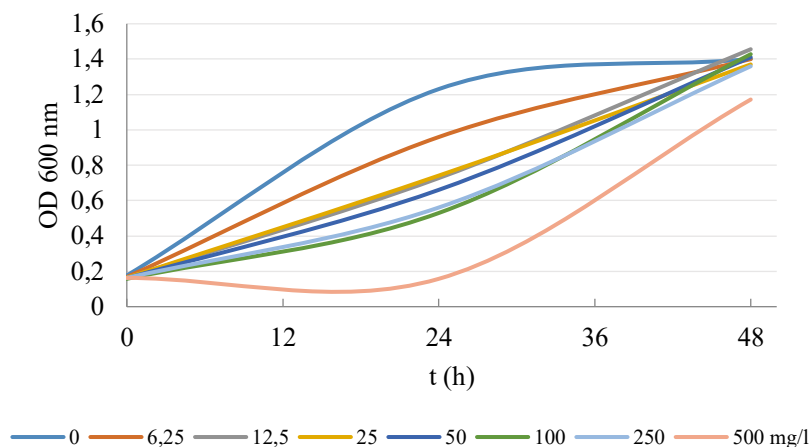


Obrázek 28: Vliv skořicového aldehydu na *Enterococcus faecalis* CCM 2665

Tymol a skořicový aldehyd inhibovaly růst *Enterococcus faecalis* CCM 2665 v nejvyšší testované koncentraci. Karvakrol vykazoval inhibiční aktivitu v prvních 24. hodinách testování, poté došlo k adaptaci dané bakterie a exponenciálnímu nárůstu, který byl zaznamenán po 48. hodinách.

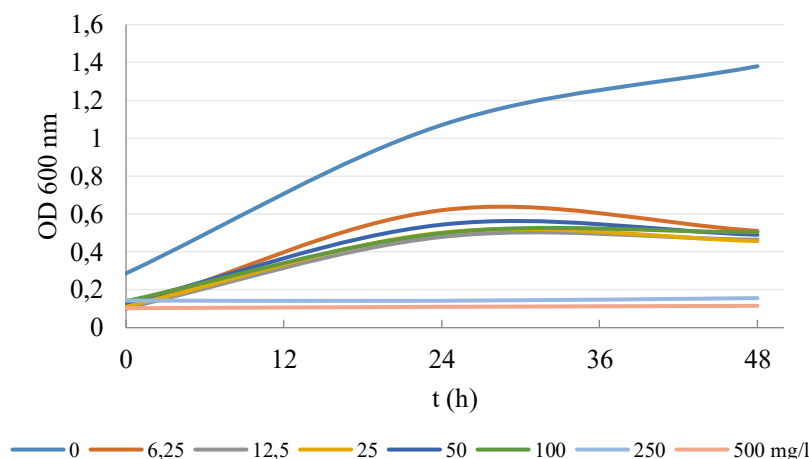
Z obrázku 29 je patrné, že karvakrol o použité koncentraci 500 mg/l prodloužil dobu adaptace *Enterococcus faecalis* CCM 4224 o zhruba 24 hodin. Po 48. hodinách byl vidět exponenciální růst bakterie v daném prostředí. Převážně v prvních hodinách měla každá

koncentrace vliv na růst a množení *E. faecalis* CCM 4224. Na konci testování již ovšem nebyl viditelný vliv na množení *E. faecalis* v prostředí karvakrolu.



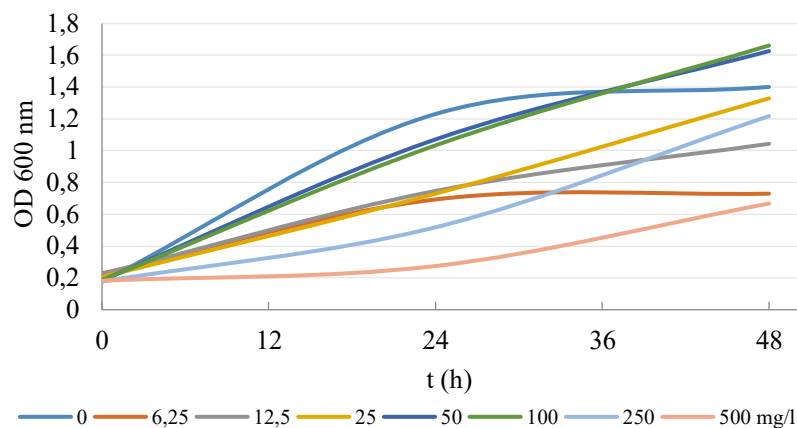
Obrázek 29: Vliv karvakrolu na *Enterococcus faecalis* CCM 4224

Tymol působil na bakterie *Enterococcus faecalis* CCM 4224 ze všech látek nejvíce. Minimální inhibiční koncentrace byla zjištěna od začátku již při použité koncentraci 250 mg/l, Obrázek 30. Nejnižší použitá koncentrace 6,25 mg/l zabránila růstu a množení bakterie o zhruba 45 %. Účinek mezi nejnižší koncentrací a prostředím bez tymolu na konci testování byl velmi významný. Inhibice bakterie *E. faecalis* byl 64 %.



Obrázek 30: Vliv tymolu na *Enterococcus faecalis* CCM 4224

Skořicový aldehyd byl bakterií *E. faecalis* CCM 4224 vnímán nejméně (Obrázek 31). K inhibici došlo do 24 hodin testování pouze u skořicového aldehydu o koncentraci 500 mg/l přidaného do živného média. Koncentrace 250 mg/l měla významný dopad na potlačení růstu mikrobiální populace do 24 hodin. Posledním měřením již ovšem nebyl zaznamenán výrazný vliv na růst bakterie oproti kultivaci bez obsahu aktivní látky.



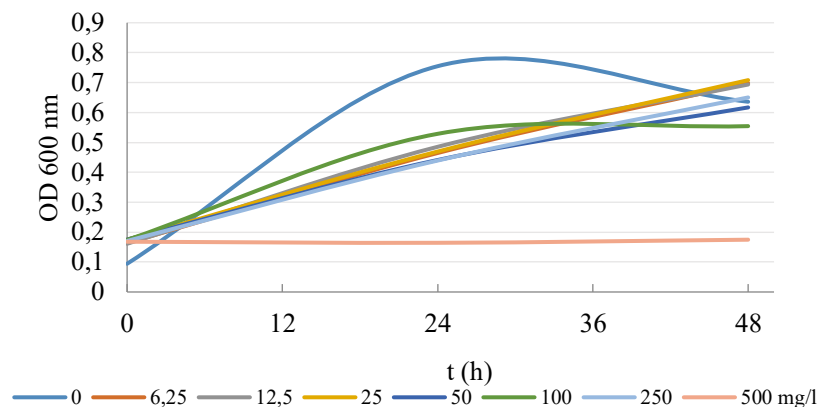
Obrázek 31: Vliv skořicového aldehydu na *Enterococcus faecalis* CCM

4224

Diluční metodou testovaná bakterie *Enterococcus faecalis* CCM 4224 vykazovala největší inhibiční aktivitu k tymolu, který se nachází v převážné většině v esenciálním oleji z tymiánu. Ten již při koncentraci 250 mg/l viditelně zastavil růst. Tymol viditelně působil na *Enterococcus faecalis* i v nejnižší testované koncentraci. Skořicový aldehyd a karvakrol působil na testovaný kmen jen v omezené míře a o při nejvyšší testované koncentraci. Eugenol ani linalool nevykazovaly významný inhibiční účinek.

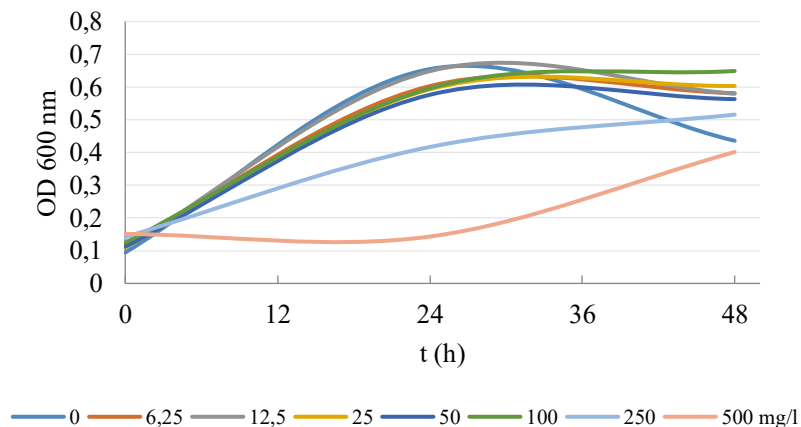
### 7.3 Vliv aktivních složek esenciálních olejů na bakterie rodu *Salmonella*

Pro bakteriální kmen *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 (Obrázek 32) byla zjištěna minimální inhibiční koncentrace při působení karvakrolu o použité koncentraci 500 mg/l. Z grafu je patrné, že inhibice nastala již od začátku. Karvakrol při koncentraci 100 mg/l ovlivnil růst zhruba třetinu s následným zastavením růstu.



Obrázek 32: Vliv karvakrolu na *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *Enteritidis* CCM 4420

Při použití skořicového aldehydu na gramnegativní bakterii *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *Enteritidis* CCM 4420 nebyl při koncentraci 6,25–100 mg/l zaznamenán účinek ovlivňující snížení koncentrace bakteriální populace (Obrázek 33). Koncentrace skořicového aldehydu 500 mg/l účinně zpozdil růst bakterií o 24 hodin. Poté následoval exponenciální růst.

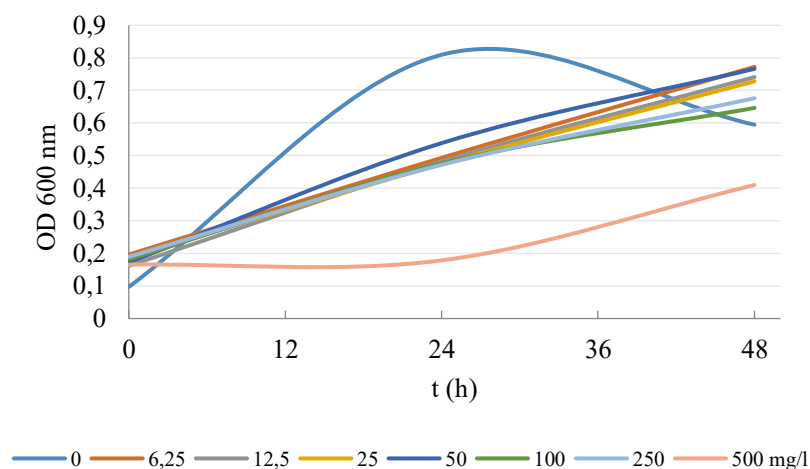


Obrázek 33: Vliv skořicového aldehydu na *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *Enteritidis* CCM 4420

U gramnegativní bakterie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *Enteritidis* byla zaznamenána inhibiční koncentrace 500 mg/l při použití karvakrolu. Použitím skořicového aldehydu o nejvyšší testované koncentrace byla prodloužena lag fáze, po které následoval rychlý, exponenciální růst. Jiné testované látky nevykazovaly inhibiční účinek z důvodu potřebných vyšších koncentrací na inhibici gramnegativních bakterií.

#### 7.4 Vliv aktivních složek esenciálních olejů na bakterie rodu *Proteus*

Na bakteriální kmen *Proteus mirabilis* CCM 7188 (Obrázek 34) působila pozitivně koncentrace karvakrolu 500 mg/l. Nejvyšší testovaná hodnota zpozdila růst bakterie o 1 den, proti ostatním testovaným koncentracím. Z grafu je patrné, že široké rozmezí koncentrací (6,25–250 mg/l) měly vliv na adaptaci *Proteus mirabilis*. Index růstu prvních 24 hodin měření vykazoval určité ovlivnění způsobené karvakrolem. Po 48. hodinách již nebyl detekován žádný účinek karvakrolu.



Obrázek 34: Vliv karvakrolu na *Proteus mirabilis* CCM 7188

Ze všech testovaných látek byl *Proteus mirabilis* CCM 7188 vnímavý pouze na účinek karvakrolu v prvním dni testování. Koncentrace 500 mg/l omezila růst s následným exponenciálním růstem. Eugenol nevykazoval inhibiční koncentraci pro gramnegativní bakterie. V koncentracích 6,25–500 gm/l. Při testování vyšších koncentrací 1000–1500 mg/l by mělo být dosaženo inhibice. V literatuře Devi, K a kol. (2013) bylo dosaženo MIC u bakterie *Proteus mirabilis* při koncentraci 1250 mg/l [97].



## 8 DISKUSE

Esenciální oleje spolu s hlavními funkčními složkami jsou čím dál častěji zkoumány pro další využití v potravinářském průmyslu. Aplikací v potravinách vykazuje zlepšení trvanlivost výrobků, převážně těch, podléhajících rychlé zkáze nebo oxidačním procesům. Esenciální oleje jsou sekundární metabolity rostlin. Jsou studovány kvůli jejich chuti, vůni a antimikrobiálním vlastnostem. Využití těchto látek jako stabilizátorů, konzervantů nebo antioxidantů má velký potenciál v potravinářském a farmaceutickém či kosmetickém průmyslu. V Evropě jsou následující látky přijaty a používány jako látky aromatické. Linalool, tymol, eugenol, karvakrol, skořicový aldehyd, vanilin, citral a limonen jsou navíc zařazené jako látky GRAS, a tudíž nepředstavují pro spotřebitele žádné zdravotní riziko [39].

Na složení esenciálních oleju a množství jednotlivých složek má významný vliv genotyp rostlin, období sklizně a geografické pásmo. Bylo zjištěno, že EO získané z bylin sklizených bezprostředně po rozkvětu vykazují nejlepší složení v rámci antimikrobiální aktivity.

Z publikovaných prací je známo, že esenciální oleje, nebo jejich složky, působí na gramnegativní bakterie rozdílně než na bakterie grampozitivní. Grampozitivní bakterie, jako je *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* a *Bacillus cereus*, jsou citlivější k EO než gramnegativní bakterie, jako je *Escherichia coli* a *Salmonella Enteritidis*. Za nejodolnější bakterie jsou uváděny bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a *Proteus mirabilis* [40, 67]. V této diplomové práci bylo docíleno výraznější inhibice u grampozitivních oproti gramnegativním bakteriím a dále potvrzeno a srovnáno s prací od Calo a kol. (2015), kde byl objasněn mechanismus účinku proti jednotlivým bakteriím. Fenolové sloučeniny, jako karvakrol a tymol působí na dezintegraci vnější membrány gramnegativních bakterií s následným uvolňováním lipopolysacharidů (LPS) a zvýšení propustnosti cytoplazmatické membrány k ATP [86].

Ze studovaných látek patří karvakrol, tymol a skořicový aldehyd k neúčinnějším.

Karvakrol působil nejvíce na testovaný kmen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004, kdy spolu s tymolem a skořicovým aldehydem výrazně zpomalily růst již v koncentraci 250 mg/l. Na bakteriální kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, CCDM 946 působila koncentrace 500 mg/l v souvislosti s minimální inhibiční koncentrací v prvním dni testování. Potlačení

růstové fáze pro nejvyšší testovanou koncentraci vykazoval v prostředí karvakrolu i *Enterococcus durans* CCDM 53 a růst *Enterococcus faecalis* CCM 2665. Působení karvakrolu na *Enterococcus faecalis* CCM 4224 měl po 48. hodinách testování zanedbatelný vliv. Z gramnegativních bakterií byl vnímavý na karvakrol *Proteus mirabilis* CCM 7188 ve 24. hodinách testování. Koncentrace 500 mg/l zpomalila růst s následným exponenciálním růstem. Touto látkou byla zaznamenána inhibice i u bakterie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis při použití karvakrolu o koncentraci 500 mg/l. Porovnáním se studií Gill a Holleye (2006), byla zjištěna koncentrace karvakrolu a eugenolu při niž došlo k okamžitému baktericidnímu účinku u *E. coli*, *Listeria monocytogenes* a *Lactobacillus sakei*. Koncentrace byla účinná v rozmezí 750–1500 mg/l. Koncentrace 200 mg/l karvakrolu nebo tymolu ve studované práci XU, J. a kol. významně inhibovala gramnegativní bakterii [88]. Koncentrace k úplné inhibici jsou v širokém rozpětí v závislosti na mikroorganismu a prostředí. Námi testované bakterie z většiny vykazovaly inhibici při nejvyšší testované koncentraci. Tato koncentrace je blízká koncentracím ze studie Gill a Holleye (2006).

Použité koncentrace tymolu vykazovaly výrazného inhibičního účinku na testované laktokoky. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, CCDM 1004 byly zcela inhibovány při koncentraci 500 mg/l. Zbylé testované mikroorganismy byly potlačeny v prvních 24. hodinách testování. *Enterococcus faecalis* CCM 4224 vykazoval největší inhibiční aktivitu k tymolu, který se nachází v převážné většině v esenciálním oleji z tymiánu. Ten již při koncentraci 250 mg/l viditelně zastavil růst. I v nejnižší testované koncentraci byl zaznamenán výrazný inhibiční účinek. V práci Calsamiglia, S a kol. (2007) se uvádí, že nejlépe prostudovanou složkou esenciálního oleje z tymiánu a oregána je tymol, u kterého byly stanoveny optimální dávky v rozmezí 50–500 mg/l [89]. Testované mikroorganismy vykazovaly největší omezení růstu při koncentracích 250–500 mg/l. Ze studie bylo také zjištěno, že účinky tymolu jsou závislé na pH. Se snižujícím se pH účinnost převážně roste [89]. Snižováním pH by tedy pravděpodobně mohlo dojít k podpoření účinku funkční složky a snížení potřebné koncentrace k inhibici. Ale i bez snížení pH byly naše výsledky adekvátní k rozsahu stanoveným z práce Calsamiglia, S a kol. (2007).

Na skořicový aldehyd byl nejvíce vnímavý *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004. I při nejnižší koncentraci 6,25 mg/l byl zaznamenán nejvyšší inhibiční účinek ze všech testovaných bakterií a při koncentraci 500 mg/l byla stanovena MIC. U *Lactococcus lactis* CCDM 48 bylo při koncentraci 250 mg/l dosaženo výtazného inhibičního účinku.

V prvních 24. hodinách testování působil skořicový aldehyd pozastavením růstu i na *Lactococcus lactis* CCDM 141. Koncentrace 500 mg/l působila inhibičně na kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Na gramnegativní bakterie působil jen v omezeném čase a jen na bakterii *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis, kde byla zaznamenána lag fáze. Aplikace skořicového oleje na bakterii *Salmonella* spp. byla studována Valverde a kol. (2010). Možství použitého oleje v tekutých vejcích, ke snížení bakteriální zátěže o  $10^2$  CFU/g bylo 7000 mg/l [90]. Porovnání s dalším výkumem od Siddiqua, S. a kol. (2015) bylo zjištěno, že inhibice potravinářských patogenů, převážně *E. coli* a *Y. enterocolitica* bylo inhibičního účinku dosaženo při koncentraci 4500 mg/l pro hřebíčkový olej a 5000 mg/l pro skořicový aldehyd [91]. Na inhibici gramnegativních bakterií jsou tedy koncentrace olejů nebo jednotlivých látek mnohem vyšší než námi testované. V porovnání s naší nevyšší koncentrací a koncentrací z předchozích studií, je pravděpodobné, že při 10x zvýšené koncentraci by mohl nastat úplný inhibiční účinek.

V testovaných koncentracích u eugenolu a linaloolu nebyl zaznamenán větší inhibiční účinek na testované grampozitivní a gramnegativní bakterie. Tyto výsledky se shodují s pracemi Garcia, Rebeca a kol. (2019), kde byly sledovány účinky esenciálních olejů a jejich složek. Bylo zjištěno významného synergického účinku mezi karvakrolem, tymolem a eugenolem při zjišťování inhibičního účinku proti *Listeria innocua*. Autoři uvádí, že při použití karvakrolu, tymolu a eugenolu v koncentraci 150, 250, 450 mg/l vykazují látky minimální baktericidní koncentraci na *Listeria innocua*. Synergickým účinkem k úplné inhibici je dostačující použít směs 62,5 mg/l tymolu a 75 mg/l karvakrolu, nebo 56,25 mg/l, tymol a 125 mg/l, eugenolu. Kombinací všech tří složek můžeme použít směs v poměru 75, 31,25 a 56,25 mg/l karvakrol – tymol – eugenol [92]. Eugenol spolu se skořicovým aldehydem působí proti čtyřem potravinářským patogenům. Bylo popsáno, že olej z bazalky působí účinněji než jeho hlavní složka linalool sama o sobě na *Lactobacillus curvatus* a *Saccharomyces cerevisiae* [93]. Testování koncentrací na grampozitivní a gramnegativní bakterie v práci Gang-Joon a kol. (2019) se ukázalo, že eugenol působí výrazněji na gramnegativní bakterie, a to v rozmezí koncentrací 1 250–5 000 mg/l. Grampozitivní rod *Lactococcus* a *Streptococcus* byl vnímavý až mezi koncentracemi 2 500–5 000 mg/l [98]. V diplomové práci nelze srovnat tvrzení od Gang-Joon (2019) z důvodu nízkých testovaných koncentrací, než které se uvádějí v článku. Při testování eugenolu na gramnegativní bakterii *Proteus mirabilis* v práci Devi, K. a kol. (2013) byla zjištěna inhibice při koncentraci 1 250 mg/l [97]. Ve srovnání s testovanými koncentracemi

v diplomové práci je pravděpodobné, že při navýšení koncentrace o zhruba 100–200 %, by mohlo dojít k inhibici gramnegativních bakterií.

Ve studované práci K. Fishera a kol. (2008) bylo zjištěno, že linalool působí na *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157, *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus* a *S. aureus*. Přijatelná MIC byla stanovena v rozmezí 600–1 250 mg/l dle mikroorganismu [94]. Od Inouye. (2003) bylo zjištěno, že koncentrace linaloolu pro inhibici grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* je 3 200 mg/l [96]. Ve srovnání se studovanými koncentracemi linaloolu v předkládané práci je zřejmé, že je třeba použít při testování vyšší koncentrace a proč linalool v testovaných koncentracích nebyl účinný.

Burt (2004) ve své práci prokázal antibakteriální aktivitu esenciálních olejů. Testem in vitro stanovil MIC karvakrolu, eugenolu, tymolu a kyseliny skořicové v rozmezí 50–5 000 mg/l. Pro dosažení inhibičního účinku v potravinách jsou ovšem nutné koncentrace vyšší. Předpokládá se, že bílkoviny nebo tuky chrání bakterie v potravinách před působením EO. Obecně lze říci, že koncentrace potřebné pro inhibici bakterií v potravinách je zhruba 500–20 000 mg/l. Pro aplikaci na ovoce nebo zeleninu 100–10 000 mg/l [95].

Antimikrobní účinky jednotlivých látek nebo esenciálních olejů nejsou zanedbatelné. Velký potenciál se jeví v jejich dalším testování a převážně v jejich synergických účincích pro zajištění co možná nejnižší koncentrace pro další využití.

## ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na ověření antimikrobních vlastností karvakrolu, tymolu, eugenolu, skořicového aldehydu a linaloolu v sedmi koncentracích na grampozitivní bakterie rodu *Lactococcus*, *Enterococcus* a gramnegativní bakterie rodu *Proteus* a *Salmonella*. Tyto látky byly vybrány jako hlavní funkční složky esenciálních olejů. V mnoha případech tyto součásti olejů vykazují lepší antimikrobní vlastnosti než samotné esenciální oleje.

Nevyšší antimikrobní účinek vykazoval skořicový aldehyd na testované laktokoky. Růst bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 byl výrazně omezen i při nejnižší testované koncentraci 6,25 mg/l. U enterokoků byl zaznamenán významný inhibiční účinek při koncentraci 250 a 500 mg/l.

Zcela inhibiční účinek měl tymol v koncentraci 500 mg/l na bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, CCDM 1004. Dále koncentrace 250 mg/l zcela inhibovala bakterii *Enterococcus faecalis* CCM 4224. Karvakrol působil inhibičně na testované bakterie pouze po dobu 24 hodin. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 patřil k nejcitlivějším testovaným kmenům.

Skupina gramnegativních bakterií byla cílová pouze na funkční látku esenciálních olejů karvakrol a skořicový aldehyd. V nejvyšší testované koncentraci byl zaznamenán bakteriostatický účinek v prvních 24. hodinách.

Tyto funkční látky působily inhibičně na sledované skupiny mikroorganismů. Obecně lze říci, že jsou vhodnými variantami při aplikaci v potravinářském průmyslu a potravinách. Velký potenciál se jeví při hledání nových alternativ využití těchto funkčních složek či esenciálních olejů.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] ZHANG, Yu-jia et al., 2019. A review of pretreatment and analytical methods of biogenic amines in food and biological samples since 2010. *Journal of Chromatography A*. 1605. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.07.015. ISSN 0021-9673. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196731930745>
- [2] SAHU, Lopamudra et al., 2015. Biogenic Amines in Fermented Foods: Overview. *Fermented Foods, Part I*. CRC Press, 318-332. DOI: 10.1201/b19872-18. ISBN 978-1-4987-4079-1. Dostupné také z: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/b19872-18>
- [3] FUSEK, Michal, Jaroslav MICHÁLEK, Leona BUŇKOVÁ, František BUŇKA, Søren Balling ENGELSEN, Chengjian XU a Caihong JIANG. Modelling biogenic amines in fish meat in Central Europe using censored distributions: a key freshness parameter of animal protein products in the coming circular economy. *Chemosphere*. 2020, 251(2), 42-49. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126390. ISSN 0045-6535. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004565352030583X>
- [4] ALVAREZ, Miguel A., Ma Victoria MORENO-ARRIBAS, Bekzod KHAKIMOV, Ulrik AUNSKJÆR, Søren Balling ENGELSEN, Chengjian XU a Caihong JIANG. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution: a key freshness parameter of animal protein products in the coming circular economy. *Current Opinion in Food Science*. 2014, 39(2), 146-155. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.07.007. ISSN 0924-2244. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224414001599>
- [5] HALÁSZ, Anna, Ágnes BARÁTH, Livia SIMON-SARKADI, Wilhelm HOLZAPFEL, Søren Balling ENGELSEN, Chengjian XU a Caihong JIANG. Biogenic amines and their production by microorganisms in food: a key freshness parameter of animal protein products in the coming circular economy. *Current Opinion in Food Science*. 1994, 5(2), 42-49. DOI: 10.1016/0924-2244(94)90070-1. ISSN 0924-2244. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0924224494900701>

- [6] SØRENSEN, Klavs Martin, Violetta ARU, Bekzod KHAKIMOV, Ulrik AUNSKJÆR, Søren Balling ENGELSEN, Chengjian XU a Caihong JIANG. Biogenic amines: a key freshness parameter of animal protein products in the coming circular economy. *Current Opinion in Food Science*. 2018, 22, 167-173. DOI: 10.1016/j.cofs.2018.05.014. ISSN 2214-7993. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214799318300079>
- [7] ERDAG, Dincer, Oguz MERHAN a Baris YILDIZ, 2019. Biochemical and Pharmacological Properties of Biogenic Amines: A Review. *Biogenic Amines*. IntechOpen, 30(1), 71-90. DOI: 10.5772/intechopen.81569. ISBN 978-1-78984-133-6. ISSN 8755-9129. Dostupné také z: <https://www.intechopen.com/books/biogenic-amines/biochemical-and-pharmacological-properties-of-biogenic-amines>
- [8] HUANG, Hua et al., 2018. Biochemical and Pharmacological Properties of Biogenic Amines: A Review. *Frontiers in Immunology*. IntechOpen, 9(1), 71-90. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01392. ISBN 978-1-78984-133-6. ISSN 1664-3224. Dostupné také z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.01392/full>
- [9] NAILA, Aishath et al., 2010. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science*. 75(7), R139-R150. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x. ISSN 0022-1147. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x>
- [10] LEHANE, Leigh a June OLLEY, 2000. Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*. 58(1-2), 1-37. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00296-8. ISSN 0168-1605. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160500002968>
- [11] RUSSO, Pasquale et al., 2012. Biogenic amine production by the wine *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 in systems that partially mimic the gastrointestinal tract stress. *BMC Microbiology*. 12(1). DOI: 10.1186/1471-2180-12-247. ISSN 1471-2180. Dostupné také z: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-12-247>

- [12] Tyramine, In: Wikimedia Commons [online]. [cit. 2020-05-02]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tyramine.png>
- [13] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Putrescine, CID=1045, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Putrescine> (accessed on Mar. 9, 2020)
- [14] Putrescine, In: Chegg Study [online]. [cit. 2020-05-02]. Dostupné z: <https://www.chegg.com/homework-help/questions-and-answers/pyridoxal-phosphate-dependent-enzyme-ornithine-decarboxylase-catalyzes-decarboxylation-orn-q28200711>
- [15] MA, Weichao, Kequan CHEN, Yan LI, Ning HAO, Xin WANG, Pingkai OUYANG, J.D. COÏSSON a T. GARDE-CERDÁN. Advances in Cadaverine Bacterial Production and Its Applications: Influence of oenological factors. Engineering. 2017, 3(3), 308-317. DOI: 10.1016/J.ENG.2017.03.012. ISSN 2095-8099. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S209580991730423X>
- [16] Cadaverine [online], In: [cit. 2020-05-02]. Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/Biotransformation-of-pyridoxal-5'-phosphate-from-by-Kim-Kim/ef4811f3938017525b6ee6a5516c98d9bd90be6a/figure/1>
- [17] WILLIAMS, Brianna B. et al., 2014. Discovery and Characterization of Gut Microbiota Decarboxylases that Can Produce the Neurotransmitter Tryptamine. Engineering. 16(4), 495-503. DOI: 10.1016/j.chom.2014.09.001. ISSN 1931-3128. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312814003096>
- [18] COSTA, Daniel J.E. et al., 2016. Determination of tryptamine in foods using square wave adsorptive stripping voltammetry. Talanta. 154(4), 134-140. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.03.063. ISSN 0039-9140. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914016301862>
- [19] Tryptamine [online], In: [cit. 2020-05-02]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/File:Tryptophan\\_decarboxylation\\_\(en\).svg](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Tryptophan_decarboxylation_(en).svg)
- [20] KUORWEL, Kuorwel K. et al., 2011. Essential Oils and Their Principal Constituents as Antimicrobial Agents for Synthetic Packaging Films. Journal of Food Science. 76(9), R164-R177. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02384.x. ISSN 0022-1147. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2011.02384>.



- [21] GARDINI, Fausto, Yesim ÖZOGUL, Giovanna SUZZI, Giulia TABANELLI, Fatih ÖZOGUL, Chengjian XU a Caihong JIANG. Technological Factors Affecting Biogenic Amine Content in Foods: A Review. *Frontiers in Microbiology*. 2016, 7(2), 42-49. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01218. ISSN 1664-302X. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.01218/abstract>
- [22] RUIZ-CAPILLAS, Claudia et al., 2019. Impact of Biogenic Amines on Food Quality and Safety. *Foods*. 8(2), 134-140. DOI: 10.3390/foods8020062. ISSN 2304-8158. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2304-8158/8/2/62>
- [23] GUTIERREZ, J., C. BARRY-RYAN a P. BOURKE, 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*. 26(2), 142-150. DOI: 10.1016/j.fm.2008.10.008. ISSN 0740-0020. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002008001986>
- [24] ÖZOGUL, Yesim a Fatih ÖZOGUL, 2019. Chapter 1. Biogenic Amines Formation, Toxicity, Regulations in Food. *Biogenic Amines in Food*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1-17. *Food Chemistry, Function and Analysis*. DOI: 10.1039/9781788015813-00001. ISBN 978-1-78801-436-6. Dostupné také z: <http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781788015813-00001>
- [25] LU, Shiling et al., 2015. The effects of starter cultures and plant extracts on the biogenic amine accumulation in traditional Chinese smoked horsemeat sausages. *Food Control*. 50, 869-875. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.08.015. ISSN 0956-7135. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713514004642>
- [26] DEL RIO, Beatriz, Begoña REDRUELLO, Daniel M. LINARES, Victor LADERO, Maria FERNANDEZ, Maria Cruz MARTIN, Patricia RUAS-MADIEDO a Miguel A. ALVAREZ. The dietary biogenic amines tyramine and histamine show synergistic toxicity towards intestinal cells in culture: Effect of storage conditions. *Food Chemistry*. 2017, 218, 249-255. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.046. ISSN 0308-8146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616314297>

- [27] LORENZO, C. et al., 2017. The impacts of temperature, alcoholic degree and amino acids content on biogenic amines and their precursor amino acids content in red wine. *Food Research International*. 99, 328-335. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.05.016. ISSN 0963-9969. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399691730217X>
- [28] MARQUES, Ana P., Maria C. LEITÃO a Maria V. SAN ROMÃO, 2008. Biogenic amines in wines: Influence of oenological factors. *Food Chemistry*. 107(2), 853-860. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.09.004. ISSN 0308-8146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607009193>
- [29] MOZZON, Massimo et al., 2015. Occurrence of biogenic amines in beers produced with malted organic Emmer wheat (*Triticum dicoccum*). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 78(1), 1-12. DOI: 10.1080/19440049.2015.1015458. ISSN 1944-0049. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19440049.2015.1015458>
- [30] VINCI, Giuliana a Lucia MADDALONI, 2020. Biogenic Amines in Alcohol-Free Beverages. *Beverages*. 6(1), 489-599. DOI: 10.3390/beverages6010017. ISSN 2306-5710. Dostupné také z: <https://www.mdpi.com/2306-5710/6/1/17>
- [31] NAŘÍZENÍ KOMISE (EU), 2013. 1019. Brusel, 2013(1019)
- [32] LEHANE, Leigh et al., 2000. Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*. 58(1-2), 1-37. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00296-8. ISSN 0168-1605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160500002968>
- [33] PRESTER, Ljerka a June OLLEY, 2011. Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 28(11), 1547-1560. DOI: 10.1080/19440049.2011.600728. ISSN 1944-0049. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19440049.2011.600728>
- [34] RUIZ-CAPILLAS, CLAUDIA a FRANCISCO JIMÉNEZ-COLMENERO, 2005. Biogenic Amines in Meat and Meat Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44(7-8), 489-599. DOI: 10.1080/10408690490489341. ISSN 1040-8398. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408690490489341>

- [35] LINARES, Daniel M. et al., 2011. Biogenic Amines in Dairy Products: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51(7), 691-703. DOI: 10.1080/10408398.2011.582813. ISSN 1040-8398. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2011.582813>
- [36] FLASAROVÁ, Radka et al., 2016. Biogenic amine production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains in the model system of Dutch-type cheese. *Food Chemistry*. 194, 68-75. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.07.069. ISSN 0308-8146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615010900>
- [37] MOHAMMED, G.I. et al., 2016. A critical overview on the chemistry, clean-up and recent advances in analysis of biogenic amines in foodstuffs. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 78(1), 84-94. DOI: 10.1016/j.trac.2016.02.007. ISSN 0165-9936. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993615301539>
- [38] NAZZARO, Filomena et al., 2013. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria: Influence of oenological factors. *Pharmaceuticals*. 6(12), 1451-1474. DOI: 10.3390/ph6121451. ISSN 1424-8247. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1424-8247/6/12/1451>
- [39] LLANA-RUIZ-CABELLO, Maria et al., 2015. In vitro toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: A review. *Food and Chemical Toxicology*. 81(4), 9-27. DOI: 10.1016/j.fct.2015.03.030. ISSN 0278-6915. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S027869151500109X>
- [40] RAUT, Jayant Shankar et al., 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils: A review. *Industrial Crops and Products*. 62(9), 250-264. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.05.055. ISSN 0926-6690. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669014005196>
- [41] BASSOLÉ, Imaël Henri Nestor a H. Rodolfo JULIANI, 2012. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules*. 17(4), 3989-4006. DOI: 10.3390/molecules17043989. ISSN 1420-3049. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/4/3989>

- [42] TOMAINO, A. et al., 2005. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils: Influence of oenological factors. *Food Chemistry*. 89(4), 549-554. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.03.011. ISSN 0308-8146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814604002407>
- [43] CHENG, Junfeng et al., 2019. An active packaging film based on yam starch with eugenol and its application for pork preservation. *Food Hydrocolloids*. 96, 546-554. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2019.06.007. ISSN 0268-005X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X19305934>
- [44] SUPPAKUL, Panuwat et al., 2008. Efficacy of polyethylene-based antimicrobial films containing principal constituents of basil: Influence of oenological factors. *LWT – Food Science and Technology*. 41(5), 779-788. DOI: 10.1016/j.lwt.2007.06.006. ISSN 0023-6438. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643807002265>
- [45] JAFRI, Huma, Firoz Ahmad ANSARI a Iqbal AHMAD, 2019. Prospects of Essential Oils in Controlling Pathogenic Biofilm. *New Look to Phytomedicine*. Elsevier, 203-236. DOI: 10.1016/B978-0-12-814619-4.00009-4. ISBN 978-0-1281-4619-4. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128146194000094>
- [46] GADKARI, Rahul Rajkumar et al., 2019. Green synthesis of chitosan-cinnamaldehyde cross-linked nanoparticles: Characterization and antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*. 226(1-2), 1-37. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115298. ISSN 0144-8617. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861719309658>
- [47] LAMBERT, R.J.W. et al., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, tymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 91(3), 453-462. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x. ISSN 1364-5072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
- [48] SINGH, A. et al., 2003. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. *LWT – Food Science and Technology*. 36(8), 787-794. DOI: 10.1016/S0023-6438(03)00112-9. ISSN 0023-6438. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643803001129>

- [49] BUSATTA, C. et al., 2008. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*. 25(1), 207-211. DOI: 10.1016/j.fm.2007.07.003. ISSN 0740-0020. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S074000200700086X>
- [50] JAYASENA, Dinesh D. a Cheorun JO, 2013. Potential Application of Essential Oils as Natural Antioxidants in Meat and Meat Products: A Review. *Food Reviews International*. 30(1), 71-90. DOI: 10.1080/87559129.2013.853776. ISSN 8755-9129. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/87559129.2013.853776>
- [51] KARAM, Layal et al., 2019. Combined effects of tymol, carvacrol and packaging on the shelf-life of marinated chicken. *International Journal of Food Microbiology*. 291, 42-47. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.008. ISSN 0168-1605. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160518308869>
- [52] VAN HAUTE, S. et al., 2016. The effect of cinnamon, oregano and thyme essential oils in marinade on the microbial shelf life of fish and meat products. *Food Control*. 68, 30-39. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.03.025. ISSN 0956-7135. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713516301311>
- [53] MOON, Hyeree a Min Suk RHEE, 2016. Synergism between carvacrol or tymol increases the antimicrobial efficacy of soy sauce with no sensory impact. *International Journal of Food Microbiology*. 217, 35-41. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.009. ISSN 01681605. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160515301422>
- [54] GARDINI, Fausto et al., 2016. Technological Factors Affecting Biogenic Amine Content in Foods: A Review. *Frontiers in Microbiology*. 7(7), 800-805. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01218. ISSN 1664-302X. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.01218/abstract>
- [55] SHARIFIFAR, F. et al., 2007. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control*. 18(7), 800-805. DOI: 10.1016/j.foodcont.2006.04.002. ISSN 09567135. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713506001125>

- [56] OLMEDO, Rubén H., Valeria NEPOTE a Nelson R. GROSSO, 2013. Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. *LWT – Food Science and Technology*. 53(2), 409-417. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.04.007. ISSN 0023–6438. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643813001333>
- [57] MANDAL, Manisha a Shyamapada MANDAL, 2016. Cumin (*Cuminum cyminum* L.) Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier, 377-383. DOI: 10.1016/B978-0-12-416641-7.00042-0. ISBN 978-0-1241-6641-7. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124166417000420>
- [58] AMEH, Sunday J. a Obiageri OBODOZIE-OFOEGBU, 2016. Essential Oils as Flavors in Carbonated Cola and Citrus Soft Drinks. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier, 111-121. DOI: 10.1016/B978-0-12-416641-7.00011-0. ISBN 978-0-1241-6641-7. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124166417000110>
- [59] HYLDGAARD, Morten et al., 2012. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology*. 3, 286-292. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00012. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00012/abstract>
- [60] SIMIONATO, Ilaria et al., 2019. Encapsulation of cinnamon oil in cyclodextrin nanospheres and their potential use for antimicrobial food packaging. *Food and Chemical Toxicology*. 132. DOI: 10.1016/j.fct.2019.110647. ISSN 0278-6915. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691519304363>
- [61] TONYALI, Bade et al., 2020. Release kinetics of cinnamaldehyde, eugenol, and tymol from sustainable and biodegradable active packaging films. *Food Packaging and Shelf Life*. 24. DOI: 10.1016/j.fpsl.2020.100484. ISSN 2214-2894. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214289419305848>
- [62] GRANATA, Giuseppe et al., 2018. Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. *Food Chemistry*. 269, 286-292. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.06.140. ISSN 0308-8146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618311166>

- [63] ADELAKUN, Oluyemisi Elizabeth, Olusegun James OYELADE a Bosede Folake OLANIPEKUN, 2016. Use of Essential Oils in Food Preservation. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier, 71-84. DOI: 10.1016/B978-0-12-416641-7.00007-9. ISBN 978-0-1241-6641-7. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124166417000079>
- [64] DHIFI, Wissal et al., 2016. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines*. 3(4), 453-462. DOI: 10.3390/medicines3040025. ISSN 2305-6320. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2305-6320/3/4/25>
- [65] BAKKALI, F. et al., 2008. Biological effects of essential oils – A review: a review. *Food and Chemical Toxicology*. 46(2), 446-475. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.106. ISSN 0278-6915. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691507004541>
- [66] HYLDGAARD, Morten et al., 2012. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology*. 3(4), 453-462. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00012. ISSN 1664-302X. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00012/abstract>
- [67] TORRES MANNÓ, Mariano et al., 2018. Genetic and phenotypic features defining industrial relevant *Lactococcus lactis*, *L. cremoris* and *L. lactis* biovar. *diacetylactis* strains: An Integrative Approach to Evaluate the Biodiversity of *Lactococcus lactis*. *Journal of Biotechnology*. 282(2), 25-31. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2018.06.345. ISSN 0168-1656. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165618305224>
- [68] LAROUTE, Valérie et al., 2017. From Genome to Phenotype: An Integrative Approach to Evaluate the Biodiversity of *Lactococcus lactis*. *Microorganisms*. 5(2), 3597-3610. DOI: 10.3390/microorganisms5020027. ISSN 2076-2607. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2076-2607/5/2/27>
- [69] *Lactococcus lactis* bacteria, SEM [online], In: [cit. 2020-05-02]. Dostupné z: <https://www.sciencephoto.com/media/589932/view/lactococcus-lactis-bacteria-sem>

- [70] MCAULIFFE, Olivia, 2018. Symposium review: *Lactococcus lactis* from nondairy sources. *Journal of Dairy Science*. 101(4), 3597-3610. DOI: 10.3168/jds.2017-13331. ISSN 0022-0302. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030218300444>
- [71] HO, Van Thi Thuy et al., 2018. Characterisation of *Lactococcus lactis* isolates from herbs, fruits and vegetables for use as biopreservatives against *Listeria monocytogenes* in cheese: An Integrative Approach to Evaluate the Biodiversity of *Lactococcus lactis*. *Food Control*. 85(2), 472-483. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.09.036. ISSN 0956-7135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095671351730453X>
- [72] KIM, Se-Hyung et al., 2020. High prevalence of non-faecalis and non-faecium *Enterococcus* spp. in farmstead cheesehouse and their applicability as hygiene indicators: An Integrative Approach to Evaluate the Biodiversity of *Lactococcus lactis*. *LWT*. 196(1-2), 95-105. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109271. ISSN 0023-6438. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643820302590>
- [73] *Enterococcus faecalis* bacteria [online], In: [cit. 2020-05-02]. Dostupné z: <https://www.sciencephoto.com/media/12964/view>
- [74] ABRIOUEL, Hikmate et al., 2008. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples: An Integrative Approach to Evaluate the Biodiversity of *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*. 123(1-2), 38-49. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.067. ISSN 0168-1605. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816050700654X>
- [75] LADERO, V. et al., 2013. Draft Genome Sequence of the Tyramine Producer *Enterococcus durans* Strain IPLA 655: Survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties. *Genome Announcements*. 1(3), e00265-13. DOI: 10.1128/genomeA.00265-13. ISSN 2169-8287. Dostupné také z: <http://genomea.asm.org/cgi/doi/10.1128/genomeA.00265-13>



- [76] KIM, Se-Hyung et al., 2020. High prevalence of non-faecalis and non-faecium *Enterococcus* spp. in farmstead cheesehouse and their applicability as hygiene indicators: Survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties. *LWT*. 100(2), 933-949. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109271. ISSN 0023-6438. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643820302590>
- [77] ZHONG, Zhi et al., 2017. Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*: An Integrative Approach to Evaluate the Biodiversity of *Lactococcus lactis*. *Microbiological Research*. 196(1-2), 95-105. DOI: 10.1016/j.micres.2016.12.009. ISSN 0944-5013. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501316306140>
- [78] AMARAL, Daniel M.F. et al., 2017. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolated from cheese: Survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties. *Journal of Dairy Science*. 100(2), 933-949. DOI: 10.3168/jds.2016-11513. ISSN 0022-0302. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030216308712>
- [79] FABREGA, A., J. VILA a Rikke Louise MEYER, 2013. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation. *Clinical Microbiology Reviews*. 26(2), 308-341. DOI: 10.1128/CMR.00066-12. ISSN 0893-8512. Dostupné také z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00066-12>
- [80] *Salmonella typhimurium* bacteria, SEM [online], In: [cit. 2020-05-02]. Dostupné z: <https://www.sciencephoto.com/media/12369/view>
- [81] KARNS, J.S. et al., 2005. Prevalence of *Salmonella enterica* in Bulk Tank Milk from US Dairies as Determined by Polymerase Chain Reaction: Survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties. *Journal of Dairy Science*. 88(10), 3475-3479. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(05)73031-9. ISSN 0022-0302. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030205730319>
- [82] BARRERE, Virginie et al., 2020. Optimization of *Salmonella* detection in garlic, onion, cinnamon, red chili pepper powders and green tea. *International Journal of Food Microbiology*. 316. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108440. ISSN 0168-1605. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816051930371X>

- [83] DRZEWIECKA, Dominika et al., 2016. Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments: Survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties. *Microbial Ecology*. 72(4), 741-758. DOI: 10.1007/s00248-015-0720-6. ISSN 0095-3628. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00248-015-0720-6>
- [84] *Proteus* sp bacteria, SEM [online], In: [cit. 2020-05-02]. Dostupné z: <https://www.sciencephoto.com/media/11830/view/teus-sp-bacteria-sem>
- [85] WANG, Yong et al., 2010. An outbreak of *Proteus mirabilis* food poisoning associated with eating stewed pork balls in brown sauce, Beijing. *Food Control*. 21(3), 302-305. DOI: 10.1016/j.foodcont.2009.06.009. ISSN 0956-7135. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713509001856>
- [86] CALO, Juliany Rivera et al., 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control*. 54, 111-119. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.12.040. ISSN 0956-7135. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713515000456>
- [87] Mikrobiologie potravin, krmiv a vody – Příprava, výroba, uchovávání a zkoušení výkonnosti kultivačních půd: ČSN EN ISO 11133, 2014. 3. Hradec Králové: Česká technická norma
- [88] XU, J. et al., 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*. 47(3), 174-179. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x. ISSN 0266-8254. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x>
- [89] CALSAMIGLIA, S. et al., 2007. Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science*. 90(6), 2580-2595. DOI: 10.3168/jds.2006-644. ISSN 0022-0302. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030207700693>
- [90] BAJPAI, Vivek K. et al., 2012. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*. 45(2), 722-734. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.04.052. ISSN 0963-9969. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996911002912>

- [91] SIDDIQUA, S. et al., 2015. Antibacterial activity of cinnamaldehyde and clove oil: effect on selected foodborne pathogens in model food systems and watermelon juice. *Journal of Food Science and Technology*. 52(9), 5834-5841. DOI: 10.1007/s13197-014-1642-x. ISSN 0022-1155. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-014-1642-x>
- [92] GARCÍA-GARCÍA, Rebeca et al., 2011. Bactericidal Action of Binary and Ternary Mixtures of Carvacrol, Tymol, and Eugenol against *Listeria innocua*: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Food Science*. 76(2), M95-M100. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.02005.x. ISSN 0022-1147. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2010.02005.x>
- [93] JU, Jian et al., 2020. Synergistic properties of citral and eugenol for the inactivation of foodborne molds in vitro and on bread: effect on selected foodborne pathogens in model food systems and watermelon juice. *LWT*. 122(9), 5834-5841. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109063. ISSN 0023-6438. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643820300517>
- [94] FISHER, Katie a Carol PHILLIPS, 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer. 19(3), 156-164. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.11.006. ISSN 0924-2244. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224407003548>
- [95] BURT, Sara, 2004. Essential oils: the irantibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94(3), 223-253. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022. ISSN 0168–1605. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160504001680>
- [96] INOUE, S, 2003. Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 1). *International Journal of Aromatherapy*. 13(2-3), 95-107. DOI: 10.1016/S0962-4562(03)00081-X. ISSN 0962–4562. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096245620300081X>
- [97] DEVI, K. Pandima et al., 2013. Eugenol altersthe integrity of cell membrane and acts against the nosocomial pathogen *Proteus mirabilis*. *Archives of Pharmacal Research*. 36(3), 282-292. DOI: 10.1007/s12272-013-0028-3. ISSN 0253–6269. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12272-013-0028-3>

- [98] GANG-JOON, Heo, 2019. Antibacterial activity of clove essential oil and eugenol against fish pathogenic bacteria isolated from cultured olive flounder (*paralichthys olivaceus*). Slovenian veterinary research. 56(1). DOI: 10.26873/SVR-590-2018. ISSN 1580-4003. Dostupné také z: <https://slovetres.si/index.php/SVR/article/view/590>

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

EO	Esenciální olej
BA	Biogenní amin
NK	Negativní kontrola
PK	Pozitivní kontrola
MIC	Minimální inhibiční koncentrace

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma vzniku histaminu [8] .....	14
Obrázek 2: Schéma vzniku tyraminu [12] .....	14
Obrázek 3: Schéma vzniku putrescinu [14] .....	15
Obrázek 4: Schéma vzniku kadaverinu [16] .....	15
Obrázek 5: Schéma vzniku tryptaminu [19] .....	16
Obrázek 6: <i>Lactococcus</i> [69] .....	30
Obrázek 7: <i>Enterococcus</i> [73] .....	31
Obrázek 8: <i>Salmonella</i> [80] .....	32
Obrázek 9: <i>Proteus</i> [84] .....	33
Obrázek 10: Vliv karvakrolu na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48 .....	41
Obrázek 11: Vliv tymolu na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48 .....	42
Obrázek 12: Vliv skořicového aldehydu na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48 .....	42
Obrázek 13: Vliv eugenolu na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48 .....	43
Obrázek 14: Vliv tymolu na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141 .....	44
Obrázek 15: Vliv skořicového aldehydu na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141 .....	44
Obrázek 16: Vliv karvakrolu na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004 .....	45
Obrázek 17: Vliv tymolu na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004 .....	45
Obrázek 18: Vliv skořicového aldehydu na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004 .....	46
Obrázek 19: Vliv karvakrolu na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 .....	47
Obrázek 20: Vliv tymolu na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 .....	47
Obrázek 21: Vliv skořicového aldehydu na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 .....	48
Obrázek 22: Vliv karvakrolu na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946 .....	49
Obrázek 23: Vliv skořicového aldehydu na <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946 .....	49
Obrázek 24: Vliv karvakrolu na <i>Enterococcus durans</i> CCDM 53 .....	50
Obrázek 25: Vliv skořicového aldehydu na <i>Enterococcus durans</i> CCDM 53 .....	50
Obrázek 26: Vliv karvakrolu na <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2665 .....	51
Obrázek 27: Vliv tymolu na <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2665 .....	52
Obrázek 28: Vliv skořicového aldehydu na <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2665 .....	52
Obrázek 29: Vliv karvakrolu na <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224 .....	53
Obrázek 30: Vliv tymolu na <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224 .....	53
Obrázek 31: Vliv skořicového aldehydu na <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224 .....	54
Obrázek 32: Vliv karvakrolu na <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. <i>Enteritidis</i> CCM 4420 .....	55

---

<i>Obrázek 33: Vliv skořicového aldehydu na Salmonella enterica subsp. enterica ser. Enteritidis CCM 4420 .....</i>	<i>55</i>
<i>Obrázek 34: Vliv karvakrolu na Proteus mirabilis CCM 7188 .....</i>	<i>56</i>

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tabulka 1: Dekarboxyláza pozitivní MO v potravinách v [37] .....</i>	20
<i>Tabulka 2: Přehled EO a jejich složek v obalových systémech [63] .....</i>	27
<i>Tabulka 3: Jednotlivé vzorky v 96-ti jamkové mikrotitrační destičce .....</i>	39



