

Antimikrobní působení esenciálních olejů na bakterie produkující biogenní aminy

Bc. Viera Nováková

Diplomová práce
2018/2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Viera Nováková**
Osobní číslo: **T16562**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Antimikrobní působení esenciálních olejů na bakterie produkující biogenní aminy**

Zásady pro vypracování:

1. Mikroorganismy produkující biogenní aminy. Specifikace použitých mikroorganismů.
2. Možnosti redukce výskytu dekarboxylázo-pozitivních mikroorganismů.
3. Esenciální oleje a jejich chemické složení. Biologická aktivita esenciálních olejů na dané mikroorganismy.
4. Sledování antimikrobiální účinnosti esenciálních olejů na dané mikroorganismy.
5. Zpracování a vyhodnocení výsledků.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* Tábor: OSSIS, 2009.

[2] KALAČ, P. Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005–mid 2013. *Food Chemistry*. 2014,161, 27–39.

[3] DAVIDSON, P. M., SOFOS, J. N., BRANNERN, A. L. *Antimicrobials in food*, CRC Press, Boca Raton, 2005.

[4] **Vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect, SciFinder Scholar, Medline aj.**

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

2. února 2019

Termín odevzdání diplomové práce:

3. května 2019

Ve Zlíně dne 2. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Jiří Miček, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně

.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

V diplomové práci byl sledován vliv vybraných esenciálních olejů na růst bakteriálních kmenů produkujících biogenní aminy. Teoretická část klasifikuje použité bakteriální kmeny, chemické složení esenciálních olejů a specifikace sledovaných biogenních aminů. Praktická část byla věnována antibakteriálním účinkům použitých esenciálních olejů. Z výsledků je patrné, že minimální inhibiční koncentrace se u testovaných olejů pohybovala v rozmezí 250 - 1500 mg/l. Dále byl sledován vliv esenciálních olejů na produkci biogenních aminů fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu u vybraných dekarboxyláza-pozitivních bakterií. Výsledky poukazují na dosažení minimální inhibiční koncentrace (250 mg/l) u rodu *Lactococcus* při aplikaci esenciálního oleje z oregana. U bakteriálního kmene *Enterococcus durans* CCDM 53 bylo zaznamenáno největší snížení produkce biogenního aminu kadaverinu až o 80 %. Použitá koncentrace esenciálního oleje byla 1000 mg/l. Celkově gram-pozitivní bakterie byly vnímavější na aplikaci testovaných esenciálních olejů. Snížená produkce biogenních aminů u gram-negativních bakterií byla zjištěna u kmene *Proteus mirabilis* CCM 7188, kdy bylo zjištěno přibližné snížení o 20 % působením esenciálních olejů z tymiánu, rozmarýnu a lemongras, každý v koncentraci 500 mg/l. Esenciální olej z tymiánu měl při koncentraci 1000 mg/l vliv na snížení produkce biogenního aminu kadaverinu u bakteriálního kmene *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *Enteritidis* CCM 4420.

Klíčová slova: esenciální olej, biogenní aminy, mikroorganismy

ABSTRACT

In this diploma thesis was observed the effect of some essential oils on the growth of bacterial strains which produce biogenic amines. The theoretical part classifies the bacterial strains, chemical compound of essential oils and the specification of observed biogenic amines. The practical part was focused on antibacterial effect of the essential oils. The results show that minimal inhibitory concentration of used oils was in the range 250 – 1500 mg/l. Next was observed the effect of essential oils on the production of biogenic amines phenyle-

thylamine, putrescine, cadaverine, histamine and tyramine at decarboxylase-positive bacteria. The results show that achievement of a minimum inhibitory concentration (250 mg/l) on *Lactococcus* in the application of oregano essential oil. The highest decrease in production of biogenic amine cadaverine, up to 80%, was recorded at the strain *Enterococcus durans* CCDM 53. The concentration of the oil used was 1000 mg/l. Overall gram-positive bacteria were more sensitive to the application of essential oils. The decrease in production of biogenic amines at gram-negative bacteria was recorded at the strain *Proteus mirabilis* CCM 7188, the decrease was approximately 20% with the usage of essential oils from thymus, rosemary and lemongrass, each in concentration 500 mg/l. The thymus essential oil in concentration 1000 mg/l influenced the decrease in production of biogenic amine cadaverine at the strain *Salmonella enterica subsp. enterica ser. Enteritidis* CCM 4420.

Key words: essential oil, biogenic amines, microorganism

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za cenné rady, vstřícný přístup a ochotu. Moje poděkování patří za pomoc i Bc. Veronice Kučabové, Ing. Andree Dlabajové a kolektivu mikrobiologické a chemické laboratoře. Za velkou trpělivost a podporu chci také poděkovat mým blízkým, kteří mi byli vždy velkou oporou po dobu mého studia.

V životě můžete dosáhnout čehokoliv, máte-li odvahu o tom snít, inteligenci vytvořit realistický plán a vůli dotáhnout tento plán do konce.

Sidney A. Friedman

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 BIOGENNÍ AMINY.....	12
1.1. HISTAMIN.....	13
1.2. PUTRESCIN.....	14
1.3. TYRAMIN.....	15
1.4. FENYLETHYLAMIN.....	15
15	
1.5. KADAVERIN.....	16
2 CHARAKTERIZACE TESTOVANÝCH MIKROORGANIZMŮ.....	17
2.1. ROD <i>LACTOCOCCUS</i>	17
2.2. ROD <i>ENTEROCOCCUS</i>	18
2.3. ROD <i>PROTEUS</i>	19
2.4. ROD <i>SALMONELLA</i>	20
3 MOŽNOSTI REDUKCE DEKARBOXYLÁZA-POZITIVNÍCH BAKTERIÍ.....	22
3.1. FYZIKÁLNÍ FAKTORY.....	22
3.1.1 Teplota.....	22
3.1.2 Osmotický tlak.....	22
3.1.3 Ultrafialové záření.....	22
3.2. CHEMICKÉ FAKTORY.....	23
3.2.1. pH.....	23
3.2.2. Aktivita vody.....	23
3.2.3. Kyslík.....	23
4 BIOLOGICKÁ AKTIVITA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA MIKROORGANIZMY.....	24
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	26
5 CÍL PRÁCE.....	27
6.1. MATERIÁL.....	28
6.1.1 Testované mikroorganismy.....	28
6.1.2 Použité chemikálie a roztoky.....	28
6.1.3 Pomůcky a vybavení.....	29
6.1.4 Příprava půd pro diluční a difuzní metodu.....	30
6.1.4.1 Půda M 17 Broth.....	30
6.1.4.2 Půda Nutrient Broth.....	30
6.1.5 Dekontaminace použitého materiálu.....	30
6.1.6 Příprava bakteriální suspenze.....	30
6.1.7 Příprava koncentrace esenciálních olejů.....	31
6.1.7.1 Použité esenciální oleje.....	31

6.1.7.2	Koncentrace esenciálních olejů	31
6.1.8	Použité Esenciální oleje a jejich chemické složení	32
6.2	METODIKA	34
6.2.1	Mikrodiluční metoda	34
6.2.2	Difuzní metoda	35
6.1.3	Analýza biogenních aminů kapalinovou chromatografií (HPLC)	35
7	VÝSLEDKY	38
7.1	MIKRODILUČNÍ METODA	38
7.1.1	Vliv esenciálních olejů na bakterie rodu <i>Lactococcus</i>	38
7.1.2	Vliv esenciálních olejů na bakterie rodu <i>Enterococcus</i>	50
8.1	DIFUZNÍ METODA	55
9.1	ANALÝZA PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ	56
7.1.3	Vliv esenciálních olejů na produkci biogenních aminů u bakterií rodu <i>Lactococcus</i>	56
9.1.2	Vliv esenciálních olejů na produkci biogenních aminů kmeny rodu <i>Enterococcus</i>	63
9.1.3	Vliv esenciálních olejů na produkci biogenních aminů u <i>Proteus</i> <i>mirabilis</i>	71
9.1.4	Vliv esenciálních olejů na produkci biogenních aminů u <i>Salmonella</i> <i>enterica</i>	73
	DISKUSE	75
	ZÁVĚR	78
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	79
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	84
	SEZNAM OBRÁZKŮ	85
	SEZNAM TABULEK	90

ÚVOD

Esenciální oleje mají specifické biochemické složení, které blahodárně působí na lidský organismus. Využívají se v kosmetice, farmacii a aromaterapii. V posledních letech je zkoumáno i jejich možné využití v potravinářství jako konzervantů, a to z důvodu jejich antivirových a antimikrobiálních účinků. Dnešní požadavky jsou vysoké, jak na údržnost potravin, tak i na bezpečnost potravin. Proto se hledají různé možnosti jak požadavky dodržet. [1]

Častým problémem je výskyt biogenních aminů v potravinách. Jsou to organické sloučeniny vznikající z aminokyselin. Přirozeně se vyskytují v rostlinných i živočišných buňkách, kde mají řadu specifických funkcí. Biogenní aminy hrají důležitou roli v lidských fyziologických funkcích, jako je imunitní odpověď nebo samotná aktivita mozku. Jejich vysoká přítomnost v přijímaných potravinách může naopak způsobit bolest hlavy, nevolnost a změny krevního tlaku. Prokázání vysokého množství biogenních aminů naznačuje proces kažení potravin. Biogenní aminy mohou vznikat při technologických procesech, například použitím mikroorganismů při fermentaci. Tyto mikroorganismy se používají jako startovací kultury v masných výrobcích, nebo v mlékárenství jako zákysové kultury. Jejich schopnost dekarboxylovat volné aminokyseliny je řadí do skupiny mikroorganismů produkujících biogenní aminy. [1,2]

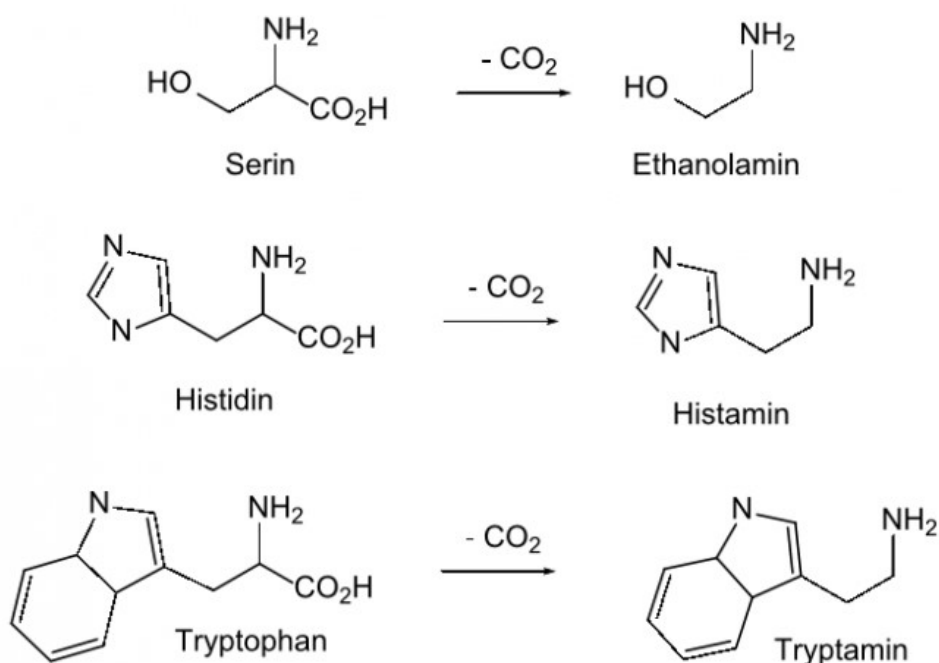
Diplomová práce se zabývá vlivem vybraných esenciálních olejů na růst bakterií, které produkují biogenní aminy. Zjišťuje minimální koncentraci esenciálních olejů, které jsou schopny inhibovat použité mikroorganismy.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy jsou organické dusíkaté látky s nízkou molekulovou hmotností, které jsou součástí přirozeného metabolismu buněk. Důležitou roli mají ve fyziologických funkcích, jako jsou imunitní odpověď, aktivita mozku nebo sekrece žaludečních kyselin. Nežádoucí je naopak přítomnost biogenních aminů v potravinách. [1]

Biogenní aminy (BA) se mohou vyskytovat jak v nefermentovaných potravinách, kde jejich přítomnost je způsobena činností hnilobných bakterií, tak ve fermentovaných potravinách působením bakterií, které jsou součástí kultur používaných k produkci potravin. Biogenní aminy vznikají z volných aminokyselin nacházejících se v potravinách a mohou být produkovány pomocí mikroorganismů, které vykazují dekarboxylázovou aktivitu. Dekarboxylázové enzymy odstraňují karboxylovou skupinu z organických sloučenin (aminokyselin) za vzniku biogenních aminů (Obr. 1). Mezi toxikologicky nejvýznamnější biogenní aminy patří histamin, který vzniká působením enzymu histidin dekarboxylázy. Potenciálním kontrolním opatřením v případech, kdy se obtížně kontrolují hladiny biogenních aminů, je použití bakterií s aminovou oxidační aktivitou nebo oxidačních enzymů. Histaminolytické bakterie (bakterie oxidující histamin) mohou umožnit vznik rovnováhy mezi produkcí histaminu a destrukcí v potravinách obsahujících vysoké množství histaminu. Mezi takové bakterie se řadí např. zástupci rodu *Lactobacillus*. [2,3]



Obr. 1: Vznik vybraných biogenních aminů [8]

Biogenní aminy jsou odolné vůči vysokým teplotám a dlouhodobému účinku tepla. V přítomnosti dusitanů se mohou změnit na nitrosaminy, které mohou být potenciálními karcinogeny. Mezi mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou, které napomáhají vzniku biogenních aminů, patří např. zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* nebo rodu *Pseudomonas*. Produkce biogenních aminů byla prokázána také u rodů *Lactobacillus*, *Enterococcus*. [1,4]

Nejvíce sledovanými biogenními aminy jsou histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, spermidin a β -fenylethylamin. Ve spojitosti s nimi jsou navrženy maximální limity některých biogenních aminů pro lidskou spotřebu v potravinách. Maximální legislativní limit (Nařízením EP a Rady (ES) č. 2073/2005 O mikrobiologických kritériích pro potraviny) stanoví přípustná množství pouze histaminu. Pro produkty rybolovu je stanoveno maximální množství 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u druhů ryb čeledí *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatocidae*, *Scombresosidae*, které jsou spojovány s vysokým obsahem histidinu. V případě rybích produktů, které byly ošetřeny enzymatickým zráním, platí maximální limit histaminu 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$. [5]

Stanovení biogenních aminů pro posouzení potencionálních rizik bezpečnosti a kvality potravin je důležité. Jsou označovány jako indikátory kvality a čerstvosti potravin. Uvádí se, že koncentrace biogenních aminů se zvyšuje v průběhu dlouhého skladování a při nedodržení teplotních skladovacích podmínek.[4, 6, 7]

Souhrn vybraných biogenních aminů a jejich biologický význam se nachází v Tab. 1.

1.1. Histamin

Histamin je hormon, který je produkován zejména bílými krvinkami. Vzniká dekarboxylací aminokyseliny histidinu pomocí enzymu histidindekarboxylázy (obr. 1). Histamin je přítomen v bazofilech, trombocytech a v neuronech mozku. Ve vysokých koncentracích se stává důležitým mediátorem alergických reakcí. Nejvyšší riziko tvorby nadměrného množství histaminu je u skombroidních ryb, mezi které patří makrely, sledě, tuňáci nebo sardele. [9]

Nejčastějšími producenty histaminu v potravinách jsou bakterie rodů *Enterococcus*, *Pedococcus*, *Lactobacillus*. [4]

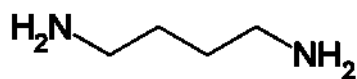
Tab. 1. Biogenní aminy, jejich prekurzory a biologický význam [10]

Biogenní amin	Původní aminokyselina	Biologický význam
Histamin	histidin	lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak, sekreci žaludeční šťávy, účast při anafylaktickém šoku a alergických reakcích
Kadaverin	lysin	stabilizace makromolekul, subcelulárních struktur, stimulace diferenciac buněk, rostlinný hormon
Putrescin	arginin, ornitin, citrulin	stabilizace makromolekul, subcelulárních struktur, diferenciac buněk, rostlinný hormon
Agmatin	arginin	stabilizace makromolekul, subcelulárních struktur, stimulace diferenciac buněk, rostlinný hormon
Fenylethylamin	fenylalanin	prekurzor tyraminu
Tyramin	tyrosin	prekurzor dopaminu, lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak a kontrakce hladkého svalstva
Dopamin	levodopa	Mediátory sympatických nervů
Tryptamin	tryptofan	Lokální tkáňové a rostlinné hormony, vliv na krevní tlak, peristaltiku střev, psychické funkce

1.2. Putrescin

Putrescin je alifatický diamín, který vzniká převážně dekarboxylací aminokyseliny ornitinu. Vzniká při hnití masa a označován je i jako mrtvolný jed. [11]

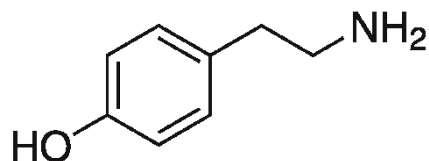
Strukturní vzorec putrescinu (Obr.2)



Obr. 2: Putrescin [12]

1.3. Tyramin

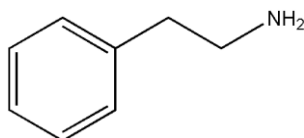
Tyramin (Obr. 3) vzniká dekarboxylací tyrosinu během fermentace nebo rozkladu. Může být prokázán v čokoládě, v alkoholických nápojích, sýrech, sójové omáčce, zelí i v dalších potravinách. Velký příjem tyraminu v potravě může mít vliv na zvýšení systolického krevního tlaku. [10]



Obr. 3: Tyramin [13]

1.4. Fenylethylamin

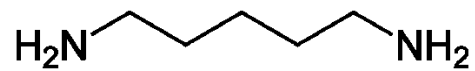
Fenylethylamin (Obr. 4) vzniká dekarboxylací fenylalaninu působením enzymu fenylalanin-dekarboxylázy. Jedná se o endogenní stopový amin nacházející se v mozku savců, který je důležitý pro činnost nervové soustavy. Nejvíce se v potravinách nachází v čokoládě, v semenech ořechů, v mase a v kvasnicích. Ve vyšší koncentraci může způsobovat úzkost, bolesti hlavy. Působením enzymu fenylalaninhydrolázy se přeměňuje na aminokyselinu tyrosin. Porucha přeměny fenylalaninu na tyrosin se nazývá fenylketonurie. Nerozpoznaná nemoc se projeví mentální retardací, svalovým třesem a hyperaktivitou. [14, 15]



Obr. 4: Fenylethylamin [16]

1.5. Kadaverin

Dekarboxylací aminokyseliny lyzinu působením enzymu lyzindekarboxylázy vzniká diamin kadaverin strukturní vzorec Obr. 5. Kadaverin je důležitý pro buňky k přežití v kyselém prostředí. Vzniká při rozkladu masa, má toxické účinky podobné amoniaku. [14]



Obr. 5: Kadaverin [17]

2 CHARAKTERIZACE TESTOVANÝCH MIKROORGANISMŮ

2.1. Rod *Lactococcus*

Tento rod patří mezi mezofilní fermentační bakterie, které produkují kyselinu L(+) mléčnou. Laktokoky jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní, nepohyblivé bakterie elipsoidního tvaru (Obr. 6). Buňky jsou buď v párech, nebo v řetězcích. Využívají se zejména při fermentační výrobě mléčných výrobků, kde dodávají výrobkům speciální chuť a vůni. [18]



Obr. 6: *Lactococcus* [19]

Optimální teplota pro růst a produkci kyseliny mléčné je 30 °C. Patří mezi nejdůležitější mikroorganismy v mlékárenském průmyslu. Z důvodu blahodárného působení na střevní mikroflóru se některé kmeny rodu *Lactococcus* řadí mezi probiotické kultury, které se využívají k výrobě probiotických potravinových doplňků. Zástupci tohoto rodu také produkují polypeptid nisin, který působí antibakteriálně na jiné grampozitivní bakterie. Řadí se mezi bakteriociny. Pozitivní vlastnosti bakteriocinů se využívají v potravinářství, kde mohou být použity náhražky chemických konzervačních látek. [18,19,20]

Lactococcus lactis subsp. *lactis* je součástí základní smetanové kultury, která se využívá k výrobě širokého sortimentu kysaných mléčných výrobků. Produkuje i extracelulární polysacharidy (exopolysacharidy; EPS). Jedná se o polymery s vysokou molekulovou hmotností, které, jak bylo zjištěno, mohou mít antiulcerózní, imunostimulační a částečně i protinádorové účinky. Tyto bakterie rostou i při teplotě 40 °C, v přítomnosti 4% NaCl a pH 9,2. [20, 21]

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* se řadí mezi základní zástupce kyselých kultur v potravinářství. Některé kmeny se mohou vyznačovat velkou dekarboxylázovou aktivitou za vzniku biogenních aminů, především putrescinu a tyraminu. Buňky *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* jsou větší než *L. lactis* subsp. *lactis* a tvoří delší řetízky. [4, 6]

2.2. Rod *Enterococcus*

Enterokoky patří do skupiny grampozitivních bakterií mléčného kvašení. Enterokoky tvoří přirozenou střevní mikroflóru. Jsou to fakultativně anaerobní, většinou nepohyblivé koky. Tvoří shluky nebo řetízky (Obr. 7). Optimální teplota růstu se pohybuje kolem 37 °C. Některé kmeny mohou růst i při teplotě -1 °C. Enterokoky mohou přežít v přítomnosti až 6,5% NaCl a při pH 9,6. Enterokoky se řadí mezi bakteriociny produkující kmeny a mohou být součástí probiotických kultur. Jsou rezistentní vůči širokému spektru antibiotik. [10]

Enterokoky produkují z biogenních aminů především histamin, kadaverin Tab. 2.



Obr. 7: *Enterococcus* [22]

V potravinářském průmyslu se přidávají do fermentovaných potravin jako startovací kultury, kdy se využívá jejich schopnosti produkovat bakteriociny, které inhibují růst patogenních mikroorganismů. Při dozrávání sýru rozkládají laktózu a citrát, což vede k tvorbě těkavých sloučenin, jako je acetaldehyd, diacetyl a ethanol, které jsou odpovědné za tvorbu jedinečné vůně a chuti konečného produktu. Jejich použití v mlékárenském průmyslu je stále kontroverzní, protože byly zjištěny některé ukazatele fekální kontaminace. [23]

Enterococcus faecalis byl v minulosti označován jako *Streptococcus faecalis*. Buňky jsou uspořádány v párech nebo v řetízích. Je tepelně stabilní, roste při 37 °C a je tolerantní vůči 6,5% NaCl. [10]

V sýrech mohou produkovat biogenní aminy, zejména tyramin. Při fermentaci sójových bobů byla zjištěna tvorba β -fenylethylaminu. U fermentovaných masných výrobků a v mléce byly detekovány biogenní aminy tyramin a fenylethylamin [1,7]

Enterococcus durans je grampozitivní bakterie, dříve známá jako *Streptococcus durans* a přirozeně se nachází ve střevní mikroflóře člověka. Může způsobovat infekci močových cest. Má schopnost přežít i při pH 3. Produkce biogenního aminu tyraminu byla potvrzena z bakteriálních kmenů, které byly izolovány ze sušeného mléka. [10, 22]

2.3. Rod *Proteus*

Rod *Proteus* se řadí do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinkovitou bakterii se značnou pohyblivostí pomocí několika bičků (Obr. 8). Může vyvolávat infekce močových cest a podílet se na etiologii střevních infekcí. Vyskytuje se ve vodě, v půdě a ve stolici lidí a zvířat. Má výraznou proteolytickou aktivitu. Ideální růstová teplota pro bakterii je v rozmezí 34-37 °C. [24]



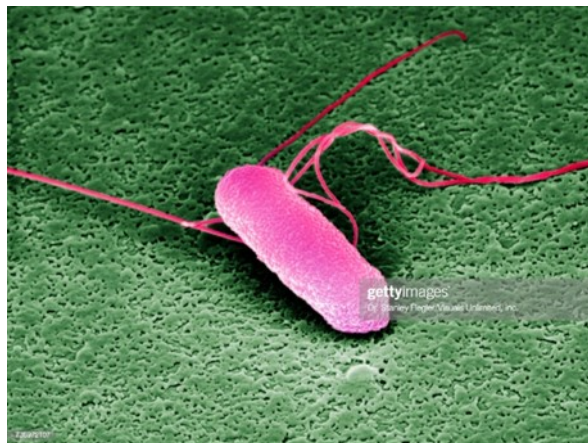
Obr. 8: *Proteus mirabilis* [23]

2.4. Rod *Salmonella*

Rod *Salmonella* náleží do čeledi *Enterobacteriaceae*. Buňky jsou gramnegativní, nesporující tyčinky (Obr. 9), obligátně patogenní. Rod *Salmonella* je fakultativně anaerobní, buňky jsou většinou pohyblivé s oxidačním a fermentačním metabolismem. Je úzce příbuzný s rodem *Escherichia* [11]

Rod *Salmonella* je původcem alimentární nákazy salmonelózy. Na kultivační půdě obsahující deoxycholát sodný roste v koloniích s černým středem. Zdrojem infekce lidí je hlavně tepelně neopracované maso drůbeže a také vejce, která pochází od nosnic kontaminovaných salmonelou. Optimální teplota růstu je 37 °C. [11]

Zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* jsou známí tvorbou biogenních aminů histaminu, putrescinu a kadaverinu, např. v sýrech [3]



Obr. 9: *Salmonella enterica*, serovar *enteritidis* [24]

Tab. 2. Vybrané mikroorganismy produkující biogenní aminy v potravinách [1,2,3]

Potravina	Mikroorganismy	Produkují aminokyseliny
Ryby	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Bacillus spp.</i>	histamin, tyramin, kadaverin, spermidin, ag- matin
Sýry	<i>Lactobacillus delbruecki</i> <i>subsp. bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>	histamin, kadaverin, tyramin, tryptamin
Maso a mastné výrobky	<i>Pediococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Micrococcus</i>	histamin, kadaverin, tyra- min, tryptamin, putrescin
Fermentovaná zelenina	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	histamin, kadaverin, tyra- min, tryptamin, putrescin
Víno	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	histamin, tyramin, fenylethylamin
Pivo	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	histamin, tyramin, kadaverin

3 MOŽNOSTI REDUKCE DEKARBOXYLÁZA-POZITIVNÍCH BAKTERIÍ

Růst a metabolismus bakterií je závislý na vnějších faktorech, které lze rozdělit na:

- fyzikální
- chemické
- biologické

3.1. Fyzikální faktory

3.1.1 Teplota

Teplota je nejvýznamnějším faktorem působícím na všechny mikroorganismy. Podle optimální růstové teploty rozdělujeme mikroorganismy na psychrofilní (12-18 °C), psychrotrofní (20-30 °C), mezofilní (20-35 °C) termofilní (45-70 °C) a hypertermofilní (90-100°C). Vlivem vysokých teplot dochází k denaturaci bílkovin, inaktivaci enzymů a narušení DNA a cytoplazmatické membrány. [25]

K destrukci nežádoucích mikroorganismů jsou využívány možnosti sterilace, kde dochází ke kombinaci teploty a času. Sterilaci přežívají spóry některých rodů např. *Bacillus*, *Clostridium*. Další možností je pasterace, kde se jedná o krátkodobé zvýšení teploty, dochází k usmrcení nesporulujících patogenů. [25, 26]

3.1.2 Osmotický tlak

Mikroorganismy rostou nejlépe při nižším osmotickém tlaku, než je v cytoplazmě. Pokud je prostředí silně hypotonické, dochází k plazmoptýze. Buňka bobtná, až může dojít k prasknutí. Opakem je plazmolýza, která vzniká v hypertonickém prostředí. Buňka se odvodňuje. Plazmolýza se nejvíc projevuje u gram-negativních bakterií. [25]

3.1.3 Ultrafialové záření

Největší vliv na poškození DNA mikroorganismů má UV záření o vlnové délce 265 nm. UV záření vyvolává tvorbu toxických peroxidů a ozonu. Při nižších dávkách UV buňky přežívají, ale dochází k jejich časté mutaci. [25]

3.2. Chemické faktory

Na mikroorganismy může působit řada organických i anorganických látek, které označujeme jako antimikrobiální látky. Podle účinku je rozdělujeme na mikrobistatické, které pouze zastaví růst mikroorganismů, a na mikrobicidní, které mají letální účinek na mikroorganismy. [26]

3.2.1. pH

Každý mikroorganismus je schopen růst jen v určitém rozmezí pH. Optimální hodnota pH pro bakterie je pH 5 – 7. Při snížení pH dochází ke snížení růstu mikroorganismů. [25, 26]

3.2.2. Aktivita vody (a_w)

Aktivita vody je definována jako poměr parciálního tlaku vodní páry nad potravinou k parciálnímu tlaku vodní páry nad čistou vodou při dané teplotě. Jedná se o množství vody dostupné pro mikroorganismy. Optimální hodnota pro bakterie je $a_w > 0,98$. Snížení aktivity vody se docílí pomocí sušení, uzení, odpaření a mražení. Další možností je zvýšení obsahu tuku či zvýšení koncentrace cukru nebo NaCl. [25, 26]

3.2.3. Kyslík

Podle potřeby kyslíku dělíme bakterie na [25]:

Aerobní bakterie, které pro svůj metabolismus potřebují kyslík.

Anaerobní bakterie, ty nejsou schopny přežít v přítomnosti kyslíku.

Fakultativně anaerobní bakterie žijí i v přítomnosti kyslíku.

Mikroaerofilní bakterie nejlépe rostou při zvýšeném množství CO_2 .

4 BIOLOGICKÁ AKTIVITA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA MIKROORGANIZMY

Esenciální oleje jsou většinou lipofilní látky s nízkou molekulovou hmotností. Obsahují různé uhlovodíky a jejich kyslíkové deriváty. Mohou obsahovat i další deriváty, zejména dusíkaté a sírné. Většinou je antibakteriální aktivita esenciálních olejů podmíněna působením hlavních složek oleje. Z pohledu antimikrobiálního účinku jsou nejúčinnější fenoly, aldehydy, ketony, alkoholy, estery a uhlovodíky. Z řady fenolů vykazuje největší antibakteriální účinky tymol. Oleje obohacené o 1,8-cineol působí více na gram-negativní bakterie a kvasinky než na gram-pozitivní bakterie. Je prokázáno, že větší účinek mají esenciální oleje jako celek než různé kombinace izolovaných hlavních komponentů. [26, 27]

Esenciální oleje se zpravidla získávají z aromatických rostlin hydrodestilací a parní destilací. Esenciální oleje získané ze stejných druhů rostlin se mohou lišit v závislosti na původu, klimatických podmínkách a způsobu sklizně. Často je sledována antibakteriální aktivita, která se může lišit u olejů získaných ze stejných rostlinných druhů, ale pěstována v různých klimatických podmínkách. [27]

Některé studie poukazují na to, že mechanismus antibakteriálního účinku esenciálních olejů pravděpodobně spočívá v narušení vnější membrány buňky. S buněčným metabolismem interferují hlavně sloučeniny tymolu a karvakrolu, které se přirozeně vyskytují v rostlinách jako bazalka, tymián a oregano. Buněčná stěna gram-negativních bakterií je tvořena tenkou vrstvou peptidoglykanu a vnější membránou, která je složena z dvojvrstvy fosfolipidů a proteinů, chrání bakteriální buňku před proniknutím látek hydrofobního charakteru. Mezi hydrofobní látky se řadí i složky esenciálních olejů a z toho důvodu se předpokládá, že gram-negativní bakterie jsou méně vnímavé na esenciální oleje. [29, 30]

Jednou z dalších vlastností esenciálních olejů je antioxidační aktivita, která je způsobena obsahem fenolů. Ty jsou schopny zastavit, nebo oddálit aerobní oxidaci organické hmoty, zejména tuků, proteinů a sacharidů. Antioxidační vliv je dán složením esenciálního oleje. Silnou antioxidační aktivitu projevují oleje, které obsahují γ -terpinen, terpinol, sabien a eugenol. Lemonen a α -pinen prokazují nízkou antioxidační aktivitu. Snaha využít i tuto vlastnost esenciálních olejů je velká z důvodu nahrazení běžných syntetických antioxidantů používaných v potravinářství, jako je butylovaný hydroxyanisol, nebo butylhydroxytoluen. [31]

Skořicový olej obsahuje velké množství fenolických látek eugenolu a linaloolu, čímž se řadí mezi nejsilnější antivirotika a antiseptika. Další z hlavních složek je aldehyd cinnamaldehyd, který dává skořici chuť a vůni. [31]

Esenciální olej z rozmarýnu se již v dávné době, než bylo vynalezeno chlazení, používal pro účely konzervace potravin. Ve svém složení obsahuje především monoterpeny, jako jsou 1,8-cineol, α -pinen, kafr, kamfen, díky nimž má esenciální olej z rozmarýnu antimikrobní a antioxidační účinky. [32]

Esenciálnímu oleji lemongras dodává citrónovou vůni aldehyd geranial, který se používá, mimo jiné, i v parfumerii. Antimikrobiální účinky jsou dány také působením monoterpeny limonenu, linaloolu. Prokazují se i fungicidní účinky esenciálního oleje z citrónu. Bylo zjištěno, že prodlužují životnost potravin. Zabraňují nepříjemným pachům a chutím. [33]

Hlavní složkou esenciálního oleje ze šalvěže jsou α -thujon, 1,8-cineol, kafr, borneol, β -pinen a β -karyofylen, humulen a linalol, dále fenolpropeny a siričné látky. Řadí se do esenciálních olejů s antimikrobním účinkem. [34]

Esenciální oleje z oregana a tymiánu, u kterých tvoří hlavní složky karvakrol, thymol, limonen a linalool, prokazují antimikrobní a antioxidační účinky. Bylo zjištěno, že oba jsou účinné jak na gram-negativní, tak na gram-pozitivní bakterie. [35]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cíle diplomové práce byly stanoveny následovně:

- vypracovat rešerši týkající se působení vybraných esenciálních olejů na mikroorganismy,
- stanovit minimální inhibiční koncentraci vybraných esenciálních olejů na testované gram-pozitivní a gram-negativní dekarboxyláza-pozitivní bakterie,
- sledovat vliv vybraných esenciálních olejů na růst a produkci biogenních aminů u testovaných dekarboxyláza-pozitivních bakterií,
- vyhodnotit výsledky a na jejich základě formulovat závěry práce.

6 MATERIÁL A METODY

6.1. Materiál

6.1.1 Testované mikroorganismy

V diplomové práci byl testován vliv esenciálních olejů na grampozitivní a gramnegativní bakterie, které byly v dřívější studii označeny jako dekarboxyláza-pozitivní bakterie. [36, 37]

Testovány byly bakterie získané z České sbírky mikroorganismů (CCM; Czech Collection of Microorganisms) a ze Sbírký mlékařských organismů Laktoflora (CCDM, Cultures Collection of Dairy Microorganisms).

Účinky esenciálních olejů byly testovány na uvedených dekarboxyláza-pozitivních bakteriích:

Lactococcus lactis subsp. lactis CCDM 48, CCDM 1004 a CCDM 141

Lactococcus lactis subsp. cremoris CCDM 824 a CCDM 946

Enterococcus faecalis CCM 2665 a CCM 4224

Enterococcus durans CCDM 53

Proteus mirabilis CCM 7188

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

6.1.2 Použité chemikálie a roztoky

Fyziologický roztok

Navážka NaCl (Penta) byla 8,5 g a následně rozpuštěna v 1000 ml destilované vody. Roztok byl rozplněn po 200 ml a autoklávován při teplotě 121 °C.

Kultivační půda M17 Broth

pro bakteriální kmeny:

Lactococcus lactis subsp. lactis CCDM 48, CCDM 1004 a CCDM 141 (kultivace 37°C)

Lactococcus lactis subsp. cremoris CCDM 824 a CCDM 946 (kultivace 30°C)

Enterococcus faecalis CCM 2665 a CCM 4224 (kultivace 37°C)

Enterococcus durans CCDM 53 (kultivace 37°C)

Kultivační půda Nutrient Broth

pro bakteriální kmeny:

Proteus mirabilis CCM 7188 (kultivace 37°C)

Salmonella enterica subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 (kultivace 37°C)

6.1.3 Pomůcky a vybavení

- Analytické váhy A&D GH-200 BC
- Autokláv Varioklav
- Termostat MEMMERT
- Biohazard box Telstar
- Centrifuga HETTICH ROTANTA 460
- Laboratorní třepačka LT2
- Mikropipety Biohit
- pH metr EUTECH INSTRUMENT pH 510
- Termoblok BENCHMARK DIGITAL BLOK
- Systém HPLC (binární pumpa Lab Agrilent Eclipse Plus C 18 RRHD 3,0 x 50 mm; UV/VIS DAD detektor ($\lambda = 254$ nm); a degaser 1260 Infinity, Agilent Technologies)
- Sterilní kličky, mikrotitrační destičky, petriho misky sterilní špičky pro automatické pipety, Ependorfovy zkumavky, laboratorní sklo
- Kyselina chloristá 70-72% (MERCK)
- L-Prolin (MERCK)
- Acetonitril CHROMASOLV (SIGMA – ALDRICH)

6.1.4 Příprava půd pro diluční a difuzní metodu

6.1.4.1 Půda M 17 Broth

Tekutá půda M17 Broth

Naváženo bylo 21,125 g půdy M 17 Broth (HIMEDIA) a poté byla přidána do 500 ml destilované vody. Takto připravená půda byla autoklávována při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Poté sterilně rozplněna do sterilních zkumavek po 4 ml.

Pevná půda M17 Broth

Bylo naváženo 42,25 g půdy M17 Broth a 60 g Agar Agar Type I (HIMEDIA). Vše se přidalo do 1000 ml destilované vody. Takhle připravená půda byla autoklávovaná při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Následně byla půda sterilně rozlita po 15 ml do Petriho misek o průměru 9 cm. Připravené plotny byly uchovávány při teplotě 8 °C do doby použití.

6.1.4.2 Půda Nutrient Broth

Tekutá půda Nutrient Broth

Navážka 6,5 g půdy Nutrient Broth (HIMEDIA) byla přidána do 500 ml destilované vody. Takto připravená půda byla autoklávovaná při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Následně se půda sterilně rozplnila po 4 ml do sterilních zkumavek.

Pevná půda Nutrient Broth

Naváženo bylo 6,5 g půdy Nutrient Broth (HIMEDIA) rozpuštěno v 500 ml destilované vody a přidalo se 35 g agaru (Agar Agar Type I; HIMEDIA). Půda se autoklavovala po dobu 15 minut při teplotě 121 °C. Po mírném ochlazení se půda sterilně rozlila do Petriho misek po 15 ml.

6.1.5 Dekontaminace použitého materiálu

Živné půdy, suspenze bakteriálních kultur, použité mikrotitrační destičky byly dekontaminovány v autoklávu při teplotě 132 °C.

6.1.6 Příprava bakteriální suspenze

Prvotní kultivace byla provedena zaočkováním bakteriálních kultur na příslušnou pevnou půdu na Petriho miskách a kultivace probíhala při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Narostlé

kultury se pak uchovaly do doby zahájení testace při teplotě 8 °C. Následně 24 hodin před zahájením testace se každý bakteriální kmen naředit na denzitu 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice ve fyziologickém roztoku. Do příslušné tekuté kultivační půdy 2 ml byla inokulovaná bakteriální kultura 200 µl. Kultivace trvala 24 hodin při 30° C. Takto připravena bakteriální kultura byla aplikována dle postupu v kapitole 6.2.1

6.1.7 Příprava koncentrace esenciálních olejů

Bylo použito šest různých esenciálních olejů (všechny Nobilis Tilia, Krásná Lípa). Každý esenciální olej byl testován v sedmi různých koncentracích (25, 50, 100, 250, 500, 1000 a 1500 mg/ml).

Nejdříve se z každého esenciálního oleje (EO) připravil 5% zásobní roztok esenciálního oleje v etanolu. Do kultivační půdy se přidalo dané množství 5% zásobního roztoku esenciálního oleje v etanolu dle Tab. 3. Tím byla získaná požadovaná koncentrace esenciálních olejů pro vlastní testaci.

6.1.7.1 Použité esenciální oleje

- Oregano Rumunsko (Nobilis Tilia)
- Lemongras Indie (Nobilis Tilia)
- Tymián Španělsko (Nobilis Tilia)
- Šalvěj Dalmácie (Nobilis Tilia)
- Rozmarýn Tunis (Nobilis Tilia)
- Skořice kůra Německo (Nobilis Tilia)

6.1.7.2 Koncentrace esenciálních olejů

Příprava 5% zásobního roztoku EO v etanolu

5 µl EO + 950 µl ethanol (Ethylalcohol)

Tab. 3. Testované koncentrace esenciálních olejů

Kultivační půda (ml)	Přidané množství 5% zásobního roztoku EO (μ l)	Získaná koncentrace EO (mg/ml)
4	2	25 (0,0025%)
4	4	50 (0,005%)
4	8	100 (0,01%)
4	20	250 (0,025%)
4	40	500 (0,05%)
4	80	1000 (0,1%)
4	120	1500 (0,15%)

6.1.8 Použité Esenciální oleje a jejich chemické složení

Esenciální oleje jsou komplexní směsi látek, které obsahují až 60 různých komponent. Každý esenciální olej se skládá min. ze dvou majoritních složek a různého počtu složek přítomných ve stopovém množství. [38]

- **Oregano Rumunsko** - Silná peprná bylinná vůně, antiseptický, protizánětlivý, účinný i proti parazitům. Složení: Origanum Vulgare Oil (éterický olej z dobromysli obecné), Limonene, Linalool. [39]

Biochemická specifikace:

BORNEOL 0,5-3,15 %; GAMMA-TERPINEN 0,1-1,9 %; KAMFEN 0,1-0,28 %; KARVAKROL 60-83 %; PARA-CYMEN 0,5-2,27 %; TERPIN-1-EN-4-OL 0,5-1,44 %
[39]

- **Lemongras Indie** - Silná citrónová vůně má protibakteriální a protiplísňové účinky. Složení: Cymbopogon Flexuosus Herb Oil (éterický olej lemongrassový), Limonene, Linalool, Geraniol, Citra [39]

Biochemická specifikace:

GERANIAL (CITRAL A) <42 %; GERANIOL <1,5 %; NERAL (CITRAL B) <40 % [37]

- **Tymián Španělsko** - Intenzivní pronikavá bylinná vůně s fenolickým nádechem. Významný olej posilující funkce celého organismu. Složení: Thymus Vulgaris Oil (éterický olej z tymiánu obecného), Limonene, Linalool [39]

Biochemická specifikace:

GAMMA-TERPINEN 1-5 %; KARVAKROL 1-3 %; LINALOOL 1-5 %; MYRCEN 1-5 %; PARA-CYMEN 20-30 %; TERPIN-1-EN-4-OL 1-5 %; THYMOL 40-60 % [39]

- **Šalvěj Dalmácie (Chorvatsko)** - Hořce bylinná vůně s kastrovitými tóny. Posiluje imunitu, zmírňuje pocení, průjem, zlepšuje zažívání. Složení: Salvia Officinalis Oil (éterický olej z šalvěje lékařské), Limonene, Linalool. [39]

Biochemická specifikace:

ALFA-PINEN 4-6 %; ALFA-THUJON 12-33 %; BETA-THUJON 2-14 %; BORNEOL 3-16 %; KAFR 8-26 % [37]

- **Rozmarýn Tunis** - Silná bylinná vůně s lehce dřevitým nádechem. Prohřívá a zvyšuje krevní tlak, zlepšuje koncentraci a paměť, účinný při melancholii, únavě a nervovém vyčerpání. Složení: Rosmarinus Officinalis Oil (éterický olej z rozmarýnu lékařského), Limonene, Linalool. [39]

Biochemická specifikace:

1,8-CINEOL (EUKALYPTOL) 39-57,7 %; ALFA-PINEN 9,6-12,7 %; ALFA-TERPINEOL <3,1 %; BETA-KARYOFYLEN 0,5-6,3 %; GAMMA-TERPINEN <1,2 %; KAFR 7,4-14,9 %; LINALOOL 0,7-1,7 %; PARA-CYMEN 0,9-2,5 % [39]

- **Skořice kůra Německo** - Intenzivní, teplá, kořenitá vůně. Silně prohřívá a posiluje srdeční činnost (únava, chlad, krátkodechost, angina pectoris), dýchání (časté a chronické obtíže, oslabená imunita), trávení, na močopohlavní infekce, vyčerpání a depresi. [39]

Složení: Cinnamomum Zeylanicum Bark Oil (éterický olej z kůry skořicovníku), Limonene*, Linalool*, Cinnamal*, Eugenol*, Cinnamyl Alcohol [39]

Biochemická specifikace:

KUMARIN 6-8 %; LIMONEN <9 %; METHOXYCINNAMALDEHYD <5 %; TRANS-CINNAMALDEHYD 42-70 % [39]

6.2 Metodika

6.2.1 Mikrodiluční metoda

Diluční metoda byla použita ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) použitých esenciálních olejů v tekutých kultivačních médiích s přidavkem příslušné koncentrace testovaného esenciálního oleje.

Mikrodiluční metoda byla provedena na mikrotitrační destičce. Schéma zaočkování mikrotitrační destičky je uvedeno v tabulce 4.

Tab. 4. Rozvrhnutí vzorků na 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	25 mg/ml	25 mg/ml	25 mg/ml	25 mg/ml	25 mg/ml	25 mg/ml	25 mg/ml	25 mg/ml	25 mg/ml	25 mg/ml
C	NK	NK	50 mg/ml	50 mg/ml	50 mg/ml	50 mg/ml	50 mg/ml	50 mg/ml	50 mg/ml	50 mg/ml	50 mg/ml	50 mg/ml
D	NK	NK	100 mg/ml	100 mg/ml	100 mg/ml	100 mg/ml	100 mg/ml	100 mg/ml	100 mg/ml	100 mg/ml	100 mg/ml	100 mg/ml
E	NK	NK	250 mg/ml	250 mg/ml	250 mg/ml	250 mg/ml	250 mg/ml	250 mg/ml	250 mg/ml	250 mg/ml	250 mg/ml	250 mg/ml
F	NK	NK	500 mg/ml	500 mg/ml	500 mg/ml	500 mg/ml	500 mg/ml	500 mg/ml	500 mg/ml	500 mg/ml	500 mg/ml	500 mg/ml
G	NK	NK	1000 mg/ml	1000 mg/ml	1000 mg/ml	1000 mg/ml	1000 mg/ml	1000 mg/ml	1000 mg/ml	1000 mg/ml	1000 mg/ml	1000 mg/ml
H	NK	NK	1500 mg/ml	1500 mg/ml	1500 mg/ml	1500 mg/ml	1500 mg/ml	1500 mg/ml	1500 mg/ml	1500 mg/ml	1500 mg/ml	1500 mg/ml

Sloupec 1 až 2 (označeno NK) - 200 μ l kultivační půda bez zaočkování kultury. Kontrola sterility půdy

Řádek A3 až A12 (označeno PK) - 200 μ l kultivační půda a 5 μ l mikroorganismu. Kontrola růstu mikroorganismu.

Řádek B3 až B12 - koncentrace EO 25 mg/ml (200 μ l), mikroorganismus (5 μ l)

Řádek C3 až C12 – koncentrace EO 50 mg/ml (200 μ l), mikroorganismus (5 μ l)

Řádek D3 až D12– koncentrace EO 100 mg/ml (200 μ l) mikroorganismus (5 μ l)

Stejným způsobem se pokračovalo až do řádku H3 - H12 podle Tab. 4.

Na jedné mikrotitrační destičce, která obsahovala 96 jamek, bylo možné sledovat 5 různých koncentrací jednoho esenciálního oleje u 5 bakterií (v tabulce 4 barevně odlišeny).

Vliv testovaných koncentrací vybraných esenciálních olejů na růst vybraných dekarboxyláza-pozitivních mikroorganismů byl sledován pomocí optické denzity (spektrofotometr Tecan). Přístroj měřil po dobu 24 hodin optickou denzitu (OD) při vlnové délce 600 nm (OD_{600}) ve 30-ti minutových intervalech. Před každým měřením byla destička protřepána po dobu

15 sekund. Ze získaných hodnot optické denzity byly vypočítány hodnoty, které byly použity pro hodnocení výsledků a odečtení hodnoty minimální inhibiční koncentrace.

6.2.2 Difuzní metoda

Difuzním testem se prokazovala citlivost bakteriálních kmenů na použité esenciální oleje a jejich koncentrace (Tab. 3). Citlivost daného bakteriálního kmene se prokazovala podle velikosti vzniklé inhibiční zóny.

Na Petriho misku s příslušnou kultivační půdou (M17 pro laktokoky a enterokoky, Nutrient agar pro enterobakterie) byl aplikován bakteriální kmen v množství 200 μl a následně sterilní hokejkou rovnoměrně rozetřen po povrchu půdy. Po 15 minutách (doba potřebná k zaschnutí inokulovaného mikroorganismu) byly naneseny sterilní papírové disky, na které bylo aplikováno pomocí automatické mikropipety 10 μl EO v testovaných koncentracích. Vždy ke každé bakteriální kultuře byl nanesen i jeden sterilní disk, na který byla aplikována sterilní voda (kontrola růstu bakterie v okolí disku). Následně byly misky kultivovány 24 hodin při teplotě 37 °C, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* byl kultivován při teplotě 30 °C. Po uplynulé době byly změřeny vzniklé inhibiční zóny.

6.1.3 Analýza biogenních aminů kapalinovou chromatografií (HPLC)

Testované kmeny byly pomnoženy v kultivačních médiích obohacených o aminokyseliny arginin, ornitin, histidin, tyrozin, lyzin, fenylalanin (Sigma-Aldrich; každá v koncentraci 0,2 % w/v) a esenciální olej. Koncentrace esenciálních olejů byly pro jednotlivé testované kmeny zvoleny tak, aby zpomalily jejich růst, avšak zcela růst neinhibovaly (Tab. 5). Kultivace probíhala při 37 °C nebo 30 °C (*L. lactis* subsp. *cremoris*). Odběry vzorků byly provedeny po 24 a 48 hodinách z 2 paralelních zkumavek. Kontrolní odběr byl proveden vždy ihned po zaočkování (čas 0 hod). Poté byly vzorky centrifugovány a z každé zkumavky bylo odebráno do 2 mikrozkušavek 650 μl supernatantu, ke kterému bylo přidáno 650 μl kyseliny chloristé (Sigma-Aldrich; 1,2 M). Připravené vzorky byly následně zamrazeny při teplotě -18 °C do doby, než byly derivatizovány.

Tab. 5 Koncentrace esenciálních olejů

Bakteriální kmen	Kultivační půda s bakteriálním kmenem (ml)	Přidané množství 5% zásobního roztoku EO (μ l)	Získaná koncentrace EO (mg/ml)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48	4	20	250 (0,025%)
	4	40	500 (0,05%)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004	4	20	250 (0,025%)
	4	40	500 (0,05%)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141	4	80	1000 (0,1%)
	4	120	1500 (0,15%)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946	4	20	250 (0,025%)
	4	40	500 (0,05%)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824	4	20	250 (0,025%)
	4	40	500 (0,05%)
<i>Enterococcus durans</i> CCDM 53	4	40	500 (0,05%)
	4	80	1000 (0,1%)
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2665	4	40	500 (0,05%)
	4	80	1000 (0,1%)
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	4	40	500 (0,05%)
	4	80	1000 (0,1%)
<i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188	4	20	250 (0,025%)
	4	40	500 (0,05%)
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. <i>Enteritidis</i> CCM 4420	4	40	500 (0,05%)
	4	80	1000 (0,1%)

K připraveným vzorkům supernatantu s kyselinou chloristou bylo přidáno 100 μ l vnitřního standardu 1,7-heptandiaminu (Sigma-Aldrich) v koncentraci 500 mg/l. Dále byl odpipetován 1 ml vzorku do derivatizační nádoby a bylo přidáno 1,5 ml čerstvě připraveného karbonátového pufru (pH 11,1 – 11,2) a 2 ml čerstvě připraveného dansylchloridu (Sigma-Aldrich) o koncentraci 5 g/l v acetonu. Uzavřené nádoby byly třepány 20 hodin v temnu. Poté bylo

ke vzorkům přidáno 200 μ l roztoku prolinu a vzorky byly třepány další hodinu. Následně byly ke vzorku přidány 3 ml heptanu (Sigma-Aldrich) a po pečlivém uzavření nádobek se vzorky třepaly 5 minut ručně. Poté bylo odpipetováno 1 ml heptanové vrstvy do vialek. Obsah vialek byl odpařen při teplotě 65 °C do sucha pod proudem dusíku a suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich). Vialky byly zamrazeny na -18 °C do doby chromatografické analýzy.

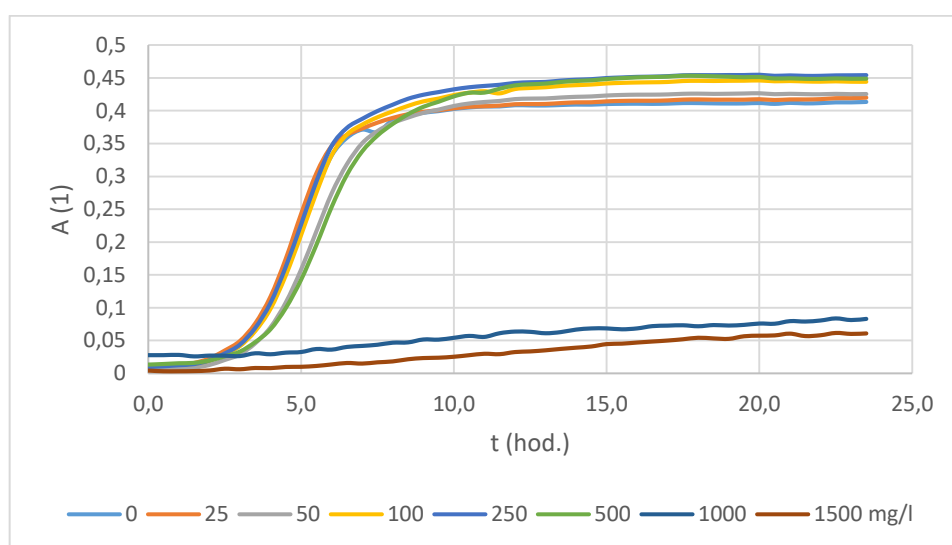
Před vlastní analýzou byly vzorky přefiltrovány přes filtr s porozitou 0,22 μ m. Následně byly dávkovány do chromatografického systému. Separace byla provedena gradientovou elucí (voda/acetonitril) na koloně Agilent Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 s parametry 50x3,0 mm, pórovitost 1,8 μ m (Agilent) při teplotě 30 °C, průtok kolonou byl nastaven na 0,453 ml/min. Chromatografický systém Dionex HPLC UltiMate 3000 byl tvořen odplyňovací jednotkou (degaserem), binární pumpou, autosamplerem, termostatem kolon a UV/VIS detektorem (Thermo Fisher Scientific); UV/VIS detekce při vlnové délce 254 nm. Chromatogramy byly vyhodnoceny pomocí softwaru Chromeleon™ 6.8

7 VÝSLEDKY

7.1 Mikrodiluční metoda

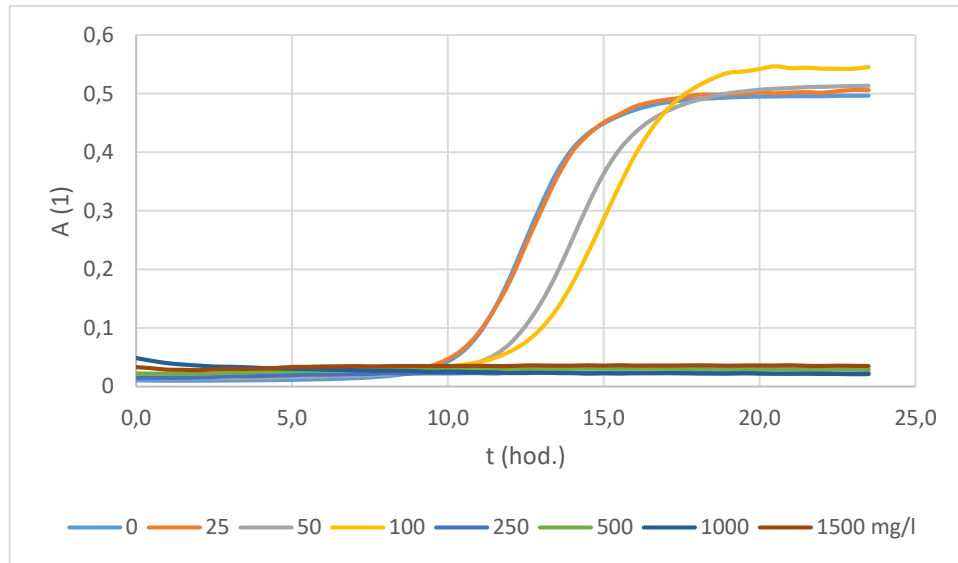
7.1.1 Vliv esenciálních olejů na bakterie rodu *Lactococcus*

Z obrázku 10 je patrné, že u kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 byla při použití esenciálního oleje lemongras zjištěna MIC (minimální inhibiční koncentrace) 1000 mg/l. U ostatních koncentrací tohoto esenciálního oleje byl pozorován stejný růst bakterie jako v prostředí bez oleje, přičemž doba lagu trvala cca 2,5 hodiny.



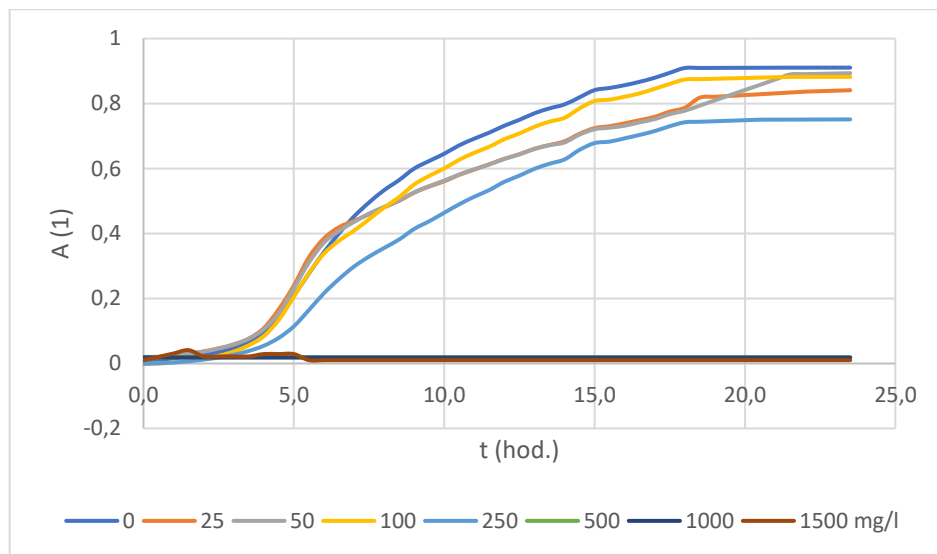
Obr. 10 Vliv esenciálního oleje lemongras na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

Obrázek 11 ukazuje, že byla prokázána MIC esenciálního oreganového oleje u bakteriálního kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 při koncentraci 250 mg/l. Doba lagu u ostatních koncentrací byla téměř stejná, cca 10 hodin, s dobou lagu testovaného mikroorganismu bez použití esenciálního oleje.



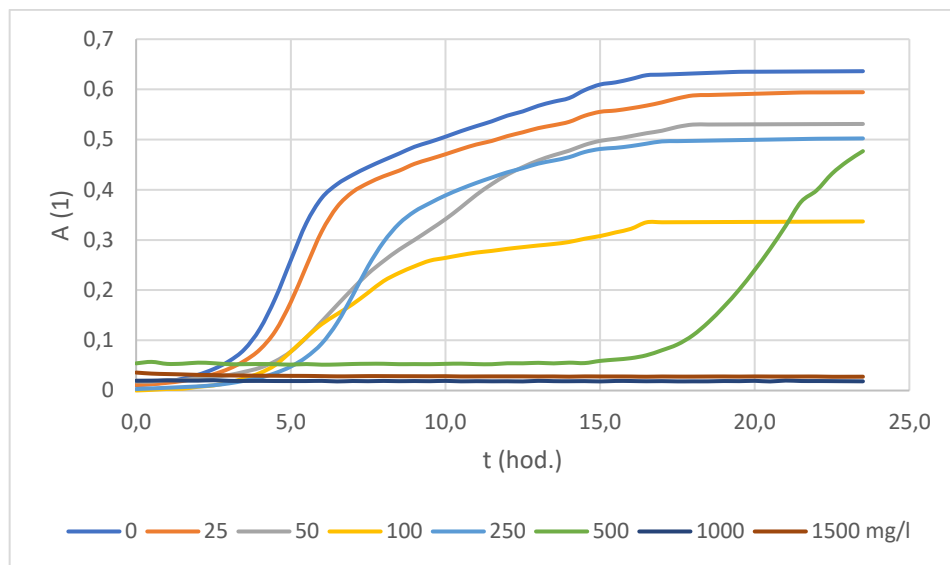
Obr. 11 Vliv esenciálního oleje z oregana na *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 48

Obrázek 12 je prokazuje dosaženou MIC u esenciálního oleje ze skořice při koncentraci 500 mg/l



Obr. 12 Vliv esenciálního oleje ze skořice na *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 48

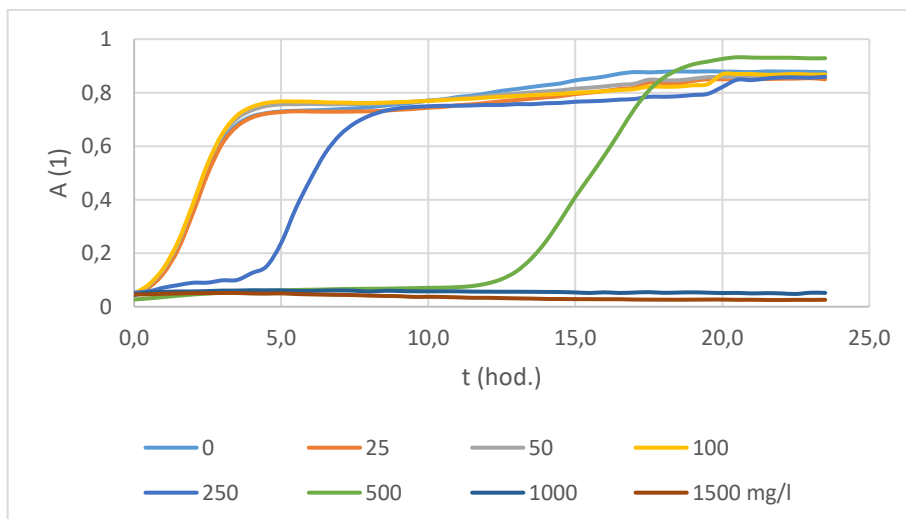
Podle obrázku 13 byla u esenciálního oleje z tymiánu prokázána MIC 1000 mg/l na mikroorganismus *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 48. Při koncentraci 500 mg/l tohoto esenciálního oleje byla lag fáze delší, celkem 16 hodin. Koncentrace 50 mg/l, 100 mg/l a 250 mg/l prodloužily lag dobu o 1 hodinu oproti kultivaci bez oleje.



Obr. 13 Vliv esenciálního oleje z tymiánu na *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 48

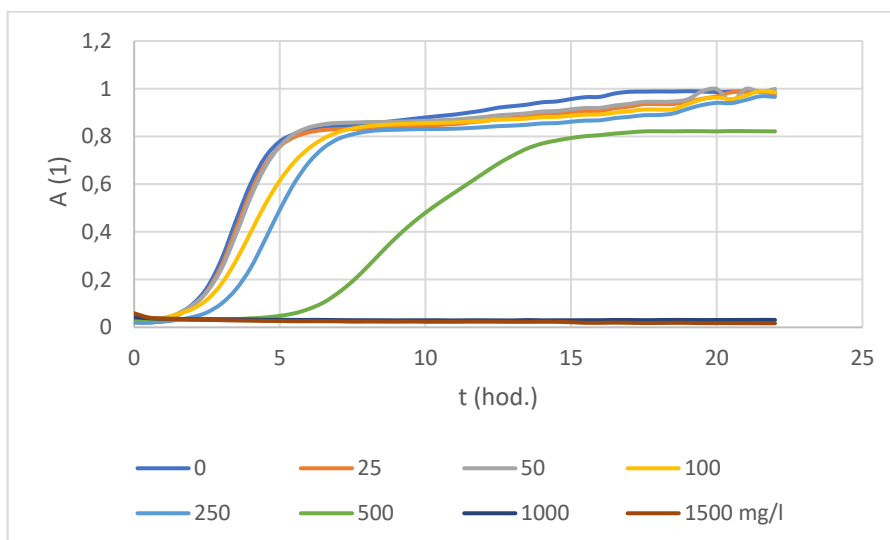
Mikroorganismus *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 48 byl nejvíce vnímavý na esenciální olej z oregana, kde již při koncentraci 250 mg/l byla prokázána minimální inhibice. Esenciální olej ze skořice měl vliv na tento bakteriální kmen při koncentraci 500 mg/l. Minimální inhibice kmene *L. lactis subsp. lactis* CCDM 48 byla také prokázána při koncentraci 1000 mg/l u esenciálních olejů z tymiánu a lemongras. Inhibice nebyla prokázána u esenciálních olejů z rozmarýnu a šalvěže.

Na obrázku 14 je patrné, že inhibice byla prokázána u esenciálního oleje z oregana, kdy byla zjištěná MIC 1000 mg/l na bakteriální kmen *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 141. Delší lag u tohoto bakteriálního kmene byl zaznamenán při koncentraci 500 mg/l na dobu cca 12 hodin. Prodloužení lagu o cca 3 hodiny bylo zaznamenáno při koncentraci 250 mg/l.



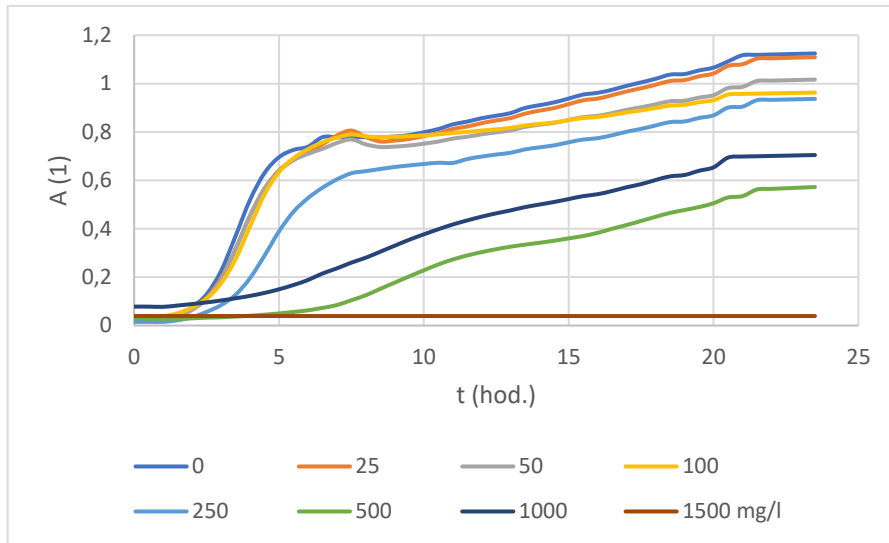
Obr. 14 Vliv esenciálního oleje z oregana na *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 141

Z obrázku 15 je patrné, že u mikroorganismu *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 141 byla prokázána inhibice u esenciálního oleje z rozmarýnu, MIC byla stanovena na 1000 mg/l. Při koncentraci 500 mg/l byla lag fáze daného bakteriálního kmene prodloužena cca o 2 hodiny.



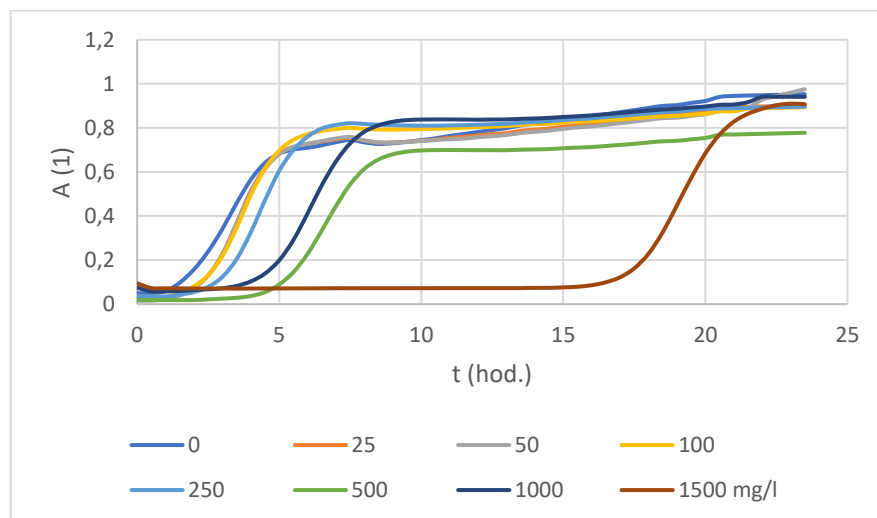
Obr. 15 Vliv esenciálního oleje z rozmarýnu na *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 141

Z grafického znázornění na obrázku 16 plyne, že u esenciálního oleje ze skořice byla u bakteriálního kmene *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 141 zjištěna MIC 1500 mg/l. Lag byl delší cca o 2 hodiny při aplikaci koncentrací 500 a 1000 mg/l esenciálního skořicového oleje oproti kultivaci v bujónu bez oleje.



Obr. 16 Vliv esenciálního oleje ze skořice na *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 141

Esenciální olej z tymiánu (obrázek 17) působil pouze slabě na kmen *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM, při nejvyšší aplikované koncentraci prodloužil dobu lagu na 16 hodin.

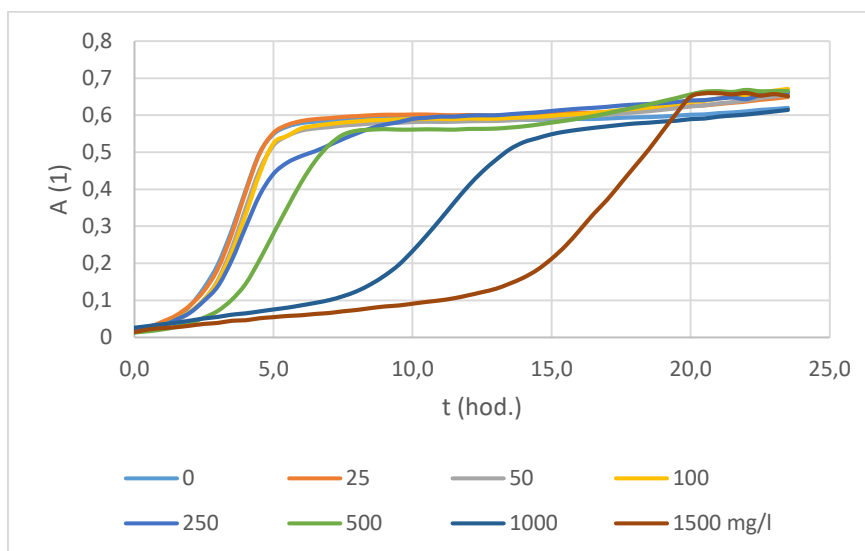


Obr. 17 Vliv esenciálního oleje z tymiánu na *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 141

Pomocí diluční metody bylo prokázáno, že bakteriální kmen *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 141 je citlivý na esenciální olej z oregana při koncentraci 1000 mg/l. Další esenciální olej, který prokázal inhibici na daný mikroorganismus byl rozmarýnový olej, jehož MIC

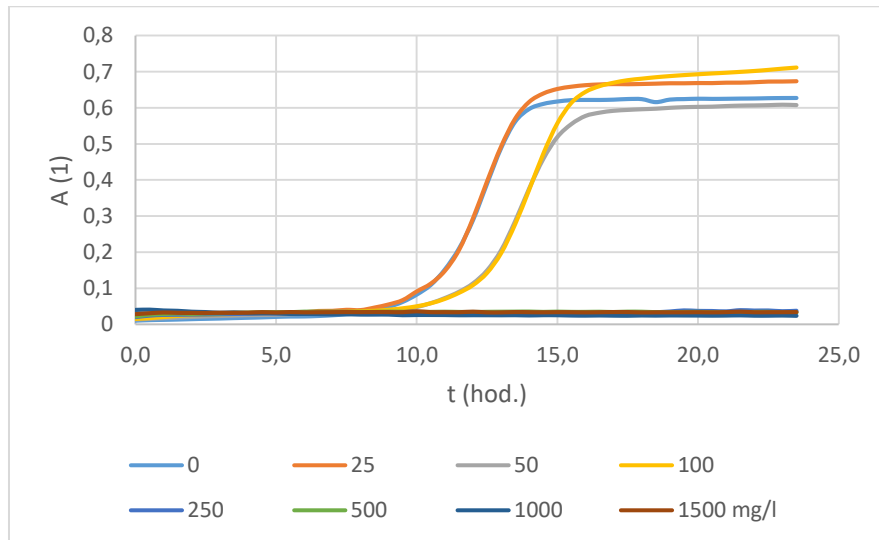
byla 1000 mg/l. U esenciálních olejů ze skořice a tymiánu byla prokázána MIC 1500 mg/l. Neprokázala se citlivost na esenciální oleje z lemongras a šalvěže.

Z grafického znázornění na obrázku 18 je patrné, že inhibice nebyla prokázána u testovaných koncentrací esenciálního oleje lemongras. Nejdelší lag fáze bakteriálního kmene *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 1004 byla zaznamenána při koncentraci 1500 mg/l, celkem po dobu 14 hodin. Koncentrace 1000 mg/l prodloužila lag fázi na 5 hodin.



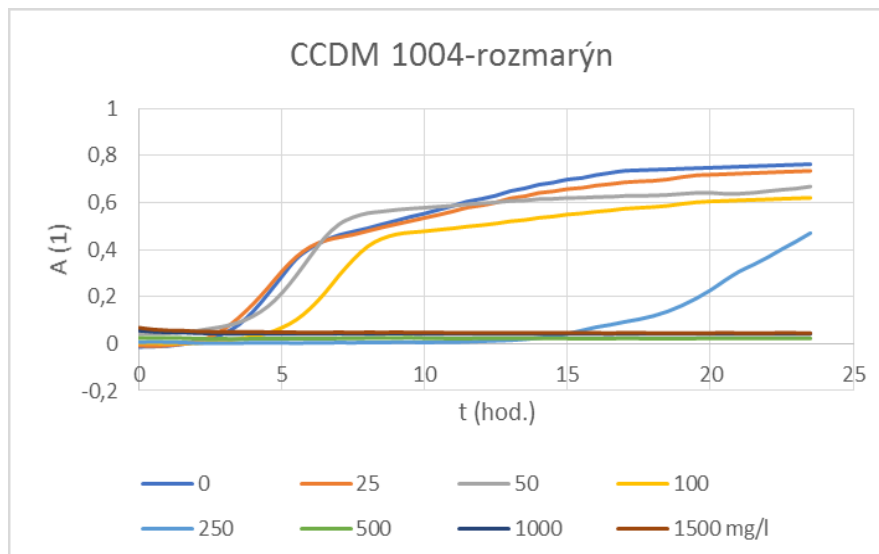
Obr. 18 Vliv esenciálního oleje lemongras na *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 1004

Z obrázku 19 je patrné, že byla prokázána inhibice bakteriálního kmene *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 1004 esenciálním olejem z oregana už při koncentraci 250 mg/l.



Obr. 19 Vliv esenciálního oleje z oregana na *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 1004

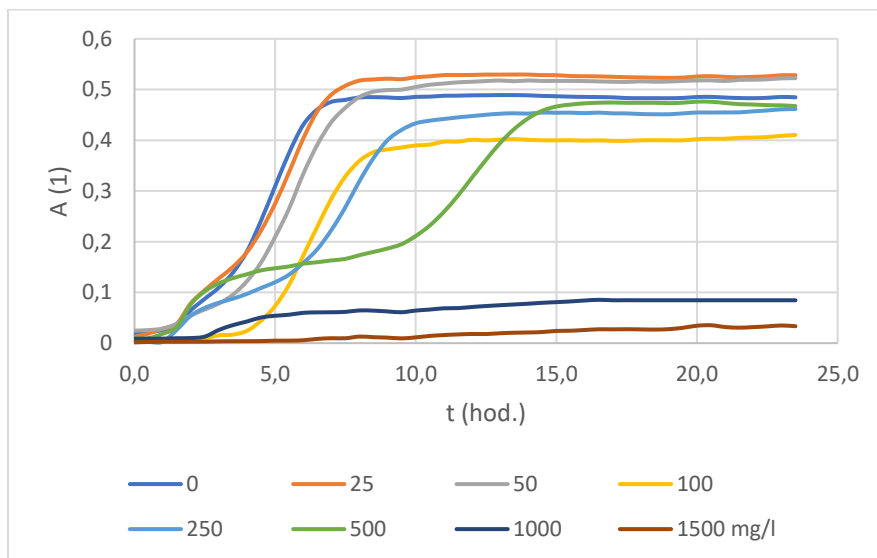
Esenciální olej z rozmarýnu působil inhibičně na *L. lactis subsp. lactis* CCDM 1004 podle obrázku 20 při koncentraci 500 mg/l. Delší lag fáze byla zaznamenána při koncentraci 250 mg/l, kdy byla prodloužena na dobu 15 hodin.



Obr. 20 Vliv esenciálního oleje z rozmarýnu na *Lactococcus lactis subsp. lactis*

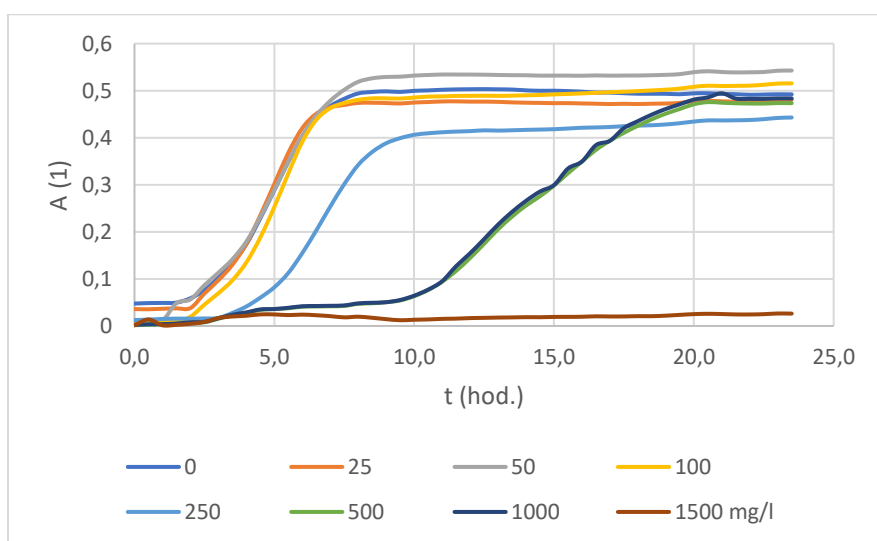
CCDM 1004

Z grafického znázornění na obrázku 21 je patrné, že inhibice mikroorganismu *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 1004 byla při použití esenciálního oleje ze skořice při koncentraci 1000 mg/l. Doba růstu byla prodloužena cca o 2 hodiny při koncentraci 100 mg/l.



Obr. 21 Vliv esenciálního oleje ze skořice na *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 1004

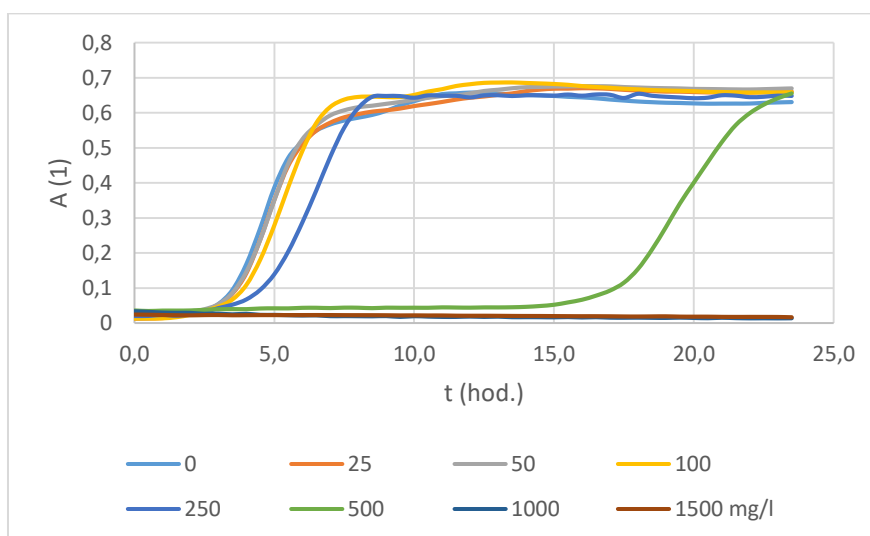
Z obrázku 22 je patrné, že u bakteriálního kmene *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 1004 za použití esenciálního oleje z tymiánu byla dosažena inhibice růstu při koncentraci 1500 mg/l. Lag byl u tohoto kmene delší cca o 6 hodin při aplikaci koncentrací 500 a 1000 mg/l tohoto esenciálního oleje oproti kultivaci v bujónu bez oleje.



Obr. 22 Vliv esenciálního oleje z tymiánu na *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 1004

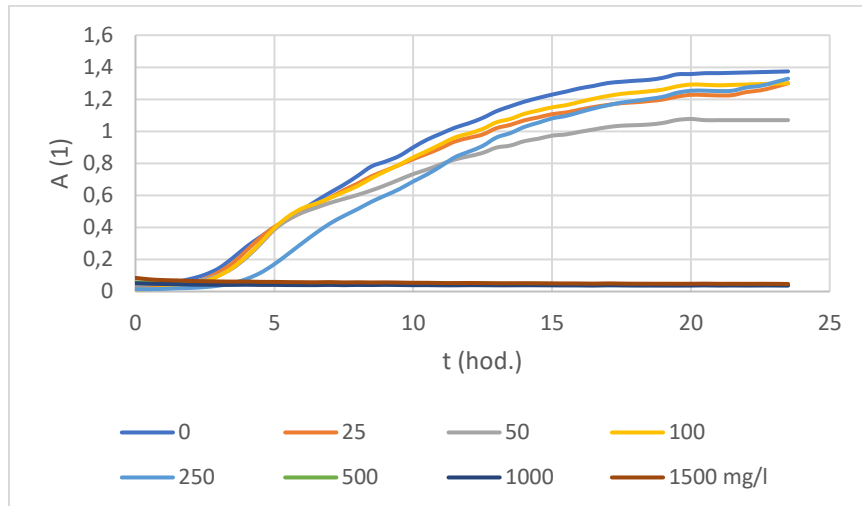
Bakteriální kmen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 prokázal největší citlivost na esenciální olej z oregana, kde už při koncentraci 250 mg/l byla prokázána inhibice růstu. Další esenciální olej, který způsobil pozastavení růstu daného mikroorganismu, byl rozmarýnový olej při koncentraci 500 mg/l. Esenciální olej ze skořice částečně prokázal inhibici při koncentraci 1000 mg/l. Použitím esenciálního oleje z tymiánu při koncentraci 1500 mg/l byl pozastaven růst bakteriálního kmene. Žádný vliv na růst bakteriálního kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 neměl esenciální olej ze šalvěje.

Obrázek 23 poukazuje na stanovenou inhibici esenciálního oleje z oregana při koncentraci 1500 mg/l. Delší lag oproti bujónu bez oleje, celkem o cca 14 hodin, byl u mikroorganismu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 pozorován při koncentraci 500 mg/l tohoto oleje.



Obr. 23 Vliv esenciálního oleje z oregana na *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

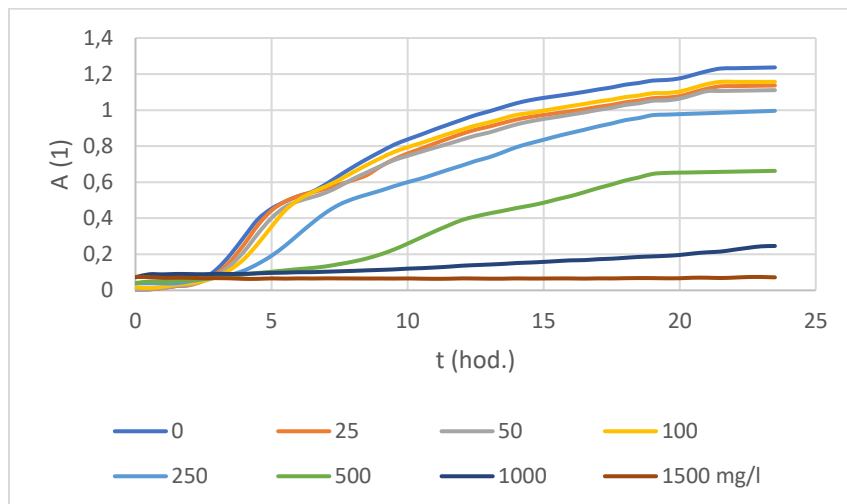
Z grafického znázornění na obrázku 24 plyne, že inhibice byla prokázána u esenciálního oleje z rozmarýnu při koncentraci 500 mg/l u bakteriálního kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946.



Obr. 24 Vliv esenciálního oleje z rozmarýnu na *Lactococcus lactis subsp. cremoris*

CCDM 946

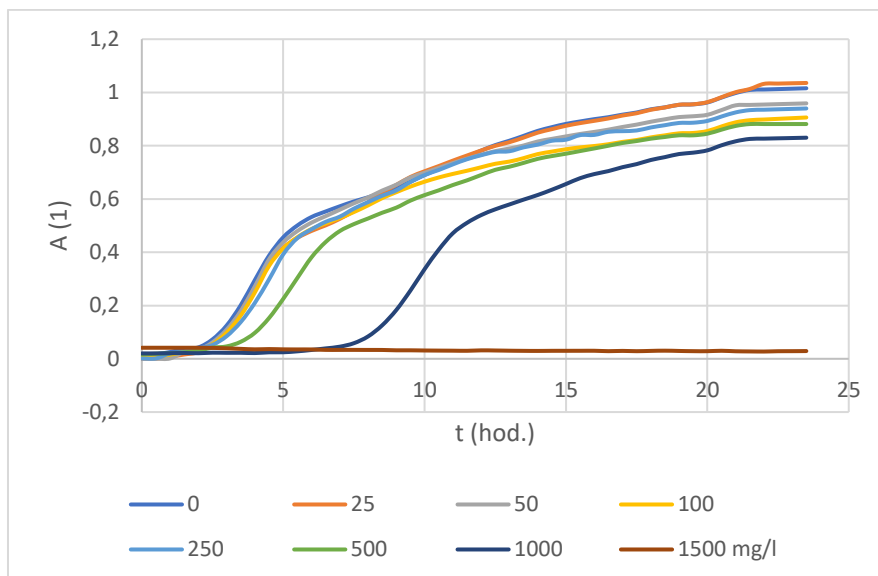
Z obrázku 25 vyplývá, že MIC esenciálního oleje ze skořice byla u daného mikroorganismu *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 946 stanovena na 1000 mg/l. Lag fáze byla prodloužena cca o 2 hodiny při koncentraci 500 mg/l.



Obr. 25 Vliv esenciálního oleje ze skořice na *Lactococcus lactis subsp. cremoris*

CCDM 946

Z obrázku 26 je patrné, že byla prokázána inhibice u esenciálního oleje z tymiánu při koncentraci 1500 mg/l na bakteriální kmen *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 946. Delší lag, cca o 5 hodin, byl zaznamenán při koncentraci 1000 mg/l.

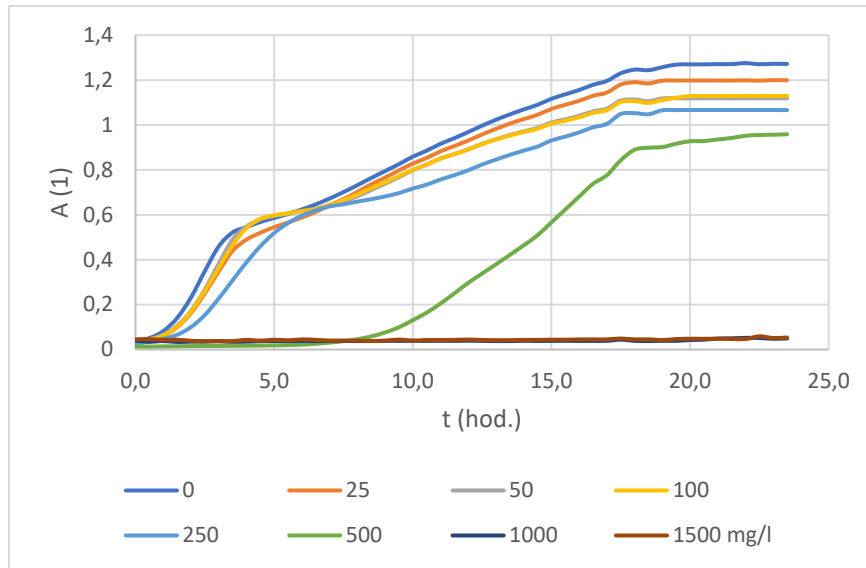


Obr. 26 Vliv esenciálního oleje z tymiánu na *Lactococcus lactis subsp. cremoris*

CCDM 946

Mikroorganismus *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 946 prokázal největší citlivost na esenciální olej z rozmarýnu, kde byla stanovena MIC 500 mg/l. Esenciální oleje z oregana a tymiánu inhibovaly tento kmen při koncentraci 1500 mg/l. Růst mikroorganismu nebyl zastaven použitím esenciálních olejů z lemongras a šalvěje.

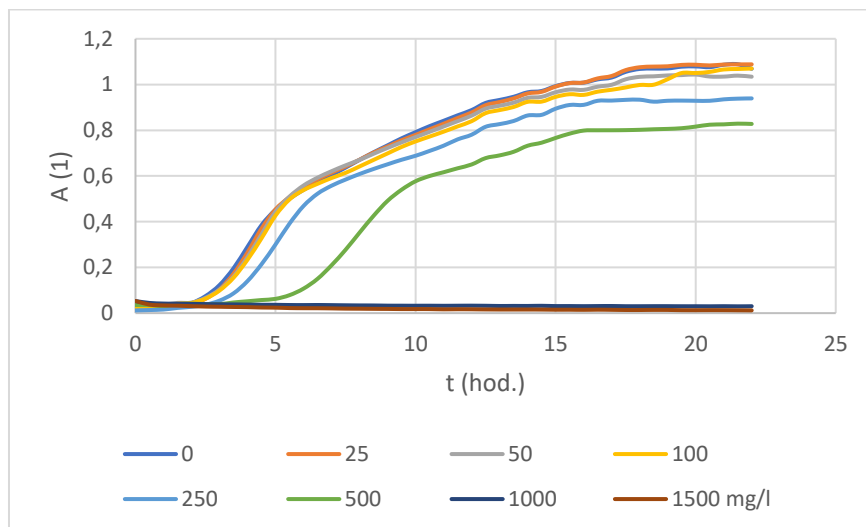
Z obrázku 27 je patrné, že inhibice byla dosažena u mikroorganismu *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 824 za použití esenciálního oleje z oregana při koncentraci 1000 mg/l. Lag bakteriálního kmene byl při koncentraci 500 mg/l delší celkem cca o 7 hodin proti vzorku s nulovou koncentrací esenciálního oleje.



Obr. 27 Vliv esenciálního oleje z oregana na *Lactococcus lactis subsp. cremoris*

CCDM 824

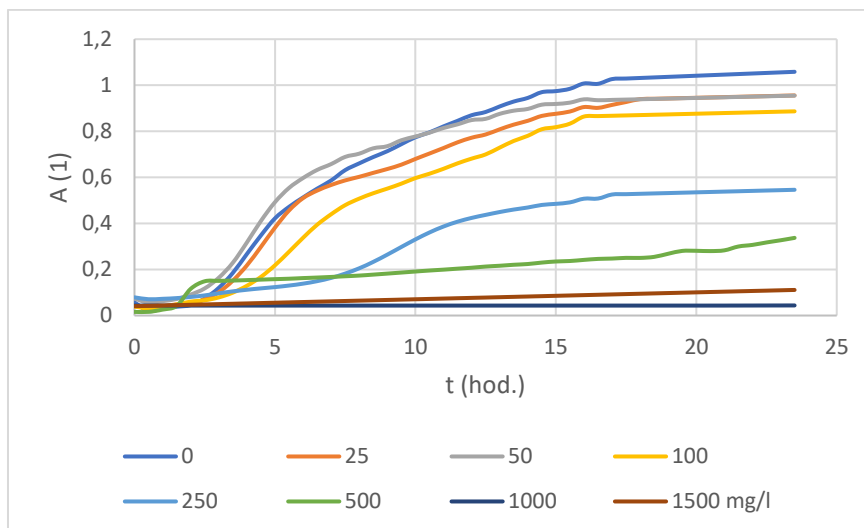
Z obrázku 28 vyplývá, že u bakteriálního kmene *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 824 byla s použitím esenciálního oleje z rozmarýnu stanovena MIC na 1000 mg/l. Lag fáze byla prodloužena o cca 3 hodiny při koncentraci 500 mg/l.



Obr. 28 Vliv esenciálního oleje z rozmarýnu na *Lactococcus lactis subsp. cremoris*

CCDM 824

Obrázek 29 poukazuje na to, že byla prokázána inhibice bakteriálního kmene *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 824 při použití esenciálního oleje ze skořice v koncentraci 1000 mg/l.

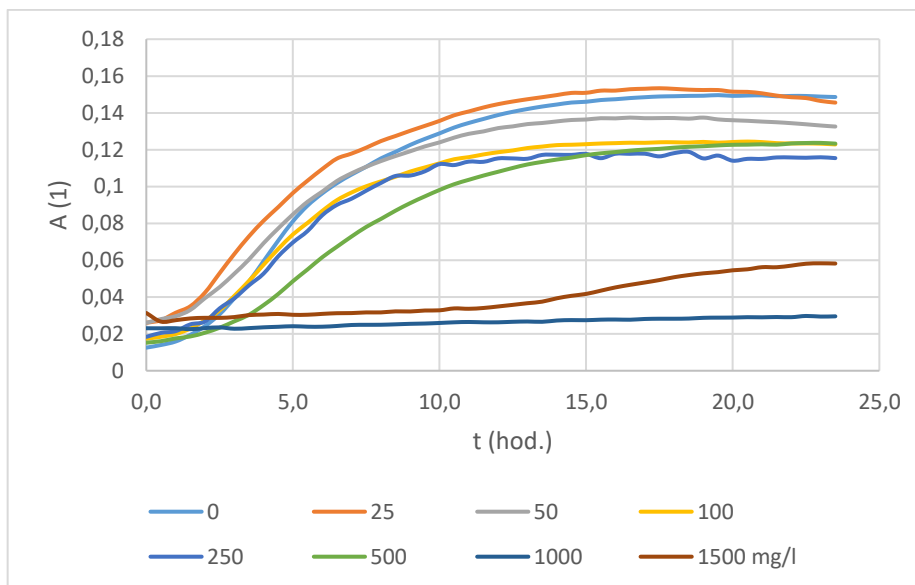


Obr. 29 Vliv esenciálního oleje ze skořice na *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 824

U testovaného bakteriálního kmene *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 824 byla prokázána inhibice působením esenciálních olejů z oregana, rozmarýnu a skořice v koncentraci 1000 mg/l. Naopak nebyla pozorována inhibice po aplikaci esenciálních olejů z lemongras, šalvěže a tymiánu.

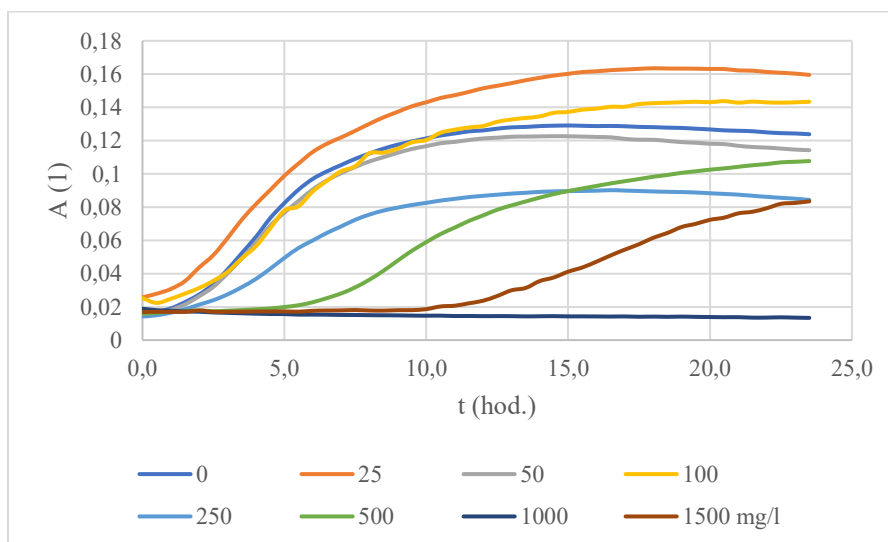
7.1.2 Vliv esenciálních olejů na bakterie rodu *Enterococcus*

Z obrázku 30 je patrné, že inhibice bakteriálního kmene *Enterococcus durans* CCDM 53 byla dosažena za použití esenciálního oleje lemongras při koncentraci 1000 mg/l.



Obr. 30 Vliv esenciálního oleje lemongras na *Enterococcus durans* CCDM 53

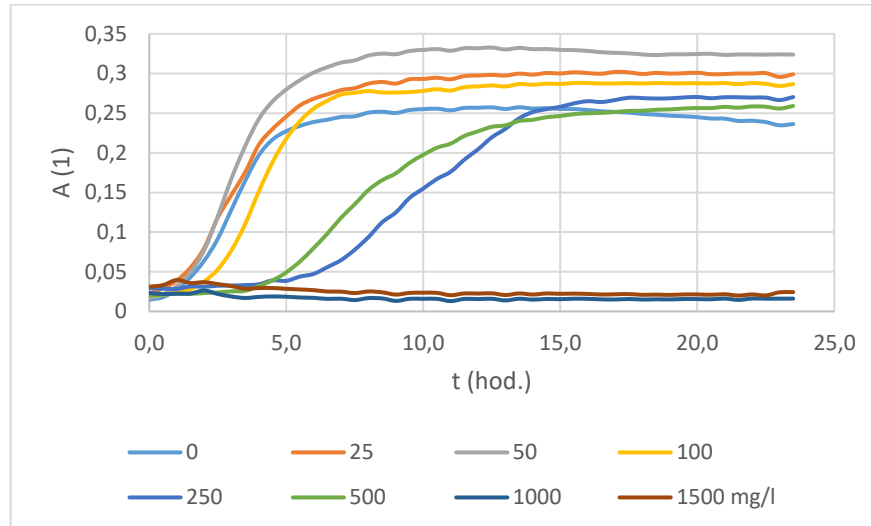
Z obrázku 31 vyplývá, že MIC po působení esenciálního oleje z oregana u mikroorganismu *Enterococcus durans* CCDM 53 byla stanovena na 1000 mg/l. Lag fáze byla prodloužena cca o 3 hodiny při aplikaci koncentrace 500 mg/l oproti kultivaci v bujónu bez tohoto oleje.



Obr. 31 Vliv esenciálního oleje z oregana na *Enterococcus durans* CCDM 53

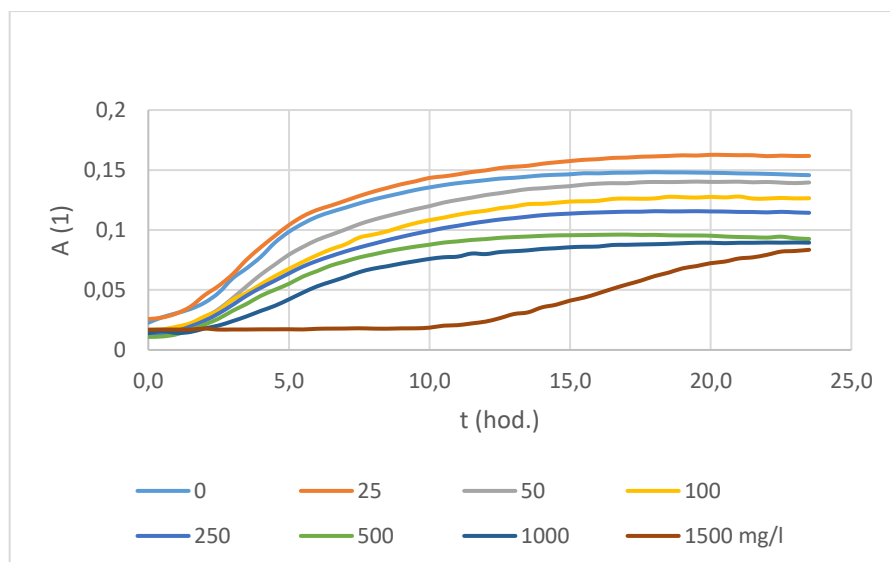
Při použití esenciálních olejů byla prokázána u bakteriálního kmene *Enterococcus durans* CCDM 53 inhibice pouze při použití esenciálního oleje z lemongras při koncentraci 1000 mg/l a esenciálního oleje z oregana při koncentraci 1500 mg/l.

Na obrázku 32 je vidět, že u bakteriálního kmene *Enterococcus faecalis* CCM 2665 byla stanovena MIC při použití esenciálního oleje z oregana na 1000 mg/l. Lag doba byla prodloužena cca o 2 hodiny po aplikaci tohoto oleje v koncentracích 250 mg/l a 500 mg/l.



Obr. 32 Vliv esenciálního oleje z oregana na *Enterococcus faecalis* CCM 2665

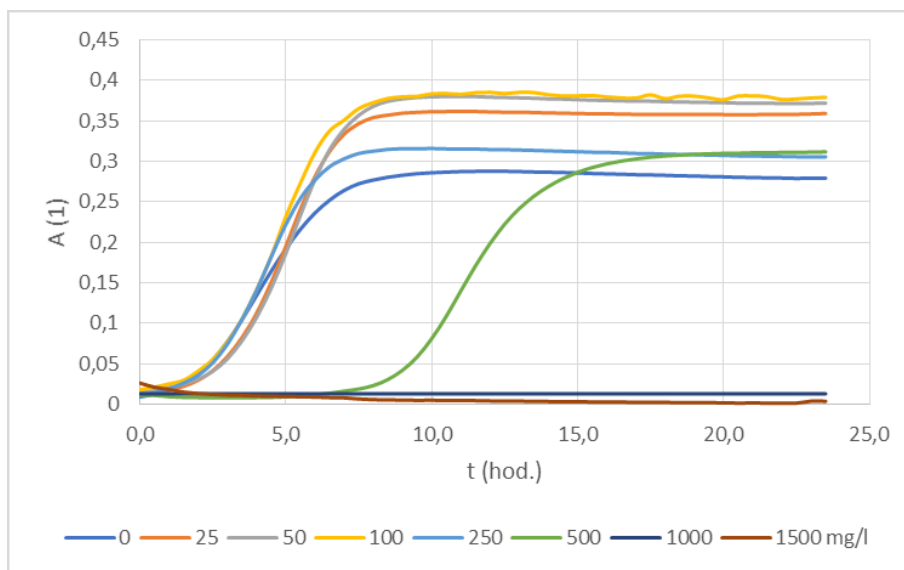
Obrázek 33 ukazuje na to, že nebyla prokázána inhibice u bakteriálního kmene *Enterococcus faecalis* CCM 2665 po aplikaci esenciálního oleje ze skořice. Pouze u koncentrace 1500 mg/l byla lag fáze prodloužena o cca 7 hodin.



Obr. 33 Vliv esenciálního oleje ze skořice na *Enterococcus faecalis* CCM 2665

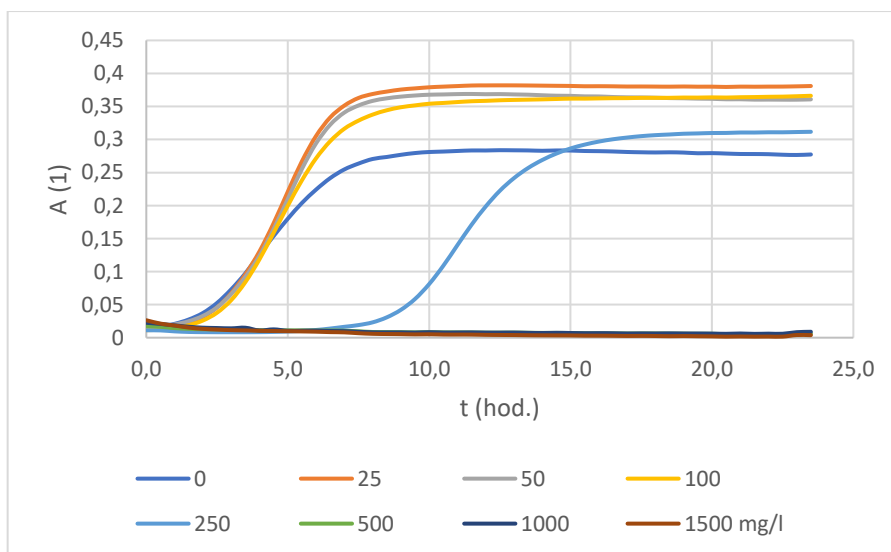
Bakteriální kmen *Enterococcus faecalis* CCM 2665 prokázal citlivost pouze na esenciální olej oregana. Při použití esenciálního oleje ze skořice byla prodloužena lag fáze (obr. 33)

Z obrázku 34 je patrné, že u bakteriálního kmene *Enterococcus faecalis* CCM 4224 byla zjištěna MIC za použití esenciálního oleje lemongras 1000 mg/l. Lag fáze byla prodloužena o cca 5 hodin při použití koncentrace 500 mg/l esenciálního oleje.



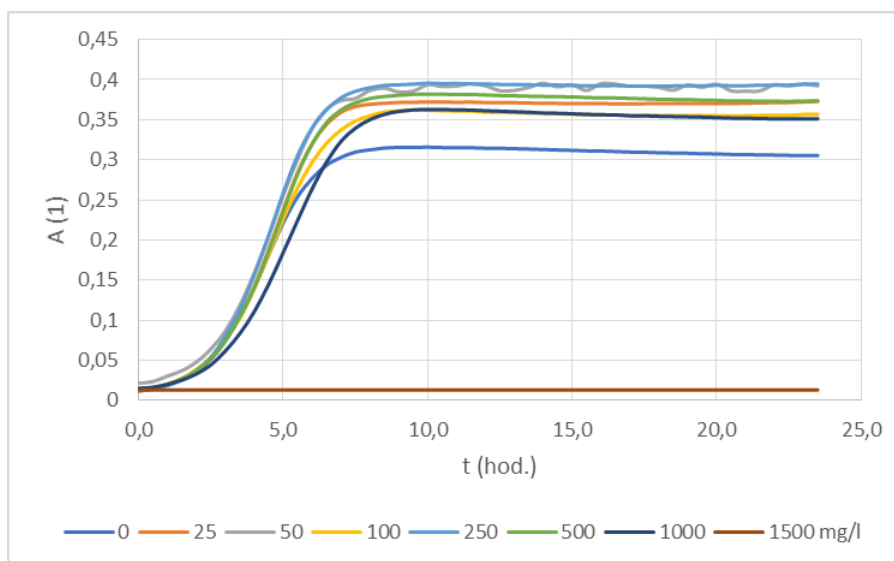
Obr. 34 Vliv esenciálního oleje lemongras na *Enterococcus faecalis* CCM 4224

Z obrázku 35 je patrné, že MIC u bakteriálního kmene *E. faecalis* CCM 4224 byla u esenciálního oleje z oregana tanovena na 500 mg/l. Lag fáze byla prodloužena při aplikaci tohoto oleje v koncentraci 250 mg/l na 7 hodin.



Obr. 35 Vliv esenciálního oleje z oregana na *Enterococcus faecalis* CCM 4224

Obrázek 36 prokazuje na stanovenou MIC u bakteriálního kmene *Enterococcus faecalis* CCM 4224 1500 mg/l u esenciálního oleje z rozmarýnu.



Obr. 36 Vliv esenciálního oleje z rozmarýnu na *Enterococcus faecalis* CCM 4224

Při testaci bakteriálního kmene *Enterococcus faecalis* CCM 4224 byla prokázána inhibice esenciálním olejem z oregana při koncentraci 500 mg/l. Další inhibice byla pozorovatelná u esenciálního oleje lemongras při koncentraci 1000 mg/l. Koncentrace 1500 mg/l esenciálního oleje z rozmarýnu také dokázala redukovat růst tohoto bakteriálního kmene. K pozastavení růstu nedošlo při použití esenciálních olejů ze skořice, šalvěje a tymiánu.

U testovaných mikroorganismů *Proteus mirabilis* CCM 7188 a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 nebyly stanoveny minimální inhibiční koncentrace testovaných esenciálních olejů.

8.1 Difuzní metoda

Výsledky naměřených inhibičních zón po aplikaci esenciálních olejů na jednotlivé bakteriální kmeny se nachází v tabulce Tab. 6

Tab. 6: Inhibiční zóny po aplikaci esenciálních olejů na testované kmeny bakterií

Mikroorganismus	Koncentrace EO	Esenciální olej											
		Lemongras		Oregano		Rozmarýn		Tymián		Skořice		Šalvěj	
		velikost inhibice (mm)	velikost inhibice (mm)	velikost inhibice (mm)	velikost inhibice (mm)	velikost inhibice (mm)	velikost inhibice (mm)	velikost inhibice (mm)	velikost inhibice (mm)	velikost inhibice (mm)	velikost inhibice (mm)	velikost inhibice (mm)	velikost inhibice (mm)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48	25 mg/l	6,6	6,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50 mg/l	7,2	7,1	7,8	7,7	6,7	6,8	8,2	8,4	8,2	8,1	-	-
	100 mg/l	7,9	7,4	8,4	8,2	8,2	8,3	8,1	8,3	8,8	8,5	8,9	8,8
	250 mg/l	8,1	7,8	9,3	9,1	8,1	8,0	10,1	10,3	7,8	7,6	11,0	11
	500 mg/l	9,8	10	10	10	8,5	8,9	11,0	10,1	7,4	7,5	10,8	11,
	1000 mg/l	11,	11	11	11,	9,5	9,6	10,6	10,8	7,7	7,8	11,6	11,
	1500 mg/l	12,	11,	11,4	11,4	9,4	9,3	11,6	11,9	8,6	8,6	11,9	11
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824	25 mg/l	-	-	-	-	-	-	6,6	6,7	-	-	-	-
	50 mg/l	-	-	-	-	-	-	6,4	6,5	6,4	6,5	-	-
	100 mg/l	-	-	10	10	-	-	8,1	8,6	9,6	8,6	9,0	9,1
	250 mg/l	10,	9,1	9	9,2	10,8	10	11,7	11,1	9,2	9,5	9,4	9,6
	500 mg/l	11	10	10	9,8	10,8	10,	10,5	10,6	10	10	10,1	10,
	1000 mg/l	10	11	10	10,4	11,8	11,3	12,7	12,4	9,7	9,8	11,4	11,5
1500 mg/l	11,5	11	11,8	12,8	11,8	11,6	11,9	11,5	11,0	11,1	12,5	12,7	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004	25 mg/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50 mg/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100 mg/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	250 mg/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	500 mg/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1000 mg/l	8,1	8,4	7,6	7,9	-	-	-	-	-	-	7,5	7,6
	1500 mg/l	9,4	9,1	7,2	7,4	9,3	10,1	-	-	7,1	7,4	7,1	7,2
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141	25 mg/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50 mg/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100 mg/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	250 mg/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	500 mg/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1000 mg/l	8,4	7,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1500 mg/l	7,2	8,2	-	-	-	-	7,6	7,4	-	-	7,4	7,9
<i>Enterococcus durans</i> CCDM 53	25 mg/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50 mg/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100 mg/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	250 mg/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	500 mg/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1000 mg/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1500 mg/l	-	-	7,0	7,2	-	-	-	-	-	-	-	-

Z dosažených hodnot vyplývá, že pomocí plotnové metody byly detekovány inhibiční zóny po působení esenciálního oleje lemongras v nejnižší koncentraci 25 mg/l u bakteriálního

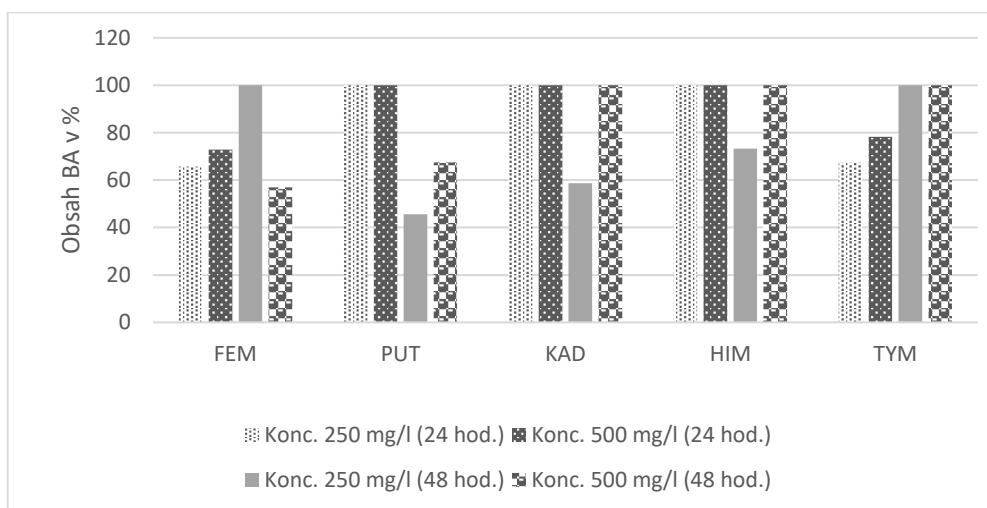
kmene *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 48. Při koncentraci 250 mg/l u všech testovaných esenciálních olejů se citlivost prokázala u kmenů *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 48, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 824. Z rodu *Enterococcus* reagoval na esenciální olej z oregana v koncentraci 1500 mg/l pouze *Enterococcus durans* CCDM 53. U rodů *Salmonella* a *Proteus* nebyly pozorovány žádné inhibiční zóny.

9.1 Analýza produkce biogenních aminů

7.1.3 Vliv esenciálních olejů na produkci biogenních aminů u bakterií rodu

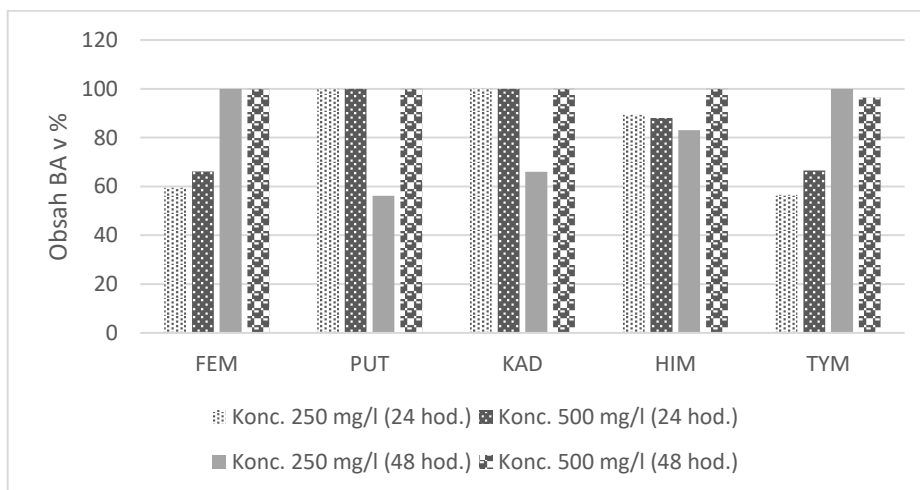
Lactococcus

Obrázek 37 znázorňuje největší pokles BA fenylethylaminu u bakteriálního kmene *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 48. Pokles činil po 48 hodinách kultivace až 40 % v přítomnosti esenciálního oleje z rozmarýnu o koncentraci 500 mg/l. Z obrázku také vyplývá, že obsah tyraminu byl snížen o 20 % pouze při kultivaci po dobu 24 hodin. Při delší kultivaci pokles již nebyl zaznamenán.



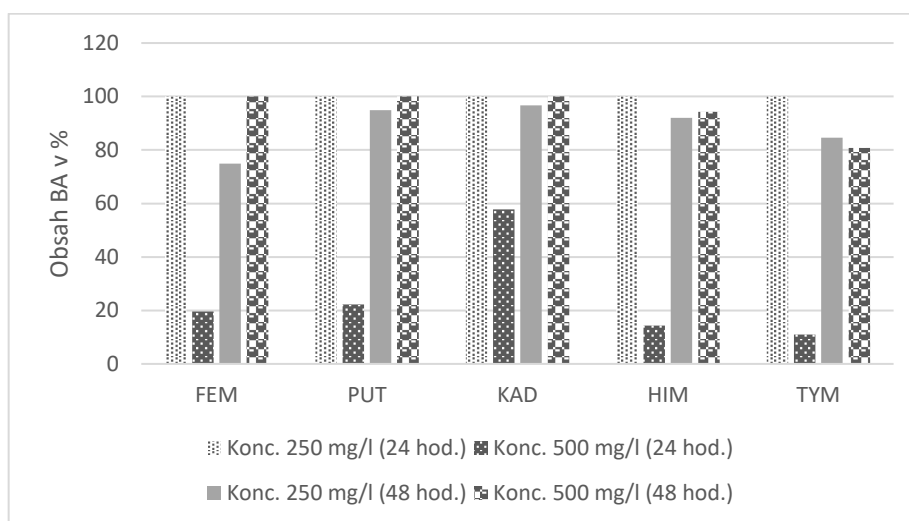
Obr. 37 Produkce biogenních aminů kmenem *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 48 v přítomnosti esenciálního oleje z rozmarýnu

Obrázek 38 poukazuje na největší úbytek fenylethylaminu po 24 hodinové kultivaci v přítomnosti tymiánového oleje o koncentraci 500 mg/l. Snížení obsahu daného BA aminu bylo o 40 %. Esenciální olej z tymiánu v koncentraci 250 a 500 mg/l měl také vliv na pokles BA tyraminu, a to o cca 20 % po 24 hodinové kultivaci.



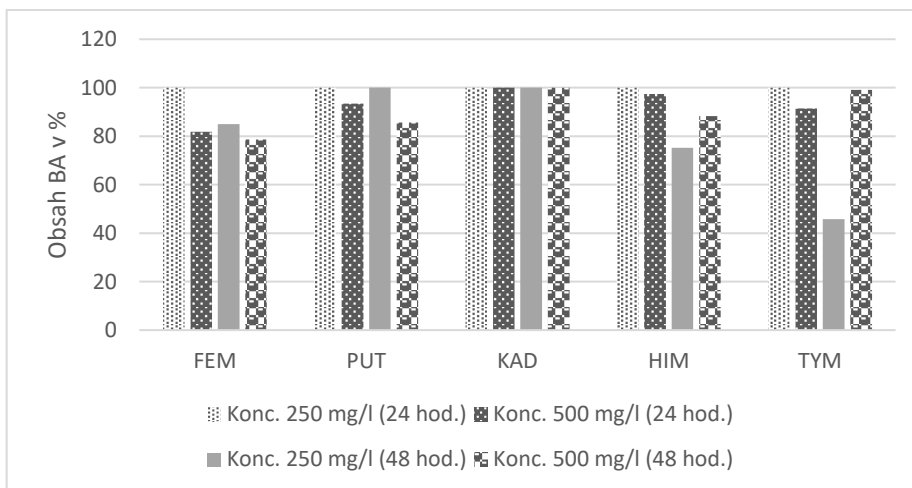
Obr. 38 Produkce biogenních aminů kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 v přítomnosti esenciálního oleje z tymiánu

Na obrázku 39 je znázorněn vliv esenciálního oleje ze skořice na produkci BA kmenem *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48. Prokázáno bylo největší snížení tyraminu po 24 hodinové kultivaci, a to až o 90 % při koncentraci oleje 500 mg/l. Všeobecně by se dalo říct, že tento olej v koncentraci 500 mg/l měl vliv na všechny sledované BA po jednodenní kultivaci. Po 48 hodinách kultivace bakteriálního kmene vzrostl obsah tyraminu na 80 %.



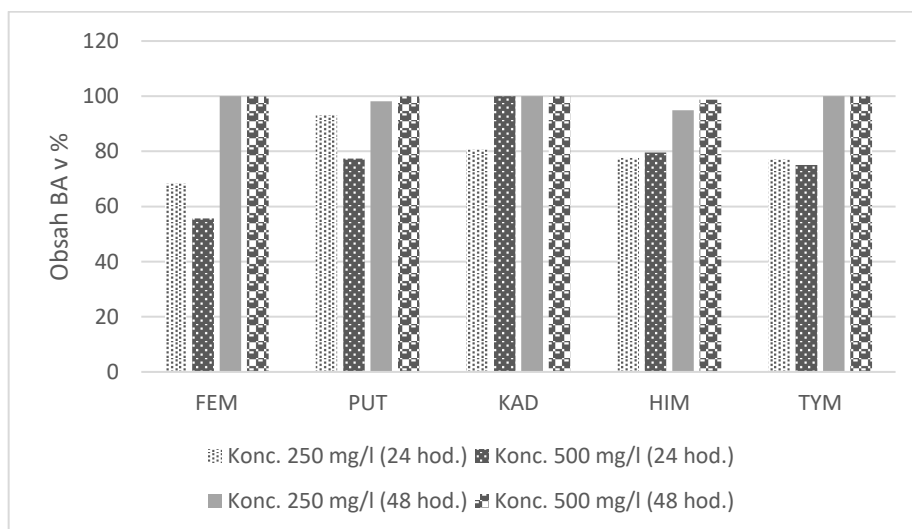
Obr. 39 Produkce biogenních aminů kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 v přítomnosti esenciálního oleje ze skořice

Podle obrázku 40 esenciální olej lemongras působil při koncentraci 500 mg/l nejvíce na obsah fenylethylaminu. Během inkubace tohoto kmene nedošlo po 48 hodinách ke zvýšení obsahu fenylethylaminu. Celkově lze říct, že byla pozastavena produkce tohoto BA na 80 %. Zhruba o 15 % byla snížena i produkce putrescinu a histaminu po dvoudenní inkubaci bakteriálního kmene a použité koncentraci oleje 500 mg/l.



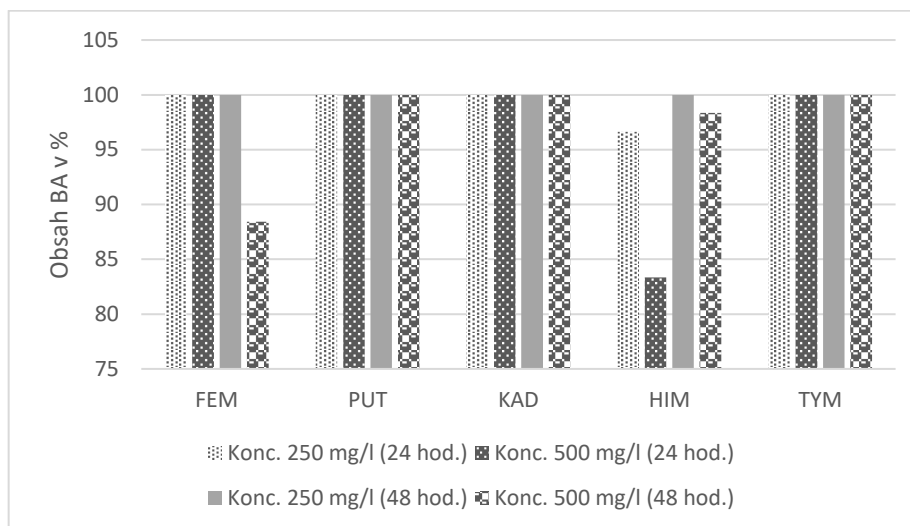
Obr. 40 Produkce biogenních aminů kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 v přítomnosti esenciálního oleje lemongras

Obrázek 41 znázorňuje snížení obsahu jednotlivých BA pouze po 24 hodinové kultivaci kmene *L. lactis subsp. lactis* CCDM 1004 za použití koncentrací 250 a 500 mg/l esenciálního oleje z tymiánu. Skoro o polovinu bylo zaznamenáno snížení fenylethylaminu. K snížení obsahu o přibližně 20 % došlo i u dalších BA putrescinu, histaminu a tyraminu



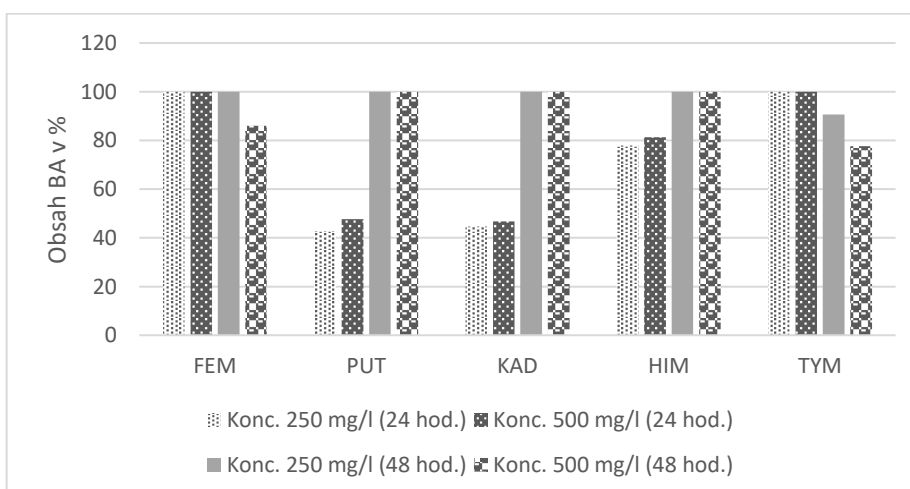
Obr. 41 Produkce biogenních aminů kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 v přítomnosti esenciálního oleje z tymiánu

Na obrázku 42 je patrný pokles obsahu fenylethylaminu po dvou dnech kultivace v přítomnosti skořicového esenciálního oleje v koncentraci 500 mg/l (zhruba o 11 %). Obsah histaminu po 24 hodinové kultivaci bakteriálního kmene *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 1004 klesl na cca 84 % ve vzorku, kde byl použit olej v koncentraci 500 mg/l.



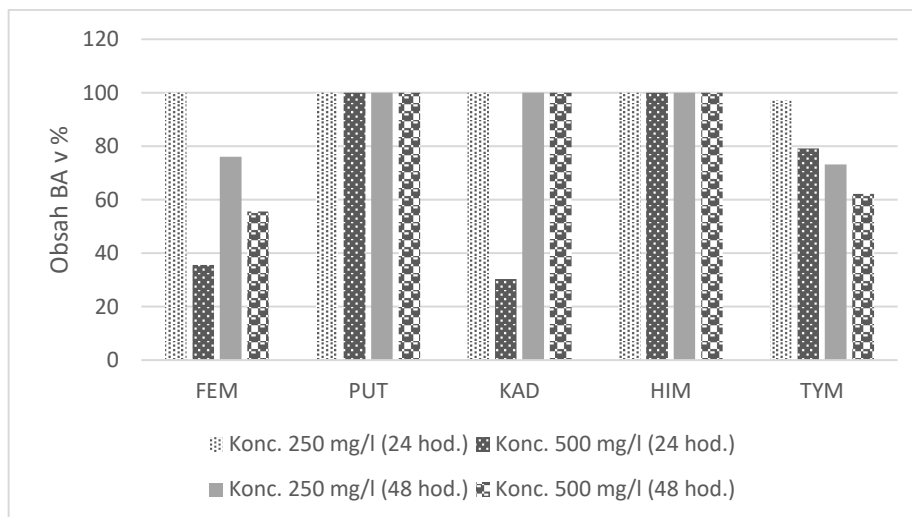
Obr. 42 Produkce biogenních aminů kmenem *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 1004 v přítomnosti esenciálního oleje ze skořice

Podle obrázku 43 esenciální olej z rozmarýnu měl největší vliv na produkci putrescinu a kadaverinu po jednodenní kultivaci kmene *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 946. Obsah se snížil skoro o 60 % při všech aplikovaných koncentracích tohoto oleje. Po dvoudenní inkubaci byl o jednu čtvrtinu snížen obsah tyraminu při použití koncentrace 500 mg/l. Obsah biogenního aminu histaminu byl snížen o 20 % při 24 hod. kultivaci.



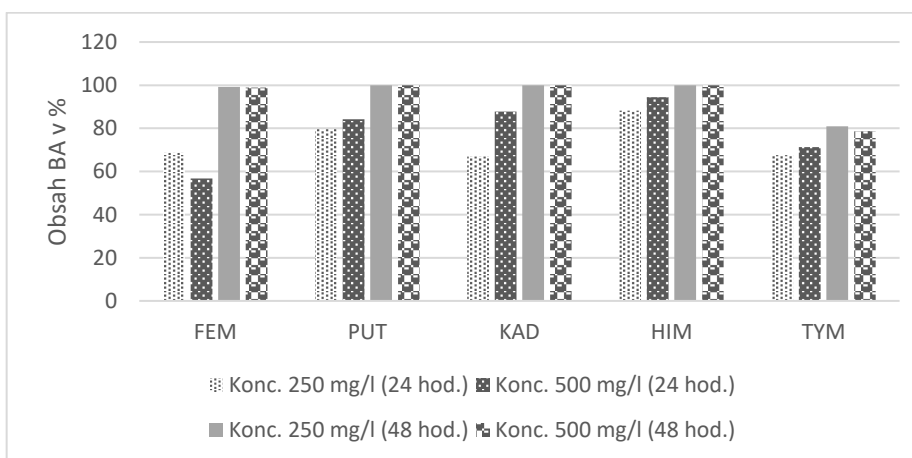
Obr. 43 Produkce biogenních aminů kmenem *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 946 v přítomnosti esenciálního oleje z rozmarýnu

Na obrázku 44 je vidět, že k největšímu úbytku BA v přítomnosti esenciálního oleje z tymiánu došlo u fenylethylaminu. Pokles až na polovinu byl zaznamenán i po dvoudenní kultivaci bakteriálního kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 946. K dalšímu zajímavému poklesu obsahu až o 40 % došlo u tyraminu po dvou dnech. Esenciální olej z tymiánu neměl vliv na snížení obsahu putrescinu a histaminu.



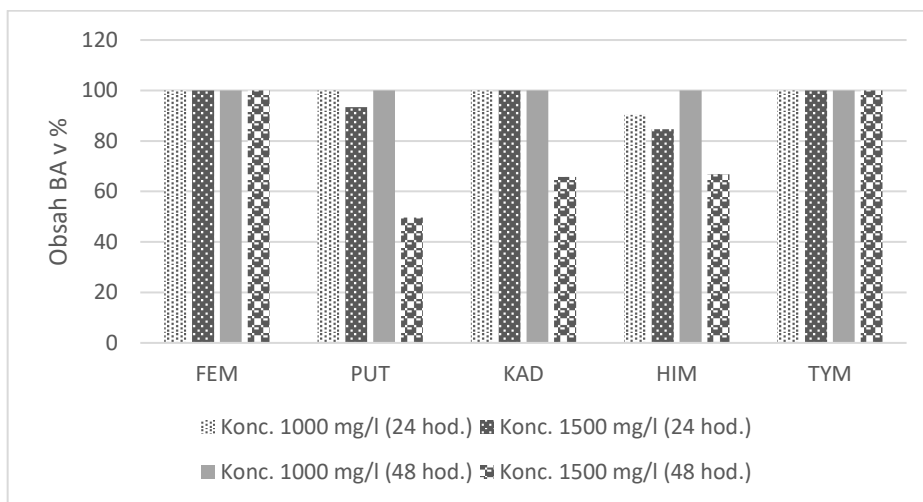
Obr. 44 Produkce biogenních aminů kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 946 v přítomnosti esenciálního oleje z tymiánu

Jak je patrné z obrázku 45, esenciální olej ze šalvěje nejvíce působil na produkci tyraminu, kde jeho obsah se snížil až o 20 %. Produkce fenylethylaminu u bakteriálního kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 946 byla snížena jenom během prvních 24 hodin.



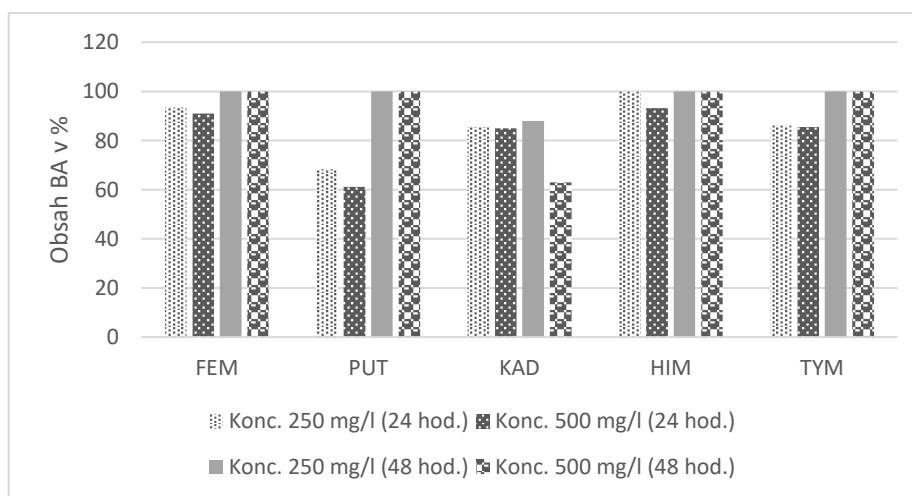
Obr. 45 Produkce biogenních aminů kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 946 v přítomnosti esenciálního oleje ze šalvěje

Obrázek 46 poukazuje na snížení obsahu putrescinu až o polovinu po dvou dnech kultivace v přítomnosti esenciálního oleje z oregana v koncentraci 1500 mg/l. Vlivem daného oleje u bakteriálního kmene *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 141 také klesla produkce kadaverinu a histaminu zhruba o jednu třetinu.



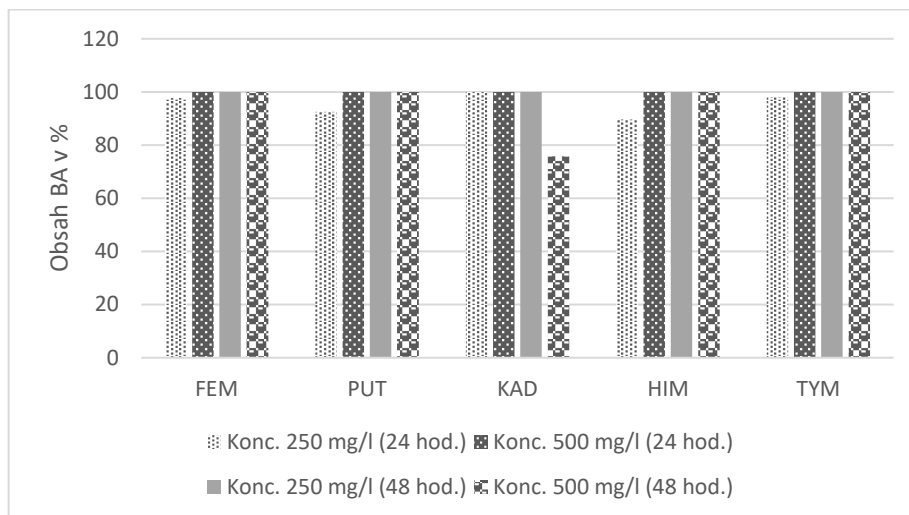
Obr. 46 Produkce biogenních aminů kmenem *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 141 v přítomnosti esenciálního oleje z oregana

Podle obrázku 47 esenciální olej lemongras a měl největší vliv u kmene *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 824 na produkci kadaverinu, kde došlo ke snížení skoro o 40 %. Snížený obsah tohoto aminu byl při koncentraci 500 mg/l. Zjištěné snížení putrescinu na 60 % bylo zjištěno po 24 hodinách kultivace. Ostatní aminy nebyly výrazněji redukovány.



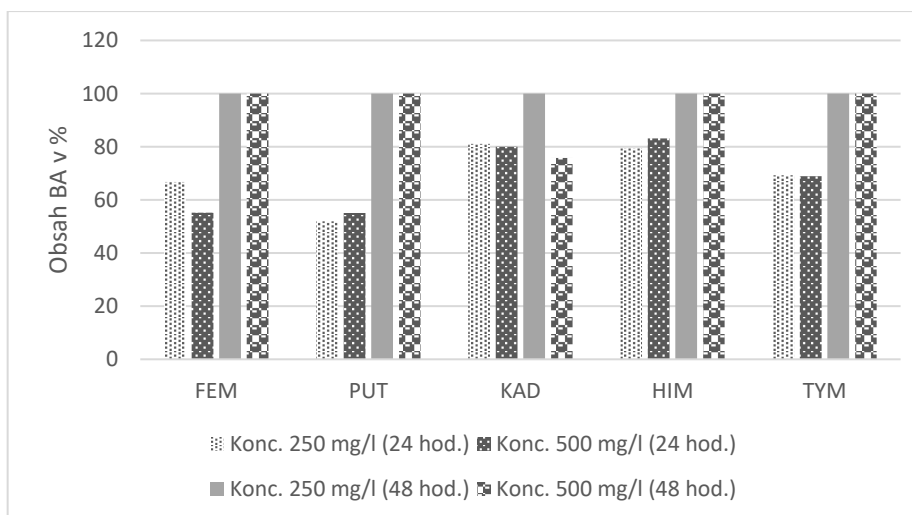
Obr. 47 Produkce biogenních aminů kmenem *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 824 v přítomnosti esenciálního oleje lemongras

Jak je patrné z obrázku 48, esenciální olej z rozmarýnu o koncentraci 500 mg/l měl pouze vliv na produkci kadaverinu produkovaného kmenem *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 824. Množství tohoto aminu bylo sníženo po dvoudenní kultivaci o jednu čtvrtinu.



Obr. 48 Produkce biogenních aminů kmenem *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 824 v přítomnosti esenciálního oleje z rozmarýnu

Na obrázku 49 je vidět, že esenciální olej ze skořice měl na produkci aminů kmenem *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 824 vliv pouze po jednodenní kultivaci. Nejvíce byla pozastavena produkce aminů fenylethylaminu a putrescinu na cca polovinu.

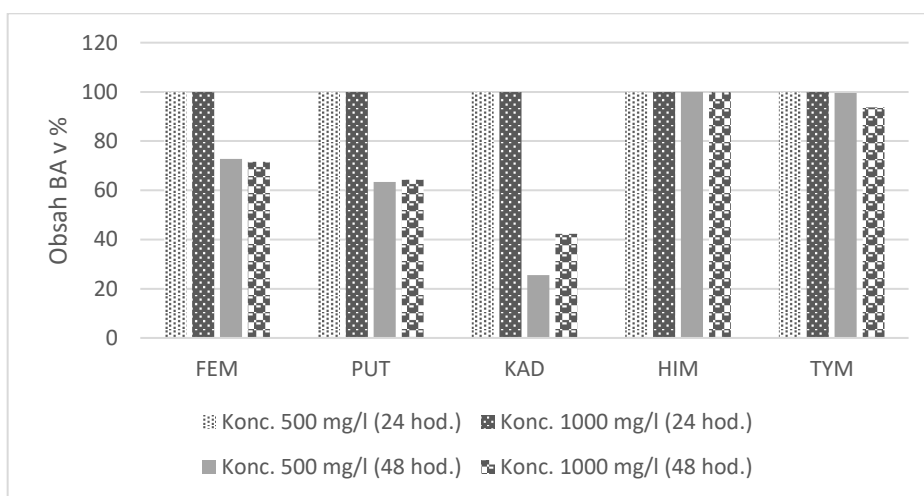


Obr. 49 Produkce biogenních aminů kmenem *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 824 v přítomnosti esenciálního oleje ze skořice

9.1.2 Vliv esenciálních olejů na produkci biogenních aminů kmeny rodu

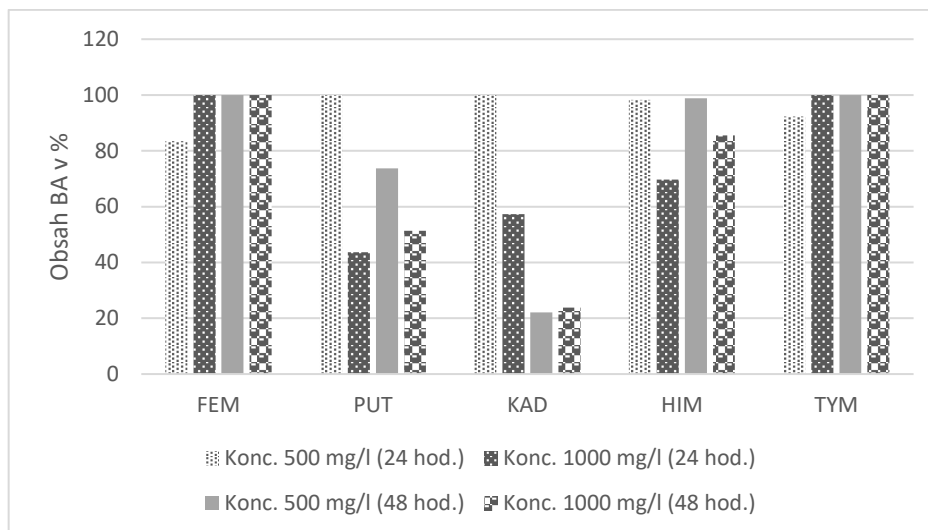
Enterococcus

Působení esenciálního oleje lemongras mělo podle obrázku 50 vliv na snížení obsahu některých aminů po dvoudenní kultivaci. Bakteriální kmen *Enterococcus durans* CCDM 53 snížil zejména produkci kadaverinu o 60 % již při koncentraci 500 mg/l. Také o jednu čtvrtinu byla snížena produkce fenylethylaminu a zhruba o 30 % putrescinu. Vliv esenciálního oleje lemongras na produkci histaminu a tyraminu nebyl prokázán.



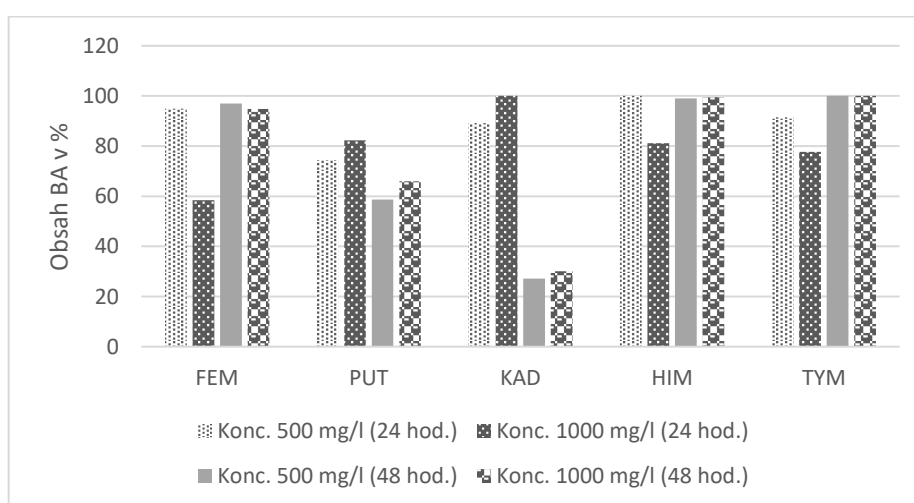
Obr. 50 Produkce biogenních aminů kmenem *Enterococcus durans* CCDM 53 v přítomnosti esenciálního oleje lemongras

Obrázek 51 poukazuje na snížení obsahu kadaverinu na 20 % u bakteriálního kmene *Enterococcus durans* CCDM 53 působením esenciálního oleje z oregana při koncentraci 500 mg/l. K dalšímu snížení obsahu aminu putrescinu, přibližně o polovinu, došlo působením tohoto oleje v koncentraci 1000 mg/l.



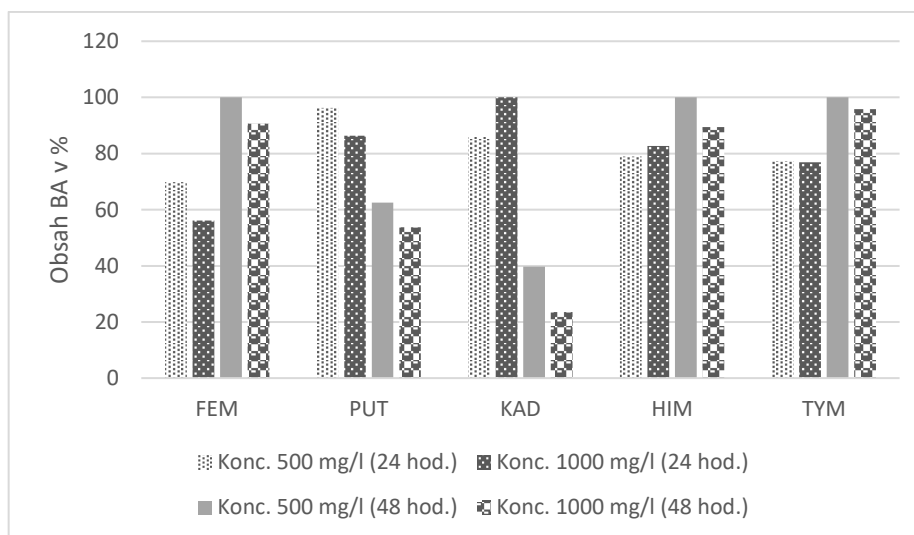
Obr. 51 Produkce biogenních aminů kmenem *Enterococcus durans* CCDM 53 v přítomnosti esenciálního oleje z oregana

Z obrázku 52 je patrné, že vlivem esenciálního oleje z rozmarýnu o koncentraci 1000 mg/l byla po dvou dnech snížena hladina kadaverinu přibližně o 75 %. Bakteriální kmen *Enterococcus durans* CCDM 53 vlivem tohoto snížil také produkci putrescinu na 60 %. Další vliv tohoto oleje na snížení obsahu aminů byl prokázán po jednodenní kultivaci. Snížený obsah byl zaznamenán u aminů fenylethylaminu, kde jeho množství bylo sníženo při koncentraci 500 mg/l o 40 %. Ostatní aminy byly sníženy do 20 %, a to v přítomnosti esenciálního oleje rozmarýnu v koncentraci 1000 mg/l.



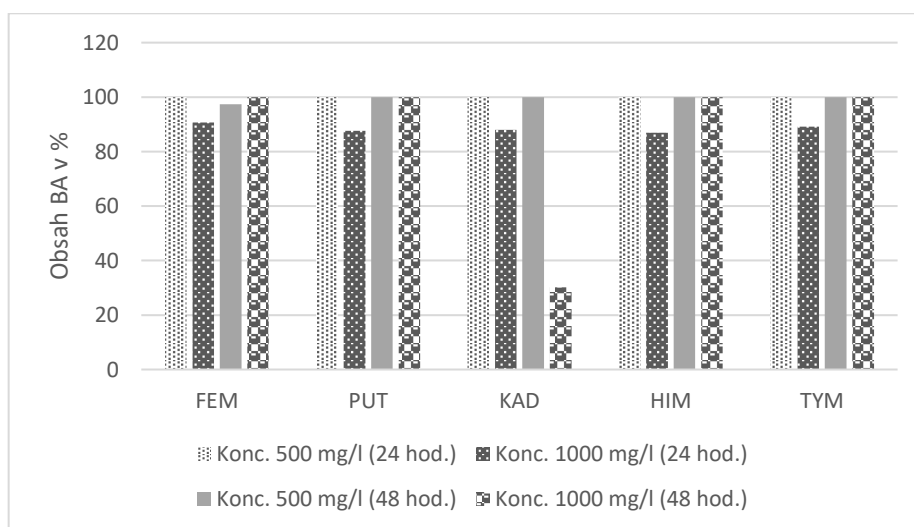
Obr. 52 Produkce biogenních aminů kmenem *Enterococcus durans* CCDM 53 v přítomnosti esenciálního oleje z rozmarýnu

Působením dvou koncentrací esenciálního oleje z tymiánu, jak je patrné z obrázku 53, došlo ke snížení produkce aminů u bakteriálního kmene *Enterococcus durans* CCDM 53 po dvou-denní inkubaci, a to hlavně kadaverinu téměř o 80 %. Množství putrescinu bylo dle obrázku 53 sníženo téměř o polovinu. Pod 30 % bylo zaznamenáno snížení pouze fenylethylaminu, a to při 24 hodinové kultivaci.



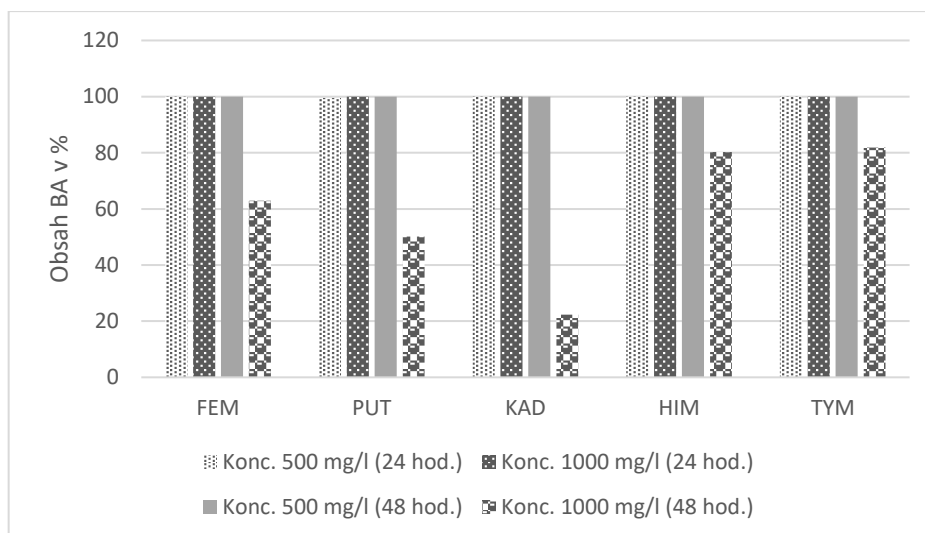
Obr. 53 Produkce biogenních aminů kmenem *Enterococcus durans* CCDM 53 v přítomnosti esenciálního oleje z tymiánu

Vlivem působení esenciálního oleje ze skořice na bakteriální kmen *Enterococcus durans* CCDM 53, bylo dosaženo snížení obsahu kadaverinu zhruba o dvě třetiny po dvoudenní kultivaci. U zbylých aminů nebylo prokázáno snížení jejich obsahu pod 20 % (obrázek 54).



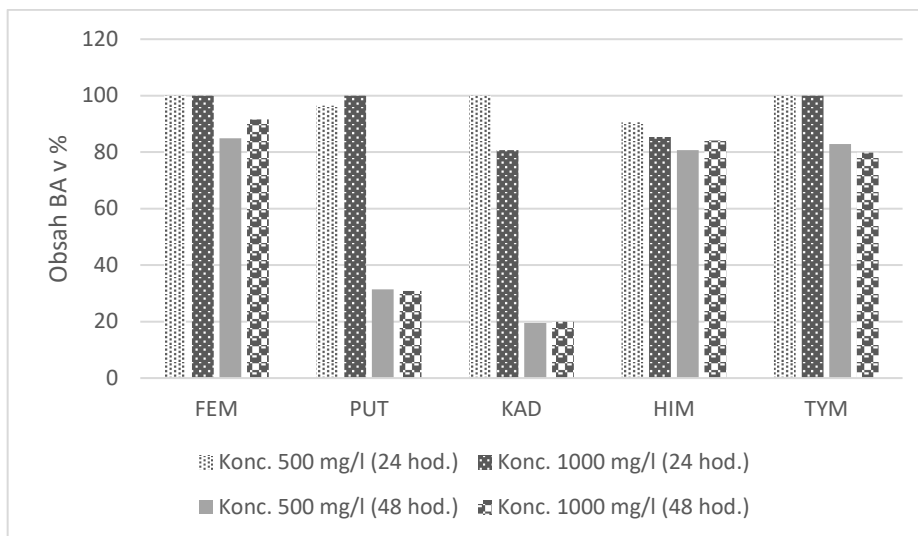
Obr. 54 Produkce biogenních aminů kmenem *Enterococcus durans* CCDM 53 v přítomnosti esenciálního oleje ze skořice

Podle obrázku 55 byla nejvíce snížena produkce kadaverinu kmenem *Enterococcus durans* CCDM 53. Obsah kadaverinu byl snížen působením esenciálního oleje ze šalvěže o koncentraci 1000 mg/l a kultivaci 48 hodin. K dalšímu snížení došlo u putrescinu přibližně o polovinu při stejné koncentraci a času. Produkce fenylethylaminu byla snížena přibližně o 40 % při koncentraci 1000 mg/l. Tento kmen byl rovněž schopen snížit produkci histaminu a tyraminu do 20 % při koncentraci 1000 mg/l.



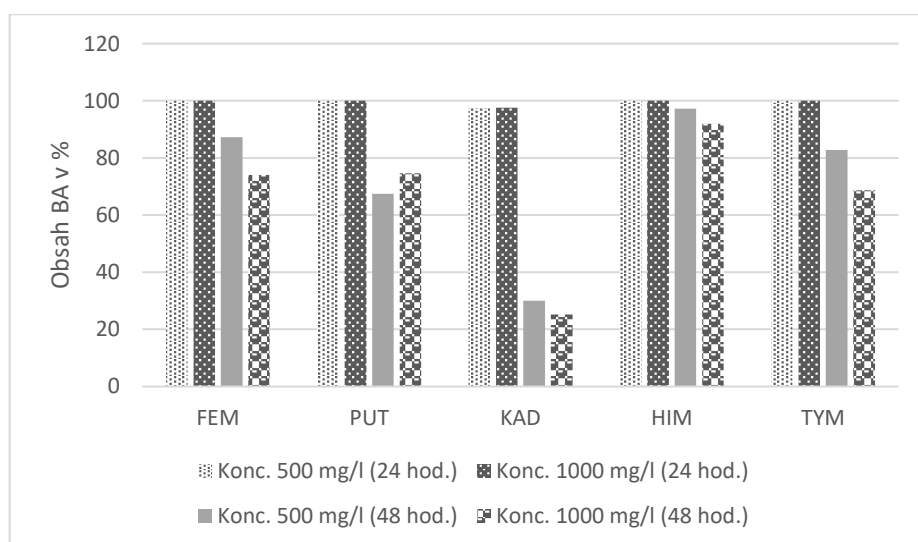
Obr. 55 Produkce biogenních aminů kmenem *Enterococcus durans* CCDM 53 v přítomnosti esenciálního oleje ze šalvěže

Dle obrázku 56 bylo prokázáno snížení produkce kadaverinu o 80 % kmenem *Enterococcus faecalis* CCM 2665 po 48 hodinové kultivaci v přítomnosti oleje lemongras o koncentraci 500 mg/l. Ke snížení došlo také u putrescinu o tři čtvrtiny za stejných podmínek. Množství histaminu bylo ve všech sledovaných koncentracích podobné, došlo k redukci na přibližně 80 %. Produkce tyraminu a fenylethylaminu byla bakteriálním kmenem snížena do 20 %.



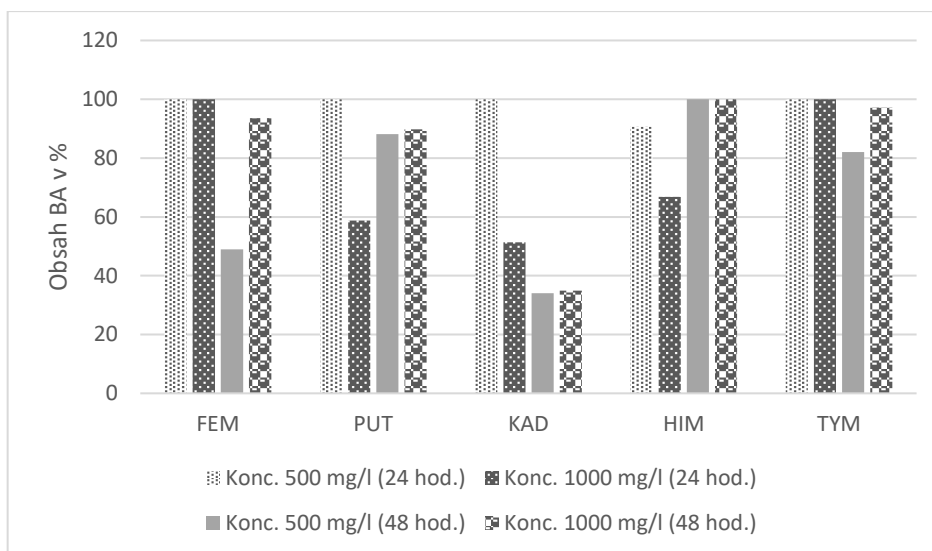
Obr. 56 Produkce biogenních aminů kmenem *Enterococcus faecalis* CCM 2665 v přítomnosti esenciálního oleje lemongras

U kmene *Enterococcus faecalis* CCM 2665 došlo podle obrázku 57 ke snížení produkce kadaverinu téměř o 80 % působením esenciálního oleje z oregana po 48 hodinové kultivaci. Další pokles byl zaznamenán u tyraminu při koncentraci 1000 mg/l, a to přibližně o jednu třetinu. Po 48 hodinové kultivaci bakteriálního kmene byl snížen obsah putrescinu o jednu čtvrtinu. Produkci histaminu se působením esenciálního oleje z oregana nepodařilo výrazněji snížit.



Obr. 57 Produkce biogenních aminů kmenem *Enterococcus faecalis* CCM 2665 v přítomnosti esenciálního oleje z oregana

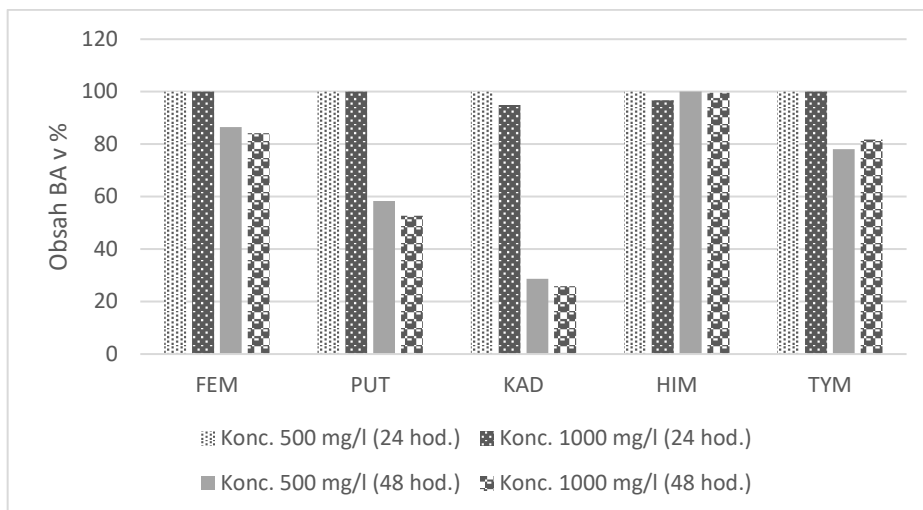
Podle obrázku 58 esenciální olej z rozmarýnu měl vliv na produkci kadaverinu, který produkoval bakteriální kmen *Enterococcus faecalis* CCM 2665. Snížení obsahu kadaverinu bylo až o 70 %, hlavně po 48 hodinové kultivaci v přítomnosti oleje o koncentraci 500 mg/l. Z dalších sledovaných BA byl zajímavý pokles putrescinu po dvoudenní inkubaci na celkový obsah 90 %. Téměř o jednu čtvrtinu byl zjištěn pokles obsahu histaminu po 24 hodinové kultivaci, ovšem po 48 hodinách pokles již nebyl naměřen.



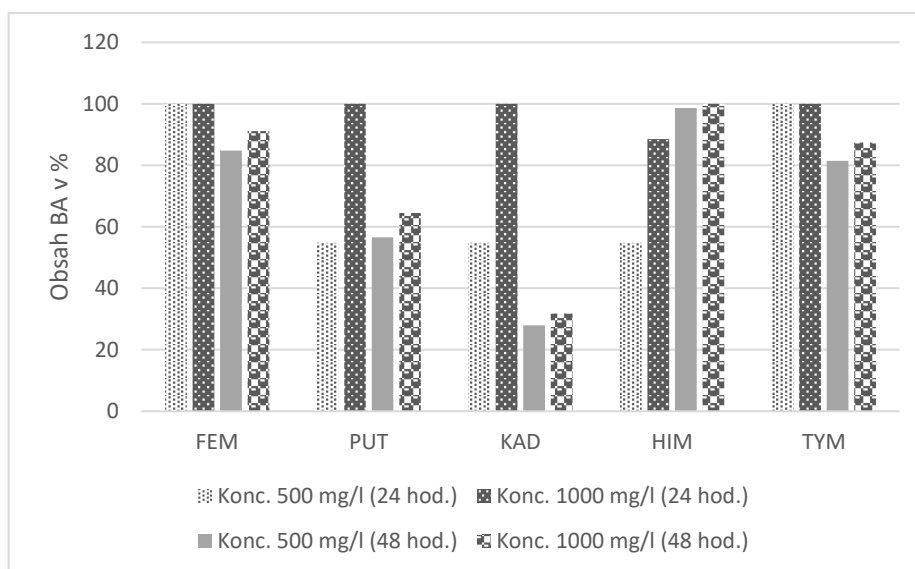
Obr. 58 Produkce biogenních aminů kmenem *Enterococcus faecalis* CCM 2665 v přítomnosti esenciálního oleje z rozmarýnu

Působením esenciálního oleje z tymiánu byla podle obrázku 59 snížena produkce kadaverinu u bakteriálního kmene *E. faecalis* CCM 2665. Množství kadaverinu bylo sníženo přibližně o 80 % po 48 hodinové kultivaci. Esenciální olej měl vliv i na produkci putrescinu, u něhož byl stanoven poloviční obsah. Tyramin byl prokázán po 48 hodinové kultivaci v množství 80 %. K dalšímu výraznému snížení obsahu ostatních sledovaných aminů nedošlo.

Největší účinek esenciálního oleje ze skořice podle obrázku 60 byl na produkci kadaverinu produkovaného bakteriálním kmenem *Enterococcus faecalis* CCM 2665. Prokázaný obsah kadaverinu po 48 hodinách byl přibližně 25 %. Esenciální olej měl vliv i na produkci putrescinu, a to snížením o 40 %.

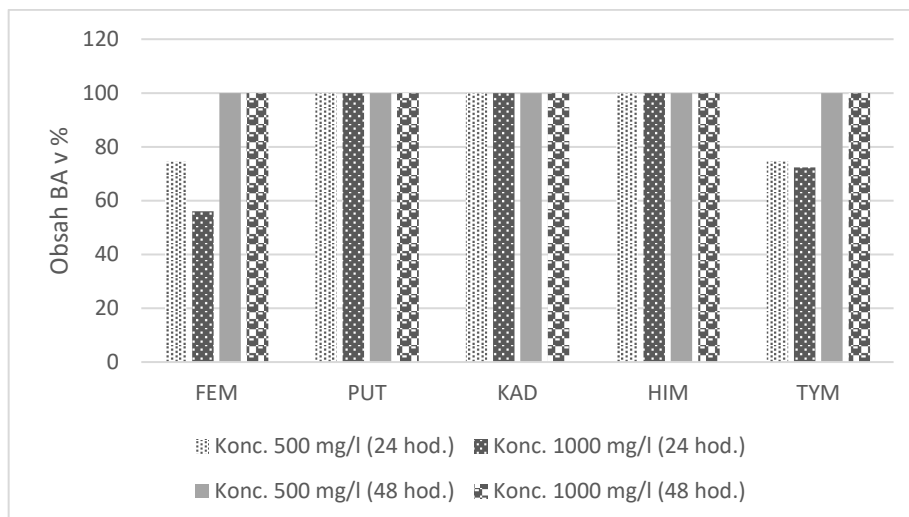


Obr. 59 Produkce biogenních aminů kmenem *Enterococcus faecalis* CCM 2665 v přítomnosti esenciálního oleje z tymiánu



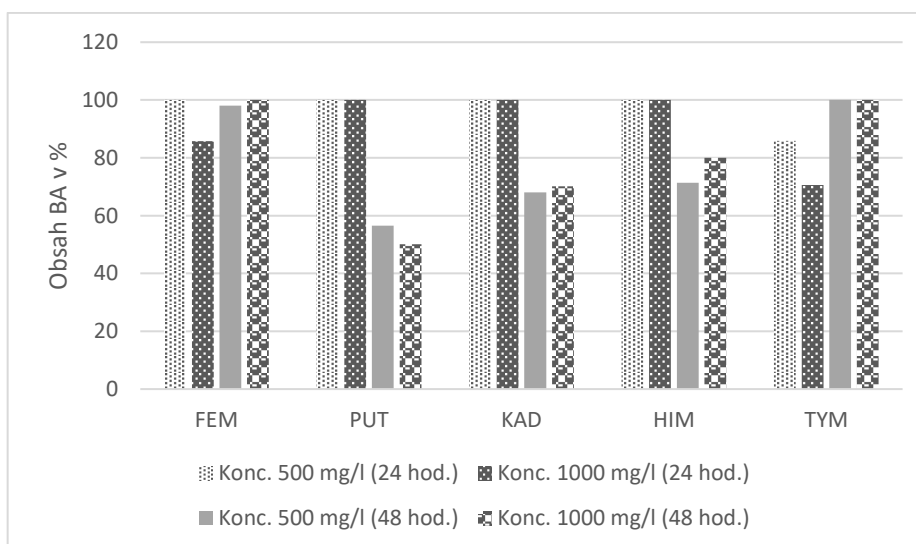
Obr. 60 Produkce biogenních aminů kmenem *Enterococcus faecalis* CCM 2665 v přítomnosti esenciálního oleje ze skořice

Podle obrázku 61 došlo u bakteriálního kmene *Enterococcus faecalis* CCM 4224 k částečnému snížení produkce fenylethylaminu o přibližně 50 % působením esenciálního oleje lemongras o koncentraci 1000 mg/l. Po 48 hodinách již pokles nebyl zaznamenán. Snížený obsah po 24 hodinové kultivaci byl detekován u tyraminu, a to o jednu čtvrtinu. Ke snížení obsahu nedošlo u putrescinu, kadaverinu a histaminu.



Obr. 61 Produkce biogenních aminů kmenem *Enterococcus faecalis* CCM 4224 v přítomnosti esenciálního oleje lemongras

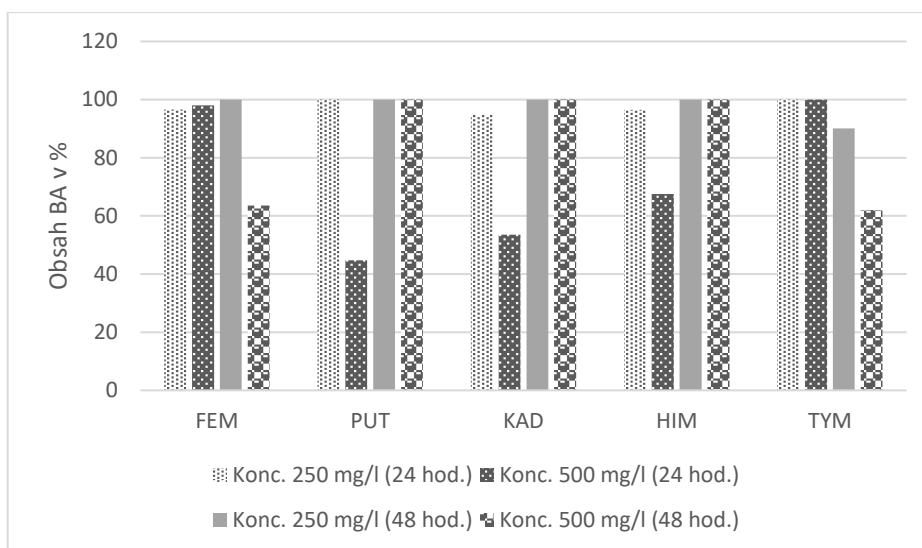
Esenciální olej z tymiánu podle obrázku 62 snížil produkci putrescinu bakteriálním kmenem *Enterococcus faecalis* CCM 4224, a to při koncentraci 1000 mg/l po 48 hodinách. Obsah kadaverinu po dvoudenní kultivaci byl snížen o cca jednu třetinu u obou použitých koncentrací oleje. Produkce histaminu byla snížena přibližně o 20 % po 48 hodinách v obou použitých koncentracích esenciálního oleje.



Obr. 62 Produkce biogenních aminů kmenem *Enterococcus faecalis* CCM 4224 v přítomnosti esenciálního oleje z tymiánu

9.1.3 Vliv esenciálních olejů na produkci biogenních aminů u *Proteus mirabilis*

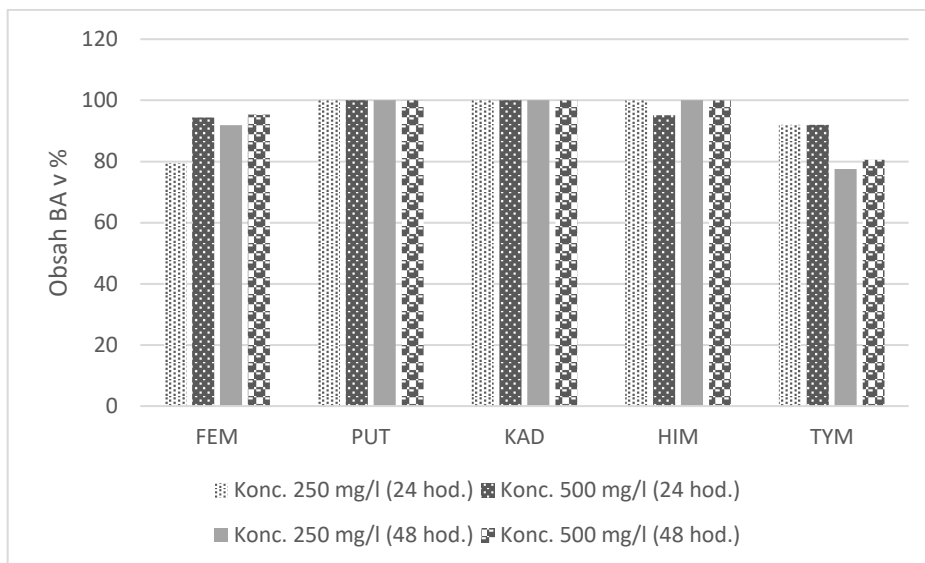
Podle obrázku 63 bylo prokázáno snížení množství aminů po 48 hodinové kultivaci kmene *Proteus mirabilis* CCM 7188 pouze u fenylethylaminu a tyraminu působením oleje z lemongras o koncentraci 500 mg/l. K výraznému snížení putrescinu došlo po 24 hodinové kultivaci (při téže koncentraci) přibližně o 40 %. Produkce kadaverinu a histaminu byla snížena pouze po 24 hodinové kultivaci.



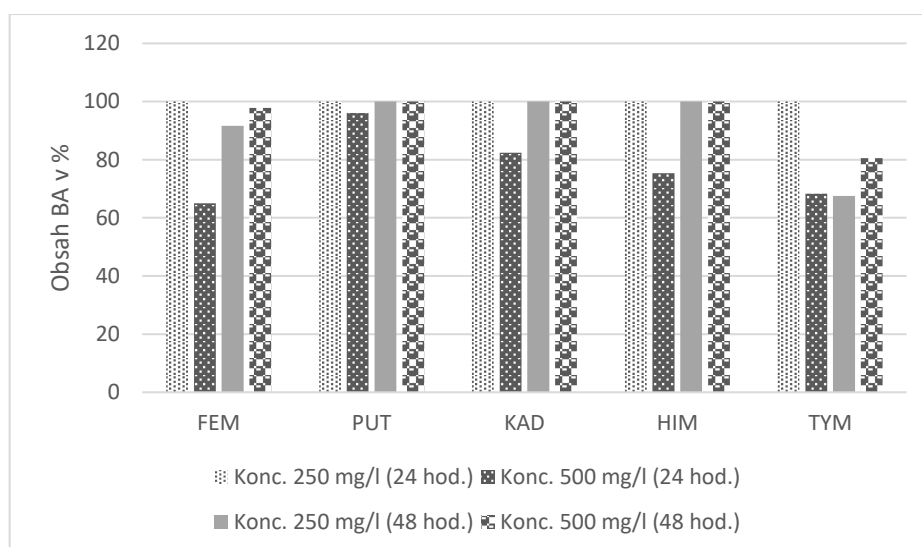
Obr.63 Produkce biogenních aminů kmenem *Proteus mirabilis* CCM 7188 v přítomnosti esenciálního oleje lemongras

Esenciální olej z rozmarýnu podle obrázku 64 neměl výraznější vliv na produkci putrescinu, kadaverinu a histaminu produkovaných bakteriálním kmenem *Proteus mirabilis* CCM 7188. K minimálnímu snížení došlo u fenylethylaminu. Po dvoudenní kultivaci bylo sníženo pouze množství tyraminu, a to celkem o 20 %.

Obrázek 65 ukazuje vliv esenciálního oleje z tymiánu na produkci aminů bakteriálním kmenem *Proteus mirabilis* CCM 7188. K výraznějšímu snížení produkce aminů došlo pouze u tyraminu, a to cca o 20 % po 48 hodinové kultivaci. Pokles byl zaznamenán po 24 hodinové kultivaci při koncentraci 500 mg/l také u fenylethylaminu, kadaverinu a histaminu. Ke snížení obsahu putrescinu téměř nedošlo.

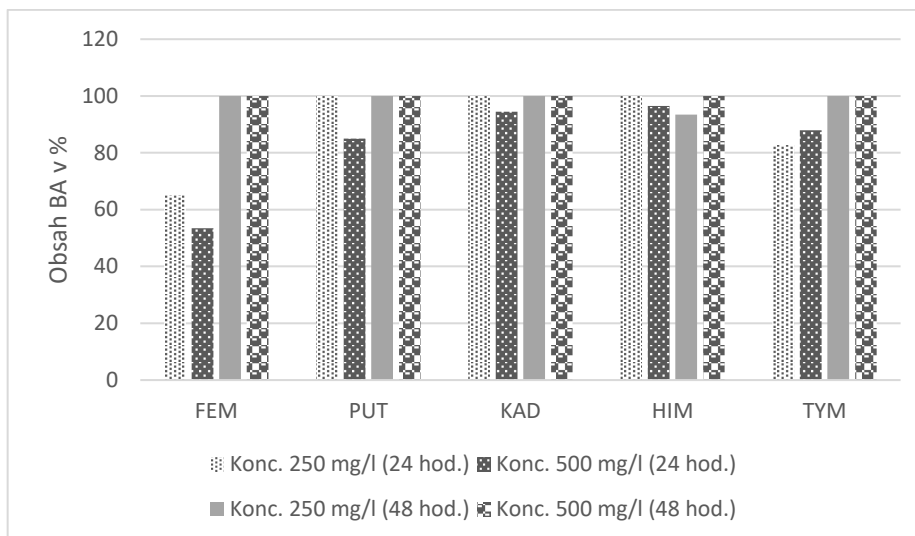


Obr. 64 Produkce biogenních aminů kmenem *Proteus mirabilis* CCM 7188 v přítomnosti esenciálního oleje z rozmarýnu



Obr. 65 Produkce biogenních aminů kmenem *Proteus mirabilis* CCM 7188 v přítomnosti esenciálního oleje z tymiánu

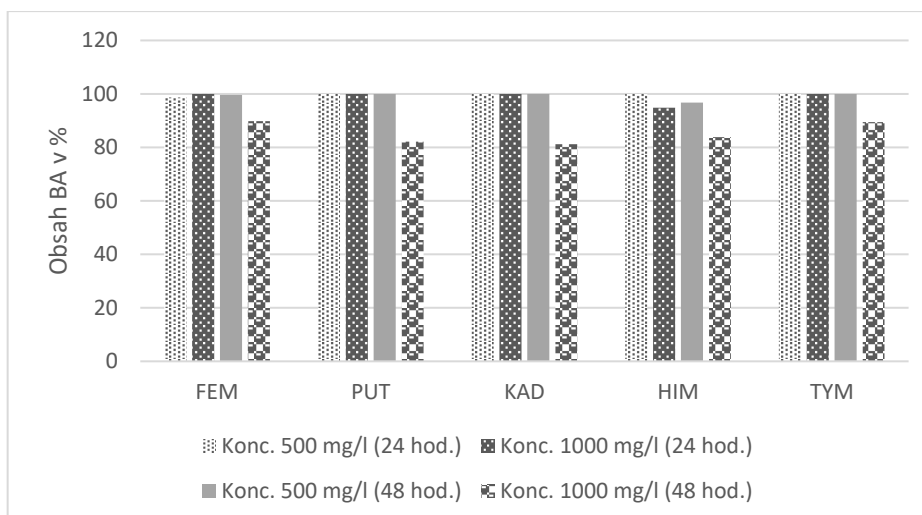
Podle obrázku 66 esenciální olej ze skořice neměl výraznější vliv na snížení produkce aminů kmenem *Proteus mirabilis* CCM 7188. Došlo pouze ke snížení produkce fenylethylaminu po 24 hodinové kultivaci, a to skoro o polovinu.



Obr. 66 Produkce biogenních aminů kmenem *Proteus mirabilis* CCM 7188 v přítomnosti esenciálního oleje ze skořice

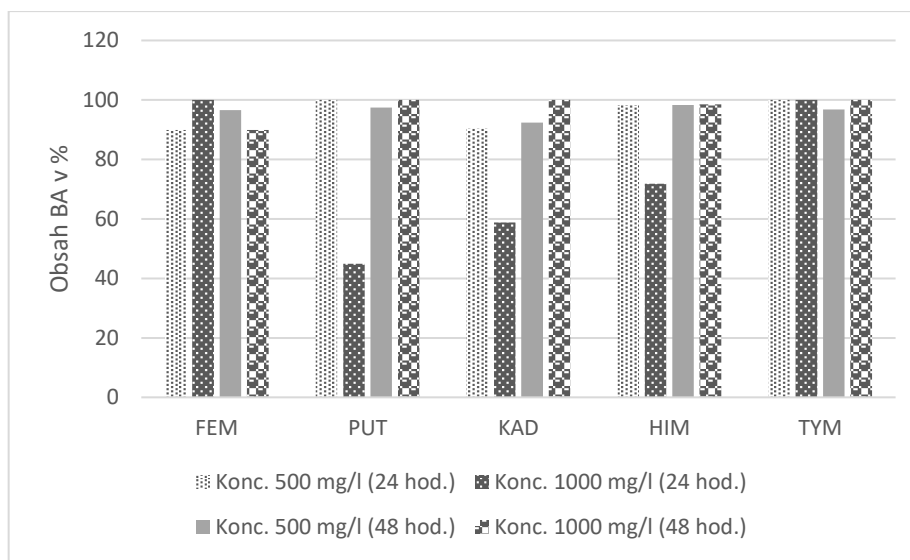
9.1.4 Vliv esenciálních olejů na produkci biogenních aminů u *Salmonella enterica*

Esenciální olej z tymiánu měl podle obrázku 67 vliv pouze v koncentraci 1000 mg/l na produkci aminů bakteriálním kmenem *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420. Snížení bylo do 20 % po 48 hodinové kultivaci u všech sledovaných aminů.



Obr. 67 Produkce biogenních aminů kmenem *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 v přítomnosti esenciálního oleje tymián

Ke snížení produkce biogenních aminů došlo podle obrázku 68 u testovaného kmene *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 po 24 hodinové kultivaci v přítomnosti skořicového oleje. Snížen byl obsah putrescinu přibližně o polovinu při koncentraci 500 mg/l. Obsah kadaverinu byl cca o 60 % snížen po 24 hodinové kultivaci. Přibližně o jednu čtvrtinu bylo sníženo množství histaminu. Na produkci tyraminu esenciální olej ze skořice neměl téměř žádný vliv.



Obr. 68 Produkce biogenních aminů kmenem *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 v přítomnosti esenciálního oleje ze skořice

DISKUSE

V poslední době se lidé snaží co nejvíce zlepšit údržnost potravin, a tím i využít různé možnosti, jak uchovat potraviny co nejdéle a nejlépe. Esenciální oleje si zaslouží velkou pozornost pro svoji antimikrobiální aktivitu proti různým patogenům, které mohou znehodnocovat potraviny. Esenciální oleje z oregana a tymiánu obsahují fenolové složky karvakrol a tymol, které mohou snižovat aktivitu mikroorganismů. Řadí se mezi nejvíce doporučované náhrady chemických konzervačních látek. [38, 39]

Esenciální oleje svým lipofilním charakterem a uhlovodíkovou strukturou obsahují velké množství alkoholů, fenolů a monoterpenů, které mohou ovlivňovat růst bakterií. Hlavními složkami esenciálních olejů, které mají vliv na inhibici bakterií, jsou thymol, karvakrol, eugenol a kyselina skořicová. Esenciální oleje více působí na gram-pozitivní bakterie, než gram-negativní. Důležitý vliv na složení esenciálních olejů má rostlinný genotyp, geografické umístění rostlin, odrůda, podnebí i výživa rostlin. Působení esenciálních olejů může být potencováno v kyselém prostředí [39]

Práce byla zaměřena na sledování antimikrobiálního působení pěti esenciálních olejů v sedmi koncentracích na dekarboxyláza-pozitivní bakterie rodů *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Proteus* a *Salmonella*. Účelem práce bylo zjistit, zda kromě ovlivnění růstu vybraných kmenů bude pomocí esenciálních olejů dosaženo i snížení produkce biogenních aminů histaminu, putrescinu, tyraminu, fenylethyaminu a kadaverinu.

Mezi nejúčinnější esenciální oleje se řadí oleje z oregana a tymiánu. Oreganový olej je znám svou antimikrobiální aktivitou nejspíš z důvodu, že ve svém složení obsahuje karvakrol [2-methyl-5-(1-methylethyl) fenol]. Karvakrol je schopen způsobit dezintegraci vnější membrány bakterií, uvolňovat lipopolysacharidy a zvyšovat propustnost cytoplazmatické membrány, čímž dochází k zastavení růstu a popř. až k degradaci buňky. Bylo prokázáno, že karvakrol má bakteriostatické a baktericidní účinky na druhy *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, a *Bacillus subtilis*. [38, 39]

Experimentem se potvrdila největší účinnost esenciálního oleje z oregana jak na růst testovaných bakteriálních kmenů, tak i na snížení produkce biogenních aminů. Vliv na růst bakterií kmenů byl zaznamenán již při koncentraci 250 mg/l, stanoveno pomocí difuzní metody u bakteriálního kmene *Lactococcus.subsp cremoris* CCDM 824. Diluční metoda tuto skutečnost potvrdila. Sledování zástupci rodu *Lactococcus* prokázali největší citlivost ze všech

sledovaných bakteriálních kmenů. Produkce biogenních aminů byla použitím esenciálních olejů snížena opět nejvíce u rodu *Lactococcus*, hlavně kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, kde došlo ke snížení biogenního aminu putrescinu až o polovinu po 48hodinové kultivaci a aplikované koncentraci 1500 mg/l. Výrazný vliv na snížení biogenních aminů měl esenciální olej z oregana i na kmen *Enterococcus durans* CCDM 53, kde došlo ke snížení produkce kadaverinu přibližně o 75 %. Inhibice rodu *Enterococcus* byla prokázána při koncentraci 1000 mg/l. Vliv esenciálního oleje z oregana na sledované gram-negativní bakterie rodu *Salmonella* a *Proteus* nebyl zjištěn. Nedošlo ke snížení produkce biogenních aminů ani k inhibici růstu.

Podobně jako u oreganového oleje jsou dominantní složkou u esenciálních olejů z tymiánu získaných z rostlin *Thymus vulgaris* fenolické sloučeniny thymol a karvakrol. [39]

Použité koncentrace esenciálního oleje z tymiánu v předložené práci měly vliv hlavně na inhibici bakteriálního rodu *Lactococcus*. Minimální inhibiční koncentrace byla stanovena u bakteriálního kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 na 1000 mg/l. Použité koncentrace esenciálního oleje z tymiánu nezpůsobily inhibici u rodů *Enterococcus*, *Proteus* a *Salmonella*. I když nebyla zjištěna úplná inhibice u rodu *Enterococcus*, působením esenciálního oleje došlo k největšímu snížení produkce biogenního aminu kadaverinu přibližně o 80 % u kmene *Enterococcus faecalis* CCM 2665. Pokles kadaverinu a putrescinu cca o 20 % byl zaznamenán u mikroorganismu *Proteus mirabilis* CCM 7188. Pokles všech sledovaných biogenních aminů do 20 % produkovaných kmenem *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 byl zaznamenán při koncentraci 1000 mg/l po dvoudenní kultivaci.

Mezi nejrizikovější potraviny, které jsou nejčastěji napadány psychrotrofními bakteriemi, převážně gram-negativními, patří čerstvé ryby. Ve sledované studii byly, kromě oleje z oregana a tymiánu, použity i emulze esenciálního oleje z rozmarýnu. Vzorky pstruha duhového byly ponořeny po dobu 3 minut do připravených emulzí a byl sledován vliv na pokles nežádoucích mikroorganismů. Největší účinnost na mikroorganismy prokázaly emulze připravené z oreganového a tymiánového oleje. Vliv rozmarýnového oleje byl sice také prokazatelný, ale jeho podstatnou nevýhodou zůstává nahořklá chuť testovaných vzorků. [40]

Práce celkově potvrzuje, že antimikrobní účinky esenciálního oleje z rozmarýnu nejsou zanedbatelné. Nejnižší byla opět rod *Lactococcus*. Nejnižší stanovená MIC u *Lactococcus*

lactis subsp. *cremoris* CCDM 946 byla 500 mg/l. *Enterococcus durans* CCDM 53, jako jediný ze sledovaných zástupců rodu *Enterococcus*, prokázal inhibici při 1500 mg/l. U tohoto kmene došlo také ke snížení produkce biogenních aminů kadaverinu o 70 % a putrescinu téměř o polovinu, při koncentraci 1000 mg/l. Zhruba třetinová produkce kadaverinu byla pak prokázána u *Enterococcus faecalis* CCM 2665. Biogenní aminy byly významně sníženy i u bakteriálních kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, kde koncentrace 500 mg/l snížila produkci putrescinu a kadaverinu přibližně o 60 %

Lemongras esenciální olej při koncentraci 1000 mg/l inhiboval růst rodu *Lactococcus* i rodu *Enterococcus*. Nejvíce se podařilo snížit obsah biogenního aminu kadaverinu až o 80% produkovaného *Enterococcus faecalis* CCM 2665. U rodu *Lactococcus* došlo ke snížení kadaverinu kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824. Z práce vyplynulo, že esenciální olej lemongras měl vliv na snížení kadaverinu. Sledované gram-negativní bakterie rodů *Proteus* a *Salmonella* neprokázaly citlivost na esenciální olej lemongras, a ani nedošlo k pozastavení produkce biogenních aminů.

Skořicový esenciální olej pozastavil růst pouze u rodu *Lactococcus* při koncentraci 500 mg/l, přesněji u *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824. U laktokoků byla působením tohoto oleje snížena až o polovinu produkce biogenních aminů fenylethyaminu, putrescinu, a to přesněji u kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824. Zajímavým zjištěním, které z práce prokazatelně vyplynulo, je, že esenciální olej ze skořice neměl na růst enterokoků prakticky žádný vliv, ale došlo k výraznému snížení obsahu aminu kadaverinu až o cca 70 % u *Enterococcus durans* CCDM 53 a *Enterococcus faecalis* CCM 2665.

Esenciální olej ze šalvěje neprokázal, při použitých koncentracích, snížení růstu žádného ze sledovaných bakteriálních kmenů. Největší vliv esenciálního oleje ze šalvěje na snížení produkce biogenních aminů byl zjištěn u kmene *Enterococcus durans* CCDM 53, kde došlo ke snížení produkce kadaverinu o přibližně 80 %. Jediný z laktokoků, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, snížil v jeho přítomnosti produkci tyraminu, a to asi o 20 %.

ZÁVĚR

Předložená práce je zaměřena na sledování inhibičních účinků esenciálních olejů z lemongras, oregana, rozmarýnu, skořice, šalvěže a tymiánu. Současně byl sledován na dekarboxyláza-pozitivních zástupcích rodů *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Proteus* a *Salmonella* vliv olejů na produkci biogenních aminů. Na základě získaných výsledků lze konstatovat:

- z testovaných esenciálních olejů vykazoval nejlepší antibakteriální účinky olej z oregana a to především u rodu *Lactococcus*, a to už při koncentraci 25 mg/l,
- nejčastěji byla snížena produkce biogenního aminu kadaverinu u všech sledovaných bakteriálních kmenů, kromě *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004,
- nejvnímavější bakterií na testované esenciální oleje se stal *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, kde byla snížena i produkce biogenního aminu fenylethyaminu působením esenciálního oleje z tymiánu a rozmarýnu,
- bakterie *Enterococcus faecalis* CCM 2665 působením použitých esenciálních olejů snížila produkci kadaverinu až o 80%,
- inhibiční účinky se neprojevily u rodů *Proteus* a *Salmonella*, ale došlo k částečnému snížení obsahu biogenních aminů přibližně o 20 %, a to histaminu, putrescinu, tyraminu, fenylethyaminu a kadaverinu působením všech použitých esenciálních olejů a jejich koncentrací 1000 mg/l,
- nejméně vnímavým bakteriálním kmenem byla *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *Enteritidis* CCM 4420, kde účinek tymiánu snížil produkci všech sledovaných biogenních aminů o 20 %.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] GUO, Yan-Yun, Yan-Ping YANG, Qian PENG a Ye HAN. Biogenic amines in wine: a review. *International Journal of Food Science & Technology*. 2015, **50**(7), 1523-1532. DOI: 10.1111/ijfs.12833. ISSN 09505423.
- [2] NAILA, Aishath, Steve FLINT, Graham FLETCHER, Phil BREMER a Gerrit MEERDINK. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science*. 2010, **75**(7), R139-R150. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x. ISSN 00221147.
- [3] SPANO, G, P RUSSO, A LONVAUD-FUNEL, et al. Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition* . 2010, **64**(S3), S95-S100. DOI: 10.1038/ejcn.2010.218. ISSN 0954-3007.
- [4] FLASAROVÁ, Radka, Vendula PACHLOVÁ, Leona BUŇKOVÁ, Anna MENŠÍKOVÁ, Nikola GEORGOVÁ, Vladimír DRÁB a František BUŇKA. Biogenic amine production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains in the model system of Dutch-type cheese. *Food Chemistry*. 2016, **194**, 68-75. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.07.069. ISSN03088146.
- [5] Dostupné z http://www.cognita.cz/Vyhlasaky/02%20Bezpecnost%20a%20Hygiena/Vyhlasaka%20ES%202073_2005.pdf
- [6] GUO, Yuxing, Daodong PAN, Hua LI, Yangying SUN, Xiaoqun ZENG a Bingxiang YAN. Antioxidant and immunomodulatory activity of selenium exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Food Chemistry* . 2013, **138**(1), 84-89. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.10.029. ISSN 03088146.
- [7] GARDINI, Fausto, Maria MARTUSCELLI, Marisa Carmela CARUSO, Fernanda GALGANO, Maria Antonietta CRUDELE, Fabio FAVATI, Maria Elisabetta GUERZONI a Giovanna SUZZI. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, **64**(1-2), 105-117. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00445-1. ISSN 01681605.
- [8] Obrázek Dostupné z : <http://www.chempoint.cz/biogenni-aminy>

- [9] JEON, Ah Ran, Jae Hoan LEE a Jae-Hyung MAH. Biogenic amine formation and bacterial contribution in Cheonggukjang , a Korean traditional fermented soybean food. *LWT*. 2018, 92, 282-289. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.02.047. ISSN 00236438.
- [10] TERZIĆ-VIDOJEVIĆ, Amarela, Katarina VELJOVIĆ, Jelena BEGOVIĆ, et al. Diversity and antibiotic susceptibility of autochthonous dairy enterococci isolates: are they safe candidates for autochthonous starter cultures?. *Frontiers in Microbiology* . 2015, 6 . DOI: 10.3389/fmicb.2015.00954. ISSN 1664-302X.
- [11] LADERO, Victor, María FERNÁNDEZ, Marina CALLES-ENRÍQUEZ, Esther SÁNCHEZ-LLANA, Elena CAÑEDO, M. Cruz MARTÍN a Miguel A. ALVAREZ. Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci?. *Food Microbiology*. 2012, **30**(1), 132-138. DOI: 10.1016/j.fm.2011.12.016. ISSN 07400020.
- [12] Obrázek Dostupné z : <https://cs.wikipedia.org/wiki/Putrescin>
- [13] Obrázek Dostupné z : <https://cs.wikipedia.org/wiki/Tyramin>
- [14] Velíšek J.,Hajšlová J.:*Chemie potravin 2:Rozš a přeparac.* 3.vyd, Tábor: OSSIS, 2009, ISNB :978-80-86659-16-9.
- [15] SENGUPTA, T. a K.P. MOHANAKUMAR. 2-Phenylethylamine, a constituent of chocolate and wine, causes mitochondrial complex-I inhibition, generation of hydroxyl radicals and depletion of striatal biogenic amines leading to psycho-motor dysfunctions in Balb/c mice. *Neurochemistry International*. 2010, **57**(6), 637-646 .DOI: 10.1016/j.neuint.2010.07.013. ISSN 01970186.
- [16] Obrázek Dostupné z :<https://cs.wikipedia.org/wiki/Fenylethylamin>
- [17] Obrázek Dostupné z : <https://cs.wikipedia.org/wiki/Kadaverin>
- [18] WEGMANN, U., M. O'CONNELL-MOTHERWAY, A. ZOMER, et al. Complete Genome Sequence of the Prototype Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* subsp. cremoris MG1363. *Journal of Bacteriology*. 2007, **189**(8), 3256-3270 . DOI: 10.1128/JB.01768-06. ISSN 0021-9193.
- [19] obrázek 6 Dostupné z https://www.google.com/search?tbm=isch&source=hp&biw=921&bih=770&ei=rp-fIXNufJYaMmwXF2L_QDw&q=lactococcus&oq=lactococc&gs_l=img.1.1.012j0i3018.1536.4578

- [20] ALVAREZ, Miguel A. a Ma Victoria MORENO-ARRIBAS. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science & Technology* . 2014, 39(2), 146-155. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.07.007. ISSN 09242244.
- [21] CESSELIN, Bénédicte, Christel GARRIGUES, Martin B. PEDERSEN, Célia ROUSSEL, Alexandra GRUSS, Philippe GAUDU a Edward G. DUDLEY. Task Distribution between Acetate and Acetoin Pathways To Prolong Growth in *Lactococcus lactis* under Respiration Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 2018, 84(18), e01005-18. DOI: 10.1128/AEM.01005-18. ISSN 0099-2240.
- [22] Obrázek 7 Dostupné z <https://www.google.com/search?biw=921&bih=770&tbm=isch&sa=1&ei=tpfIXO-qBHMmTlwSF9qioCg&q=enterococcus&oq>
- [23] ZALA, Alkesh a Nicholas COLLINS. Enterococcus durans Prosthetic Valve Endocarditis: A Previously Unreported Clinical Entity. *Heart, Lung and Circulation*. 2016, 25(10), e133-e136. DOI: 10.1016/j.hlc.2016.01.010. ISSN 14439506.
- [24] Obrázek Dostupné z <https://de.wikipedia.org/wiki/Salmonellen>
- [25] VYTRÁSOVÁ, J., BÍLKOVÁ Z., *Laboratorní cvičení z obecné mikrobiologie*, Vyd. 3. *Pardubice: Univerzita Pardubice*, 2014, ISBN 978-80-7395-747-6.
- [26] ŘÍHOVÁ, AMBROŽOVÁ, J., *Mikrobiologie v technologii vod*, *Praha: Vysoká škola chemicko-technologická*, 2004, ISBN 80-7080-534- x.
- [27] BAI A, Jamuna a Ravishankar Rai VITTAL. Quorum Sensing Inhibitory and Anti-Biofilm Activity of Essential Oils and Their in vivo Efficacy in Food Systems. *Food Biotechnology*. 2014, 28(3), 269-292. DOI: 10.1080/08905436.2014.932287. ISSN 0890-5436.
- [28] RODRIGUES, L., DUARTE, A., FIGUEUREDO, A. C., BRITO, L., TEIXEIRA, G., MOLDAO, M., MONTEIRO, A. Chemical composition and antibacterial activity of the Essentials oils from the medicinbal plant *Mentha cervina* L.grow in Portugal. *Medicinal chemistry researche*. 2012,r.21,č. 11, s. 3485-3490

- [29] KUORWEL, Kuorwel K., Marlene J. CRAN, Kees SONNEVELD, Joseph MILTZ a Stephen W. BIGGER. Essential Oils and Their Principal Constituents as Antimicrobial Agents for Synthetic Packaging Films. *Journal of Food Science* . 2011, 76(9), R164-R177 .DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02384.x.ISSN 00221147.
- [30] SEOW, YX; YEO, CR; CHUNG, HL, YUK, HG. Piant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2014, vol. 54, no.5 s 625-644. ISSN:1404-8398
- [31] AMORATI, Riccardo, Mario C. FOTI a Luca VALGIMIGLI. Antioxidant Activity of Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, 61(46), 10835-10847. DOI: 10.1021/jf403496k. ISSN 0021-8561.
- [32] TURASAN, Hazal, Serpil SAHIN a Gulum SUMNU. Encapsulation of rosemary essential oil. *LWT - Food Science and Technology* . 2015, 64(1), 112-119. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.05.036. ISSN 00236438.
- [33] VIUDA-MARTOS, M., Y. RUIZ-NAVAJAS, J. FERNÁNDEZ-LÓPEZ a J. PÉREZ-ÁLVAREZ. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*. 2008, 19(12), 1130-1138. DOI: 10.1016/j.foodcont.2007.12.003. ISSN 09567135.
- [34] LONGARAY DELAMARE, Ana Paula, Ivete T. MOSCHEN-PISTORELLO, Liane ARTICO, Luciana ATTI-SERAFINI a Sergio ECHEVERRIGARAY. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*.2007, **100**(2), 603-608. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.09.078. ISSN 03088146.
- [35] KARABAGIAS, I., A. BADEKA a M.G. KONTOMINAS. Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. *Meat Science*. 2011, 88(1), 109-116. DOI: 10.1016/j.meatsci.2010.12.010. ISSN 03091740.
- [36] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., POLLAKOVÁ, E., PODEŠVOVÁ, T., DRÁB, V. The effect of lactose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 147: 112-119. 2011

- [37] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., DRÁB, S., KRÁČMAR, S., KUBÁŇ, V. Effects of NaCl, lactose and availability of oxygen on tyramine production by the *Enterococcus durans* CCDM 53. *European Food Research and Technology*, 234: 973-979. 2012.
- [38] CAN BAŞER a DEMIRCI. *Chemistry of Essential Oils*. BERGER, Ralf G. Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability. New York: Springer, c2007, s. 43-75. ISBN 978-3-540-49338-9.
- [39] Dostupné z <https://eshop.nobilis.cz/>
- [40] BELDA-GALBIS, Clara Miracle, Anders LEUFVÉN, Antonio MARTÍNEZ a Dolores RODRIGO. Predictive microbiology quantification of the antimicrobial effect of carvacrol. *Journal of Food Engineering*. 2014, 141, 37-43. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2014.05.013. ISSN 02608774.
- [41] NISSEN, Lorenzo, Alessandro ZATTA, Ilaria STEFANINI, Silvia GRANDI, Barbara SGORBATI, Bruno BIAVATI a Andrea MONTI. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia*. 2010, 81(5), 413-419. DOI: 10.1016/j.fitote.2009.11.010. ISSN 0367326X.
- [42] Thomar(Ed.), *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*, John Wiley & Sons, UK (2011), pp. 203-238

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

EO Esenciální olej

BA Biogenní aminy

NEG Negativní

POZ Pozitivní

FEM Fenylethylamin

PUT Putrescin

KAD Kadaverin

HIM Histamin

TYM Tyramin

CCM Česká sbírka mikroorganismů

CCDM Sběrka mlékařských organismů

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Vznik biogenních aminů[8].....	12
Obr.2: Putrescin [12].....	15
Obr.3: Tyramin [13].....	15
Obr. 4: Fenylethylamin [16].....	15
Obr. 5: Kadaverin [17].....	16
Obr. 6: <i>Lactococcus</i> [19].....	17
Obrázek 7: <i>Enterococcus</i> [22].....	18
Obr. 8: <i>Proteus mirabilis</i> [23].....	19
Obr. 9: <i>Salmonella enterica, serovar enteritidis</i> [24].....	20
Obr. 10 Vliv esenciálního oleje lemongras na <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CCDM 48.....	38
Obr. 11 Vliv esenciálního oleje oregana na <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CCDM 48.....	39
Obr. 12 Vliv esenciálního oleje skořice na <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CCDM 48.....	39
Obr. 13 Vliv esenciálního oleje tymiánu na <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CCDM 48.....	40
Obr. 14 Vliv esenciálního oleje oregana na <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CCDM 141.....	41
Obr. 15 Vliv esenciálního oleje rozmarýnu na <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CCDM 141.....	41
Obr. 16 Vliv esenciálního oleje skořice na <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CCDM 141.....	42
Obr. 17 Vliv esenciálního oleje tymiánu na <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CCDM 141.....	42

Obr. 18 Vliv esenciálního oleje lemongras na <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	
CCDM 1004.....	43
Obr. 19 Vliv esenciálního oleje oregana na <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	
CCDM 1004.....	44
Obr. 20 Vliv esenciálního oleje rozmarýn na <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	
CCDM 1004.....	44
Obr. 21 Vliv esenciálního oleje skořice na <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	
CCDM 1004.....	45
Obr.22 Vliv esenciálního oleje tymián na <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	
CCDM 1004.....	45
Obr. 23 Vliv esenciálního oleje oregano na <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	
CCDM 946.....	46
Obr. 24 Vliv esenciálního oleje rozmarýn na <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	
CCDM 946.....	47
Obr. 25 Vliv esenciálního oleje skořice na <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	
CCDM 946.....	47
Obr. 26 Vliv esenciálního oleje tymián na <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	
CCDM 946.....	48
Obr. 27 Vliv esenciálního oleje oregano na <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	
CCDM 824.....	49
Obr. 28 Vliv esenciálního oleje rozmarýn na <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	
CCDM824.....	49
Obr. 29 Vliv esenciálního oleje skořice na <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	
CCDM 824.....	50
Obr. 30 Vliv esenciálního oleje lemongras na <i>Enterococcus durans</i>	
CCDM 53.....	51

Obr. 31 Vliv esenciálního oleje oregana na <i>Enterococcus durans</i> CCDM 53.....	51
Obr. 32 Vliv esenciálního oleje oregan na <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2665.....	52
Obr. 33 Vliv esenciálního oleje skořice na <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2665.....	52
Obr. 34 Vliv esenciálního oleje lemongras na <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224.....	53
Obr.35 Vliv esenciálního oleje oregan na <i>Enterococcus faecalis</i> , CCM 4224.....	53
Obr. 36 Vliv esenciálního oleje rozmarýn na <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224.....	54
Obr. 37 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CCDM 48 - v přítomnosti esenciálního oleje z rozrýnu.....	56
Obr. 38 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CCDM 48 - v přítomnosti esenciálního oleje tymián.....	57
Obr. 39 Produkce biogenních aminů kmenem - <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CCDM 48 - v přítomnosti esenciálního oleje skořice.....	57
Obr. 40 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CCDM 1004 v přítomnosti esenciálního oleje lemongras.....	58
Obr. 41 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CCDM 1004 v přítomnosti esenciálního oleje tymiánu.....	58
Obr. 42 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CCDM 1004 v přítomnosti esenciálního oleje skořice.....	59
Obr. 43 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CCDM 946 - v přítomnosti esenciálního oleje rozmarýn.....	59
Obr. 44 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CCDM 946 - v přítomnosti esenciálního oleje tymián.....	60

Obr. 45 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CCDM 946 - v přítomnosti esenciálního oleje šalvěj.....	60
Obr. 46 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CCDM 141 - v přítomnosti esenciálního oleje oregano.....	61
Obr. 47 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> CCDM 824 - v přítomnosti esenciálního oleje lemongras.....	61
Obr. 48 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> CCDM 824 - v přítomnosti esenciálního oleje rozmarýn.....	62
Obr. 49 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> CCDM 824 - v přítomnosti esenciálního oleje skořice.....	62
Obr. 50 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Enterococcus durans</i> CCDM 53 v přítomnosti esenciálního oleje lemongras.....	63
Obr. 51 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Enterococcus durans</i> CCDM 53 v přítomnosti esenciálního oleje oregano.....	64
Obr. 52 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Enterococcus durans</i> CCDM 53 v přítomnosti esenciálního oleje rozmarýn.....	64
Obr. 53 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Enterococcus durans</i> CCDM 53 v přítomnosti esenciálního oleje tymián.....	65
Obr. 54 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Enterococcus durans</i> CCDM 53 v přítomnosti esenciálního oleje skořice.....	65
Obr. 55 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Enterococcus durans</i> CCDM 53 v přítomnosti esenciálního oleje šalvěj.....	66
Obr. 56 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2665 - v přítomnosti esenciálního oleje lemongras.....	67
Obr. 57 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2665 v přítomnosti esenciálního oleje oregano.....	67

Obr. 58 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2665 v přítomnosti esenciálního oleje rozmarýn.....	68
Obr. 59 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2665 v přítom- nosti esenciálního oleje tymián.....	69
Obr. 60 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 2665 v přítom- nosti esenciálního oleje skořice.....	69
Obr. 61 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224 v přítomnosti esenciálního oleje lemongras.....	70
Obr. 62 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224 v přítomnosti esenciálního oleje tymián.....	70
Obr.63 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188 v přítomnosti esenciálního oleje lemongras.....	71
Obr.64 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188 v přítomnosti esenciálního oleje rozmarýn.....	72
Obr.65 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188 v přítomnosti esenciálního oleje tymián.....	72
Obr.66 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188 v přítomnosti esenciálního oleje skořice.....	73
Obr. 67 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. <i>En- teritidis</i> CCM 4420 v přítomnosti esenciálního oleje tymián.....	73
Obr. 68 Produkce biogenních aminů kmenem <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. <i>En- teritidis</i> CCM 4420 - v přítomnosti esenciálního oleje skořice.....	74

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Biogenní aminy, jejich prekurzory a biologický význam [10].....	14
Tab. 2. Vybrané mikroorganismy produkující biogenní aminy v potravinách [1,2,3].....	21
Tab. 3. Testované koncentrace esenciálních olejů.....	32
Tab. 4. Rozvrhnutí vzorků na mikrotitrační destičce	34
Tab. 5. Koncentrace esenciálních olejů.....	36
Tab. 6: Inhibiční zóny po aplikaci esenciálních olejů na testované kmeny bakterií.....	55