Netradiční oleje s antimikrobními účinky

Bc. Kateřina Vinklerová

Diplomová práce
2015

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2014/2015

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

Jméno a příjmení:	**Bc. Kateřina Vinklerová**
Osobní číslo:	**T13415**
Studijní program:	**N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia:	**prezenční**
Téma práce:	**Netradiční oleje s antimikrobními účinky**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. **V teoretické části zpracujete literární rešerši na zadané téma. Popište složení, vlastnosti a použití studovaných olejů a uveďte analytické metody vhodné pro jejich charakterizaci. Dále se zaměřte na získání informací o jejich bioaktivitě, farmakologické účinnosti a antimikrobních vlastnostech.**

II. Praktická část

1. **V praktické části charakterizujte vzorky studovaných olejů pomocí vhodných fyzikálních a chemických metod. V dalším kroku stanovte jejich antimikrobní účinnost proti běžným patogenům. Výsledky zpracujte, přehledně uspořádejte a diskutujte.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Akoh, C.C., Min, D.B.: Food Lipids Chemistry, Nutrition, and Biotechnology Second Edition, Marcel Dekker, Inc., 2002, ISBN: 0-8247-0749-4
GUNSTONE, F. D., Ed. Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses, Second Edition ,2011 Blackwell Publishing Ltd. ISBN, 9781444339925
A. Dieffenbacher , W.D. Pocklington: Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives 1992 Blackwell Science ISBN: 0-63203-3371
ORTH, Donald S. Insights into cosmetic microbiology. Carol Stream: Allured Books, c2010, [26], 336 s. ISBN 978-1-932633-62-7.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce: **20. ledna 2015**

Termín odevzdání diplomové práce: **18. května 2015**

Ve Zlíně dne 20. ledna 2015

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

L.S.

Ing. Martina Černeková, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno Vinklerová Kateřina Obor: Technologie tuků, detergentů a kosmetiky

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 13. 5. 2015

Vinklerová Kateřina

[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 nevýdělečně 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 vzdělávacího 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 přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá stanovením antimikrobních účinků pěti netradičních rostlinných olejů (tamanu, šípkový, rakytníkový, nimbový a olej z černého kmínu) na vybrané mikroorganismy. V teoretické části práce je popsáno chemické složení studovaných olejů, jejich vlastnosti, využití v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu, jakož i metody pro hodnocení jejich antimikrobní účinnosti.

Praktická část diplomové práce je zaměřená na stanovení inhibičních účinků studovaných olejů na vybrané gram-pozitivní a gram-negativní bakterie. Dále je práce věnována charakterizaci těchto olejů pomocí vhodných fyzikálních a chemických metod. Jsou rovněž představeny výsledky z pilotních testů stanovení antioxidační aktivity a cytotoxicity.

Klíčová slova: rostlinné oleje, antimikrobní účinky, antioxidační aktivita, cytotoxicita

ABSTRACT

Diploma thesis is dealing with the determination of antimicrobial activity of the five non-traditional vegetable oils (tamanu, rosehip, sea buckthorn, neem and black cumin oil) on selected microorganisms. The theoretical part describes chemical composition of the studied oils, their properties and use in cosmetics and pharmaceutical industries, as well as methods for the evaluation of their antimicrobial efficacy.

The experimental part is focused on determination of the inhibitory effect of the studied oils on the selected gram-positive and gram-negative bacteria. A part of the thesis is focused on the characterization of these oils using relevant physico-chemical methods. The results of pilot tests for antioxidant activity and cytotoxicity of the oils are also presented.

Keywords: vegetable oils, antimicrobial effect, antioxidant activity, cytotoxicity

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. za pomoc, odborné vedení, cenné rady, připomínky, čas a hlavně za trpělivost a ochotu při zpracování této diplomové práce.

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

OBSAH

ÚVOD **11**
I TEORETICKÁ ČÁST **12**
1 OBECNÉ SLOŽENÍ TUKŮ A OLEJŮ **13**
1.1 MASTNÉ KYSELINY 13
1.2 MINORITNÍ LÁTKY OBSAŽENÉ V OLEJÍCH 15
2 NETRADIČNÍ OLEJE S ANTIMIKROBNÍ AKTIVITOU **16**
2.1 NIMBOVÝ OLEJ 16
2.2 OLEJ Z ČERNÉHO KMÍNU 18
2.3 ŠÍPKOVÝ OLEJ 21
2.4 TAMANU OLEJ 22
2.5 RAKYTNÍKOVÝ OLEJ 24
3 CHARAKTERIZACE TUKŮ A OLEJŮ **27**
3.1 TUKOVÁ ČÍSLA 27
3.1.1 Číslo kyselosti 27
3.1.2 Číslo zmýdelnění 27
3.1.3 Esterové číslo 27
3.1.4 Jodové číslo 28
3.2 STANOVENÍ OXIDAČNÍ STABILITY TUKŮ A OLEJŮ 28
3.2.1 Peroxidové číslo 28
3.2.2 Stanovení konjugovaných dienových a trienových mastných kyselin 28
3.3 SLOŽENÍ MASTNÝCH KYSELIN 29
3.3.1 Plynová chromatografie 29
3.3.2 Stanovení mastných kyselin pomocí GC – praktické příklady 30
4 METODY STANOVENÍ ANTIMIKROBNÍ AKTIVITY OLEJŮ **32**
4.1 KVALITATIVNÍ METODY 32
4.1.1 Disková difúzní metoda 32
4.1.2 Epsilon test citlivosti (E-test) 33
4.2 KVANTITATIVNÍ METODY 33
4.2.1 Agarová diluční metoda 33
4.2.2 Bujónová diluční metoda 34
4.2.3 Mikrodiluční metoda 34
5 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY **35**
5.1 METODA FRAP (FERRIC REDUCTION ANTIOXIDANT POWER) 36
5.2 METODA DPPH 36
6 STANOVENÍ CYTOTOXICITY **38**
6.1 MTT TEST 39
6.2 TEST NEUTRÁLNÍ ČERVENÍ 39
7 CÍL PRÁCE **40**
II PRAKTICKÁ ČÁST **41**
8 MATERIÁL A METODY **42**

8.1 ROSTLINNÉ OLEJE 42
8.2 CHEMIKÁLIE 42
8.3 PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ 42
8.4 BAKTERIÁLNÍ KMENY 43
8.4.1 Grampozitivní kmeny 43
8.4.2 Gramnegativní kmeny 43
8.5 KULTIVAČNÍ PŮDY 43
8.5.1 Mueller-Hinton agar (MHA) 43
8.5.2 Masopeptonový agar (MPA) 44
8.5.3 Masopeptonový bujón (MPB) 44
8.6 KULTIVAČNÍ MEDIUM 44
8.7 METODY 44
8.7.1 Charakterizace rostlinných olejů 45
8.7.1.1 Stanovení čísla kyselosti a zmýdelnění 45
8.7.1.2 Stanovení jodového čísla 45
8.7.1.3 Stanovení peroxidového čísla 46
8.7.1.4 Stanovení konjugovaných dienových a trienových mastných kyselin UV spektrometrií 46
8.7.1.5 Stanovení mastných kyselin plynovou chromatografií 47
8.7.2 Stanovení antimikrobních účinků rostlinných olejů 48
8.7.2.1 Příprava suspenze bakteriálních kmenů 48
8.7.2.2 Testování antimikrobních účinků pomocí bujónové diluční metody 48
8.7.2.3 Testování antimikrobních účinků pomocí difúzní diskové metody 49
8.7.2.4 Stanovení MIC 49
8.7.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH 50
8.7.4 Stanovení cytotoxicity metodou MTT 51
9 VÝSLEDKY A DISKUZE 52
9.1 CHARAKTERIZACE ROSTLINNÝCH OLEJŮ 52
9.1.1 Tuková čísla 52
9.1.1.1 Číslo kyselosti 52
9.1.1.2 Číslo zmýdelnění 53
9.1.1.3 Jodové číslo 54
9.1.2 Stanovení oxidační stability 55
9.1.2.1 Peroxidové číslo 55
9.1.2.2 Obsah konjugovaných dienových a trienových mastných kyselin 56
9.1.3 Analýza mastných kyselin plynovou chromatografií 57
9.2 STANOVENÍ ANTIMIKROBNÍCH ÚČINKŮ NETRADIČNÍCH ROSTLINNÝCH OLEJŮ 60
9.2.1 Diluční bujónová metoda 60
9.2.2 Difuzní disková metoda 61
9.2.3 Stanovení MIC tamanu oleje 66
9.3 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU DPPH 67
9.4 STANOVENÍ CYTOTOXICITY METODOU MTT 69
ZÁVĚR 73
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 75
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 83
SEZNAM OBRÁZKŮ 84

SEZNAM TABULEK.....85

ÚVOD

Rostlinné tuky a oleje patří do široké skupiny lipidů. Lipidy pak patří mezi základní složky lidské potravy, kde slouží jako zdroj energie a důležitý prvek ovlivňující správnou činnost a vývoj organismu. Podstatnou část olejů tvoří triacylglyceroly, což jsou estery mastných kyselin s alkoholem glycerolem. Mastné kyseliny tvoří největší část triacylglycerolů a jejich stupeň nenasycenosti má významný vliv na konzistenci tuků a olejů. Oleje obsahují vysoké množství nenasycených mastných kyselin, což jim dodává tekutou konzistenci. Významnou skupinu látek tvoří esenciální mastné kyseliny, které jsou pro lidský organismus nezbytné a hrají důležitou roli při ochraně organismu před celou řadou onemocnění. Rostlinné oleje jsou bohaté na ω-6 mastné kyseliny. Oleje doprovázejí i látky lipofilního charakteru, a to především uhlovodíky, fosfolipidy, steroly, barviva, chuťové a aromatické látky, antioxidanty, vitaminy.

Netradiční rostlinné oleje se získávají pomocí šetrných postupů s cílem zajistit jejich maximální kvalitu. Rozsah jejich využití je široký. Díky blahodárnému složení s obsahem celé řady bioaktivních látek mají jedinečné chemické vlastnosti a příznivé účinky na organismus. Většina netradičních olejů se spotřebovává v jejich přirozeném stavu, kde je zachována řada minoritních látek, které jsou obvykle z ostatních rostlinných olejů odstraňovány v různých fázích rafinace a zpracování. Slouží pro vnitřní užití, jako doplněk stravy nebo pro vnější užití. Vzhledem ke schopnostem změkčovat, regenerovat, vyživovat a léčit pokožku nachází uplatnění i v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu.

V posledních letech se zvyšuje zájem o využití přírodních látek při léčbě různých onemocnění, což podnítilo řadu farmaceutických firem, aby se touto problematikou zabývaly. U řady rostlinných olejů je známo, že mají antimikrobní účinky, čehož lze využít např. při léčbě onemocnění kůže. Jejich antimikrobní aktivita je přisuzována obsahu velkého množství bioaktivních látek či éterických olejů, které některé oleje doprovázejí.

Cílem praktické části diplomové práce bylo pomocí vhodných metod stanovit antimikrobní účinnost pěti druhů rostlinných olejů proti vybraným mikroorganismům. Další část práce byla věnována charakterizaci těchto olejů, stanovení jejich antioxidační aktivity a cytotoxicity.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 OBECNÉ SLOŽENÍ TUKŮ A OLEJŮ

Tuky a oleje jsou převážně tvořeny triacylglyceroly. Po chemické stránce se jedná o estery mastných kyselin s trojsytným alkoholem glycerolem. Na glycerol může být vázaná jedna mastná kyselina, pak se jedná o monoacylglyceroly, jsou-li navázané dvě mastné kyseliny vzniknou diacylglyceroly a pokud jsou navázané tři mastné kyseliny, jde o triacylglyceroly [1, 2].

Jestliže jsou mastné kyseliny navázané na molekulu glycerolu stejné, v tomto případě jde o jednoduché triacylglyceroly a pokud jsou navázané mastné kyseliny různé, jedná se o smíšené triacylglyceroly. V přírodních tucích a olejích jsou v molekule navázány obvykle různé mastné kyseliny [1, 2].

Tuky jsou, díky převažujícímu zastoupení nasycených mastných kyselin, za běžných podmínek tuhé, zatímco oleje jsou díky vysokému obsahu nenasycených mastných kyselin tekuté. Je rovněž známo, že rostlinné oleje obsahují kromě triacylglycerolů i doprovodné (minoritní) látky, jejichž množství nepřevyšuje 1 %. Mezi tyto látky patří fosfolipidy, vitaminy, uhlovodíky, steroly, barviva, chuťové a aromatické látky a přírodní antioxidanty [1, 2].

1.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny tvoří nejpodstatnější část tuků a olejů. Jsou to alifatické monokarboxylové kyseliny, které se liší svou délkou, stupněm nenasycenosti a charakterem nepolárního, uhlovodíkového řetězce [1, 3].

Podle délky uhlovodíkového řetězce se mastné kyseliny dělí na:

- Mastné kyseliny s krátkým řetězcem, obsahující 4 – 6 atomů uhlíku;
- Mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem, které obsahují 6–12 atomů uhlíku;
- Mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, osahující 14 – 20 atomů uhlíku;
- Mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem, které obsahují více jak 20 atomů uhlíku.

Podle stupně nasycení uhlovodíkového řetězce se mastné kyseliny dělí na:

- Nasycené, obsahující ve svém uhlovodíkovém řetězci pouze jednoduché vazby;
- Nenasycené, které obsahují ve své struktuře kromě jednoduchých vazeb i vazby dvojné.

Nenasycené mastné kyseliny se můžou dále dělit podle počtu dvojných vazeb na:

- Monoenové (MUFA = monounsaturated fatty acids), obsahující ve své molekule jednu dvojnou vazbu;
- Polyenové (PUFA = polyunsaturated fatty acids), obsahující ve své molekule dvě a více dvojných vazeb [1, 2, 3].

Některé polyenové mastné kyseliny jsou esenciální (α-linolenová, linolová), které si lidské tělo nedokáže syntetizovat a je třeba je přijímat prostřednictvím potravy. Dělí se do dvou skupin: ω-3 a ω-6 mastné kyseliny (název podle pozice první dvojné vazby počítáno od koncového methylenového uhlíku). Mezi ω-3 mastné kyseliny řadíme: kyselinu α-linolenovou, eikosapentaenovou (EPA) a kyselinu dokosahexaenovou (DHA). Do skupiny ω-6 mastných kyselin řadíme: kyselinu linolovou, γ-linolenovou a arachidonovou. Hlavním zdrojem ω-6 mastných kyselin jsou rostlinné oleje, zatímco ω-3 mastné kyseliny se vyskytují hlavně v rybím tuku a některých mořských živočiších. Nedostatek ale i změna poměru ω-6 a ω-3 mastných kyselin může nepříznivě působit na lidské zdraví. Optimálně by ω-6 a ω-3 mastné kyseliny měly být přijímány v poměru ca 4-5:1 [1, 4, 5].

Mezi nejdůležitější zdraví prospěšné účinky ω-3 mastných kyselin např. patří:

- Snižují pravděpodobnost vzniku onemocnění srdce;
- Snižují hladinu LDL cholesterolu v krvi;
- Snižují pravděpodobnost výskytu rakoviny;
- Snižují vysoký krevní tlak;
- Působí protizánětlivě;
- Zvyšují hladinu HDL cholesterolu v krvi;
- Posilují imunitu;
- Příznivě působí při alergiích, cukrovce a artróze atd.

Mezi pozitivní účinky ω-6 mastných kyselin lze např. zařadit:

- Snižují hladinu LDL cholesterolu v krvi;
- ω-6 MK tvoří ceramid 1, který přispívá k udržení optimální vlhkosti pokožky;
- Kyselina γ-linolenová se podílí na buněčné regeneraci a napomáhá při léčbě poškozených tkání atd. [1, 4, 5].

1.2 Minoritní látky obsažené v olejích

Rostlinné oleje jsou doprovázeny i různými látkami lipofilního charakteru. Při izolaci oleje přecházejí do lipidové frakce a jejich obsah nepřevyšuje 1 %. Mezi tyto látky patří: volné uhlovodíky, fosfolipidy, vitaminy, steroly, barviva, chuťové a aromatické látky a antioxidanty. Některé minoritní látky se z oleje odstraňují úmyslně, protože mohou nepříznivě ovlivnit celkovou kvalitu oleje. Jejich obsah je v různých olejích odlišný [1, 6].

2 NETRADIČNÍ OLEJE S ANTIMIKROBNÍ AKTIVITOU

V následující části diplomové práce budou podrobněji popsány vlastnosti a použití olejů, které jsou v práci studovány. Oleje byly vybrány na základě literární rešerše a jejich společnou vlastností je antimikrobní aktivita.

2.1 Nimbový olej

Český botanický název rostliny: Zederach indický

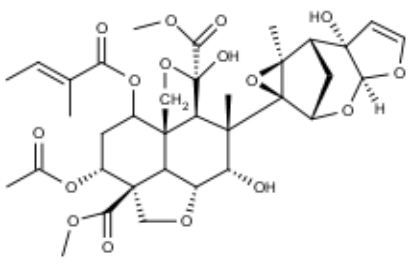
Latinský název rostliny: *Azadirachta indica*

Zederach indický je strom, který se pěstuje hlavně v Indii, ale i v Africe a Americe. Ze semen plodů se pomocí lisování za studena nebo extrakcí rozpouštědlem, případně superkritickým CO_2 získává nimbový olej, který je ceněn pro své významné léčivé účinky. Tyto účinky jsou přisuzovány bioaktivním látkám, které jsou v tomto oleji přítomné. Patří zde především triterpenoidy, konkrétněji limonoidy (azadirachtin, nimbin, nimbidin, salanin, meliantriol atd.), které dodávají nimbovému oleji významné antimikrobní, antiseptické a protizánětlivé vlastnosti. Co se týká složení, semeno nimby obsahuje okolo 40 – 45 % oleje, 8 – 15 % bílkovin, 16 – 35 % sacharidů. Složení mastných kyselin nimbového oleje je uvedeno v Tabulce 1. Dále tento olej obsahuje až 2 % nezmýdelnitelných látek, především steroly (3.1 – 5.1 mg/g) a tokoferoly (ca 1.2 mg/g). Nimbový olej je zbarven převážně tmavě a na rozdíl od většiny rostlinných olejů, obsahuje sloučeniny síry, díky kterým má štiplavý zápach připomínající česnek. Tento rostlinný olej je také významný pro své antidiabetické, protizánětlivé, antihyperglykemické, antivirové, protivředové, estrogenní a imunitní účinky. Vzhledem k jeho antimikrobním vlastnostem je součástí farmaceutických přípravků, zejména emulzí, mastí a obkladů. Příznivě působí při léčbě kožních onemocnění (psoriáza), zabraňuje předčasnému stárnutí pokožky a redukuje tvorbu vrásek. V aromaterapii lze použít při projevech bakteriálních a virových infekcí na pokožce (plané neštovice). Nimbový olej je účinný při léčbě vaginálních a kožních mykóz. Dále působí proti vším a parazitům, které hubí. Rafinovaný nimbový olej nachází uplatnění i v kosmetickém průmyslu, kde je přidáván např. do krémů, pleťových vod, šamponů, kondicionérů, vlasové vody, zubních past, kloktadel, laků na nehty a další kosmetiky. Surový nimbový olej, získaný extrakcí rozpouštědlem je využíván především pro výrobu klasických nebo speciálních medicinálních mýdel. Díky

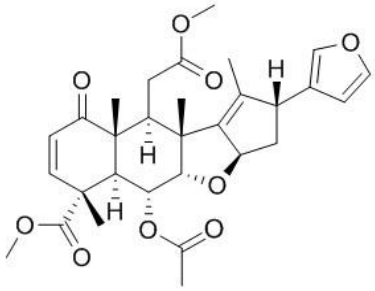
nepříjemnému česnekovému odéru je vhodné tento olej ředit např. s mandlovým nebo meruňkovým olejem v kombinaci s levandulí a tea tree, které tento odér překryjí [7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14].

Antibakteriálními účinky nimbového oleje se ve své práci [15] zabýval Warra (2012). Použil nezředěný nimbový olej, jehož antimikrobní aktivita byla testovaná proti různým kmenům bakterií (*Bacillus subtilis, Escherichia coli, Corynebacterium diphtheriae, Salmonella paratyphi A* a *B, Salmonella typhosa, Staphylococcus aureus, Staphylococcus albus*). Ze získaných inhibičních zón bylo zjištěno, že největší inhibiční účinek vykazoval nimbový olej na bakterie *Salmonella paratyphi B* a *Staphylococcus aureus*, kde inhibiční zóny byly stanoveny na 20 mm. Nejmenší antimikrobní aktivitu vykazoval nimbový olej na bakterii *Corynebacterium diphtheriae*, kde inhibiční zóna činila 14 mm.

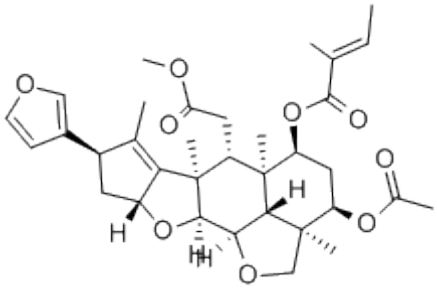
V další studii [9], kterou provedl Sandanasamy a kol. (2013), byl sledován antimikrobní účinek nimbového oleje vůči gram-negativní bakterii *Escherichia coli* a gram-pozitivní bakterii *Staphylococcus aureus.* Antibakteriální aktivita byla stanovena pomocí difúzní diskové metody, kde na povrch agarové plotny spolu s nanesenými bakteriemi byly umístěny sterilní disky, na které byl aplikován vzorek nimbového oleje. Pro každý vzorek byla provedena dvě měření a antibakteriální aktivita byla hodnocena z výsledků průměrných velikostí inhibičních zón. Po 48 hodinové kultivaci při 35 ± 2 °C, bylo zjištěno, že maximální inhibiční zóna u testované bakterie *Escherichia coli* byla 11.7 mm při koncentraci oleje 100 mg/ml. U dalších koncentracích oleje (5, 20, 50, a 80 mg/ml) byly inhibiční zóny 8.7, 9.7, 10.3, a 11.3 mm. U bakterie *Staphylococcus aureus* byla největší inhibiční zóna 13.0 mm při koncentraci oleje 100 mg/ml, zatímco u ostatních koncentrací oleje (5, 20, 50 a 80 mg/ml) měřily inhibiční zóny 8.7, 9.7, 10.7 a 11.0 mm. Dále bylo zjištěno, že hexanový extrakt nimbového oleje vykazoval větší inhibiční účinek na bakterii *Escherichia coli*, kde inhibiční zóny se pohybovaly v rozmezí 13.0 až 14.0 mm.



Obrázek 1: Strukturní vzorec aktivní látky nimbového oleje, azadirachtinu [16]



Obrázek 2: Strukturní vzorec aktivní látky nimbového oleje, nimbinu *[17]*



Obrázek 3: Strukturní vzorec aktivní látky nimbového oleje, salaninu [18]

2.2 Olej z černého kmínu

Český botanický název rostliny: Černucha setá

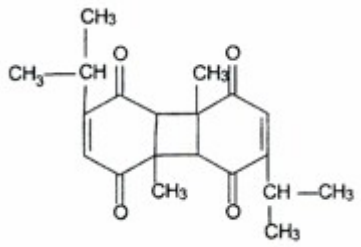
Latinský název rostliny: *Nigella sativa*

Černucha setá je původem z Asie, Středního východu a Evropy, ale v dnešní době se pěstuje hlavně v Indii. Černý kmín je velmi ceněn pro svá semena, která obsahují až 40 % oleje, 22 % proteinů, aminokyseliny, redukující cukry, slizy, alkaloidy, organické kyseliny, třísloviny, pryskyřice, hořčiny a další minoritní látky. Surový olej z černého kmínu je bohatý zejména na polyenové (60 %), monoenové (24 %) a nasycené (16 %) mastné kyseliny. Dále obsahuje okolo 1.5 % nezmýdelnitelných látek, tvořených především tokoferoly (α-tokoferol: 0.28 g/kg, γ-tokoferol: 0.23 g/kg), steroly (stigmasterol: 0.31 g/kg, kampesterol: 0.23 g/kg) a β-karotenem (0.6 g/kg). Olej z černého kmínu se získává hlavně lisováním za studena. Obsahuje více než sto biologicky aktivních látek, mezi které patří např. vitaminy A, B1, B2, B3, B6, D, E a F, kyselina listová, minerální látky, fosfor, železo, zinek, měď a hořčina nigellin.

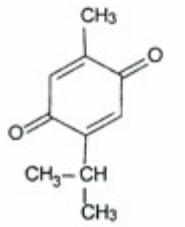
Díky jeho pozitivním účinkům na zdraví používali tento olej již Egypťané, kteří jej označovali jako všelék. Olej z černého kmínu obsahuje i určité množství éterických olejů (až 2.5 %), dále obsahuje monoterpeny karvon, limonen, a-pinen a p-cymen. Farmakologicky účinné složky éterického oleje jsou thymochinon, dithymochinon, thymohydrochinon a thymol. Hlavní mastné kyseliny obsažené v oleji jsou kyselina linolová, olejová, margarová (heptadekanová), palmitová a kyselina stearová. Složení mastných kyselin tohoto oleje je uvedeno v Tabulce 1. Bylo dokázáno, že olej z černého kmínu má antibakteriální, protizánětlivé, spasmolytické, broncho-dilatační, hepatoprotektivní a antihypertenzní účinky. Díky pozitivnímu působení lze olej z černého kmínu použít při léčbě onemocnění kůže, jako je psoriáza a ekzém. Ve směsi s včelím voskem se využívá při zklidnění popálenin, potlačování kožních infekcí, proti bolesti kloubů nebo proti vráskám. Používá se jako základní složka do masek nebo jako přísada do masážních olejů. Je užitečný při masážích suché pokožky s alergickými projevy. Díky svému blahodárnému složení je tento olej vhodný pro vnější i vnitřní užití [14, 19, 20, 21, 22, 23].

Ali a kol. (2003) ve své studii [24] provedené na řadě mikroorganismů, zkoumali antibakteriální účinky oleje z černého kmínu a bylo zjištěno, že olej vykazuje široké spektrum antimikrobní aktivity. Inhibičně působí např. proti *Staphylococcus albus, Escherichia coli, Salmonella typhi* nebo *Shigella niger* a *Vibrio cholera*. Testy prokázaly, že tento olej byl více účinný proti gram-pozitivním, než proti gram-negativním mikroorganismům. Dále bylo také zjištěno, že olej z černého kmínu má vynikající antifungální aktivitu, zejména proti některým druhům *Aspergillus*.

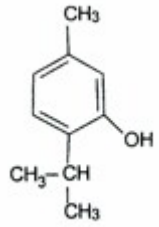
El-Kamali a kol. se ve své práci [25] zabývali antimikrobními účinky esenciálního oleje, který je v oleji z černého kmínu obsažen. Za použití difúzní diskové metody zjistili, že má antimikrobní účinky proti gram-pozitivním bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*. Rovněž byl účinný i proti gram-negativním bakteriím *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Z výše uvedených testovaných bakterií vykazoval maximální inhibiční účinek proti *Bacillus subtilis*.



Obrázek 4: Strukturní vzorec aktivní látky oleje z černého kmínu, dithymochinonu [26]



Obrázek 5: Strukturní vzorec aktivní látky oleje z černého kmínu, thymochinonu [26]



Obrázek 6: Strukturní vzorec aktivní látky oleje z černého kmínu, thymolu [26]

Tabulka 1: Zastoupení majoritních mastných kyselin vyskytujících se v nimbovém oleji a oleji z černého kmínu [19, 21, 80]

Mastná kyselina	Zastoupení mastných kyselin [%]	
	Nimbový	Olej z černého kmínu
Palmitová	16 – 34	10 – 13
Stearová	15 – 24	3
Olejová	25 – 58	24 – 35
Linolová	6 – 17	45 – 57
Margarová	–	10

Tabulka 2: Tuková čísla nimbového oleje a oleje z černého kmínu [13, 27, 28, 29, 30]

Rostlinný olej	Číslo kyselosti [mg KOH/g]	Číslo zmýdelnění [mg KOH/g]	Jodové číslo [g I_2/100g]
Nimbový	15 – 40	180 – 205	65 – 80
Z černého kmínu	0.4	172 – 204	101 – 119

2.3 Šípkový olej

Český botanický název rostliny: Růže šípková

Latinský název rostliny: *Rosa canina*

Šípkový olej je získán lisováním jader šípků růže šípkové, která je rozšířená téměř po celé Evropě, ale i v Severní Americe, Asii a Africe. Obsahuje přibližně 90 % nenasycených mastných kyselin (15 % MUFA, 75 % PUFA), což ho činí významným zdrojem nenasycených a esenciálních mastných kyselin. Je významný díky vysokému obsahu kyseliny α-linolenové, která se v rostlinných olejích (kromě lněného) téměř nevyskytuje nebo jen ve velmi malém množství. Složení mastných kyselin tohoto oleje je uvedeno v Tabulce 3. Dále šípkový olej obsahuje vysoké množství vitaminů A, C, D a 1.4 % nezmýdelnitelných látek (steroly, tokoferoly). Hlavní bioaktivní složkou šípkové oleje je *all-trans*-kyselina retinová (tretinoin), přírodní prekurzor vitaminu A, který je zodpovědný za obnovu tkání. Šípkový

olej se řadí mezi tzv. suché oleje, které po nanesení nezanechávají mastné stopy na pokožce. Tento olej obsahuje rovněž vysoké množství antioxidantů, především γ-tokoferol, který chrání buňky i tkáně před oxidačním působením a účinky volných radikálů. Má baktericidní, protizánětlivé a hydratační účinky [21, 22, 31, 32, 33, 34].

Díky vysokému obsahu nenasycených mastných kyselin, zejména kyseliny linolové a linolenové, napomáhá tento olej při výstavbě a regeneraci kožních buněk. Dále je aktivní pří zpomalování procesu stárnutí pleti a tvorby vrásek. Reguluje tvorbu kožního mazu a zklidňuje zánětlivé projevy pokožky. Vzhledem k již zmíněnému, vysokému obsahu esenciálních mastných kyselin se olej rovněž uplatňuje při snižování hladiny cholesterolu, dále zlepšuje krevní oběh a přispívá ke správné funkci srdce a cév [10, 21, 22, 31].

2.4 Tamanu olej

Český botanický název rostliny: Kalaba obvejčitá

Latinský název rostliny: *Calophyllum inophyllum*

Strom Kalaby obvejčité neboli domby roste především v zemích jihovýchodní Asie, Austrálie, Thajsku, Vietnamu nebo ve východní Africe a Madagaskaru. Na rozdíl od většiny rostlinných olejů, není tamanu olej téměř obsažen v čerstvých zralých plodech, ale tvoří se až při jejich vysychání. Olej se lisuje ze sušených jader plodů, která jej obsahují až 75 % a je zeleně zbarven. Postup úpravy semen před lisováním oleje je následující: skořápky zralých a nenaklíčených plodů jsou mírně nadrceny tak, aby nedošlo k poškození jádra. Jádra jsou pak rychle vyjmuta, uložena v tenkých vrstvách a vystavena slunci. Vylisovaný olej je složen z 88 % triacylglycerolů, 3.5 % fytosterolů a esterů sterolů, 6.4 % glykolipidů, 1.6% fosfolipidů a obsahuje ca 2.0 % nezmýdelnitelných látek, především steroly, tokoferoly a tokotrienoly. Hlavní triacylglyceroly tamanu oleje jsou OLL (10.8 %), POL (10.7 %) a OOL (10.4 %). Složení mastných kyselin tohoto oleje je uvedeno v Tabulce 3. Mezi dvě důležité, účinné látky obsažené v tomto oleji patří řídce se vyskytující mastná kyselina (calophyllic acid) a lakton calophyllolide, který je výjimečný svými antibakteriálními vlastnostmi. Tamanu olej má specifické aroma a je pro něj rovněž typický obsah vzácných rostlinných pryskyřic. Díky svému složení má regenerační, protizánětlivé, antibakteriální a hojivé účinky. Tamanu olej je vynikající surovinou pro výrobu řady kosmetických přípravků, zejména se přidává do regeneračních a ochranných přípravků. Je výborný jako součást hojivých a uklidňujících přípravků (mléka, krémy, gely, masky), přípravků po opalování nebo se přidává do

rtěnek a balzámů na rty. Tento olej je obzvláště užitečný pro léčbu popálenin, většiny dermatóz, pooperačních jizev, kožních alergií, akné, lupénky, oparů, omrzlin, kožních trhlin, diabetických vředů, hemoroidů a je vhodný pro suchou kůži. Lze jej synergicky kombinovat s éterickými oleji podle požadovaných účinků [14, 35, 36, 37].

V jedné z publikovaných studií [38], byla zjišťována minimální inhibiční koncentrace tamanu oleje potřebná k zastavení růstu bakterií. Bylo dokázáno, že působením tamanu oleje na *Propionibacterium acnes,* docházelo k inhibičnímu účinku a tedy k potlačení růstu při koncentraci 0.125 mg/ml - 0.250 mg/ml. Tyto výsledky jsou velmi podobné minimální inhibiční koncentrací derivátů zinku, který je známý pro své antibakteriální vlastnosti.

Tabulka 3: Zastoupení majoritních mastných kyselin vyskytujících se v šípkovém a tamanu oleji [21, 33, 34, 37]

Mastná kyselina	Zastoupení mastných kyselin [%]	
	Šípkový	Tamanu
Palmitová	5	12 – 14
Stearová	3	13 – 15
Olejová	8 – 22	34 – 40
Linolová	48 – 54	31 – 38
Linolenová	20 – 32	–

Tabulka 4: Tuková čísla šípkového a tamanu oleje [33, 37, 39, 40]

Rostlinný olej	Číslo kyselosti [mg KOH/g]	Číslo zmýdelnění [mg KOH/g]	Jodové číslo [g I_2/100g]
Šípkový	Max. 4	175 – 188	165 – 180
Tamanu	23 – 40	194 – 210	90 – 100

2.5 Rakytníkový olej

Český botanický název rostliny: Rakytník řešetlákový

Latinský název rostliny: *Hippophae rhamnoides*

Rakytník řešetlákový je volně rostoucí nízký až středně velký keř, který se vyskytuje především na Sibiři a v jižní Evropě, Skandinávii, Asii, Japonsku nebo v Severní Americe. Olej se získává z oranžově zbarvených plodů a jeho složení je ovlivněno tím, z které části plodů je získán. Může to být buď z dužniny plodu, nebo ze semene. Obsah oleje v semenech a dužnině se pohybuje okolo 13 až 15 %. Rakytníkový olej obsahuje vysoký podíl nezmýdelnitelných látek (0.3 – 2.0 %), jedná se především o karotenoidy, tokoferoly a steroly. Tento olej lze získat jednak lisováním, avšak této metody izolace se moc nevyužívá díky malé výtěžnosti anebo extrakcí superkritickým CO_2. Výrazné oranžové zbarvení tohoto oleje je přisuzováno vysokému obsahu karotenoidů. Olej získaný ze semen je bohatý na nenasycené mastné kyseliny, především na kyselinu linolovou a α-linolenovou, zatímco olej získaný z dužniny obsahuje především nasycené mastné kyseliny, zejména palmitovou a palmitoolejovou. Složení mastných kyselin tohoto oleje je uvedeno v Tabulce 5. Rakytníkový olej je jedinečný díky vysokému obsahu biologicky aktivních látek. Mezi nejvýznamnější složky lze zařadit vitaminy A, K, E, D, C, vitaminy skupiny B, dále třísloviny, minerální soli (bór, mangan, železo) nebo flavonoidy, které se uplatňují při snižování koncentrace cholesterolu v krvi a spolu s karotenoidy stimulují růst a hojení poškozených tkání i sliznic. Flavonoidy spolu s fytoncidy přispívají k baktericidním účinkům tohoto oleje. Největší uplatnění nachází v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu pro jeho regenerační, protizánětlivé, zklidňující a hojivé vlastnosti. Napomáhá při léčbě kožních onemocnění, podporuje růst nehtů a vlasů a pozitivně působí při termických a chemických spáleninách kůže. Rakytníkový olej se nachází např. v balzámech, hydratačních, denních a nočních krémech nebo se používá do pleťových mlék a vlasových masek. Rakytníkový olej má široké spektrum využití a je vhodný jak pro vnitřní, tak pro vnější užití. Díky jeho prospěšným účinkům na zdraví je vyhledávaným potravinovým doplňkem a je taktéž součástí tzv. funkčních potravin [21, 41, 42, 43, 44, 45].

Antibakteriálními vlastnostmi rakytníkového oleje se ve své publikaci [46] zabývali Kaushal a kol. (2011). Sterilní Petriho misky obsahující EMB medium (Eosin methylen blue) byly inokulovány standardní kulturou *Escherichia coli* nebo *Bacillus subtilis* a do středu misky byl položen disk filtračního papíru nasáklý studovaným olejem. Vzorek byl inkubován při

38 °C po dobu 24 – 48 hodin, po které byla měřena velikost inhibičních zón. Pro každý vzorek byla provedena čtyři měření, ze kterých byla vypočítána průměrná hodnota. Po 24 – 48 hodinové inkubaci byly na agaru patrné inhibiční zóny pouze v případě *Escherichia coli*. A jejich průměr činil 4 mm.

V další studii [47], kterou se zabývali Arora a kol. (2012), byla sledována antimikrobiální aktivita methanolických a vodných extraktů z rakytníku řešetlákového, konkrétně z listů, semen a pokrutin. Inhibiční účinnost extraktů studovali proti 17 patogenním mikroorganismům. V této práci byla použita agarová difúzní metoda, kde antimikrobní aktivita byla hodnocena z průměrných velikostí inhibičních zón. Bylo zjištěno, že methanolický extrakt z pokrutin, semen a listů vykazoval větší inhibiční účinek proti testovaným kmenům v porovnání s jejich vodným extraktem a působil inhibičně zejména proti bakteriím *Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis* a *Salmonella enterica*. Vodný extrakt působil antimikrobně především na bakterii *Salmonella enterica* a *Staphylococcus aureus*. Dále bylo zjištěno, že MIC methanolických extraktů byly nižší (125 až 4000 µg/ml) než u extraktů vodných, jejichž hodnoty se pohybovaly od 2000 do 4000 µg/ml.

Tabulka 5: Zastoupení majoritních mastných kyselin vyskytujících se v rakytníkovém oleji [21, 48]

Složení mastných kyselin	Specifikace	
	Ze semen	Z bobulí
Palmitová	7.7 – 20	23.1 – 38
Stearová	2.5 – 3	–
Palmitoolejová	–	23 – 50
Olejová	18.5 – 19	17.8 – 33
Vakcenová	2.3 – 4	7
Linolová	39 – 40	15 – 17.4
Linolenová	30	10.4

Tabulka 6: Tuková čísla rakytníkového oleje [46, 49]

Rostlinný olej	Číslo kyselosti [mg KOH/g]	Číslo zmýdelnění [mg KOH/g]	Jodové číslo [g I_2/100g]
Rakytníkový	4 – 9.5	181 – 230	63 – 125

3 CHARAKTERIZACE TUKŮ A OLEJŮ

V této kapitole jsou popsány pouze základní charakteristiky tuků a olejů, mezi které patří především stanovení tzv. tukových čísel (číslo kyselosti, číslo zmýdelnění, esterové číslo jodové číslo) a stanovení oxidační stability tuků a olejů. Tu lze určit např. pomocí peroxidového čísla nebo spektrofotometricky jako obsah konjugovaných dienových a trienových mastných kyselin. Tuky a oleje se obvykle charakterizují rovněž pomocí obsahu celkových lipidů, zastoupení jednotlivých mastných kyselin a dalších minoritních látek.

3.1 Tuková čísla

Pomocí tukových čísel lze snadno a rychle charakterizovat analyzované oleje.

3.1.1 Číslo kyselosti

Číslo kyselosti se definuje jako počet mg KOH potřebných k neutralizaci volných mastných kyselin v 1 g vzorku tuku. Udává tedy obsah volných mastných kyselin v analyzovaném vzorku tuku. Jedná se o rychlé a jednoduché stanovení, založené na titraci odměrným roztokem KOH na vhodný indikátor (fenolftalein). Při stárnutí tuků a olejů dochází ke štěpení TAG, uvolňování mastných kyselin a ke zvýšení čísla kyselosti [50, 51, 52].

3.1.2 Číslo zmýdelnění

Číslo zmýdelnění je definováno jako počet mg KOH potřebných k neutralizaci volných mastných kyselin a ke zmýdelnění esterů mastných kyselin v 1 g vzorku tuku. Udává obsah veškerých mastných kyselin (volných a estericky vázaných) v analyzovaném vzorku tuku. Toto stanovení se provádí nepřímou titrací nadbytečného KOH odměrným roztokem kyseliny chlorovodíkové [50, 51, 52].

3.1.3 Esterové číslo

Esterové číslo je definováno jako počet mg KOH potřebných k hydrolýze estericky vázaných mastných kyselin v 1 g vzorku tuku. Udává obsah estericky vázaných mastných kyselin v analyzovaném vzorku. Hodnota esterového čísla se vypočítá z rozdílu hodnoty čísla zmýdelnění a čísla kyselosti [50, 51, 52].

3.1.4 Jodové číslo

Jodové číslo je definováno jako množství halogenu (přepočteného na jód) v gramech navázaného na 100 g vzorku tuku za daných podmínek. Stanovení lze provést podle Hanuše s jodmonobromidem jako reakčním činidlem nebo dle Wijse, kde se použije jodmonochlorid. Udává obsah nenasycených mastných kyselin v analyzovaném vzorku tuku a stanovuje se jodometrickou metodou odměrné analýzy. Stanovení jodového čísla spočívá v adici známého množství halogenu na dvojnou vazbu a zjištění nezreagovaného činidla zpětnou titrací thiosíranem. Hodnotu jodového čísla lze použít např. ke sledování hydrogenačního procesu anebo pro zjišťování míry oxidace oleje [50, 51, 52].

3.2 Stanovení oxidační stability tuků a olejů

Díky působení vzdušného kyslíku dochází k oxidaci tuků a olejů. Jedná se o nežádoucí reakci, snižující jejich kvalitu. Autooxidace je nejběžnějším typem oxidace, která probíhá při běžných i zvýšených teplotách a při níž dochází ke vzniku hydroperoxidů, primárních oxidačních produktů, které jsou nestabilní a iniciují vznik sekundárních produktů (aldehydy, ketony, uhlovodíky). Na reakci se podílejí především nenasycené mastné kyseliny, avšak při vysokých teplotách se mohou reakce zúčastnit i mastné kyseliny s jednoduchou vazbou. Mezi nežádoucí projevy oxidace řadíme vznik nepříjemného zápachu a chuti, které jsou způsobeny zejména přítomností aldehydů a ketonů. Průběh oxidačních změn tuků a olejů, lze sledovat pomocí kvalitativních analýz nebo lze využít i kvantitativních stanovení, mezi něž patří např. peroxidové číslo, anisidinové číslo, thiobarbiturové číslo nebo stanovení obsahu konjugovaných dienový a trienových mastných kyselin [53, 54].

3.2.1 Peroxidové číslo

Peroxidové číslo udává obsah primárních oxidačních produktů tuků a stanovuje se jodometrickou metodou odměrné analýzy. Princip této metody spočívá ve schopnosti hydroperoxidů uvolnit z jodidu jód, který se dále stanoví titrací odměrným roztokem thiosíranu v kyselém prostředí. U čerstvých, vysoce kvalitních olejů by měla být hodnota peroxidového čísla nízká [52, 53, 55].

3.2.2 Stanovení konjugovaných dienových a trienových mastných kyselin

Pro stanovení obsahu konjugovaných mastných kyselin se využívá UV spektrometrie. Konjugované dieny absorbují UV záření při 233 nm a konjugované trieny vykazují absorpční

maxima při 268 a 278 nm. V přírodních lipidech se systém konjugovaných dvojných vazeb nevyskytuje. K jeho vzniku dochází při oxidaci polyenových mastných kyselin, kdy nekonjugované dvojné vazby mastných kyselin přecházejí na konjugovaný systém dvojných vazeb [53].

3.3 Složení mastných kyselin

Složení mastných kyselin v tucích a olejích lze určit pomocí chromatografických technik. V této kapitole je popsán princip plynové chromatografie, což je jedna z metod, která se k této analýze používá nejčastěji.

3.3.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je metoda, která slouží k separaci složek obsažených v analyzovaném vzorku. Může být využívaná jak ke kvalitativnímu stanovení, tak ke kvantitativní analýze. Využívá se zejména v analýze těkavých látek a lze s ní analyzovat nejen plyny, ale i látky, které je možné před separací převést na plyn. Mobilní fází je vhodný nosný plyn, pohybující se skrz stacionární fázi umístěnou v koloně. Dle skupenství stacionární fáze se plynová chromatografie dělí na dva typy: 1) plynová rozdělovací chromatografie (GLC – gas-liquid chromatography), kde stacionární fází je kapalina zakotvená na inertním nosiči a princip separace je založen na rozdílné rozpustnosti analyzovaných látek ve stacionární a mobilní fázi; 2) plynová adsorpční chromatografie (GSC – gas-solid chromatography), kde stacionární fází je tuhý sorbent a princip separace spočívá v rozdílné adsorpci analyzovaných látek na povrchu stacionární fáze [56, 57, 58, 59].

Analyzovaný vzorek je nástřikem zaveden do injektoru, ve kterém dojde k jeho odpaření a následně je ve formě par unášen v proudu mobilní fáze do kolony, ve které dojde k separaci tohoto vzorku na jednotlivé složky. Rozdělené složky analytu postupně opouštějí kolonu a putují do detektoru, kde dojde k jejich detekci. Detektor indikuje okamžitou koncentraci analyzovaných látek v nosném plynu a jeho signál je zaznamenáván počítačem a vyhodnocován v podobě chromatogramu [56, 57, 58].

Plynový chromatograf, který je zobrazen na Obrázku 7. se skládá z: zásobníku nosného plynu, regulátoru tlaku a průtoku plynu, dávkovacího zařízení (injektor), chromatografické kolony, termostatu, detektoru a zobrazovacího a vyhodnocovacího zařízení. Chromatografická kolona je nejdůležitější součástí plynového chromatografu, ve které dochází k separaci složek analytu. Obsahuje stacionární fázi a je umístěna v termostatu. V současnosti jsou

nejčastěji používány kapilární kolony o vnitřním průměru menším než 1 mm a délce 10 – 100 m, vyráběné z křemenného skla potaženého vrstvou polymeru. Stacionární fáze je nanesená na vnitřní stěně kapiláry ve formě tenkého filmu. Další důležitou součástí plynového chromatografu je detektor, který slouží k detekci složek analyzovaného vzorku. Mezi vlastnosti ideálního detektoru patří rychlá a lineární odezva, vysoká citlivost, selektivita a stabilita. V kombinaci s GC lze použít několik druhů detektorů, přičemž k nejpoužívanějším řadíme tepelně vodivostní detektor, plamenově ionizační detektor a detektor elektronového záchytu. Plynová chromatografie může být kombinována s hmotnostní spektrometrií (GC-MS – gas chromatography-mass spectrometry), která plní funkci detektoru a umožňuje detekci složek s využitím hmotnostních spekter [56, 57, 58, 59].

Před samotnou analýzou mastných kyselin je nutné vzorek tuku nebo oleje převést na methylestery, což jsou nízkomolekulární nepolární deriváty. V prvním kroku dochází ke zmýdelnění acylglycerolů v oleji a poté se provede esterifikace volných mastných kyselin v alkalickém prostředí methanolu.

3.3.2 Stanovení mastných kyselin pomocí GC – praktické příklady

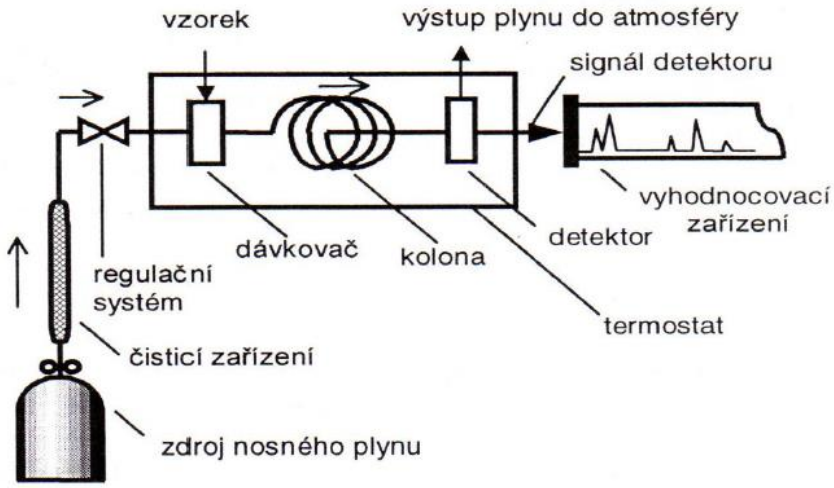
Analýzou složení mastných kyselin v olejích pomocí GC se zabývala řada autorů. V následující části práce je uvedeno jen několik příkladů metod vhodných pro jejich stanovení.

Concha a kol. [33] provedli analýzu mastných kyselin šípkového oleje pomocí plynové chromatografie za následujících podmínek: byl použit plynový chromatograf (Hewlett-Packard 5890 series II) s FID detektorem, kolonou (SP-2330, 30 m x 0.25 mm x 0.2 μm, Supelco, Bellefonte, PA) a objemem nástřiku 0.5 μl. Nosným plynem bylo He, teplota injektoru činila 220 °C a teplota detektoru 250 °C. Vzorky byly analyzovány teplotním programem s výchozí teplotou 170 °C, poté následoval lineární vzrůst teploty rychlostí 1 °C/min. do 190 °C, dále 4 °C/min. do 215°C a při této teplotě pokračovala analýza po dobu 30 minut.

Obsah mastných kyselin nimbového oleje ve své práci [9] analyzovali Sandanasamy a kol. Toto stanovení bylo provedeno plynovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Analýza byla provedena na plynovém chromatografu Agilent Technologies 7890 A, s nepolární kapilární kolonou DB-1 (100% dimethylpolysiloxan) o rozměrech 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) a objemem nástřiku 1.0 μl. Jako nosný plyn bylo použito He s průtokem 1 ml/min. Teplotní program byl následující: počáteční teplota 60 °C s výdrží po dobu 3 minut, poté následovalo lineární zvýšení teploty na 240 °C rychlostí 3 °C/min. a izotermální

analýza po dobu 10 minut. Vstupní teplota detektoru byla nastavena na 250 ° C. Pro hmotnostní detektor byly použity následující podmínky: splitless technika, teplota injektoru 250 °C a teplota iontového zdroje 230 °C.

Ali a kol. [27] provedli GC analýzu oleje z černého kmínu. Obsah jednotlivých mastných kyselin stanovili pomocí plynového chromatografu GCD PYE Unicam (PYE Unicam Ltd., Cambridge, Velká Británie) s FID. Použili skleněnou kolonu (1.8 m x 2 mm) s 6 % BDS na pevném nosiči, Anakorm ABS (100/120). Nosným plynem byl N_2 (průtok 30 ml/min.) a teplota kolony byla konstantní, 190 °C. Teplota injektoru a detektoru byly nastaveny na 240 °C.



Obrázek 7: Schéma GC [56]

4 METODY STANOVENÍ ANTIMIKROBNÍ AKTIVITY OLEJŮ

Ke zjišťování antimikrobní aktivity vybraných rostlinných olejů lze využít kvalitativní a kvantitativní metody stanovení. Metody kvalitativní jsou metody difúzní, jsou využívané zejména pro svou jednoduchost a rychlost stanovení a slouží k orientačnímu stanovení antimikrobní účinnosti dané látky. Mezi metody kvantitativní patří diluční metody, které lze využít ke kvantitativnímu stanovení stupně citlivosti (rezistence) a dále slouží ke stanovení hladiny minimální inhibiční koncentrace (MIC), což je nejnižší koncentrace inhibiční látky, která inhibuje růst testovaného mikroorganismu [60, 61].

4.1 Kvalitativní metody

4.1.1 Disková difúzní metoda

Pomocí diskové difuzní metody lze prokázat citlivost (rezistenci) testovaných mikroorganismů vůči antimikrobním látkám. Tato metoda je založena na postupném uvolňování antimikrobní látky z papírových disků, vložených do média s inokulovaným testovaným kmenem mikroorganismů. Testovaný mikroorganismus je inokulován na agarovou půdu (Mueller-Hinton agar) a následně jsou na povrch média přiloženy standartní papírové disky obsahující inhibiční látku. Tato inhibiční látka v průběhu předepsané inkubace difunduje z disků do okolního média a vytváří různě velké zóny kruhových tvarů, v nichž dochází k potlačování růstu mikroorganismů. Po inkubaci je měřen průměr zón okolo každého disku. Inokulum je připraveno z izolované kolonie testovaných mikroorganismů, která se v agarové půdě inkubuje po dobu 18 až 24 hodin. Dalším způsobem přípravy inokula je příprava suspenze izolovaných kmenů ve fyziologickém solném roztoku (0.85 %) o zákalu odpovídajícím 0.5 stupně McFarlandovy stupnice. Hustota inokula může přímo ovlivnit velikost inhibičních zón, bez ohledu na citlivost zkoušeného mikroorganismu. Husté a velmi koncentrované inokulum vede k falešně menším velikostem inhibiční zóny, zatímco velmi zředěné inokulum způsobí opačný účinek a oba tyto případy vedou k nesprávným výsledkům. Diskové kotouče lze aplikovat na povrch agarové plotny buď ručně, nebo pomocí dávkovacího zařízení. V optimálním případě by měly být disky umístěny ve vzdálenosti 30 mm od sebe, minimální vzdálenost mezi disky by však měla být alespoň 24 mm, aby se minimalizovalo překrývání inhibičních zón. Agarové plotny se inkubují v obrácené poloze za podmínek vhodných pro testované organismy. Inhibiční zóna je identifikována jako oblast, ve které není zřejmý žádný viditelný růst mikroorganismů a lze ji pozorovat pouhým okem.

Slabý nárůst kolonií nebo mikro-kolonie viditelné pouze pod lupou nebo při naklánění desky by měly být při vyhodnocování ignorovány. Mezi hlavní výhodu difúzního diskového testu je jeho jednoduchost, finanční nenáročnost a možnost výběru antimikrobních látek pro testování. Nevýhodou této metody je její časová náročnost [60, 61, 62].

4.1.2 Epsilon test citlivosti (E-test)

E-test je obdobou difúzního agarového testu, který kombinuje principy diskové difúzní a diluční metody pro stanovení citlivosti mikroorganismů *in vitro*. Tento test je relativně lehce proveditelný a na rozdíl od diskové difúzní metody umožňuje stanovit MIC. MIC je nejnižší koncentrace antimikrobní látky, která inhibuje růst testovaného mikroorganismu. E-test, lze využít pouze za předpokladu, že je testováno pouze malé množství antimikrobních látek a substancí. Na inokulovanou agarovou půdu jsou pokládány speciální proužky opatřené stupnicí, které na okrajích obsahují gradient antimikrobní látky. Následně dochází k pronikání antimikrobní látky do okolního média a podél strany proužku se rovněž vytváří kontinuální koncentrační gradient antimikrobní látky. Po uplynutí předepsané doby inkubace se na povrchu půdy vytváří inhibiční zóna ve tvaru elipsy. Hodnota MIC se odečte v místě, kde se inhibiční zóna protíná s proužkem. Metody se využívá se pro klinické testování gram-pozitivních a gram-negativních, aerobních a anaerobních bakterií, pneumokoků, streptokoků, gonokoků, a kvasinek. Výhodou této metody je stanovení širokého spektra koncentrací antimikrobní látky. Nevýhodou je její relativně vysoká cena [60, 62].

4.2 Kvantitativní metody

4.2.1 Agarová diluční metoda

Tato metoda je založena na hodnocení MIC na agarových půdách, které obsahují antimikrobní látky s odstupňovanou koncentrací. Nejčastěji se připravuje série koncentrací jednoho druhu antimikrobní látky. Následně se základní roztok ředí geometrickou řadou. Na plotny s agarem (Mueller-Hinton agar) se očkuje standartní inokulum testovaného kmene a po předepsané inkubační době se odečte nejnižší koncentrace antimikrobní látky, u které došlo k zastavení růstu sledovaného kmene mikroorganismů (MIC). Agarová diluční metoda je vysoce standardizovaná, referenční metoda, pomocí níž, lze testovat citlivost velkého množství kmenů mikroorganismů [60, 61, 63].

4.2.2 Bujónová diluční metoda

Principem této metody je naočkování testovaného kmene mikroorganismů do zkumavek se snižující se koncentrací inhibiční látky a po inkubaci se sleduje, při které koncentraci inhibiční látky nedošlo k tvorbě zákalu a tedy k pomnožení sledovaných mikroorganismů. Nejnižší koncentrace antimikrobní látky, u které došlo k potlačení růstu mikroorganismů, se určí jako MIC [61].

4.2.3 Mikrodiluční metoda

U mikrodiluční metody se hodnotí MIC v jamkách mikrodiluční destičky, které obsahují živné médium (bujón) v kombinaci se zvolenými koncentracemi antimikrobní látky. Mikrodiluční destička obsahuje obvykle 96 jamek s kónickým nebo kulatým dnem. Tyto jamky s antimikrobní látkou o různých koncentracích, jsou zaočkovány suspenzí testovaných mikroorganismů. Po inkubační době je rovněž určena MIC. Růst mikroorganismů se projevuje sedimentem nebo zákalem obsahu jamky. U mikrodiluční metody daná koncentrace inokula neovlivňuje výsledky testu tak významně jako u diskové difúzní metody nebo u E-testu. Výhodou této metody je vysoká shoda výsledků v porovnání s agarovou diluční metodou, její jednoduchost, časová nenáročnost a snadná příprava velkého množství mikrodilučních destiček s různými typy půd v kombinaci s inhibičními látkami o různé koncentraci [60, 61, 62].

5 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY

Antioxidační aktivita udává míru schopnosti biologického materiálu inhibovat volné radikály. Ty působí nepříznivě na lidské zdraví a jedná se zejména o reaktivní kyslíkové a dusíkové radikály. Negativní působení těchto radikálů je přisuzováno jejich schopnosti reagovat s biologicky významnými sloučeninami, což pak vede ke změnám ve struktuře buněk, významných funkcí v organismu nebo k poškození tkání, popř. orgánů. Důležitou roli v ochraně organismu před volnými, radikály hrají antioxidanty, které tyto radikály převádějí na nereaktivní či méně reaktivní formu. Tím dochází k eliminaci reaktivních procesů v organismu a jeho ochraně před oxidačním stresem. Dostatečný příjem antioxidantů z potravin může např. snižovat pravděpodobnost vzniku onemocnění srdce, zpomalovat proces stárnutí, snižovat hladinu cholesterolu nebo snižovat riziko vzniku nádorů. V nízkých koncentracích antioxidanty oddalují nebo zamezují oxidaci substrátu (lipidy, proteiny, sacharidy) a tím prodlužují údržnost potravin. [64, 65, 66, 67, 68]

Antioxidanty lze klasifikovat na základě mnoha kritérií. Jedním z možných rozdělení může být podle:

- Původu: přírodní (tokoferoly, kyselina askorbová) a syntetické (galláty);
- Mechanismu působení: přímá reakce s radikály (vychytávání, zhášení), reakce s přechodnými kovy nebo reakce s přítomným kyslíkem;
- Způsobu vstupu do organismu: endogenní – vznikající pomocí metabolických procesů v organismu (kyselina močová) nebo exogenní – přijímané zvenčí např. formou potravy (karotenoidy);
- Struktury: fenolové (tokoferoly), endioly (kyselina erythorbová) či ostatní látky;
- Rozpustnosti: lipofilní (flavonoidy), hydrofilní (kyselina askorbová) nebo amfifilní (kyselina lipoová) [67, 68, 69].

Vzhledem ke skutečnosti, že bezpečnost syntetických antioxidantů je s ohledem na současnou úroveň znalostí sporná, jsou stále více využívány přírodní, rostlinné antioxidanty, přítomné např. v ovoci, zelenině, olejnatých semenech, tedy i v rostlinných olejích. Netradiční rostlinné oleje jsou důležité, protože jejich složky mají jedinečné chemické vlastnosti a mohou rozšířit nabídku jedlých olejů [66].

Rostlinné oleje běžně obsahují polyenové mastné kyseliny, které podléhají snáze oxidaci. Antioxidanty chrání oleje před oxidací, při které dochází k negativnímu ovlivnění jejich vý-

živové a senzorické hodnoty. Nejvýznamnějšími antioxidanty, vyskytujícími se v rostlinných olejích, jsou tokoferoly, tokotrienoly a karotenoidy. O dalších bioaktivních sloučeninách s antioxidačními schopnostmi, které jsou přítomné v rostlinných olejích není však stále dostatek informací. Proto, aby bylo možné lépe pochopit prospěšné účinky antioxidačních látek v rostlinných olejích, je důležité zjistit, zda se jednotlivé oleje, jako celek, liší ve svých reakcích s volnými radikály.

Pro stanovení antioxidační aktivity existuje řada pracovních postupů a metod. Tyto metody se dělí do dvou skupin: 1) metody hodnotící schopnost eliminovat vzniklé radikály (např. ABTS, DPPH); 2) metody posuzující redoxní vlastnosti látek (např. FRAP) [64, 65].

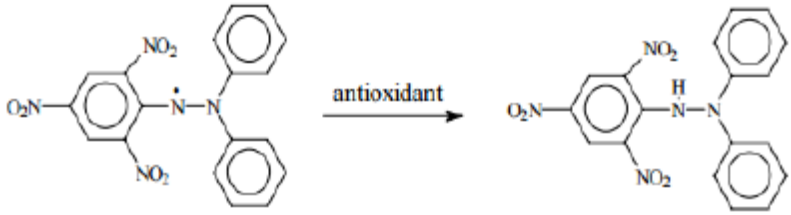
V následující části práce bude zmíněna metoda FRAP, což je jedna ze základních metodik pro stanovení antioxidační aktivity. Dále bude popsána metoda používající DPPH, která je v diplomové práci použita.

5.1 Metoda FRAP (Ferric reduction antioxidant power)

Metoda FRAP pro stanovení antioxidační aktivity je založená na schopnosti antioxidantů redukovat železité ionty TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-triazin) na ionty železnaté. Projevem redukce je vznik intenzivně modrého zbarvení, které se sleduje spektrofotometricky. Nárůst absorbance při 593 nm je mírou antioxidační aktivity vzorku [64, 65].

5.2 Metoda DPPH

Princip této metody spočívá v reakci testované látky se stabilním volným radikálem DPPH [1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl], kdy dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Fialové zabarvení radikálu DPPH je způsobeno nepárovým elektronem na dusíku hydrazylu. Radikál DPPH vykazuje silnou absorpci v UV/VIS spektru a při působení antioxidantů se intenzita jeho zabarvení snižuje. Odbarvování roztoku je sledováno spektrofotometricky, při vlnové délce 515 nm. Antioxidační aktivita se vyjadřuje buď jako úbytek absorbance, neboli inhibiční účinnost (%) nebo v ekvivalentech použitého standardu (např. β-karoten, kyselina askorbová, Trolox) [64, 65].



Obrázek 8: Redukce radikálu DPPH za vzniku DPPH-H [70]

V praktické části byly použity dva postupy, a to modifikovaný postup podle Ferri a kol. [71]. Při této metodě se smísí alikvotní část extraktu vzorku (450 µl) a 8.55 ml čerstvě vyrobeného roztoku DPPH (0,17 M) a ponechá se stát po dobu 60 minut ve tmě. Absorbance se měří při 515 nm. Druhým postupem je metoda podle Ramadan a kol. [66]. Zde byla schopnost olejů deaktivovat radikály testována po jejich rozpuštění v toluenu (koncentrace DPPH 1.10^{-4} M). Praktické provedení spočívalo v rozpuštění 10 mg oleje ve 100 µl toluenu a jeho smíchání s 390 µl roztoku DPPH. Směs byla homogenizována 10 sekund na vortexu a měření absorbance bylo prováděno při 515 nm v časových intervalech 1, 15, 30, 45 a 60 min. po smíchání oleje s DPPH.

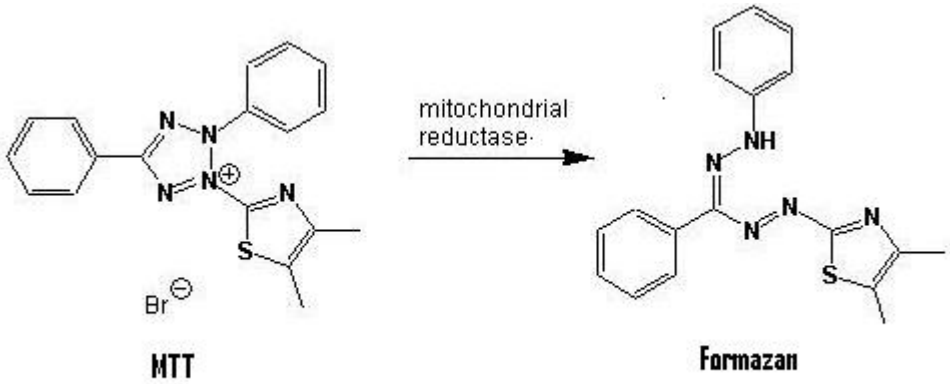
6 STANOVENÍ CYTOTOXICITY

Obecně lze cytotoxicita definovat jako schopnost látek nebo sloučenin způsobit buněčnou smrt. K testování cytotoxicity existuje velké množství testů *in vitro*, pomocí kterých je možné zkoumání toxických účinků látek na buněčné a molekulární úrovni. Ke stanovení cytotoxicity se využívá buněčných linií kultivovaných za specifických podmínek. Představují širokou škálu buněčných typů a jsou komerčně dostupné. Hodnocení cytotoxicity zahrnuje morfologické posouzení poškození buněk, měření růstu buněk nebo měření specifických aspektů buněčného metabolismu. Existuje celá řada testů, které lze rozdělit do čtyř skupin: 1) testy viability, u kterých se sleduje životaschopnost buněk vystavených zkoušené látce; 2) testy proliferace; 3) testy založené na detekci metabolické aktivity (MTT, XTT); 4) testy detekce genové exprese. Testy pro stanovení cytotoxického účinku se řídí mezinárodní normou ČSN EN ISO 10993, která definuje požadavky, parametry a postupy používané při biologickém hodnocení zdravotnických prostředků a skládá se ze dvaceti dokumentů. V páté části jsou definovány metody zkoušek pro hodnocení cytotoxicity zdravotnických prostředku *in vitro*. Cytotoxické testování zahrnuje kultivaci buněk, jejich vystavení toxické látkce a vyhodnocení jejich poškození. Jednotlivé testy cytotoxicity *in vitro* se vyhodnocují nejčastěji pomocí spektrofotometru, průtokové cytometrie, luminometru či fluorescenční mikroskopie. V současnosti se hodnocení cytotoxicity *in vitro* stalo velmi používanou a poptávanou analýzou. Hlavním důvodem jejich používání je minimalizování pokusů a výzkumů na zvířatech při testování toxicity zkoušených látek. Jedná se tedy o alternativní způsob v testování toxicity. Hodnocení cytotoxicity *in vitro* lze uplatnit např. při testování bezpečnosti nových léčiv, kosmetických přípravků nebo potravinových přísad [72, 73, 74].

V některých případech jsou antimikrobní vlastnosti látek spojeny s jejich cytotoxicitou, proto bylo do praktické části diplomové práce zařazeno stanovení cytotoxicity studovaných rostlinných olejů. V následující části kapitoly bude popsán princip metody MTT, která je v praxi pro toto stanovení hojně využívaná. Tato kapitola bude rovněž věnovaná testu využívající neutrální červeň. Test neutrální červení patří také mezi vyhledávané metody pro vyhodnocování cytotoxicity na tkáňových kulturách.

6.1 MTT test

Tato metoda pro stanovení cytotoxicity je založená na redukci MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid], v živých a metabolizujících buňkách, do kterých může přejít prostřednictvím endocytózy. Žlutě zabarvený MTT je mitochondriálními dehydrogenázami a redukčními činidly převeden na fialově zbarvený, nerozpustný formazan, který se po přídavku detergentu rozpustí. Stupeň zabarvení se sleduje spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm a míra absorbance je přímo úměrná počtu živých buněk (čím větší absorbance, tím vyšší počet živých buněk). MTT test se využívá k hodnocení viability, proliferace a cytotoxicity buněk [72, 75, 76].



Obrázek 9: Redukce MTT na formazan [77]

6.2 Test neutrální červení

Jedná se o kvantitativní kolorimetrickou metodu, která je založena na schopnosti živých buněk vázat neutrální červeň ve svých lysozomech. U mrtvých nebo poškozených buněk se schopnost udržet či akumulovat barvivo snižuje. Sledovaným parametrem je intenzita zabarvení neutrální červení v buněčné populaci, která je přímo úměrná množství životaschopných buněk. Detekce se provádí nejčastěji spektrofotometricky či fluorometricky. Nevýhodou tohoto testu je možnost srážení barviva do tvarů krystalů, které může být vyvoláno některými chemikáliemi. V důsledku tohoto jevu dochází k nepřesnému a chybnému stanovení [72, 78].

7 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo, v rámci literární rešerše, popsat složení, vlastnosti, metody charakterizace a použití netradičních olejů (rakytníkový, šípkový, tamanu, nimbový a olej z černého kmínu) a uvést vybrané analytické metody vhodné pro jejich charakterizaci. Další část práce byla zaměřena na popis jejich farmakologických a antimikrobních účinků.

V praktické části diplomové práce bylo cílem charakterizovat vzorky studovaných olejů pomocí vhodných fyzikálních a chemických metod. Dalším cílem práce pak bylo stanovit jejich biologickou aktivitu, konkrétně antimikrobní účinnost proti běžným patogenům, cytotoxicitu a antioxidační účinky, výsledky zpracovat a diskutovat a vyvodit z nich závěry.

PRAKTICKÁ ČÁST

8 MATERIÁL A METODY

8.1 Rostlinné oleje

Biologická aktivita netradičních rostlinných olejů byla sledována na následujících pěti olejích:

- BIO Šípkový olej, Nobilis Tilia s.r.o., Česká Lípa;
- BIO Rakytníkový olej, Nobilis Tilia s.r.o., Česká Lípa;
- BIO Olej z černého kmínu, Nobilis Tilia s.r.o., Česká Lípa;
- Nimbový olej, Nobilis Tilia s.r.o., Česká Lípa;
- Tamanu olej, Nobilis Tilia s.r.o., Česká Lípa.

8.2 Chemikálie

- Hexan, 99 % p.a. (PENTA, Ing. Petr Švec);
- Tween 80 (Sigma-Aldrich);
- Methanol (PENTA, Ing. Petr Švec);
- DPPH (Sigma-Aldrich);
- β-karoten (Sigma-Aldrich);
- Tetrahydrofuran (PENTA, Ing. Petr Švec);
- KOH, HCl (Ing. Petr Lukeš);
- Fenolftalein;
- Xylen (PENTA, Ing. Petr Švec);
- Chloroform (Ing. Petr Lukeš);
- KI (Chemapol);
- Toluen (PENTA, Ing. Petr Švec);
- Thiosíran sodný (Sigma-Aldrich).

8.3 Přístroje a vybavení

- Plynový chromatograf Shimadzu GC - 14A s FID detektorem;
- Spektrofotometr – UV-VIS Photolab;
- Biohazard box;
- Autokláv;
- Denzitometr;

- Vortex;
- Disky z filtračního papíru (d = 0.5 cm);
- Běžné laboratorní vybavení.

8.4 Bakteriální kmeny

Antimikrobní aktivita použitých rostlinných olejů byla studována na osmi bakteriálních kmenech, které byly získány z České sbírky mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms, CCM):

8.4.1 Grampozitivní kmeny

- *Micrococcus luteus* CCM 732;
- *Staphylococcus aureus* subps. *aureus* CCM 3953;
- *Bacillus cereus* CCM 2010;
- *Enterococcus faecalis* CCM 2665.

8.4.2 Gramnegativní kmeny

- *Escherichia coli* CCM 3954;
- *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955;
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420;
- *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303.

Bakteriální kmeny byly uchovávány v chladničce při teplotě 4 ± 2 °C.

8.5 Kultivační půdy

Pro porovnání antimikrobních účinků testovaných olejů pomocí difúzní diskové metody byl použit Mueller-Hinton agar. Pro bujónovou diluční metodu byl připraven masopeptonový agar a na přípravu inokula byl použit masopeptonový bujón.

8.5.1 Mueller-Hinton agar (MHA)

Složení Mueller-Hinton agaru bylo následující: hovězí masová infúze (300 g); kyselý hydrolyzát kaseinu (17.5 g); škrob (1.5 g); agar (17 g); destilovaná voda (ad 1000 ml).

Postup přípravy:

Jednotlivé složky směsi byly naváženy, převedeny do zásobní láhve a doplněny destilovanou vodou. Poté byla provedena sterilizace v autoklávu (132 °C, 90 min) a takto připravený MHA byl nadávkován do sterilních Petriho misek.

8.5.2 Masopeptonový agar (MPA)

Složení masopeptonového agaru bylo následující: beef extrakt (3 g); NaCl (3 g); pepton (5 g); agar (15 g); destilovaná voda (ad 1000 ml).

Postup přípravy:

Jednotlivé složky směsi byly naváženy, převedeny do zásobní láhve a doplněny destilovanou vodou. Poté byla provedena sterilizace v autoklávu (132 °C, 90 min) a takto připravený MPA byl nadávkován do sterilních Petriho misek.

8.5.3 Masopeptonový bujón (MPB)

Složení mastopeptonového bujónu bylo následující: beef extrakt (3 g); NaCl (3 g); pepton (5 g); destilovaná voda (ad 1000 ml).

Postup přípravy:

Jednotlivé složky směsi byly naváženy, převedeny do zásobní láhve a doplněny destilovanou vodou. Poté byla provedena sterilizace v autoklávu (132 °C, 90min).

8.6 Kultivační medium

Pro zkoušku cytotoxicity bylo jako kultivační médium použito DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle Medium), ke kterému bylo přidáno 10 % fetálního bovinního séra a směs penicillinu/streptomycinu o 100 U/ml (100 μg/ml).

8.7 Metody

V praktické části diplomové práce byly studované rostlinné oleje charakterizovány pomocí vhodných chemických a fyzikálních metod. Pro stanovení jejich antimikrobní aktivity byla použita difúzní disková metoda a bujónová diluční metoda.

8.7.1 Charakterizace rostlinných olejů

8.7.1.1 Stanovení čísla kyselosti a zmýdelnění

Do baňky bylo naváženo ca 2 g vzorku oleje a k němu bylo přidáno 5 ml xylenu, 30 ml neutrálního ethanolu a fenolftalein. Roztok byl zahříván pod zpětným chladičem ca 10 – 15 minut na 50 – 60 °C a poté titrován za horka 0.5 M ethanolickým roztokem KOH do růžového zbarvení. K roztoku byl opět přidán ethanolický KOH, a to v takovém množství, aby jeho celkový objem včetně spotřeby na číslo kyselosti byl 20 ml. Roztok byl po dobu 2 hodin udržován na topném hnízdě ve varu pod zpětným chladičem. Po ukončení varu byl k roztoku přidán fenolftalein a roztok byl titrován za horka 0.5 M HCl do vymizení zbarvení. Číslo kyselosti a zmýdelnění bylo vypočteno dle Rovnice 1 a 2:

$$\text{Číslo kyselosti} = \frac{(a - b) \cdot c_{KOH} \cdot M_{KOH}}{n} \quad (1)$$

Kde:

a – spotřeba 0.5 M KOH pro vlastní titraci [ml];
b – spotřeba 0.5 M KOH pro slepý pokus [ml];
c_{KOH} – koncentrace odměrného roztoku KOH [mol/l];
M_{KOH} – molární hmotnost KOH [g/mol];
n – navážka vzorku [g].

$$\text{Číslo zmýdelnění} = \frac{(b - a) \cdot c_{HCl} \cdot M_{KOH}}{n} \quad (2)$$

Kde:

a – spotřeba 0.5 M HCl pro vlastní titraci [ml];
b – spotřeba 0.5 M HCl pro slepý pokus [ml];
c_{HCl} – koncentrace odměrného roztoku HCl [mol/l];
M_{KOH} – molární hmotnost KOH [g/mol];
n – navážka vzorku [g].

8.7.1.2 Stanovení jodového čísla

Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo ca 0.1g vzorku oleje a k němu přidáno 25 ml chloroformu a 25 ml Hanušova činidla, obsah baňky byl promíchán a ponechán na tmavém místě po dobu 1 hodiny. Po uplynutí předepsané doby bylo přidáno 20 ml 10 % roztoku KI a 100 ml destilované vody. Roztok byl titrován 0.1 M roztokem thiosíranu do žlutého zbarvení.

Poté byl přidán škrobový maz (1 ml) a roztok byl dotitrován do odbarvení. Jodové číslo bylo vypočteno dle Rovnice 3:

$$\text{Jodové číslo} = \frac{(a - b) \cdot c_{Na_2S_2O_3} \cdot M_{I_2}}{2 \cdot n \cdot 1000} \cdot 100 \quad (3)$$

Kde:

a – spotřeba 0.1 M $Na_2S_2O_3$ na slepý pokus [ml];

b – spotřeba 0.1 M $Na_2S_2O_3$ pro vlastní stanovení [ml];

$c_{Na2S2O3}$ – koncentrace odměrného roztoku $Na_2S_2O_3$ [mol/l];

M_{I2} – molární hmotnost I_2 [g/mol];

n – navážka vzorku [g].

8.7.1.3 Stanovení peroxidového čísla

Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo ca 1.2 – 1.4 g vzorku oleje, ke kterému bylo přidáno 25 ml směsi chloroform:kyselina octová v poměru 1:1. Vzorek oleje byl rozpuštěn a po přídavku 1 ml roztoku KI byl roztok promíchán a ponechán 5 minut ve tmě. Poté bylo přidáno 75 ml destilované vody, 2 ml škrobového mazu a obsah baňky byl titrován 0.01 M thiosíranem do odbarvení. Peroxidové číslo se vypočte dle Rovnice 4:

$$\text{Peroxidové číslo} = \frac{1000 \cdot M \cdot (a - b)}{n} \quad (4)$$

Kde:

M – přesná koncentrace roztoku $Na_2S_2O_3$ [mol/l];

a – spotřeba 0.01 M $Na_2S_2O_3$ pro vlastní stanovení [ml];

b – spotřeba 0.01 M $Na_2S_2O_3$ na slepý pokus [ml];

n – navážka vzorku [g].

8.7.1.4 Stanovení konjugovaných dienových a trienových mastných kyselin UV spektrometrií

Vzorek oleje (50 mg) byl rozpuštěn v 10 ml hexanu. V křemenných kyvetách bylo na přístroji UV-VIS Photolab proměřeno UV spektrum připravených roztoků olejů v rozmezí vlnových délek 200 – 400 nm proti čistému hexanu. Ze získaných záznamů byla hodnocena přítomnost absorpčních píků v oblasti 233 nm pro konjugované dieny a 268, 278 nm pro konjugované trieny. Obsah konjugovaných dienových (CD) a trienových (CT) mastných kyselin byl stanoven dle Rovnic 5, 6, 7:

$$CD = 0.91 \cdot (a_{233} - 0.07) \quad (5)$$

$$CT = 1.316 \cdot (a_{268} - 0.05 \cdot (a_{262} - a_{274})) \quad (6)$$

$$a_\lambda = \frac{A_\lambda}{c \cdot l} \quad (7)$$

Kde:

A_λ – absorbance stanovená pro příslušnou vlnovou délku;

m – hmotnost navážky [mg];

V – výsledný objem roztoku [ml];

l – délka kyvety [cm].

8.7.1.5 Stanovení mastných kyselin plynovou chromatografií

Složení mastných kyselin ve studovaných olejích bylo stanoveno metodou plynové chromatografie s FID detekcí. Před chromatografickou analýzou bylo potřeba vzorek oleje převést na těkavé methyestery.

Příprava methylesterů:

Do varné baňky bylo odváženo ca 2 g vzorku oleje, ke kterému bylo přidáno 20 ml methanolu a 0.5 ml 1 M methanolického roztoku KOH. Směs byla ponechána vařit pod zpětným chladičem po dobu 30 minut. Po uplynutí této doby byl obsah baňky ochlazen a převeden do dělicí nálevky. Na promytí bylo použito 10 ml hexanu a 20 ml 20% roztoku NaCl. Obsah nálevky byl protřepán a vodná fáze byla oddělena do druhé dělicí nálevky, do které bylo přidáno 5 ml hexanu. Roztok v druhé dělící nálevce byl opět protřepán a vodný a hexanový podíl byl od sebe oddělen. Hexanové extrakty z první a druhé extrakce byly spojeny a poté promyty 15 ml 20% roztoku NaCl. Vodná fáze byla oddělena a hexanový podíl byl vysušen filtrací přes bezvodý síran sodný. Takto připravené methylestery byly analyzovány pomocí GC.

Analýza GC:

Před analýzou byly nejprve vzorky methylesterů naředěny hexanem v poměru 1:5. Stanovení mastných kyselin testovaných olejů bylo provedeno na plynovém chromatografu Shimadzu GC-14A, vybaveném FID detektorem a kapilární kolonou DB WAX (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, Agilent). Nástřikový objem byl 1 μl, teplota injektoru 235 °C, průtok nosného

plynu 2.5 kg.cm^{-2}. Teplotní program byl následující: počáteční teplota byla 110 °C, po které následovalo zvýšení teploty na 230 °C rychlostí 5 °C/min a při této teplotě pokračovala analýza po dobu 10 minut. Teplota detektoru byla nastavena na 235 °C.

Identifikace jednotlivých mastných kyselin v analyzovaných vzorcích byla provedena na základě srovnání retenčních časů elučních píků vzorků s retenčními časy elučních píků použitého standardu *SUPELCO^{TM} 37 Component FAME Mix* (Sigma Aldrich). Kvantitativní zastoupení mastných kyselin ve vzorcích bylo určeno pomocí metody vnitřní normalizace.

8.7.2 Stanovení antimikrobních účinků rostlinných olejů

Pro posouzení antimikrobní účinnosti studovaných olejů byla použita difúzní disková metoda a bujónová diluční metoda.

8.7.2.1 Příprava suspenze bakteriálních kmenů

Suspenze bakteriálních kmenů byly připraveny zaočkováním čisté kultury z Petriho misek do předem připravených, vysterilizovaných zkumavek s MPB. Následně byly zkumavky vloženy do termostatu a kultivovány při 30 °C po dobu 24 hodin u kmenů *Pseudomonas aeruginosa* a *Bacillus cereus*. U ostatních bakteriálních kmenů kultivace probíhala při 37 °C po dobu 24 hodin.

8.7.2.2 Testování antimikrobních účinků pomocí bujónové diluční metody

Suspenze bakteriálních kmenů, kultivované přes noc, byly nejprve ředěny sterilním fyziologickým roztokem na zákal odpovídající 0.5 stupně McFarlandovy stupnice. Do sterilních, plastových zkumavek bylo pipetováno 500 µl vzorku oleje, 20 µl 10% roztoku TWEEN 80 a dále bylo přidáno odpovídající množství MPB do objemu 1.8 ml. Obsah každé zkumavky byl řádně protřepán a zhomogenizován pomocí vortexu. Následně byly vzorky zaočkovány 200 µl suspenze bakteriálních kmenů. Výsledný objem připravené směsi činil 2 ml. Obdobně byl připraven i slepý vzorek, avšak bez přídavku vzorku oleje. Zkumavky se vzorkem byly poté inkubovány po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C. Po skončení kultivační doby byly jednotlivé vzorky naočkovány v množství 100 µl na Petriho misky s MPA a rozetřeny po celé ploše sterilní hokejkou. Kultivační podmínky se lišily v závislosti na použitých bakteriálních kmenech. Následovalo vyhodnocení a pozorování přítomnosti a růstu mikroorganismů u jednotlivých vzorků olejů. Z důvodu hydrofobicity použitých olejů, byl použit emulgátor

TWEEN 80, který umožnil účinnou dispergaci oleje v bujónu. Maximální koncentrace emulgátoru byla 0.05 %. Tato koncentrace zajistila emulgování oleje, aniž by samotný TWEEN 80 inhiboval růst testovaných mikroorganismů [79].

8.7.2.3 Testování antimikrobních účinků pomocí difúzní diskové metody

K testování antimikrobních účinků byly použity vzorky neředěných olejů nebo jejich směsi s hexanem v poměru 1:1.

V první části experimentu byly jednotlivé suspenze bakteriálních kmenů naředěny pomocí sterilního fyziologického roztoku na hustotu odpovídající 0.5 stupně McFarlandovy stupnice. Takto připravené inokulum bylo v množství 100 µl pipetováno do Petriho misek s MHA. Za pomocí sterilní hokejky byla suspenze rozprostřena po celé ploše Petriho misky. Po zaschnutí bylo na plotny s MHA kladeno šest sterilních papírových disků o průměru 5 mm. Pět disků bylo určeno pro jednotlivé vzorky studovaných olejů, popř. jejich směsi s hexanem v poměru 1:1. Na šestý disk byla pipetovaná sterilní destilovaná voda, která sloužila jako negativní kontrola. Na každý papírový disk bylo pipetováno 7 µl zkoušeného čistého oleje, popř. 10 µl směsi oleje s hexanem. Pro každý vzorek byla provedena dvě stanovení. Petriho misky spolu s disky byly vloženy do termostatu a kultivovány při 30 °C po dobu 24 hodin u kmenů *Pseudomonas aeruginosa* a *Bacillus cereus*. Ostatní bakteriální kmeny byly kultivovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Po ukončení inkubace byla odečtena velikost inhibičních zón (mm), které vznikly kolem papírových disků v důsledku inhibičních účinků studovaných rostlinných olejů.

8.7.2.4 Stanovení MIC

MIC testovaného oleje byla stanovena bujonovou diluční metodou. Stanovení MIC bylo provedeno pouze u tamanu oleje, u kterého byly zjištěny výrazné inhibiční účinky na některé druhy testovaných mikroorganismů, konkrétně na *Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*. Do předem vysterilizované, plastové zkumavky bylo napipetováno 250 µl tamanu oleje, 10 µl 10% roztoku TWEEN 80 a zkumavka byla doplněna odpovídajícím množstvím MHB do objemu 1 ml. Poté byla směs důkladně protřepána a promíchána na vortexu. Vzorek byl následně ředěn dvojkovou geometrickou řadou až na konečnou koncentraci oleje ca 2 µl/ml. Ředění bylo prováděno MHB. Následně bylo do všech zkumavek zaočkováno 200 µl suspenze testovaných mikroorganismů, naředěných na zákal odpovídající 0.5 stupně McFarlandovy stupnice. Kultivace probíhala při 37 °C po dobu 1

hodiny. Takto kultivované vzorky byly naočkovány a rozetřeny sterilní hokejkou v množství 100 µl na Petriho misky s MHA. Kultivace probíhala při 37 °C po dobu 24 hodin. Po ukončení kultivace byl pozorován růst a přítomnost testovaných mikroorganismů a byla stanovena nejnižší koncentrace oleje, u které došlo k úplné inhibici růstu bakterií, která odpovídala hodnotě MIC.

8.7.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Pro stanovení antioxidační aktivity olejů metodou DPPH byly použity dva postupy. Při prvním, modifikovaném postupu dle Ferri a kol. [71], byl použit zásobní roztok DPPH v THF. Do odměrné baňky bylo připraveno 100 ml zásobního roztoku DPPH, navážením 0.024 g DPPH a doplněním THF. Z takto připraveného zásobního roztoku byl připraven pracovní roztok DPPH, kdy bylo smícháno 30 ml zásobního roztoku DPPH se 135 ml THF. K analýze bylo do kádinky odpipetováno 450 µl vzorku oleje a k němu přidáno 8.55 ml pracovního roztoku a následně byla kádinka vložena na 60 min do tmy. V křemenných kyvetách byla na přístroji UV-VIS Photolab změřena absorbance pracovního roztoku DPPH a připravených vzorků, při vlnové délce 515 nm proti THF. Podle Rovnice 8 byla vypočtena inhibiční účinnost, neboli % inhibice radikálů DPPH v přítomnosti testovaných olejů. Každý ze tří paralelně připravených vzorků byl proměřen dvakrát.

$$\text{Inhibiční účinnost (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \cdot 100 \qquad (8)$$

Kde:

A_0 – absorbance pracovního roztoku DPPH;
A_1 – absorbance reakční směsi.

Druhým postupem byla metoda podle Ramadan a kol. [66]. V prvním kroku byl připraven toluenový roztok DPPH (koncentrace DPPH 1.10^{-4} M). Ke stanovení bylo naváženo 10 mg oleje a k němu bylo přidáno 100 µl toluenu. Po rozpuštění oleje byla směs smíchána s 390 µl roztoku DPPH. Poté tato směs byla homogenizována po dobu 10 sekund na vortexu. V křemenných kyvetách byla na přístroji UV-VIS Photolab změřena absorbance při 515 nm v časových intervalech 1, 15, 30, 45 a 60 minut po smíchání oleje s DPPH. Mezi jednotlivými měřeními byl roztok uložen ve tmě. Inhibiční účinnost, neboli % inhibice radikálů DPPH v přítomnosti testovaných olejů, byla rovněž vypočtena dle Rovnice 8. Měření bylo provedeno tři krát.

8.7.4 Stanovení cytotoxicity metodou MTT

Stanovení cytotoxicity bylo provedeno v Laboratoři buněčné biologie Centra Polymerních systémů UTB ve Zlíně. K testování cytotoxicity byly vzorky připraveny obdobným způsobem, jako pro testování antimikrobní aktivity. Do sterilních zkumavek bylo pipetováno 500 μl vzorku oleje, 20 μl 10 % roztoku TWEEN 80 a odpovídající množství DMEM do objemu 2 ml. Testované vzorky olejů byly zředěny kultivačním médiem na koncentrace 100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1 a 0.01 μl/ml. Testování bylo provedeno podle normy EN ISO 10993-5, s drobnými úpravami. Buňky byly nejdříve prekultivovány po dobu 24 hodin v médiu, které bylo následně nahrazeno suspenzemi olejů ředěnými na výše uvedené koncentrace. Pro srovnání byla připravena rovněž suspenze TWEENU 80 bez přítomnosti olejů. Jako reference bylo použito čisté kultivační médium bez testovaných složek. Po přidání olejů byly buňky opět 24 hodin kultivovány v inkubátoru Heracell 150i. K posouzení cytotoxického účinku byl použit MTT test a testování bylo provedeno po jednodenní kultivaci buněk v přítomnosti olejů o výše uvedených koncentracích. Po této kultivaci byly oleje z jamek s buňkami odsáty, bylo přidáno čisté médium a MTT o koncentraci 0.5 mg/ml. Buňky s MTT byly opět po dobu 4 hodin kultivovány. Po uplynutí této doby byl přidán dimethylsulfoxid a po 15 minutách bylo provedeno již vlastní stanovení cytotoxicity. Množství živých buněk bylo stanoveno spektrofotometricky přístrojem Infinite M200 Pro NanoQuant, při vlnové délce 570 nm. Všechny testy byly provedeny čtyřikrát. Pro odstranění odlehlých hodnot byl použit Dixonův Q test; pro vyhodnocení byly použity pouze střední průměrné hodnoty. Podle požadavků mezinárodní normy ISO 10993-5 byla použita následující stupnice cytotoxického účinku testovaných vzorků:

- Necytotoxický účinek: množství viabilních buněk vyšší než 80 %;
- Slabě cytotoxický účinek: množství viabilních buněk 60 – 80 %;
- Středně cytotoxický účinek: množství viabilních buněk 40 – 60 %;
- Silně cytotoxický účinek: množství viabilních buněk menší než 40 %.

9 VÝSLEDKY A DISKUZE

9.1 Charakterizace rostlinných olejů

9.1.1 Tuková čísla

9.1.1.1 Číslo kyselosti

Číslo kyselosti udává počet mg KOH potřebných k neutralizaci volných mastných kyselin v 1 g vzorku tuku. Jeho hodnota se mění při stárnutí tuků a olejů, kdy dochází ke štěpícím procesům v triacylglycerolech, uvolňování mastných kyselin a ke zvýšení čísla kyselosti. Výsledky shrnující hodnoty čísla kyselosti sledovaných olejů jsou uvedeny v Tabulce 7. Největší hodnotu čísla kyselosti vykazoval tamanu olej 62.9 mg KOH/g, zatímco nejnižší hodnota byla stanovena u oleje šípkového, a to 1.0 mg KOH/g. Číslo kyselosti 62.9 mg KOH/g stanovené pro Tamanu olej, představuje ve srovnání s tradičními oleji velmi vysokou hodnotu. V publikaci [37] a [40], je číslo kyselosti tamanu oleje udáváno v rozmezí 23 – 40 mg KOH/g. Tyto hodnoty neodpovídají průměrné hodnotě získané při naší analýze, což mohlo být způsobeno např. tím, že k tomuto stanovení byl použit nerafinovaný tamanu olej, který díky tomu, že neprošel procesem rafinace, může obsahovat vysoké množství volných mastných kyselin.

Při porovnání čísel kyselosti dalších studovaných olejů s literaturou se některé hodnoty od sebe mírně lišily, ale rozdíly nebyly tak výrazné jako u zmíněného tamanu oleje. U šípkového oleje se hodnota čísla kyselosti pohybuje max. do 4.0 mg KOH/g [33, 39], naměřená hodnota činila 1.0 mg KOH/g. V nimbovém oleji bylo stanoveno číslo kyselosti na 26.7 mg KOH/g, podle publikace [13] a [30] se udává v rozmezí 15 – 40 mg KOH/g. U rakytníkového oleje bylo číslo kyselosti stanoveno na 3.1 mg KOH/g, což je hodnota menší než uvedená v literatuře (4 – 9.5 mg KOH/g) [46, 49]. Číslo kyselosti 5.0 mg KOH/g, které bylo zjištěno u oleje z černého kmínu, bylo vyšší, než číslo kyselosti uvedené v publikaci [28] a to max. 0.4 mg KOH/g. Tyto rozdílné hodnoty čísel kyselosti mohou být způsobeny např. z důvodu použití různých extrakčních postupů při izolaci oleje, nebo odlišným složením oleje.

Tabulka 7: Průměrné hodnoty čísel kyselosti a směrodatná odchylka (SD) stanovení

Olej	Číslo kyselosti [mg KOH/g] ± SD
Tamanu	62.9 ± 3.0
Nimbový	26.7 ± 0.4
Z černého kmínu	5.0 ± 0.4
Šípkový	1.0 ± 0.0
Rakytníkový	3.1 ± 0.5

9.1.1.2 Číslo zmýdelnění

Číslo zmýdelnění udává množství KOH v mg potřebných k neutralizaci volných mastných kyselin a ke zmýdelnění esterů mastných kyselin v 1 g vzorku tuku. Je mírou obsahu volných a estericky vázaných mastných kyselin v analyzovaném vzorku tuku. Výsledky shrnující hodnoty čísla zmýdelnění sledovaných olejů jsou uvedeny v Tabulce 8. Z výsledků bylo zjištěno, že největší číslo zmýdelnění vykazoval rakytníkový olej 212.5 mg KOH/g. Naproti tomu nejmenší hodnota čísla zmýdelnění byla zjištěna u šípkového oleje, a to 194.0 mg KOH/g. Naměřené hodnoty čísel zmýdelnění testovaných olejů se shodují s hodnotami uváděných v literatuře, až na šípkový olej, jehož hodnota se mírně lišila. Číslo zmýdelnění šípkového oleje byla stanovena na 194 mg KOH/g, v publikaci [33] a [39] se uvádí hodnota nižší, a to 175 – 188 mg KOH/g. U nimbového oleje byla hodnota čísla zmýdelnění stanovena na 203.2 mg KOH/g, což spadá do rozmezí hodnot uvedených v literatuře (180 až 205 mg KOH/g) [13]. U rakytníkového oleje bylo číslo zmýdelnění 212.5 KOH/g, podle publikace [46] a [49] se má pohybovat v rozmezí 181 – 230 mg KOH/g. Číslo zmýdelnění stanovené pro tamanu olej činilo 200.8 mg KOH/g, což odpovídá hodnotám uvedeným v literatuře 194 – 210 mg KOH/g [37, 40]. Hodnota čísla zmýdelnění oleje z černého kmínu 197.2 mg KOH/g, vyhovovala rozmezím hodnot uvedeným v literatuře (172 – 204 mg KOH/g) [27, 28].

Tabulka 8: Průměrné hodnoty čísel zmýdelnění a směrodatná odchylka (SD) stanovení

Olej	Číslo zmýdelnění [mg KOH/g] ± SD
Tamanu	200.8 ± 1.9
Nimbový	203.2 ± 1.3
Z černého kmínu	197.2 ± 0.5
Šípkový	194.0 ± 0.2
Rakytníkový	212.5 ± 0.4

9.1.1.3 Jodové číslo

Jodové číslo udává množství halogenu (přepočteného na jód) v gramech navázaného na 100 g vzorku za daných podmínek. Je mírou obsahu nenasycených mastných kyselin v analyzovaném vzorku. Výsledky shrnující hodnoty jodových čísel sledovaných olejů jsou uvedeny v Tabulce 9. Největší hodnota jodového čísla ze všech vzorků olejů byla zjištěna u šípkového oleje 147.8 g I_2/100g, což je hodnota nižší než uvedená v publikaci [33] a [39], a to 165 – 180 g I_2/100g. Naopak nejnižší hodnota jodového čísla byla stanovena u rakytníkového oleje 61.5 g I_2/100g, podle publikace [49] se má pohybovat v rozmezí 63 – 125 g I_2/100g. Jodové číslo tamanu oleje bylo stanoveno na 83.3 g I_2/100g, v publikaci [37] a [40] se uvádí hodnota vyšší, a to v rozmezí 90 – 100 g I_2/100g. U nimbového oleje bylo jodové číslo stanoveno na 70.1 g I_2/100g, což spadá do rozmezí hodnot uvedených v literatuře (65 – 80 g I_2/100g) [13]. Jodové číslo 116.0 g I_2/100g, které bylo stanovené u oleje z černého kmínu, odpovídalo rovněž hodnotám uvedeným v literatuře (101 – 119 g I_2/100g) [29]. Z naměřených hodnot jodových čísel vyplývá, že největší podíl nenasycených mastných kyselin obsahuje šípkový olej, u kterého lze předpokládat, že jeho náchylnost k oxidaci bude oproti ostatním testovaným olejům vyšší.

Tabulka 9: Průměrné hodnoty jodového čísla a směrodatná odchylka (SD) stanovení

Olej	Jodové číslo [g I2/100g] ± SD
Tamanu	83.3 ± 0.5
Nimbový	70.1 ± 2.4
Z černého kmínu	116.0 ± 0.9
Šípkový	147.8 ± 0.7
Rakytníkový	61.5 ± 0.1

9.1.2 Stanovení oxidační stability

9.1.2.1 Peroxidové číslo

Peroxidové číslo udává obsah primárních oxidačních produktů (hydroperoxidů) ve vzorku tuku. Jejich přítomnost snižuje nutriční a senzorické vlastnosti olejů. Pomocí peroxidového čísla lze pozorovat průběh oxidačních změn tuků a olejů. Výsledky naměřených peroxidových čísel studovaných olejů jsou uvedeny v Tabulce 10. Nejvyšší peroxidové číslo vykazoval ze všech testovaných olejů tamanu olej, jehož hodnota činila 1.23 μval/g, zatímco nejnižší hodnota byla zjištěna u šípkového oleje, a to 1.02 μval/g. Peroxidová čísla analyzovaných olejů se od sebe lišila minimálně. Vzhledem k velmi nízkým hodnotám peroxidového čísla lze konstatovat, že testované oleje vykazují minimální stupeň oxidace, který se v závislosti na podmínkách skladování mění. Vyšší hodnota peroxidového čísla by poukazovala na probíhající proces oxidace oleje, což by mohlo vést až k degradaci prospěšných složek obsažených v oleji.

Tabulka 10: Průměrné hodnoty peroxidového čísla a směrodatná odchylka (SD) stanovení

Olej	Peroxidové číslo [μval/g] ± SD
Tamanu	1.23 ± 0.00
Nimbový	1.05 ± 0.00
Z černého kmínu	1.05 ± 0.01
Šípkový	1.02 ± 0.03
Rakytníkový	1.04 ± 0.00

9.1.2.2 Obsah konjugovaných dienových a trienových mastných kyselin

Konjugované dienové a trienové mastné kyseliny vznikají při oxidaci tuku, kdy nekonjugované dvojné vazby mastných kyselin přecházejí na konjugovaný systém dvojných vazeb. Výsledky naměřených hodnot jsou uvedeny v Tabulce 11. Stanovení obsahu dienů a trienů v testovaných olejích bylo provedeno dvakrát v časovém rozmezí třech měsíců. Nejvyšší podíl dienových a trienových mastných kyselin byl zjištěn u tamanu oleje, a to 0.37 % konjugovaných dienů a 5.13 % konjugovaných trienů. Naopak nejnižší obsah byl v oleji z černého kmínu. Stanovení nebylo provedeno pro rakytníkový olej, jelikož je známo, že je rušeno obsahem karotenů. A ty jsou v tomto oleji ve vyšším množství přítomny. Při porovnání naměřených hodnot je zřejmé, že s odstupem tří měsíců došlo u všech olejů, ke zvýšení obsahu konjugovaných dienových a trienových mastných kyselin.

Tabulka 11: Obsah konjugovaných dienových a trienových mastných kyselin

Olej	Konjugované dieny [%]	Konjugované trieny [%]
Tamanu	0.37	5.13
Nimbový	0.15	0.24
Z černého kmínu	0.04	0.13
Šípkový	0.11	0.25
Stanovení po třech měsících		
Tamanu	0.39	5.88
Nimbový	0.32	4.85
Z černého kmínu	0.07	0.15
Šípkový	0.35	0.36

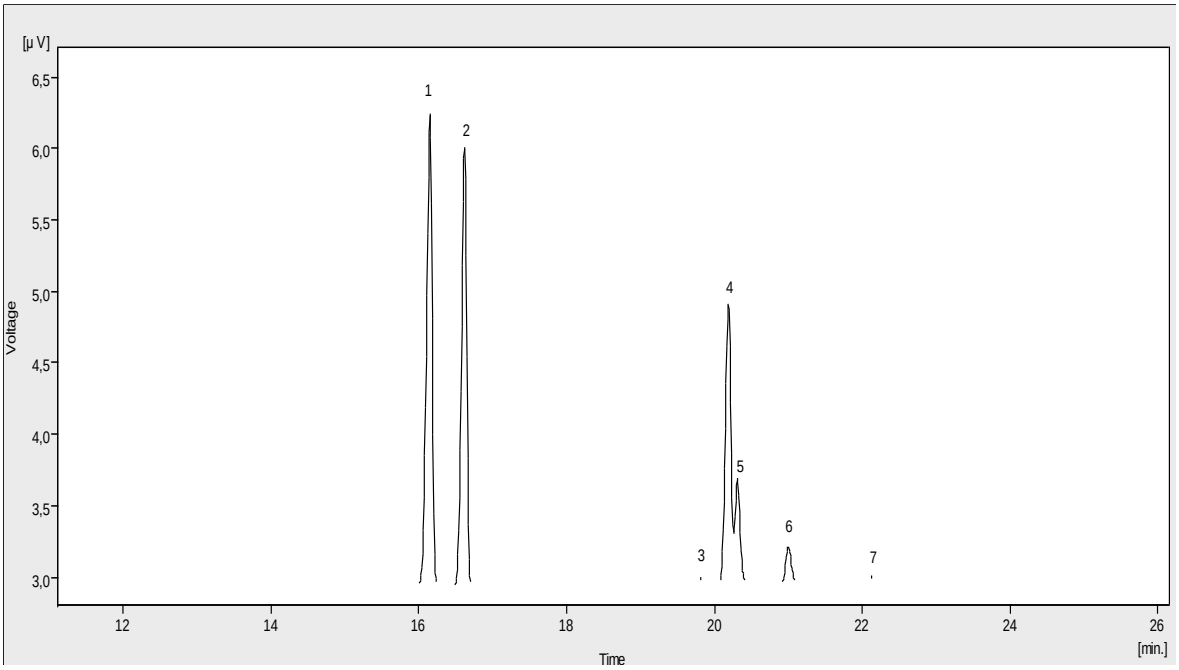
9.1.3 Analýza mastných kyselin plynovou chromatografií

Před samotnou analýzou mastných kyselin, byly jednotlivé rostlinné oleje převedeny na methylestery, které byly zředěny hexanem v poměru 1:5. Takto připravené vzorky byly následně analyzovány pomocí plynové chromatografie. V každém z olejů byly stanoveny jen nejvíce zastoupené mastné kyseliny, jelikož podrobnější analýza by vyžadovala rozsáhlejší, samostatnou práci. Kvalitativní a kvantitativní zastoupení mastných kyselin studovaných olejů je uvedeno v Tabulce 12. Ve všech studovaných olejích byla analyzovaná kyselina palmitová, stearová, olejová a linolová s různým procentuálním zastoupením. V nimbovém oleji byl stanoven největší podíl kyseliny linolové (56 %) a kyseliny olejové (24 %). Rovněž v oleji z černého kmínu byl zjištěn vysoký obsah kyseliny linolové (52 %) a kyseliny olejové (24 %). V šípkovém oleji byla nevíce zastoupena kyselina linolová (45 %) a kyselina linolenová (34 %). Rakytníkový olej obsahoval největší množství kyseliny palmitové (36 %) a palmitoolejové (31 %). Z výsledků lze usoudit, že nimbový olej, šípkový olej a olej z černého kmínu jsou bohaté na kyselinu linolovou, patřící k esenciálním mastným kyselinám, které lidský organismus dokáže vytvářet jen v omezeném množství, a proto lze tyto oleje využívat jako vhodný doplněk stravy. Porovnáním naměřených hodnot s publikaci [19] a [80], ve

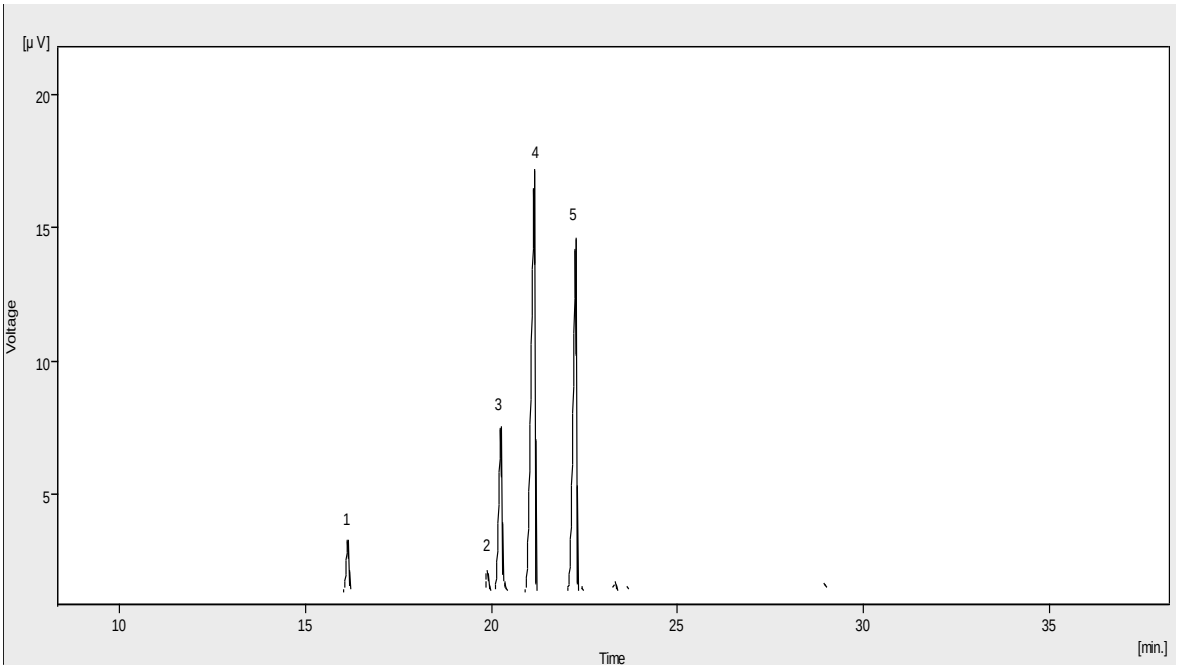
které bylo uvedeno složení nimbového oleje, byly zaznamenány rozdíly v zastoupení mastných kyselin. U oleje šípkového, rakytníkového a z černého kmínu odpovídaly stanovené hodnoty údajům uvedeným v literatuře [19, 21, 33, 34, 48]. Pozorované rozdíly v kvantitativním zastoupení jednotlivých mastných kyselin mezi našimi výsledky a literaturou mohly být způsobeny tím, že složení netradičních olejů je značně variabilní a závisí na jejich původu i způsobu získávání. Navíc tyto oleje obsahují i minoritní látky, které mohou ovlivnit přípravu methylesterů a následně i GC analýzu. To bylo patrné např. z analýzy methylesterů oleje černého kmínu, kdy byly na chromatogramu detekovány neznámé složky s retenčními časy delšími, než byl nejdelší retenční čas použitého standardu (kyselina nevronová C24:1). Na Obrázku 10 a 11 je zobrazen chromatografický záznam analýzy methylesterů (rakytníkový a šípkový olej).

Tabulka 12: GC analýza - složení mastných kyselin netradičních olejů

Mastná kyselina	Zastoupení mastných kyselin [%]			
	Nimbový	Z černého kmínu	Šípkový	Rakytníkový
Palmitová	12	11	4	36
Palmitoolejová	–	–	–	31
Stearová	8	8	2	1
Olejová	24	24	15	21
Linolová	56	52	45	8
Linolenová	–	–	34	3
Arachová	–	–	1	–
Vakcenová	–	–	–	7



Obrázek 10: Chromatografický záznam analýzy methylesterů − rakytníkový olej (1-kyselina palmitová, 2-kyselina palmitoolejová, 3-kyselina stearová, 4-kyselina olejová, 5-kyselina linolová, 6-kyselina linolenová, 7-kyselina vakcenová)



Obrázek 11: Chromatografický záznam analýzy methylesterů − šípkový olej (1- kyselina palmitová, 2-kyselina stearová, 3-kyselina olejová, 4-kyselina linolová, 5-kyselina linolenová)

9.2 Stanovení antimikrobních účinků netradičních rostlinných olejů

9.2.1 Diluční bujónová metoda

Pro stanovení antimikrobních účinků pomocí diluční bujónové metody byl k testovaným olejům přidán 10% roztok TWEENU (pro zajištění dispergace oleje v bujónu), MPB a po zaočkování suspenzí mikroorganismů byly tyto vzorky inkubovány (1 hod.). Poté byly vzorky naneseny a rozetřeny hokejkou na sterilní Petriho misky s MPA a opět kultivovány přes noc. Obdobně byl připraven slepý vzorek, bez přídavku testovaného oleje. Antimikrobní aktivita netradičních rostlinných olejů byla sledována na čtyřech gram-pozitivních a čtyřech gram-negativních bakteriích. Výsledky tohoto stanovení jsou uvedeny v Tabulce 13 a 14. V tomto testu byly zjištěny značné rozdíly v antimikrobních účincích studovaných rostlinných olejů. K výraznější inhibici růstu docházelo u testovaných gram-pozitivních bakteriálních kmenů, v porovnání s gram-negativními bakteriemi, které byly vůči inhibičnímu působení studovaných olejů odolnější. Ze všech testovaných olejů vykazoval největší inhibiční účinek tamanu olej, zejména na *Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*. Proto bylo u tohoto oleje provedeno rovněž stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC). Naměřené výsledky MIC jsou uvedeny v části 9.2.3 v Tabulce 19. Další prokazatelný inhibiční účinek byl zaznamenán u oleje z černého kmínu, kdy byl ze všech testovaných bakteriálních kmenů nejvíce inhibován růst *Staphylococcus aureus*. Rovněž u nimbového a šípkového oleje byly prokázány schopnosti inhibovat růst mikroorganismů, avšak míra této inhibice byla podstatně nižší než u předešlých olejů. Naproti tomu u rakytníkového oleje nebyla prokázána žádná antimikrobní aktivita proti testovaným mikroorganismům. Dále je z výsledků zřejmé, že největší citlivost vůči inhibičnímu působení všech testovaných olejů vykazoval *Staphylococcus aureus*, zatímco největší odolnost byla pozorována u *Pseudomonas aeruginosa a Serratia marcescens*.

Tabulka 13: Růst gram-pozitivních mikroorganismů v přítomnosti testovaných olejů.

Rostlinný olej	*Micrococcus luteus*	*Staphylococcus aureus*	*Bacillus cereus*	*Enterococcus faecalis*
Tamanu	–	–	+++	–
Nimbový	++	++	++	+++
Z černého kmínu	++	+	++	++
Šípkový	++	++	+++	++
Rakytníkový	+++	+++	+++	+++

+++ Výrazný nárůst mikroorganismů na MPA po inkubaci v přítomnosti oleje
++ Průměrný nárůst mikroorganismů na MPA po inkubaci v přítomnosti oleje
+ Malý nárůst mikroorganismů na MPA po inkubaci v přítomnosti oleje
- Nárůst bakterií nebyl pozorován

Tabulka 14: Růst gram-negativních mikroorganismů v přítomnosti testovaných olejů

Rostlinný olej	*Escherichia coli*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Salmonella enterica*	*Serratia marcescens*
Tamanu	++	+++	++	+++
Nimbový	+++	+++	+++	+++
Z černého kmínu	+++	+++	++	+++
Šípkový	+++	+++	++	+++
Rakytníkový	+++	+++	+++	+++

+++ Výrazný nárůst mikroorganismů na MPA po inkubaci v přítomnosti oleje
++ Průměrný nárůst mikroorganismů na MPA po inkubaci v přítomnosti oleje
+ Malý nárůst mikroorganismů na MPA po inkubaci v přítomnosti oleje
- Nárůst bakterií nebyl pozorován

9.2.2 Difuzní disková metoda

V souladu s ostatními zkouškami antimikrobních účinků studovaných olejů bylo jejich testování pomocí difúzní diskové metody provedeno rovněž na čtyřech gram-pozitivních a čtyřech gram-negativních mikroorganismech. Nejprve na Petriho misky s MHA byla nanesena suspenze mikroorganismů. Na takto připravené misky byly kladeny sterilní papírové disky,

které byly nasáknuty vzorky neředěných olejů, nebo jejich směsi s hexanem v poměru 1:1, a následně kultivovány. Na šestý disk byla pipetována sterilní destilovaná voda, která sloužila jako negativní kontrola. Průměrné velikosti inhibičních zón a jejich směrodatné odchylky jsou uvedeny v Tabulkách 15, 16, 17 a 18. Na Obrázku 12 a 13 je graficky znázorněna inhibiční účinnost neředěných olejů, nebo jejich směsí s hexanem, vůči testovaným mikroorganismům. Větší citlivost vůči účinkům rostlinných olejů byla zjištěna u gram-pozitivních bakterií v porovnání s bakteriemi s gram-negativním typem buněčné stěny. Odlišnost v citlivosti gram-negativních a gram-pozitivních bakterií vůči testovaným olejům je přisuzována rozdílné stavbě jejich buněčné stěny, kdy gram-negativní bakterie obsahují vnější membránu bránící penetraci hydrofobních látek dovnitř buňky, a proto vykazují větší odolnost vůči inhibičnímu působení testovaných olejů. Dále z těchto výsledků vyplývá, že vzorky rostlinných olejů ve směsi s hexanem (1:1) vykazovaly na testované bakterie nižší inhibiční účinek, než vzorky koncentrovaných olejů. Tato skutečnost se jeví logicky vzhledem k tomu, že koncentrace použitého oleje na disku byla poloviční. Nejvýraznější inhibiční účinky byly pozorovány u tamanu oleje, konkrétně na bakterie *Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*, u nichž se průměrné velikosti inhibičních zón pohybovaly v rozmezí 10.5 – 16.5 mm. Naproti tomu u rakytníkového oleje nebyla pozorována žádná inhibiční aktivita vůči celé škále testovaných bakterií. Jako dobrý inhibitor růstu se projevil olej z černého kmínu, který působil inhibičně proti všem použitým mikroorganismům, nejvíce však proti *Staphylococcus aureus* a *Micrococcus luteus.*

Lze konstatovat, že výsledky z difuzní diskové metody jsou v dobré korelaci s výsledky dilučního testu, u kterého bylo rovněž zjištěno, že největší inhibiční aktivitu vůči použitým bakteriálním kmenům vykazoval tamanu olej a olej z černého kmínu.

Tabulka 15: Velikost inhibičních zón u gram-pozitivních mikroorganismů v přítomnosti rostlinného oleje

Olej	Ø Inhibičních zón [mm] ± SD u testovaných gram-pozitivních mikroorganismů			
	Micrococcus luteus	*Staphylococcus aureus*	*Bacillus cereus*	*Enterococcus faecalis*
Tamanu	16.5 ± 2.4	13.0 ± 0.0	0	10.5 ± 0.7
Nimbový	1.3 ± 0.5	4.0 ± 0.0	0	0
Z černého kmínu	6.3 ± 0.5	7.5 ± 0.7	3.0 ± 0.0	3.5 ± 0.7
Šípkový	1.5 ± 0.6	2.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0
Rakytníkový	0	0	0	0

Tabulka 16: Velikost inhibičních zón u gram-pozitivních mikroorganismů v přítomnosti rostlinného oleje ve směsi s hexanem

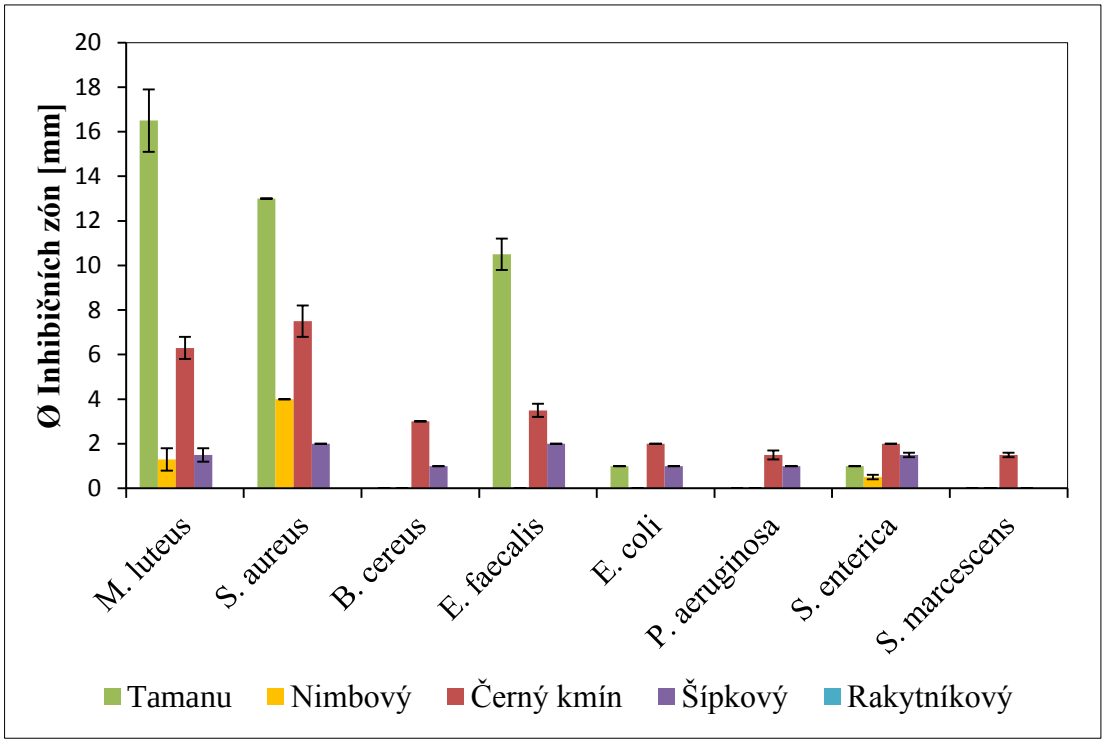
Olej a hexan (1:1)	Ø Inhibičních zón [mm] ± SD u testovaných gram-pozitivních mikroorganismů			
	Micrococcus luteus	*Staphylococcus aureus*	*Bacillus cereus*	*Enterococcus faecalis*
Tamanu	12.5 ± 2.4	9.0 ± 1.4	0	5.5 ± 0.7
Nimbový	0	1.5 ± 0.7	0	0
Z černého kmínu	3.5 ± 1.3	4.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	1.5 ± 0.7
Šípkový	0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
Rakytníkový	0	0	0	0

Tabulka 17: Velikost inhibičních zón u gram-negativních mikroorganismů v přítomnosti rostlinného oleje

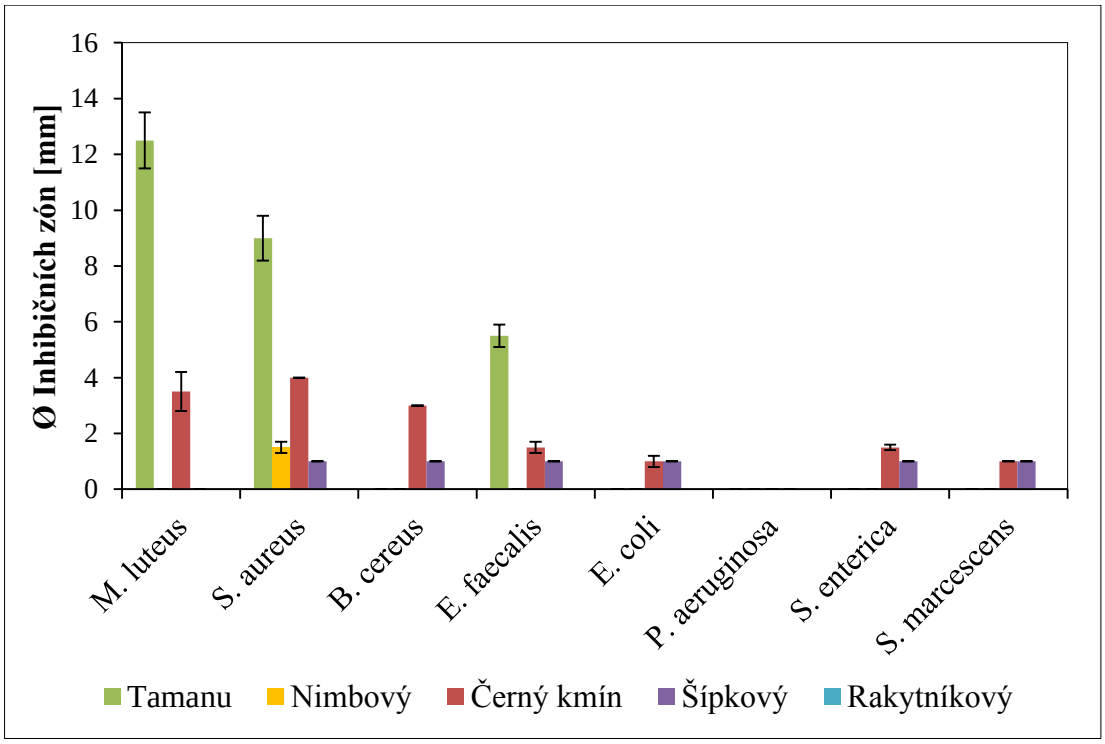
Olej	Ø Inhibičních zón [mm] ± SD u testovaných gram-negativních mikroorganismů			
	Escherichia coli	*Pseudomonas aeruginosa*	*Salmonella enterica*	*Serratia marcescens*
Tamanu	1.0 ± 0.0	0	1.0 ± 0.0	0
Nimbový	0	0	0.5 ± 0.7	0
Z černého kmínu	2.0 ± 0.0	1.5 ± 0.7	2.0 ± 0.0	1.5 ± 0.7
Šípkový	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.5 ± 0.7	0
Rakytníkový	0	0	0	0

Tabulka 18: Velikost inhibičních zón u gram-negativních mikroorganismů v přítomnosti rostlinného oleje ve směsi s hexanem

Olej a hexan (1:1)	Ø Inhibičních zón [mm] ± SD u testovaných gram-negativních mikroorganismů			
	Escherichia coli	*Pseudomonas aeruginosa*	*Salmonella enterica*	*Serratia marcescens*
Tamanu	0	0	0	0
Nimbový	0	0	0	0
Z černého kmínu	1.0 ± 1.4	0	1.5 ± 0.7	1.0 ± 0.0
Šípkový	1.0 ± 0.0	0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
Rakytníkový	0	0	0	0



Obrázek 12: Inhibiční působení rostlinných olejů na testované mikroorganismy. Disková metoda – použití neředěných olejů



Obrázek 13: Inhibiční působení rostlinných olejů na testované mikroorganismy Disková metoda – použití rostlinných olejů ve směsi s hexanem (1:1)

9.2.3 Stanovení MIC tamanu oleje

V předcházející kapitole bylo uvedeno, že u tamanu oleje byly zjištěny pomocí difúzního diskového testu a bujónového dilučního testu výrazné inhibiční účinky na některé bakteriální kmeny (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*). Z tohoto důvodu bylo provedeno stanovení MIC, a to bujónovou diluční metodou. Naměřené MIC tamanu oleje jsou uvedeny v Tabulce 19. Vliv tohoto oleje na růst bakterií byl pozorován v intervalu koncentrací 2.0 µl/ml – 250.0 µl/ml. MIC tamanu oleje, tedy nejnižší účinná koncentrace, při které docházelo k potlačení růstu mikroorganismů, byla stanovena u *Micrococcus luteus* na 15.6 µl/ml, u *Staphylococcus aureus* činila 62.5 µl/ml a u *Enterococcus faecalis* byla 250 µl/ml. Z výsledků je zřejmé, že především *Micrococcus luteus* byl vůči působení tohoto oleje velmi citlivý.

Na ÚTTTK jsou intenzivně studovanými antimikrobními systémy monoacylglyceroly (MAG). Proto bylo provedeno porovnání jejich antimikrobní účinnosti s efektivitou studovaných olejů. V práci [81] byla stanovena minimální inhibiční koncentrace MAG vůči *Enterococcus faecalis*, a to pro MAG kyseliny laurové na 200 µg/ml a MAG kyseliny kaprinové na 250 µg/ml. Pro *Staphylococcus aureus* se pak hodnota MIC koncentrace pohybovala v rozmezí 100 − 300 µg/ml. Z tohoto srovnání je zřejmé, že antimikrobní aktivitu tamanu oleje lze označit za příznivou.

Tabulka 19: Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) tamanu oleje

Mikroorganismus	Koncentrace oleje [µl/ml]							
	250.0	125.0	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	2.0
Micrococcus luteus	–	–	–	–	–*	+	+	+
Staphylococcus aureus	–	–	–*	+	+	+	+	+
Enterococcus faecalis	–*	+	+	+	+	+	+	+

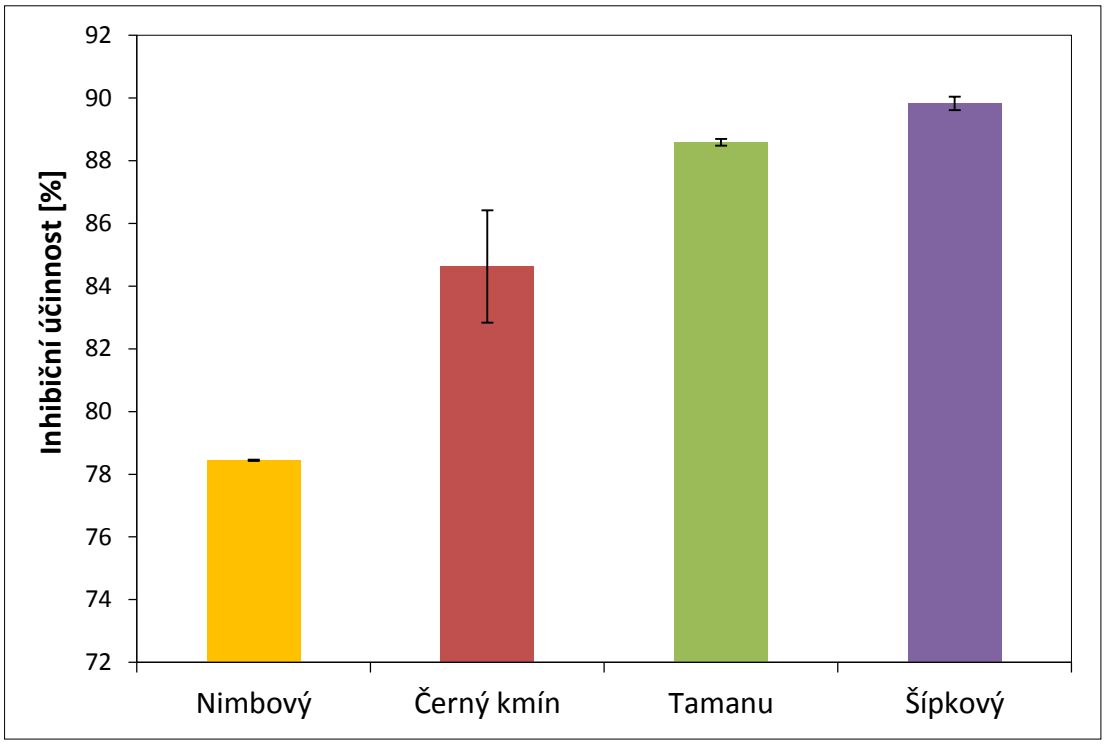
\+ Malý nárůst mikroorganismů na MPA po inkubaci v přítomnosti oleje
\- Nárůst bakterií nebyl pozorován
* MIC [µl/ml]

Srovnáme-li výsledky naší práce s publikovanými daty je zřejmé, že antibakteriální účinky stejných olejů se liší. Např. Warra (2012) ve své práci [15] použil neředěný nimbový olej, který nejvíce inhiboval růst bakterií *Salmonella paratyphi B* a *Staphylococcus aureus.* Byly zde zjištěny inhibiční zóny o velikosti 20 mm. To je výrazně vyšší aktivita ve srovnání s tím, co bylo stanoveno v této diplomové práci. Zde se tedy může projevit nevýhoda antimikrobních látek přírodního původu, které díky své variabilitě složení mohou vykazovat i variabilní antimikrobní účinnost, což může omezovat jejich praktické použití.

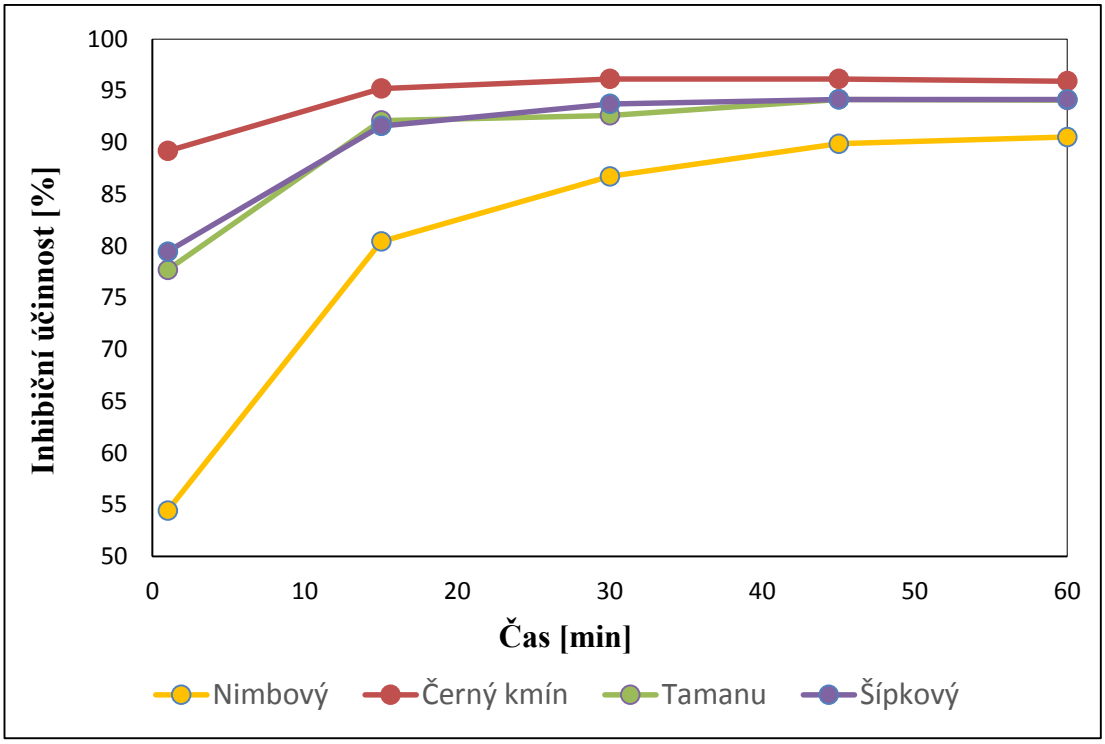
9.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Antioxidační aktivita rostlinných olejů byla stanovena metodou DPPH pomocí spektrofotometrického měření. Touto metodou byla zjišťována schopnost olejů deaktivovat radikály DPPH. V rámci diplomové práce byly testovány dva publikované postupy. V prvním případě [71], kdy byl k testu použit zásobní roztok DPPH v THF, byla absorbance měřena při 515 nm po předepsané době stání ve tmě (1 hod). Antioxidační aktivita je graficky znázorněna na Obrázku 14. Druhá použitá metoda [66], využívá podobného principu, ale DPPH i oleje byly rozpuštěny v toluenu a měření absorbance bylo provedeno v časových intervalech 1, 15, 30, 45 a 60 minut po smíchání oleje s DPPH. Antioxidační aktivita vzorků olejů byla opět stanovena podle Rovnice 8 a je graficky znázorněna v Obrázku 15. Použití těchto metod umožnilo charakterizovat a porovnat antioxidační potenciál všech vzorků za různých podmínek. Výpočet podle Rovnice 8 poskytuje jako výsledek procentuální úbytek absorbance, neboli % inhibice radikálů DPPH v přítomnosti testovaných olejů. To je interpretováno jako vymizení DPPH radikálů v důsledku antioxidačního působení olejů. Z Obrázku 14 je zřejmé, že největší antioxidační aktivitu z testovaných olejů vykazoval šípkový olej, poté tamanu olej, olej z černého kmínu a nakonec nimbový olej. Z Obrázku 15, který znázorňuje kinetiku probíhající reakce lze konstatovat, že s prodlužující se dobou reakce, docházelo k efektivnější inhibici radikálů DPPH. Docházelo k odbarvování vzorků a tedy k úbytku absorbance. Výsledky druhého testovaného postupu, kdy byly oleje rozpuštěny v toluenu ukazují, že největší inhibiční potenciál byl stanoven u oleje z černého kmínu, dále u šípkového, tamanu a nimbového oleje. Při porovnání výsledků, je zřejmé, že antioxidační aktivita studovaných olejů se mírně lišila v závislosti na použitém postupu stanovení. Tento fakt, mohl být způsobený např. použitím odlišných rozpouštědel, či podmínek při tomto stanovení. Nejhorší antioxidační potenciál vykazoval nimbový olej, zatímco aktivita šípkového oleje, tamanu oleje a oleje z černého kmínu byla obdobná.

Stanovení antioxidační aktivity nebylo provedeno u rakytníkového oleje, protože jeho výrazné oranžové zbarvení znemožnilo správné stanovení absorbance při vlnové délce 515 nm.



Obrázek 14: Antioxidační aktivita testovaných olejů – použití DPPH v THF



Obrázek 15: Antioxidační aktivita testovaných olejů meřená v časovém intervalu – použití DPPH v toluenu

9.4 Stanovení cytotoxicity metodou MTT

Pro posouzení cytotoxického účinku studovaných olejů byla použita MTT assay. Tato metoda je založena na redukci žlutého MTT v živých a metabolizujících buňkách na fialový, nerozpustný formazan a po jeho rozpuštění v detergentu se měří intenzita zabarvení spektrofotometricky při 570 nm. Testování bylo provedeno po kultivaci buněk v přítomnosti vzorků olejů o různých koncentracích. Cytotoxický účinek byl vyjádřen pomocí viability buněk. Ta udává míru životaschopnosti buněk odolných vůči testovaným olejům, vztažené na množství buněk v čistém kultivačním médiu. Naměřené výsledky jsou uvedeny v Tabulce 20. Testování cytotoxicity bylo provedeno i na referenčním vzorku, kdy byla připravena suspenze TWEENU 80 bez přítomnosti olejů a hodnoty viability buněk po expozici referenčnímu vzorku TWEEN 80 jsou shrnuty v Tabulce 21.

Pro posouzení cytotoxického účinku testovaných olejů byla použita stupnice podle EN ISO 10993-5, která je uvedena v kapitole 8.7.4.:

- Necytotoxický účinek: množství viabilních buněk vyšší než 80 %;
- Slabě cytotoxický účinek: množství viabilních buněk 60 – 80 %;

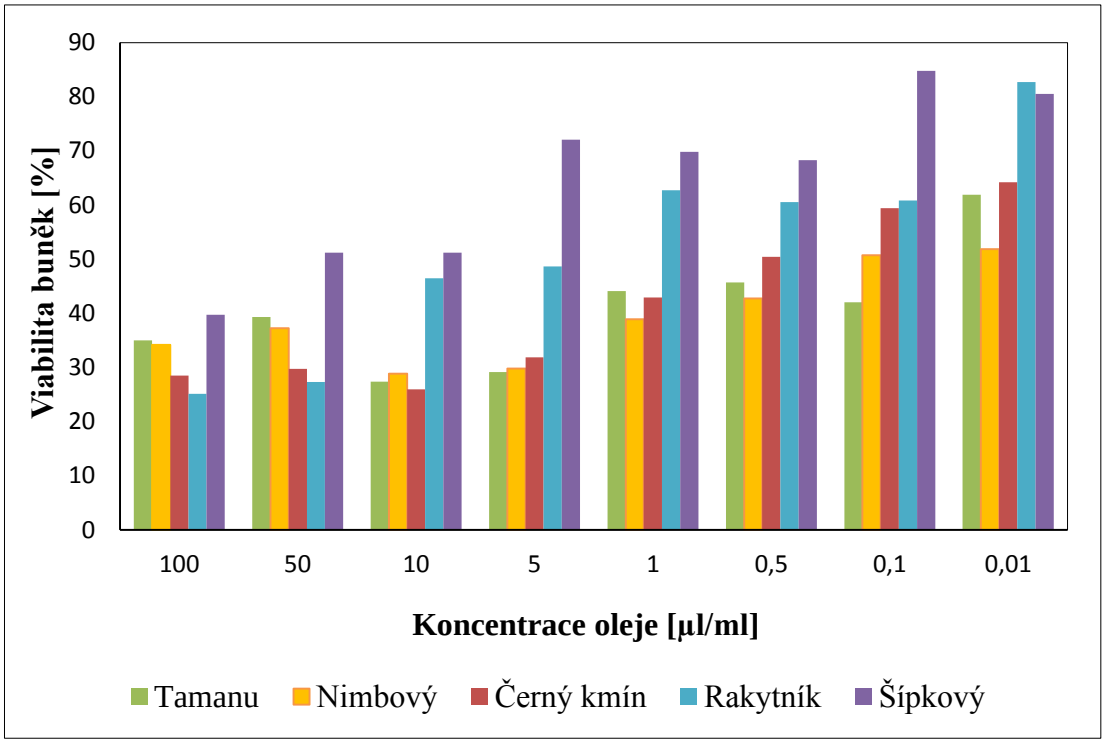
- Středně cytotoxický účinek: množství viabilních buněk 40 – 60 %;
- Silně cytotoxický účinek: množství viabilních buněk menší než 40 %.

Tabulka 20: Viabilita buněk v přítomnosti netradičních olejů

Koncentrace oleje [µl/ml]	Viabilita buněk [%]				
	Tamanu	Nimbový	Z černého kmínu	Šípkový	Rakytníkový
100	35 ± 0.01	34 ± 0.01	29 ± 0.01	40 ± 0.02	25 ± 0.01
50	39 ± 0.01	37 ± 0.02	30 ± 0.01	51 ± 0.03	27 ± 0.01
10	27 ± 0.00	29 ± 0.01	26 ± 0.01	51 ± 0.01	46 ± 0.01
5	29 ± 0.01	30 ± 0.02	32 ± 0.02	72 ± 0.02	49 ± 0.02
1	44 ± 0.02	39 ± 0.01	43 ± 0.02	70 ± 0.02	63 ± 0.01
0.5	46 ± 0.00	43 ± 0.01	50 ± 0.01	68 ± 0.03	61 ± 0.01
0.1	42 ± 0.00	51 ± 0.01	59 ± 0.01	85 ± 0.01	61 ± 0.01
0.01	62 ± 0.01	52 ± 0.01	64 ± 0.02	81 ± 0.02	83 ± 0.02

Tabulka 21: Viabilita buněk referenčního vzorku

Referenční vzorek	
Ředění [µl/ml]	Viabilita buněk [%]
100	50 ± 0.02
50	53 ± 0.01
10	52 ± 0.02
5	53 ± 0.02
1	58 ± 0.01
0.5	58 ± 0.01
0.1	81 ± 0.03
0.01	84 ± 0.02



Obrázek 16: Srovnání cytotoxického účinku netradičních olejů

Z výsledků bylo zjištěno, že cytotoxický účinek studovaných olejů byl závislý na jejich koncentraci. U všech testovaných olejů (kromě šípkového) byly při nejvyšší koncentraci oleje (100 µl/ml) pozorovány silně cytotoxické účinky na použitou buněčnou linii, kdy se viabilita buněk snížila pod 40 %. Při nejvyšší koncentraci šípkového oleje, je podle ISO normy tato koncentrace středně cytotoxická. U nejnižších koncentrací oleje (0.01 – 0,5 µl/ml) byly pozorovány středně cytotoxické účinky (např. nimbový olej) s viabilitou buněk ležící v intervalu 40 až 60 %, až necytotoxické účinky (např. rakytníkový olej) s množstvím viabilních buněk vyšším než 80 %. Z grafického srovnání cytotoxického působení netradičních olejů, které je zobrazeno na Obrázku 16 je zřejmé, že největší cytotoxické účinky na použitou buněčnou linii vykazoval tamanu olej, nimbový olej a olej z černého kmínu. Naproti tomu jako nejméně cytotoxický se jevil olej šípkový a rakytníkový.

Z výsledků, které jsou shrnuty v Tabulce 21, je zřejmé, že i referenční vzorek (TWEEN 80) působil na použitou buněčnou linii cytotoxicky. Při nejvyšší koncentraci (100 µl/ml) vykazoval středně cytotoxický účinek, zatímco necytotoxický účinek byl zaznamenán až v koncentraci 0.1 µl/ml. Z této skutečnosti je možné usuzovat, že pozorovaná cytotoxicita olejů může být do značné míry způsobena i přítomným surfaktantem, který je použit pro jejich

dispergaci. Pro stanovení cytotoxického působení olejů, jako takových, bude tedy nutné metodu vhodně modifikovat.

ZÁVĚR

Diplomová práce byla ve své první části zaměřena na obecnou charakteristiku studovaných olejů (tamanu, nimbový, rakytníkový, šípkový a olej z černého kmínu), konkrétně na stanovení čísla kyselosti, zmýdelnění, dále peroxidového a jodového čísla. Součástí charakterizace bylo také stanovení konjugovaných dienových a trienových mastných kyselin a analýza mastných kyselin pomocí GC. V druhé části byly studovány antimikrobní účinky testovaných olejů pomocí dvou metod, a to difúzní diskové metody a bujónové diluční metody. Další informace o bioaktivitě netradičních olejů byly získány prostřednictvím stanovení antioxidační aktivity (metoda DPPH) a pomocí testovaní jejich cytotoxického účinku (MTT).

Z výsledků získaných při charakterizaci netradičních olejů je možné učinit závěr, že tamanu olej vykazoval výrazně odlišné vlastnosti ve srovnání s ostatními oleji. To bylo možno usuzovat z neobvykle vysoké hodnoty čísla kyselosti (62.9 mg KOH/g), z obsahu dienových a trienových mastných kyselin (0.37 % konjugovaných dienů, 5.13 % konjugovaných trienů) i z hodnoty peroxidového čísla (1.23 μval/g), které byly nejvyšší ze všech testovaných olejů.

Informace o složení mastných kyselin poskytla metoda plynové chromatografie. Některé oleje (nimbový) vykazovaly mírné odchylky ve složení mastných kyselin od údajů nalezených v literatuře, což mohlo být způsobeno variabilitou složení těchto netradičních olejů, která je běžně dokumentována v literatuře. Výsledky prokázaly, že studovaný rakytníkový olej byl získán z bobulí, o čemž svědčila přítomnost kyseliny palmitoolejové, která je pro tento olej typická.

Po vyhodnocení výsledků antimikrobní aktivity, stanovené pomocí difúzní diskové metody a bujónové diluční metody bylo zjištěno, že gram-negativní bakterie byly k inhibičním účinkům testovaných olejů odolnější než bakterie gram-pozitivní. Největší inhibiční účinek na vybrané bakteriální kmeny vykazoval tamanu olej, zejména na *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*. Druhým nejlepším inhibitorem růstu bakterií byl olej z černého kmínu. Naopak rakytníkový olej nevykazoval žádné inhibiční účinky na celé spektrum použitých bakterií. Největší citlivost vůči inhibičnímu působení všech testovaných olejů vykazoval *Staphylococcus aureus* a *Micrococcus luteus*, zatímco největší odolnost byla pozorována u *Pseudomonas aeruginosa a Serratia marcescens*. Pro nejvíce účinný tamanu olej byla stanovena i jeho minimální inhibiční koncentrace MIC, která činila pro *Micrococcus luteus* 15.6 μl/ml, *Staphylococcus aureus* 62.5 μl/ml a pro *Enterococcus faecalis* 250 μl/ml.

Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody DPPH prokázalo, že nejvyšší antioxidační aktivitu má olej z černého kmínu a šípkový olej, dále tamanu olej a nejmenší antioxidační potenciál byl zjištěn u oleje nimbového.

Vzhledem ke skutečnosti, že studované oleje jsou kosmetickými surovinami a používají se v kontaktu s lidským tělem, byly testovány rovněž jejich cytotoxické účinky za použití metody MTT. Po vyhodnocení výsledků tohoto stanovení lze učinit závěr, že za podmínek testu vykazoval největší cytotoxické účinky na použitou buněčnou linii tamanu olej, který byl i při nejnižší studované koncentraci 0,01 µl/ml slabě cytotoxický (viabilita 62 ± 0.01 %). Jako nejméně cytotoxické se jevily oleje šípkový a rakytníkový. Stanovení však bylo ovlivněno přítomností surfaktantu použitého pro dispergaci oleje.

Z výsledků této práce plyne, že netradiční oleje jsou díky složení, obsahu velkého množství bioaktivních látek, léčebným a antimikrobním účinkům, velmi cennými surovinami pro celou řadu kosmetických a farmaceutických produktů a rovněž jsou vhodné i jako doplněk stravy.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] DAVÍDEK, Jiří, Gustav JANÍČEK a Jan POKORNÝ. *Chemie potravin*. Praha: SNTL/ALFA, 1983, 632 s.

[2] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 1*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6.

[3] IBURG, Anne. *Lexikon octů a olejů: původ, chuť, použití, recepty*. 1. vyd. Čestlice: Rebo Productions, 2004, 299 s. ISBN 80-7234-382-3.

[4] FREJ, L.: *Zdravé tuky omega*. Praha: EB nakladatelství, 2004. 166 s. ISBN 80-903234-1-3.

[5] MOUREK, Jindřich. *Mastné kyseliny Omega-3: zdraví a vývoj*. 2., rozš. vyd. Praha: Triton, 2009, 187 s. ISBN 978-80-7387-310-3.

[6] ULLRICH, Ladislav. *Chemia a technógia jedlých tukov a olejov*. 1. vyd. Bratislava: Slovenské vydavateľstvo technickej literatury, 1963, 436 s

[7] SCHMUTTERER, Heinrich. *The neem tree: Azadirachta indica A. Juss. and other meliaceous plants : sources of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry, and other purposes*. New York: VCH, 1995, 696 s. ISBN 35-273-0054-6.

[8] BRAHMACHARI, Goutam. Neem-AnOmnipotent Plant: A Retrospection. *ChemBioChem* [online]. 2004, roč. 5, č. 4, s. 408-421 [cit. 2014-10-11]. DOI: 10.1002/cbic.200300749.

Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/cbic.200300749.

[9] SANDANASAMY, Jessinta D/O. Fatty Acid Composition and Antibacterial Activity of Neem (Azadirachta indica) Seed Oil. *The Open Conference Proceedings Journal*. 2013, roč. 4, č. 1, s. 43-48. DOI: 10.2174/2210289201304020043.

[10] KUSMIREK, Jan. *Tekuté slunce: rostlinné oleje pro masáže, aromaterapii, kosmetiku a výživu*. 1. vyd. Praha: One Woman Press, 2005, 213 s. ISBN 80-863-5641-8.

[11] *Neem: a tree for solving global problems : report of an ad hoc panel of the Board on Science and Technology for International Development, National Research Council*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1992, 141 s. ISBN 03-090-4686-6.

[12] NAGARAJ, G. *Oil seeds: properties, processing, products and procedures*. New Delhi: New India Pub. Agency, 2009. ISBN 81-907-2375-8.

[13] LOKANADHAN, Subbalakshmi et al. *Neem products and their agricultural applications* [online]. 2012 [cit. 2015-03-04].

Dostupné z: http://www.jbiopest.com/users/lw8/efiles/vol_5_0_72_76f.pdf.

[14] *Nobilis Tilia*. [online]. [cit. 2015-03-05]. Dostupné z: http://www.nobilis.cz/.

[15] WARRA, A.A. Medicinal and Cosmetic Potential of Neem (Azadirachta Indica) Seed Oil: A Review. *Research and reviews: Journal of Medicinal Chemistry*. 2012, roč. 1, č. 1.

[16] Chemical book: Azadirachtin. [online]. [cit. 2015-04-17]. Dostupné z: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB1308833.htm.

[17] ChemFaces: Nimbin. [online]. [cit. 2015-04-17]. Dostupné z: http://www.chemfaces.com/natural/Nimbin-CFN97722.html.

[18] Chemical book: Salannin. [online]. [cit. 2015-04-17]. Dostupné z: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7506990.htm.

[19] RAMADAN, Mohamed Fawzy. Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (Nigella sativa L.): anoverview. *International Journal of Food Science*. 2007, roč. 42, č. 10, s. 1208-1218. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2006.01417.x.

[20] SINGH, Gurdip, Palanisamy MARIMUTHU, Carola S DE HELUANI a Cesar CATALAN. Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of Nigella sativa seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2005, roč. 85, č. 13, s. 2297-2306. DOI: 10.1002/jsfa.2255.

[21] GUNSTONE, F., John L HARWOOD a Albert J DIJKSTRA. *The lipid handbook*. 3. vyd. Boca Raton: CRC Press, 2007, 656 s. ISBN 08-493-9688-3.

[22] SHAHIDI, Edited by Fereidoon. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. 6. vyd. N. J.: Wiley, 2005, ISBN 978-160-1191-212.

[23] VEIT, Myriam. *Léčivá kosmetika z přírody: jak si vyrobit hojivé masti, oleje a esence*. 1. vyd. Praha: Grada, 2014, 199 s. ISBN 978-80-247-4586-2.

[24] ALI, B. H. a Gerald BLUNDEN. Pharmacological and toxicological properties of Nigella sativa. *Phytotherapy Research*. roč. 17, č. 4, s. 299-305. DOI: 10.1002/ptr.1309.

[25] EL-KAMALI, H.H. et al. *Antibacterial properties of essential oils from Nigella sativa seeds, Cymbopogon citratus leaves, and Pulicaria undulata aerial parts.* 1998, s. 77-78.

[26] TABORSKY, Jan, Miroslav KUNT, Pavel KLOUCEK, Jaromir LACHMAN, Vaclav ZELENY a Ladislav KOKOSKA. Identification of potential sources of thymoquinone and related compounds in Asteraceae, Cupressaceae, Lamiaceae, and Ranunculaceae families. *Central European Journal of Chemistry*. 2012, roč. 10, č. 6, s. 1899-1906. DOI: 10.2478/s11532-012-0114-2.

[27] ALI, M. Abbas, M. Abu SAYEED, M. Shahinur ALAM, Mst. Sarmina YEASMIN, Astaq Mohal KHAN a Ida I. MUHAMAD. Characteristics of oils and nutrient contents of *Nigella sativa* Linn. and *Trigonella foenum-graecum* seeds. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*. DOI: 10.4314/bcse.v26i1.6. ISSN 1011-3924.

[28] SULTAN, Muhhamad T. et al. Nutritional profile of indigenous cultivar of black cumin seeds and antioxidant potential of its fixed and essential oil. 2009, roč. 41, č. 3. s. 1321-1330.

[29] CHEIKH-ROUHOU, Salma, Souhail BESBES, Basma HENTATI, Christophe BLECKER, Claude DEROANNE a Hamadi ATTIA. Nigella sativa L: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chemistry*. 2007, roč. 101, č. 2, s. 673-681. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.02.022.

[30] USMAN, J.G., P. C. OKONKWO a M.S. SHEHU. Investigation into the Usage of Solvent for Extracting Neem Oil from Neem Seed for Industrial Application. *Academic Journal of Interdisciplinary Studies*. roč. 3, č. 5. DOI: 10.5901/ajis.2014.v3n5p39.

[31] ÖZCAN, Musa. Nutrient Compositionof Rose (Rosa canina L.) Seed and Oils. *Journal of Medicinal Food*. 2002, roč. 5, č. 3, s. 137-140. DOI: 10.1089/10966200260398161.

[32] CHRUBASIK, Cosima, Basil D. ROUFOGALIS, Ulf MÜLLER-LADNER a Sigrun CHRUBASIK. A systematic review on the Rosa canina effect and efficacy profiles. *Phytotherapy Research* [online]. 2008, roč. 22, č. 6, s. 725-733 [cit. 2015-03-04]. DOI: 10.1002/ptr.2400.

Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.2400.

[33] CONCHA, J. et al *Effect of Rosehip Extraction Process on Oil and Defatted Meal Physicochemical Properties* [online]. 2006, roč. 83, č. 9 [cit. 2015-03-16]. Dostupné z: http://link.springer.com/article/10.1007/s11746-006-5013-2#page-1.

[34] KAZAZ, Soner. Variations in Chemical Compositions of Rosa damascena Mill. and Rosa canina L. Fruits. [online]. 2009, roč. 27, č. 3 [cit. 2015-03-18]. Dostupné z: http://agriculturejournals.cz/publicFiles/08681.pdf.

[35] DWECK, A. C. a T. MEADOWS. Tamanu (Calophyllum inophyllum) – the African, Asian, Polynesian and Pacific Panacea. *International Journal of Cosmetic Science*. 2002, roč. 24, č. 6, s. 341-348. DOI: 10.1046/j.1467-2494.2002.00160.x.

[36] PRABAKARAN, K. a S. John BRITTO. *Biology, agroforestry and medicinal value of calophyllum inophyllum l. (clusiacea): a review* [online]. 2012 [cit. 2015-03-17]. ISSN 2249 - 0353.

Dostupné z: http://urpjournals.com/tocjnls/21_12v1i2_3.pdf.

[37] CRANE, Sylvie, Guylène AURORE, Henry JOSEPH, Zéphirin MOULOUNGUI a Paul BOURGEOIS. Composition of fatty acids triacylglycerols and unsaponifiable matter in Calophyllum calaba L. oil from Guadeloupe. *Phytochemistry*. 2005, roč. 66, č. 15, s. 1825-1831. DOI:10.1016/j.phytochem.2005.06.009.

[38] *Tamanu Original Unrefined Oil: Pacifique Sud Ingredients*. Francie, 2011, 9 s. Dostupné z:

http://www.in-cosmetics.com/__novadocuments/42571?v=635203903033930000.

[39] Rosehip seed oil. *Parque industrial gulmué* [online]. Chile [cit. 2015-05-04].

Dostupné z: http://www.fontevita.cl/wp-content/uploads/2014/05/Ficha_cosmetica_rosamosqueta.pdf.

[40] Tamanu: Calophyllum Inophyllum Seed Oil. *Bionat Consult* [online]. Francie [cit. 2015-05-04]. Dostupné z:

http://www.organat.com/images/fichespdf-bionat/tamanu_BioNat.pdf.

[41] VALÍČEK, Pavel a Emil Václav HAVELKA. *Rakytník řešetlákový:* r*ostlina budoucnosti*. 1. vyd. Benešov: Start, 2008, 86 s. ISBN 978-80-86231-44-0.

[42] VALÍČEK, Pavel, Ladislav KOKOŠKA a Kamila HOLUBOVÁ. *Léčivé rostliny třetího tísiciletí*. 1. vyd. Benešov: START, 2001, 175 s. ISBN 80-862-3114-3.

[43] GUNSTONE, Frank. *Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses*. UK: Wiley-Blackwell, 2011, 353 s. ISBN 978-144-4332-681.

[44] SURYAKUMAR, Geetha a Asheesh GUPTA. Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.). *Journal of Ethnopharmacology*. 2011, roč. 138, č. 2, s. 268-278. DOI: 10.1016/j.jep.2011.09.024.

[45] LI, Thomas S a Thomas H BEVERIDGE. *Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.): production and utilization*. Ottawa: NRC Research Press, 2003, 133 s. ISBN 0-660-19007-9.

[46] KAUSHAL, Manisha. Nutritional and antimicrobial property of seabuckthorn (Hippophae sp.) seed oil. *Journal of Scientific & Industrial Research* [online]. s. 1033-1036 [cit. 2015-03-04]. Dostupné z: http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/13113/1/JSIR%2070%2812%29%201033-1036.pdf.

[47] RICHA ARORA. Antimicrobial activity of seed, pomace and leaf extracts of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) against foodborne and food spoilage pathogens. *African journal of biotechnology*. roč. 11, č. 45. DOI: 10.5897/AJB11.4150.

[48] BEVERIDGE, Tom, Thomas S. C. LI, B. Dave OOMAH a Allen SMITH. Sea Buckthorn Products: Manufacture and Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999, roč. 47, č. 9, s. 3480-3488. DOI: 10.1021/jf981331m.

[49] ABID, H. Physicochemical characteristicsand fatty acid composition of Sea-buckthorn (Hippophae rhamnoides) oil. 2007. *Journal* of the *Chemical Society* of *Pakistan. roč. 29. č. 3.*

[50] PRÍBELA, Alexander. *Analýza potravín: Cvičenie*. 2. vyd. Bratislava: STU, 1993, 394 s. ISBN 80-227-0398-2.

[51] DAVÍDEK, Jiří a Jan VELÍŠEK. *Analýza potravin*. 2.vyd. Praha: VŠCHT, 1992, 122 s.

[52] *Český lékopis 2009: doplněk 2013*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-802-4746-791.

[53] NIELSEN, S. *Food analysis*. 3. vyd. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003, 557 s. ISBN 03-064-7495-6.

[54] O'BRIEN, Richard D. *Fats and oils: formulating and processing for applications*. 2. vyd. Boca Raton, Fla.: CRC Press, c2004. ISBN 0849315999.

[55] DAVÍDEK, Jiří. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. 2. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1981, 718 s.

[56] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.

[57] ZÝKA, Jaroslav. *Analytická příručka*. 4. upravené vyd. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1988, 680 s.

[58] *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254 s. ISBN 80-708-0449-1.

[59] CAZES, Jack. *Encyclopedia of chromatography*. 3. vyd. Boca Raton, FL: CRC Press, 2010. ISBN 14200848283.

[60] TANG, Yi-Wei a Charles W STRATTON. *Advanced techniques in diagnostic microbiology*. New York, N.Y.: Springer, 2006, 540 s. ISBN 03-872-9741-3.

[61] KALÁBOVÁ, Jana. *Studium antimikrobiálního účinku vybraných druhů koření*. 2013. 69 l. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.

[62] KOUKALOVÁ, Dagmar. *Praktická cvičení z lékařské mikrobiologie I*. 2. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009, 94 s. ISBN 978-80-244-2266-4.

[63] BEDNÁŘ, M.; FRAŇKOVÁ, V.; SCHINDLER, J.; SOUČEK, A.; VÁVRA, J.: Lékařská mikrobiologie, Marvil, 1996. ISBN 80-2380-297-6.

[64] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. 2004, s. 174-179.

[65] ANTOLOVICH, Michael, Paul D. PRENZLER, Emilios PATSALIDES, Suzanne MCDONALD a Kevin ROBARDS. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst* [online]. roč. 127, č. 1, s. 183-198 [cit. 2015-04-20]. DOI: 10.1039/b009171p. Dostupné z: http://xlink.rsc.org/?DOI=b009171p.

[66] RAMADAN, Mohamed Fawzy a Joerg-Thomas MOERSEL. Screening of the antiradical action of vegetable oils. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006, roč. 19, č. 8, s. 838-842. DOI: 10.1016/j.jfca.2006.02.013.

[67] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999, 342 s. ISBN 80-902-3912-9.

[68] POKORNÝ, J., YANISHLIEVA, N., GORDON, M., Antioxidants in food: Practical applications, Woodhead Publishing, 2001, ISBN 18-557-3463-X.

[69] BENEŠOVÁ, Luisa. *Potravinářství 6*. 1. vyd. Praha: ÚZPI-Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2000, 150 s. ISBN 80-727-1003-6.

[70] *Stanovení antiradikálové aktivity metodou DPPH.* VSCHT.cz. [online]. [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: http://web.vscht.cz/~dole-zala/LRMCHP/%C3%9Aloha%20%C4%8D.%206%20LabRM%20-%20DPPH.pdf.

[71] FERRI, Maura et al., Optimisation of assay conditions for the determination of antioxidant capacity and polyphenols in cereal food components. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2013, s. 94 – 10. DOI: doi:10.1016/j.jfca.2013.02.004.

[72] FRESHNEY, R., 2005. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 5. vyd. Hoboken, N. J.: Wiley-Liss, 642 s. ISBN 0471453293.

[73] CELIS, J. *Cell biology: a laboratory handbook*. 3. vyd. Boston: Elsevier Academic, 2006. ISBN 978-012-1647-308.

[74] HUMPOLÍČEK, Petr a Věra KAŠPÁRKOVÁ. *Polymerní materiály ve zdravotnických prostředcích a jejich biologické vlastnosti*. Zlín, 2012, roč. 49, č. 7-8. ISSN 0322-7340.

[75] D. HUGHES, D.H. *Cell Proliferation and Apoptosis*. London: BIOS Scientific Publishers, 2003. ISBN 02-034-9586-1.

[76] LÜ, Lanhai et al., 2012. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicology in Vitro*. Roč. 26, č. 4, s. 636-644. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.02.006.

[77] BRESCIA, P. a BANKS P. Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch™ Microplate Spectrophotometer. BIOTEK INSTRUMENTS [online]. 2009 [cit. 2015-4-28]. Dostupné z: http://www.biotek.com/resources/articles/quontification-cell-viability-epoch.html

[78] MOMMSEN, T a T MOON. *Environmental toxicology*. 1. vyd. Boston: Elsevier, 2005, 562 s. ISBN 978-044-4891-853. s.

[79] HOOD, Jennie R., Jenny M. WILKINSON a Heather M.A. CAVANAGH. Evaluation of Common Antibacterial Screening Methods Utilized in Essential Oil Research. *Journal of Essential Oil Research*. 2003, roč. 15, č. 6, s. 428-433. DOI: 10.1080/10412905.2003.9698631.

[80] KAUSHIK, N. a S. VIR. Variations in fatty acid composition of neem seeds collected from the Rajasthan state of India. *Biochemical Society Transactions*. roč. 28, č. 6. DOI: 10.1042/0300-5127:0280880. ISSN 03005127.

[81] RŮŽIČKA, Jan, Kateřina VELCLOVÁ, Rahula JANIŠ a Jiří KREJČÍ. 2003. Antimicrobial effects of 1-monoacylglycerols prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids. *European Food Research and Technology*. roč. 217, č. 4. s. 329-331. DOI: 10.1007/s00217-003-0764-6. ISSN 1438-2377.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

GC Plynová chromatografie

MHA Mueller-Hinton agar

MPA Masopeptonový agar

MPB Masopeptonový bujón

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Strukturní vzorec aktivní látky nimbového oleje, azadirachtinu 17
Obrázek 2: Strukturní vzorec aktivní látky nimbového oleje, nimbinu 18
Obrázek 3: Strukturní vzorec aktivní látky nimbového oleje, salaninu 18
Obrázek 4: Strukturní vzorec aktivní látky oleje z černého kmínu, dithymochinonu 20
Obrázek 5: Strukturní vzorec aktivní látky oleje z černého kmínu, thymochinonu 20
Obrázek 6: Strukturní vzorec aktivní látky oleje z černého kmínu, thymolu 20
Obrázek 7: Schéma GC 31
Obrázek 8: Redukce radikálu DPPH za vzniku DPPH-H 37
Obrázek 9: Redukce MTT na formazan 39
Obrázek 10: Chromatografický záznam analýzy methylesterů − rakytníkový olej ...59
Obrázek 11: Chromatografický záznam analýzy methylesterů − šípkový olej 59
Obrázek 12: Inhibiční působení rostlinných olejů na testované mikroorganismy. Disková metoda – použití neředěných olejů 65
Obrázek 13: Inhibiční působení rostlinných olejů na testované mikroorganismy Disková metoda – použití rostlinných olejů ve směsi s hexanem (1:1) 65
Obrázek 14: Antioxidační aktivita testovaných olejů – použití DPPH v THF 68
Obrázek 15: Antioxidační aktivita testovaných olejů meřená v časovém intervalu – použití DPPH v toluenu 69
Obrázek 16: Srovnáni cytotoxického účinku netradičních olejů 71

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Zastoupení majoritních mastných kyselin vyskytujících se v nimbovém oleji a oleji z černého kmínu 21
Tabulka 2: Tuková čísla nimbového oleje a oleje z černého kmínu 21
Tabulka 3: Zastoupení majoritních mastných kyselin vyskytujících se v šípkovém a tamanu oleji 23
Tabulka 4: Tuková čísla šípkového a tamanu oleje 23
Tabulka 5: Zastoupení majoritních mastných kyselin vyskytujících se v rakytníkovém oleji 25
Tabulka 6: Tuková čísla rakytníkového oleje 26
Tabulka 7: Průměrné hodnoty čísel kyselosti a směrodatná odchylka (SD) stanovení 53
Tabulka 8: Průměrné hodnoty čísel zmýdelnění a směrodatná odchylka (SD) stanovení 54
Tabulka 9: Průměrné hodnoty jodového čísla a směrodatná odchylka (SD) stanovení 55
Tabulka 10: Průměrné hodnoty peroxidového čísla a směrodatná odchylka (SD) stanovení 56
Tabulka 11: Obsah konjugovaných dienových a trienových mastných kyselin 57
Tabulka 12: GC analýza - složení mastných kyselin netradičních olejů 58
Tabulka 13: Růst gram-pozitivních mikroorganismů v přítomnosti testovaných olejů. 61
Tabulka 14: Růst gram-negativních mikroorganismů v přítomnosti testovaných olejů 61
Tabulka 15: Velikost inhibičních zón u gram-pozitivních mikroorganismů v přítomnosti rostlinného oleje 63
Tabulka 16: Velikost inhibičních zón u gram-pozitivních mikroorganismů v přítomnosti rostlinného oleje ve směsi s hexanem 63
Tabulka 17: Velikost inhibičních zón u gram-negativních mikroorganismů v přítomnosti rostlinného oleje 64
Tabulka 18: Velikost inhibičních zón u gram-negativních mikroorganismů v přítomnosti rostlinného oleje ve směsi s hexanem 64
Tabulka 19: Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) tamanu oleje 66

Tabulka 20: Viabilita buněk v přítomnosti netradičních olejů 70
Tabulka 21: Viabilita buněk referenčního vzorku 70