

Vliv esenciálních olejů na růst mikroorganismů

Bc. Jana Podlipná

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. Jana Podlipná**
Osobní číslo: **T13760**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Vliv esenciálních olejů na růst mikroorganismů**

Zásady pro vypracování:

1. V teoretické části vypracujte literární rešerši na zadané téma.
2. Věnujte se charakteristice esenciálních olejů, jejich vlastnostem a využití.
3. V další části se zaměřte na antimikrobiální účinky esenciálních olejů a jejich komponent a metody stanovení antibakteriální aktivity.
1. V praktické části sledujte antimikrobiální účinky esenciálních olejů.
2. Získané výsledky zpracujte a vyhodnoťte. Srovnajte účinky jednotlivých esenciálních olejů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. **BASER, K. H. C., BUCHBAUER, G. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. 1 st ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. 975 p. ISBN 978-1-4200-6315-8.**
2. **BERGER, R. G. Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. 1 st ed. Heidelberg: Springer, 2007. 648 p. ISBN 978-3-540-49338-9.**
3. **BAKKALI, F., AVERBECK, S., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. Food and Chemical Toxicology. 2008, 46, p. 446-475.**
4. **BASSOLÉ, I. H. N., JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules. 2012, 17, p. 3989-4006.**

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Iva Hauerlandová, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

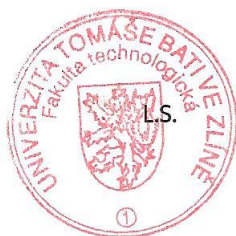
20. ledna 2015

Termín odevzdání diplomové práce:

18. května 2015

Ve Zlíně dne 20. ledna 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Martina Černeková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně

.....

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

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

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

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

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

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či 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 zabývala antimikrobiální aktivitou šesti zvolených esenciálních olejů a to esenciálního oleje konopného, oleje z kůry skořice, z máty kadeřavé, máty luční, máty peprné a plodů hřebíčku. Ke zkoumání antimikrobiální aktivity byly využity jak grampozitivní, tak gramnegativní mikroorganismy.

Samotné vlastnosti a charakteristika zvolených esenciálních olejů byla rozebrána v teoretické části této diplomové práce. Experimentální část byla zaměřena na zjištění antimikrobiální aktivity esenciálních olejů pomocí agarové difúzní metody. Následně byly z těchto esenciálních olejů připraveny mikroemulze, které byly podrobeny testům antibakteriální aktivity založeným na mikrodiluční metodě.

Klíčová slova: Esenciální olej, bakterie, mikroorganismy, antibakteriální aktivita, mikroemulze.

ABSTRACT

The diploma thesis has dealt with the antimicrobial activity of six selected essential oils: cannabis essential oil, cinnamon bark oil, spearmint oil, peppermint meadow oil, organic peppermint oil and clove fruit oil. To investigate the antimicrobial activity were used both gram positive and gram negative microorganisms.

The actual properties and characteristics of selected essential oils were summarized in the theoretical part of the thesis. The experimental part was focused on evaluating antimicrobial properties of essential oils using the agar diffusion method. Subsequently, microemulsions containing these essential oils have been created and antibacterial activity of microemulsions was determined using a broth dilution method.

Keywords: Essential oil, bacteria, microorganisms, antibacterial activity, microemulsions.

Díky předkládané diplomové práci bych velmi ráda poděkovala paní RNDr. Ivě Hauerlandové, Ph.D., která mne při vytváření diplomové práce odborně vedla a dávala mi cenné rady, které mi velice pomohly. Dále bych chtěla také poděkovat paní doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc., která mi značně pomohla při mé praktické části. Obrovský dík patří mým rodičům, mé sestře Zdeně, tetě Boženě a mým kamarádům, kteří mne po dobu studia a psaní diplomové práce velmi podporovali.

V životě se řídím několika mottý, ale toto důležité životní motto mne doprovázelo po celou dobu studia a to včetně psaní této práce, proto bych jej zde ráda uvedla.

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

Sidney A. Friedman

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 ESENCIÁLNÍ OLEJE OBECNĚ	12
2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	14
2.1 TERPENY	14
2.1.1 Hemiterpeny	15
2.1.2 Monoterpeny	16
2.1.3 Seskviterpeny	17
2.1.4 Diterpeny	17
2.2 ŠIKIMÁTY	17
2.2.1 Fenylypropanoidy	18
2.3 DALŠÍ SLOŽKY ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	18
3 ZÍSKÁVÁNÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	19
3.1.1 Průmyslová produkce esenciálních olejů	19
3.1.2 Laboratorní techniky	20
4 BIOLOGICKÁ AKTIVITA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	21
4.1.1 Antimikrobiální aktivita	21
4.1.2 Protiplísňová aktivita esenciálních olejů	22
4.1.3 Vlastnosti vedoucí k prevenci vzniku rakoviny	23
4.1.4 Antivirové účinky esenciálních olejů	23
4.1.5 Antioxidační účinky	24
4.1.6 Toxicita esenciálních olejů	24
5 CHARAKTERISTIKA POUŽITÝCH ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ.....	26
5.1 KONOPNÝ OLEJ.....	26
5.1.1 Získávání konopného oleje	26
5.1.2 Využití konopného oleje	27
5.2 ESENCIÁLNÍ OLEJ Z PLODŮ HŘEBÍČKU	28
5.2.1 Získávání hřebíčkového oleje	28
5.2.2 Využití hřebíčkového oleje	29
5.3 SKOŘICOVÝ OLEJ.....	30
5.3.1 Získávání skořicového oleje.....	30
5.3.2 Využití skořicového oleje	31
5.4 MÁTOVÝ OLEJ	32
5.4.1 Získávání mátového oleje	32
5.4.2 Využití mátového oleje	33
5.4.3 Máta peprná.....	33
5.4.4 Máta kadeřavá	33
5.4.5 Máta luční.....	34
6 EMULZE.....	35
6.1 MIKROEMULZE.....	36
7 CÍLE PRÁCE	37
II PRAKTICKÁ ČÁST	38
8 MATERIÁL, ZAŘÍZENÍ A PŘÍSTROJE	39

8.1	POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE	39
8.2	PŘÍSTROJE A POMŮCKY	39
8.3	KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	40
8.3.1	Fyziologický roztok	40
8.3.2	Masopeptonový agar	41
8.3.3	Masopeptonový bujón	41
8.3.4	Mueller Hinton Agar	42
8.4	POUŽITÉ MIKROORGANIZMY.....	42
9	METODIKA	44
9.1	PŘÍPRAVA BAKTERIÁLNÍ SUSPENZE	44
9.2	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ.....	45
9.3	DIFÚZNÍ METODA	45
9.4	PŘÍPRAVA MIKROEMULZÍ JEDNOTLIVÝCH ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	46
9.5	MIKRODILUČNÍ METODA STANOVENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY EO.....	47
10	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	49
10.1	DIFÚZNÍ METODA	49
10.1.1	Vliv esenciálních olejů na růst grampozitivních bakterií.....	49
10.1.2	Vliv esenciálních olejů na růst gramnegativních bakterií	51
10.2	MIKRODILUČNÍ METODA U GRAMPOZITIVNÍCH MIKROORGANIZMŮ	52
10.2.1	Vliv esenciálních olejů na růst <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953	52
10.2.2	Vliv esenciálních olejů na růst <i>Bacillus cereus</i> CCM 2010.....	53
10.2.3	Vliv esenciálních olejů na růst <i>Bacillus subtilis</i> susp. <i>spizizenii</i> CCM 4062.....	54
10.2.4	Vliv esenciálních olejů na růst <i>Micrococcus luteus</i> CCM 732	55
10.3	MIKRODILUČNÍ METODA U GRAMNEGATIVNÍCH MIKROORGANIZMŮ	57
10.3.1	Vliv esenciálních olejů na růst <i>Citrobacter freundii</i>	57
10.3.2	Vliv esenciálních olejů na růst <i>Escherichia coli</i> CCM 3954	58
10.3.3	Vliv mikroemulzí esenciálních olejů na růst <i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis CCM 4420	59
10.3.4	Vliv esenciálních olejů na růst <i>Serratia marcescens</i> CCM 303	60
10.3.5	Vliv esenciálních olejů na růst <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 3954	61
	ZÁVĚR	64
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	65
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	71
	SEZNAM OBRÁZKŮ	72
	SEZNAM TABULEK.....	73

ÚVOD

Mikrobiologická bezpečnost potravin a kosmetických prostředků je dlouhodobě předmětem zájmu výzkumníků, výrobců, ale i konečných spotřebitelů. A právě ze strany spotřebitelů roste poptávka po „zdravějších“ přírodních produktech, které nejsou chemicky ošetřeny, neobsahují náhražky přírodních surovin a neobsahují chemické konzervační látky. V důsledku toho se výrobci potravin či kosmetiky snaží celkově omezit aplikaci chemických konzervantů v potravinách, kosmetických přípravcích a farmaceutikách a nahradit je látkami přírodního charakteru. Takovými látkami by mohly být některé esenciální oleje či jejich jednotlivé komponenty. Esenciální oleje jsou získávány převážně z rostlin, a to buď extrakcí rostlinného materiálu nebo destilací. Mnohé oleje jsou známy svými antimikrobiálními účinky či rozmanitou biologickou aktivitou a jejich využití by mohlo být velkým přínosem v řadě odvětví. Esenciální oleje je možné využít nejen pro zvýšení antimikrobiální ochrany kosmetických přípravků či farmaceutik a zlepšení jejich údržnosti, ale lze je využít i jako vonné esence.

Esenciální oleje jsou těkavé látky olejové konzistence, které obsahují jak primární, tak sekundární metabolity rostlin. Primární metabolity rostlin jsou sloučeniny, které se podílí na strukturních a stavebních funkcích rostlin jako jsou lipidy, proteiny nebo nukleové kyseliny. Sekundární metabolity mají zcela jiný charakter. Rostlina díky těmto sekundárním metabolitům vábí opylovače nebo produkuje látky, které mohou negativně ovlivnit metabolismus potenciálně nebezpečného nepřítele. Mezi tyto sekundární metabolity, které jsou ve významném množství zastoupeny v některých esenciálních olejích, se řadí například menthol přítomný v mátových olejích, nebo eugenol obsažený v olejích z hřebíčku.

Cílem předkládané diplomové práce bylo studovat esenciální oleje používané v oblasti potravinářství či kosmetického a farmaceutického průmyslu z hlediska jejich antimikrobiální aktivity. Antimikrobiální aktivita těchto olejů by mohla vést k rozšíření jejich využití jako antimikrobiálních látek v potravinách, farmacii či kosmetickém průmyslu. Antibakteriální aktivita byla v této práci sledována diskovou difúzní metodou, následně byly z olejů připraveny mikroemulze, jejichž účinky na růst bakterií byly sledovány pomocí mikrobiálních metody.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ESENCIÁLNÍ OLEJE OBECNĚ

Esenciální oleje (EO) jsou složité směsi těkavých látek přírodního původu. Převážná část esenciálních olejů je získávána z rostlinného materiálu, avšak některé oleje mohou být produkty živočichů či mikroorganismů. Esenciální oleje bývají také nazývány jako éterické oleje, esence nebo silice. Izolovány mohou být různými metodami, především destilací nebo lisováním. Za esenciální oleje zpravidla nejsou považovány látky získané extrakcí organickými rozpouštědly. Rostlinné silice bývají izolovány z rostlin ve formě intenzivně vonících látek olejové konzistence, které se vyznačují lipofilním charakterem. Výchozím materiálem pro izolaci mohou být jak celé rostliny, tak i jednotlivé rostlinné části, např. květy, listy, kořeny či kůra [1, 2].

Esenciální oleje, respektive jejich jednotlivé složky, jsou produkovány rostlinami při takzvaném sekundárním metabolismu. V průběhu vegetativního období dochází u rostlin k řadě biochemických pochodů, při kterých vznikají dvě skupiny látek. Jednou skupinou jsou produkty primárního metabolismu, které rostlina nutně potřebuje jako zdroj energie a pro správný růst a rozmnožování. Jedná se o vysokomolekulární látky, jako jsou bílkoviny, lipidy, nukleové kyseliny a uhlovodíky. Druhou skupinu tvoří tzv. produkty sekundárního metabolismu, které rostlina vytváří jako vedlejší produkt při degradaci vysokomolekulárních produktů primárního metabolismu. Tyto látky nejsou nezbytně nutné pro růst či rozmnožování dané rostliny. Na rozdíl od živočichů, rostliny nejsou schopny rychle utéci před svým nepřítelem nebo se přemístit při změně okolních podmínek, proto se u nich v průběhu evoluce vyvinuly jiné možnosti obrany v podobě produkce produktů sekundárního metabolismu. Některé z těchto produktů mají za cíl nepřítele odpudit, znechutit, poškodit nebo nějakým jiným způsobem ovlivnit jeho metabolismus. Současně hrají sekundární metabolity významnou roli při vábení opylovačů [3].

Esenciální oleje mají řadu využití. Významnou oblastí použití esenciálních olejů je aromaterapie, která využívá účinků silic k prevenci onemocnění, obnovení a posílení tělesného, duševního a emocionálního zdraví a pohody [4]. Esenciální oleje zde působí psychoterapeuticky. Je využíváno léčivých komponent esenciálních olejů, které se rozpustí v rostlinné bázi a jsou aplikovány na pokožku člověka při masážích, popřípadě jsou esenciální oleje používány pro přípravu studených či teplých obkladů. Tyto oleje jsou často součástí osvěžovačů vzduchu nebo jsou přidávány v malých dávkách jako součást tukové-

ho základu do koupelí. Díky antiseptickým a antibakteriálním účinkům některých esenciálních olejů je působeno proti infekcím [4].

Esenciální oleje nebo jejich komponenty se také využívají jako chuťové a vonné látky při výrobě potravin, parfémů nebo kosmetických přípravků. Dalším odvětvím uplatnění těchto látek je farmaceutický průmysl. Díky antimikrobním účinkům jsou esenciální oleje základem ústních vod a antiseptik [5].

Esenciální oleje je potřeba uchovávat v suchu, chladu a temnu, kdy EO jsou schopny vydržet při vhodných skladovacích podmínkách i déle než jeden rok. Esenciální oleje získané z květů rostlin mohou při správném uchování mít stejnou kvalitu až tři roky i déle [6].

Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují množství a kvalitu esenciálních olejů. Mezi tyto faktory se řadí například genetická variabilita, rostlinný ekotyp nebo odrůda, výživa rostlin, použití hnojiv, geografické umístění rostlin, okolní podnebí, sezónní výkyvy, stres během růstu a zralosti a také po sušení a skladování dané sklizně [7].

Esenciální oleje jsou obvykle uloženy v olejových kanálcích, pryskyřičných kanálcích, žlázkách nebo trichomech rostlin [8]. V průmyslovém měřítku je parní destilace preferovanou metodou pro výrobu esenciálních olejů. EO může představovat 20 až 100 různých sekundárních metabolitů rostlin, které patří do různých chemických skupin [9].

2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ

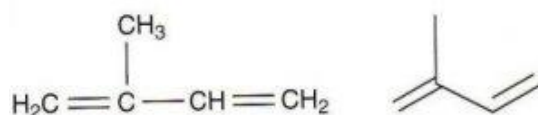
Díky označení „esenciální olej“ dochází velmi často k záměně esenciálních olejů s triacylglyceroly, tedy s tuky a oleji. Esenciální oleje a triacylglyceroly se však od sebe liší nejenom chemickým, ale i fyzikálním charakterem. Jak již bylo zmíněno, EO jsou směsi těkavých látek a lze je tedy od acylglycerolů rozlišit pomocí jednoduchého testu. Pokud je na filtrační papír nanesen esenciální olej, dojde postupně k jeho celkovému odpaření. Olej tvořený triacylglyceroly se po nanesení na filtrační papír neodpaří, dokonce ani při zahřátí [10].

Esenciální oleje se skládají z mnoha komponent, ale významné postavení mají zejména nízkomolekulární lipofilní sloučeniny vznikající jako produkty sekundárního metabolismu rostliny, nazývané terpeny. Esenciální oleje obsahují jak produkty primárního, tak sekundárního metabolismu. Mezi nejdůležitější sekundární metabolity se řadí terpeny a šikimáty [11].

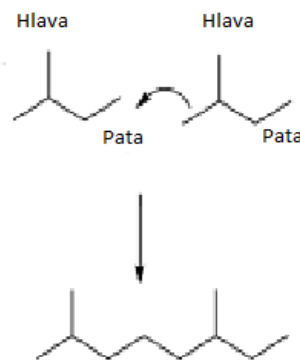
Složky esenciálních olejů jsou těkavé látky, které lze obecně rozdělit do dvou skupin, na látky terpenoidní a neterpenoidní. Jedná se o uhlovodíky a jejich kyslíkaté deriváty, které mohou být ve formě alkoholů, kyselin, esterů, epoxidů, aldehydů, ketonů, aminů, sulfidů atd. [10].

2.1 Terpeny

Terpeny jsou přírodní produkty převážně rostlinného původu, které mohou být formálně považovány za produkty polymerizace uhlovodíkových izoprenů. Terpeny však mají význam i pro mnohé živočichy, například u hmyzu v podobě feromonů. Základem všech terpenů je izoprenová jednotka, jež je tvořena přesmykem hlava-pata (Obr. 2) jedné nebo více izoprenových jednotek. Po chemické stránce odpovídá izoprenová jednotka 2-methylbuta-1,3-dienu [12], která je vyobrazena na Obr. 1.



Obr. 1. Chemická struktura izoprenové jednotky [12].



Obr. 2. Schematické znázornění přesmyku hlava-pata (vpravo) [1]

Terpeny představují velmi obsáhlou skupinu látek, kterou lze dále rozdělit na základě počtu izoprenových jednotek tvořící strukturu dané látky. Nejnižší počet izoprenových jednotek mají hemiterpeny. Tyto látky obsahují pouze jednu izoprenovou jednotku, počet atomů uhlíku v molekule je tudíž pět (C_5) a v esenciálních olejích jsou přítomny pouze v minoritním množství. Další skupinou jsou monoterpeny (C_{10}), které jsou tvořeny dvěma izoprenovými jednotkami. Seskviterpeny (C_{15}) se vyznačují přítomností tří izoprenových jednotek a společně s monoterpeny jsou v esenciálních olejích nejvíce zastoupeny. Do skupiny terpenů dále náleží diterpeny (C_{20}) se čtyřmi izoprenovými jednotkami, sesterterpeny (C_{25}) s pěti a triterpeny (C_{30}) se šesti izoprenovými jednotkami [13].

Na jednotlivé izoprenové jednotky mohou být navázány různé funkční skupiny, po chemické stránce tedy mohou terpeny být alkoholy, estery, karboxylové kyseliny popřípadě aldehydy [1].

Složkami esenciálních olejů jsou především látky náležící mezi hemiterpeny, monoterpeny, seskviterpeny a diterpeny [10].

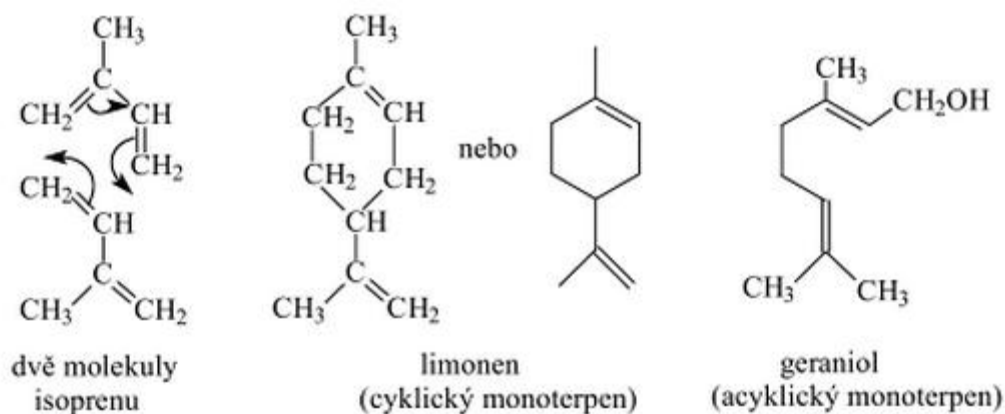
2.1.1 Hemiterpeny

Mnoho alkoholů, aldehydů a ketonů, které ve své struktuře obsahují jednu molekulu 2-methylbutanu (jednu izoprenovou jednotku), se vyskytují jako minoritní složka v esenciálních olejích. Příkladem takového hemiterpenu může být prenil (3-methylbut-2-en-1-ol). Deriváty prenilu jsou často součástí různých esenciálních olejů. Prenyl acetát, je obsažen v esenciálním oleji ylang ylang [1].

2.1.2 Monoterpeny

Monoterpeny jsou látky, které vznikají z geranylpyrofosfátu při současném působení monoterpensyntázy, která katalyzuje probíhající chemickou reakci. Monoterpensyntáza také bývá označována jako cykláza v případě, že katalyzuje tvorbu cyklických produktů (Obr. 3) [14]. Terpeny tedy mohou být acyklické nebo cyklické, s jedním nebo několika uhlíkatými kruhy [15].

Monoterpeny jsou produkovány v sekrečních strukturách rostliny. Esenciální oleje jsou u většiny rostlin uloženy v různých typech sekrečních kanálků a dutin, ve žláznatých trichomech nebo jiných specializovaných buňkách. Za jejich produkci jsou zodpovědné epitelové buňky, které tvoří výstelku takových kanálků či dutin. Buňky, které se podílí na biosyntéze monoterpenů, obvykle obsahují velký počet plastidů bez pigmentů, tzv. leukoplastů. Tyto leukoplasty postrádají složitý membránový systém tylakoidů, kterými jsou vybaveny jiné typy plastidů - chloroplasty. Materiál je v nich uložen ve formě kapének a tyto buňky mají také velmi dobře vyvinutou síť endoplasmatického retikula, které také může být zapojeno do procesu biosyntézy monoterpenů [15].



Obr. 3. Schematické znázornění cyklizace izoprenových jednotek (vlevo) a příklad cyklického a acyklického monoterpenu [15].

Mezi cyklické monoterpeny patří například limonen, který je obsažen v silici citrusových plodů, menthol obsažený v silici máty peprné, kafr ze dřeva kastrovníku, eugenol v silici hřebíčku nebo pinen získaný z borovicové silice. Příkladem acyklického monoterpenu je geraniol, což je alkohol nacházející se v růžovém oleji [1, 15].

2.1.3 Seskviterpeny

Seskviterpeny jsou tvořeny třemi izoprenovými jednotkami a jejich obecný vzorec je tedy $C_{15}H_{24}$. Mohou být lineární, větvené, ale i cyklické. Cyklické seskviterpeny lze dále rozdělit na monocyklické, bicyklické a tricyklické. Mezi acyklické seskviterpeny patří například β -farnesen, který je obsažen v silici chmele, dále pak farnesol, který je významnou složkou silice růže, akátu nebo bramboříku.

Monocyklické seskviterpeny jsou častou složkou esenciálních olejů. Jako příklad lze uvést bisabolen a jeho kyslíkatý derivát bisabolol, které jsou zastoupeny v bergamotovém oleji, myrhovém oleji nebo v oleji heřmánku. Příkladem bicyklických seskviterpenů je selinen, eudesmol nebo ciperon [10].

2.1.4 Diterpeny

Je známo více než 2500 diterpenů, které jsou produkovány rostlinami náležícími do značného počtu čeledí. Z chemického hlediska se jedná o velice komplexní skupinu látek, kterou lze mnohdy obtížně izolovat, purifikovat a charakterizovat. Z toho důvodu diterpeny nejsou tak dobře prostudovány jako monoterpeny či seskviterpeny. Diterpeny jsou často obsaženy v rostlinných pryskyřicích, kde mohou tvořit až 60 % jejich celkové hmotnosti. Nejběžnějšími diterpeny jsou netěkavé kyseliny získané z jehličnanů, hluchavkovitých nebo bobovitých rostlin [16].

Ke známým diterpenům se řadí tixol, který je získáván z tisu a je v lékařství používán jako cytostatikum při léčbě rakoviny vaječníku a prsu [17]. Retinol, běžně označovaný jako vitamin A, je diterpen velmi důležitý pro správnou funkci zraku. V kávě jsou obsaženy diterpeny kafestol a kahweol, jenž se prokazatelně podílejí na zvyšování LDL cholesterolu a hypertenzi [18]. Mezi diterpeny, které se vyskytují v esenciálních olejích, patří například kyselina pimarová a levopimarová, kyselina abietová nebo manool [16].

2.2 Šikimáty

Kyselina šikimová je klíčovým meziproduktem biosyntetických pochodů rostlin, jelikož je hlavním prekurzorem pro flavonoidy a lignin. Flavonoidy jsou důležité pro rostliny, jako antioxidanty, barviva, ochranné prostředky proti UV záření, apod. Lignin je klíčovou součástí stavebních materiálů rostlin, zejména dřevnatých tkání.

Kyselina šikimová je syntetizována z fosfoenol pyruvátu a erytróza-4-fosfátu. Její deriváty se obvykle vyznačují podobnou základní strukturou, tedy šestičlenným kruhem s jedno- nebo tří-uhlíkovým substituentem v poloze 1 a kyslíkem v poloze 3, 4 nebo 5. Metabolickou cestou kyseliny šikimové vznikají významné komponenty esenciálních olejů - fenylypropanoidy [10].

2.2.1 Fenylypropanoidy

Fenylypropanoidy jsou syntetizované šikimátovou cestou přes aminokyselinu fenylalanin a kyselinu skořicovou za působení celé řady enzymů, lyáz, hydroláz, oxidoreduktáz a ligáz. Fenylypropanoidy obsahují jednu nebo více C₆-C₃ fragmentů, kde C₆ představuje benzenový kruh. Jednoduché fenylypropanoidy jsou složky esenciálních olejů. Mezi ty nejvýznamnější patří vanilín, eugenol nebo cinnamaldehyd [10, 15].

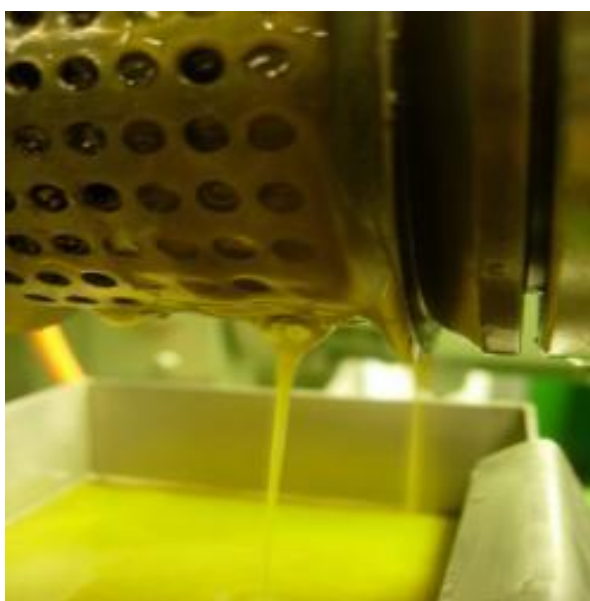
2.3 Další složky esenciálních olejů

Mezi další komponenty silic patří různé neterpenoidní uhlovodíky v podobě alkoholů s krátkým řetězcem a aldehydů. Tyto sekundární produkty jsou tvořeny metabolickými přeměnami nebo degradací fosfolipidů a mastných kyselin [10]. Poměrně velkou skupinu tvoří takzvané C₁₃ neterpenoidní uhlovodíky, které vznikají degradací karotenoidů nebo vznikají při metabolismu kyseliny abscisové. C₁₃ nonterpenoidy je možné najít v řadě esenciálních olejů nebo čaji. Složkami esenciálních olejů bývají i různé estery, laktony, izothiokyanáty a některé dusíkaté či sírné sloučeniny [10, 15].

3 ZÍSKÁVÁNÍ ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ

3.1.1 Průmyslová produkce esenciálních olejů

Značná část esenciálních olejů je získávána z rostlinného materiálu. Majoritní roli při získávání esenciálního oleje hraje destilace anebo lisování za studena (Obr. 4). Produkce esenciálních olejů lisováním za studena se využívá u esenciálních olejů citrusového původu, kdy díky působení vysokého tlaku dochází k narušení rostlinného pletiva a kůry a následnému získání esenciálního oleje [16, 17].



Obr. 4. Lisování esenciálního oleje za studena [16].

Destilace vodní parou je nejčastější metodou produkce esenciálních olejů. Při této metodě pára prostupuje vedením na dno kotle, kde je umístěn rostlinný materiál v perforovaném zásobníku. Při vysokotlaké parní destilaci, která je nejpoužívanější destilací v evropských a amerických zemích, je používána zvýšená teplota. Tato teplota napomáhá urychlení reakce a rychlejšímu zisku esenciálního oleje. Tento druh získávání esenciálních olejů se používá zejména při výrobě mátového oleje a levandulového oleje [12, 14].

Další možností pro získání silic je extrakce. Může se jednat o takzvanou enfleuráž, kdy jsou vonné látky z rostlin získávány pomocí extrakce tukem při pokojové teplotě. Tato metoda je však poměrně nákladná a používá se například při výrobě jasmínové silice nebo silice pomerančových květů. Běžnou metodou je i extrakce pomocí rozpouštědel. V tomto případě jsou využívána organická rozpouštědla, mezi něž patří benzín, hexan

a petroléter. V praxi je možné se rovněž setkat se získáváním esenciálních olejů za pomoci superkritického oxidu uhličitého. Tohoto typu se využívá zejména v potravinářství při výrobě potravinových aromat [1, 7].

3.1.2 Laboratorní techniky

Tyto metody jsou využívány k získávání stopových množství esenciálních olejů z aromatických rostlin. Získaný materiál může sloužit například pro stanovení množství esenciálních olejů v rostlinách či pro jiné výzkumné účely. Nejpoužívanější laboratorní technikou je cirkulární extrakce z rostlinného materiálu. Při této metodě je destilát kontinuálně extrahován za přítomnosti malého množství organického rozpouštědla. Délka destilace závisí na použitém rostlinném materiálu a obvykle probíhá 3 – 4 hodiny.

Velmi využívanou metodou pro izolaci esenciálních olejů z rostlinného materiálu je extrakce pevné fáze do kapaliny za použití Soxhletova extraktoru. Při této extrakci dochází k izolaci analytu získaného z pevného vzorku. Důležitou podmínkou při použití této metody je stabilita izolované látky při teplotě varu rozpouštědla. Výsledný produkt je potřeba po dokončené extrakci zkoncentrovat odpařením rozpouštědla. Jedná se o jednu z nejstarších metod získávání olejů vůbec [19].

Další metodou je mikroextrakce tuhými fázemi (Solid Phase Microextraction, SPME). Jedná se o izolační metodu, která kombinuje proces vzorkování a samotnou extrakci. Principem této metody je sorpce složky vzorku na stacionární fázi pokrývající křemenné vlákno, které se nachází uvnitř kovové jehly. Jehla s vláknem se zasune do vzorku, vlákno se při procesu vzorkování vysune pomocí pístu a po dosažení sorpční rovnováhy se vlákno zatáhne a celá jehla se ze vzorkované matrice vytáhne a vloží se do nástřikového prostoru chromatografu (plynového nebo kapalinového), kde se vlákno opět vysune. Látky, jež se uchytily na sorbentu, jsou tepelně sorbovány a jsou unášeny pomocí nosného plynu do kolony, kde probíhá separace jednotlivých látek. Výsledný kvalitativní i kvantitativní obsah látek lze pozorovat na chromatogramu. K výhodám této metody patří rychlost stanovení, citlivost a také vysoká přesnost [1, 7].

Za použití mikroextrakce pomocí tuhé fáze lze získat silice a to bez dalších složek primární matrice. Těmito látkami by mohlo být následně komplikováno vlastní stanovení pomocí plynové chromatografie. Mikroextrakce tuhými fázemi je poměrně levná, jednoduchá metoda, kdy nedochází k použití extrakčního rozpouštědla. Velkou výhodou je i krátká doba mikroextrakce [1, 10, 19].

4 BIOLOGICKÁ AKTIVITA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ

V posledních letech dochází k rapidnímu nárůstu zájmu o otázky týkající se bezpečnosti syntetických látek používaných v kosmetickém i potravinářském průmyslu. S tím souvisí i zvýšená poptávka po produktech vyrobených výhradně či převážně z přírodních substancí. Zájem o esenciální oleje však neplyne pouze z faktu, že se jedná o přírodní látky. Oleje a jejich jednotlivé komponenty jsou také známy svou rozmanitou biologickou aktivitou, která v sobě nese značný potenciál pro budoucí rozmanité aplikace.

Mezi účinky připisované esenciálním olejům, či jejich složkám patří především jejich schopnost inhibovat růst prokaryotických i eukaryotických mikroorganismů, dále pak antivirová aktivita, antioxidační účinky nebo jejich vliv na proliferaci nádorových buněk [1, 10].

4.1.1 Antimikrobiální aktivita

Citlivost mikroorganismu na EO závisí především na vlastnostech esenciálního oleje a na mikroorganismu samotném, jedná se tedy o vlastnost velice specifickou. Přesto však lze obecně formulovat určité společné rysy interakce mikroorganismus - esenciální olej. Na základě těchto rysů je pak do určité míry možné předvídat výsledky experimentů.

U široké škály EO je známo, že mají antimikrobiální vlastnosti a to díky účinným složkám v oleji obsažených. Antimikrobiální aktivita je možná přičíst monoterpenům, seskviterpenům, alkoholům či fenolům. Lipofilní charakter uhlovodíkové struktury esenciálních olejů a hydrofilní charakter jejich funkčních skupin je jedním z nejdůležitějších faktorů v antimikrobiálním působení komponent esenciálních olejů. Mezi antimikrobně nejúčinnější složky lze obecně zařadit fenolické látky, dále pak především aldehydy a ketony [10].

Některé EO obsahující fenolické látky, jako je například karvakrol a thymol, jsou vysoce aktivní proti širokému spektru mikroorganismů, nicméně s ohledem na specifičnost interakce mikroorganismu s esenciálním olejem by měly být prováděny experimenty samostatně pro daný olej a pro daný mikroorganismus.

Je všeobecně známo, že gram-pozitivní bakterie jsou obecně citlivější k antimikrobní aktivitě esenciálních olejů než gram-negativní bakterie [20]. Mnoho výzkumných prací potvrzuje, že existují jisté výjimky. Příkladem může být studie, jejíž autoři prokázali výrazně vyšší citlivost gram-negativní bakterie *Escherichia coli* k přítomnosti tea tree oleje než jaká byla zjištěna u gram-pozitivního druhu *Staphylococcus aureus*. V dalších pracích

byla zjištěna například značná citlivost *Pseudomonas aeruginosa* k hruškové a borovicové silici [21].

Aktivita esenciálních olejů vůči bakteriím je využívána při některých onemocněních. Jako příklad lze uvést využití tea tree oleje při léčbě, respektive zmírnění projevů *acne vulgaris*, což je velice časté kožní onemocnění. Bylo prokázáno, že *Propionibacterium acnes*, mikroorganismus významně se podílející na etiologii akné, je citlivý na tea tree olej [21, 22].

Esenciální oleje mohou sloužit jako antimikrobiální činidla proti široké škále ústních bakterií nalezených v zubních kazech. Ústní vody, které obsahují různé druhy silic, jsou obecně považované za bezpečné a účinné přípravky, jenž jsou doporučovány pro ústní hygienu. Četné studie byly prováděny na komerčně registrovaných vzorcích ústních vod s esenciálními oleji. Bylo zjištěno, že esenciální olej v ústní vodě má inhibiční účinek na zubní plak.

Za použití ústní vody s obsahem esenciálního oleje byla detekována větší inhibice bakterií než u ústních vod s obsahem aminu fluoridu nebo fluoridu cínatého [23, 24].

Poněkud problematická je otázka mechanismu účinku olejů na bakterie. Je třeba mít na paměti, že esenciální olej je složitou směsí látek, které mohou mít různé mechanismy působení. U mnohých olejů je navíc výrazného inhibičního účinku dosaženo díky kombinaci a vzájemném synergickém působení jednotlivých komponent. U některých olejů je mechanismus účinku spojen s narušením funkce cytoplazmatické membrány, což může vést k úniku K⁺ iontů, inhibici respirace a lyzi buněk. Takový efekt byl pozorován například u tea tree oleje a gram-negativní bakterie *E. coli*. [25].

4.1.2 Protiplísňová aktivita esenciálních olejů

Plísně neboli mikroskopické vláknité houby patří mezi eukaryotické organizmy. Terapie plísňových infekcí je díky tomu komplikována podobností buněk hub s buňkami hostitele, a to jak na buněčné, tak i molekulární úrovni. Proto je těžké plísně cíleně zasáhnout a zároveň se vyhnout zasažení funkcí lidských buněk [26]. Některé z oportunních plísňových patogenů (například *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus sp.*) jsou obecně známy, že způsobují potíže velké populaci pacientů s oslabenou imunitou. K dispozici jsou pouze omezené možnosti léků pro úspěšné fungicidní chemoterapie [27]. I z těchto důvodů jsou neustále hledány a testovány nové antimikrobiální látky a nemalá pozornost je věnována právě esenciálním olejům a jejich složkám.

U mnohých esenciálních olejů byla inhibiční aktivita vůči mikroskopickým vláknitým houbám prokázána. Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) olej, nebo-li olej z citronové trávy, je jedním z nejúčinnějších olejů proti plísním v účinných koncentracích v rozmezí 0,006 - 0,03%. Pomerančový, citronový, mandarinkový a grapefruitový olej potlačuje růst plísně *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium verrucosum* a *Penicillium chrysogenum* na méně než jedno procento [28].

4.1.3 Vlastnosti vedoucí k prevenci vzniku rakoviny

Jedním z nejobtížnějších úkolů v chemoterapii je léčba zhoubného růstu buněk vedoucí k rakovině. Rostlinné molekuly, jako je taxol, jsou účinné proti rakovinné buněčné poliferační. U různých typů malignit, jako jsou gliom, rakovina tlustého střeva, rakovina žaludku, nádory jater, plicní nádory, rakovina prsu a leukémie bylo zjištěno, že látky vyskytující se v esenciálních olejích, mohou hrát roli v prevenci těchto onemocnění a lze je využít v terapeutických strategiích [28].

Popsáno bylo i přímé působení složek EO na nádorové buňky. Například, geraniol z *Cymbopogon martini* (tj palmarosový olej), zasahuje do funkce membrány, iontové homeostázy a buněčné signalizace nádorových buněčných linií. Bylo zjištěno, že inhibuje syntézu DNA a zmenšuje velikost nádorů tlustého střeva [29]. Terpenoidy, jakož i polyfenolové složky rostlinných olejů, zabraňují proliferaci nádorových buněk prostřednictvím nekrózy nebo indukce apoptózy [30].

4.1.4 Antivirové účinky esenciálních olejů

Kromě antimikrobiální aktivity esenciálních olejů směrem k bakteriím a mikroskopickým houbám, mají tyto oleje také antivirové vlastnosti. Některé oleje mohou mít inhibiční vliv na replikaci virové nukleové kyseliny, čímž prakticky brání vzniku nových virových částic a šíření virové infekce do dalších buněk. Tato inhibice virové replikace je pravděpodobně způsobena v důsledku přítomnosti monoterpenových, seskviterpenových a fenylypropanových složek EO [31]. Příkladem takového účinku oleje na viry může být inhibiční aktivita proti herpes viru, která byla zaznamenána u eukalyptového a tymiánového oleje.

Taktéž bylo zjištěno, že kajeputský olej vykazuje významnou účinnost při léčbě infekcí rekurentních (tj. opakujících se) herpes virů [32]. U oregánového oleje je také známo, že má velmi dobrou antivirovou aktivitu proti viru žluté zimnice [31].

4.1.5 Antioxidační účinky

Oxidačním stresem v důsledku vzniku volných radikálů a reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), může dojít k poškození buněčných makromolekul. Oxidační poškození je spojeno s různými zdravotními problémy, jako je stárnutí, arterioskleróza, rakovina, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, diabetes a astma [33].

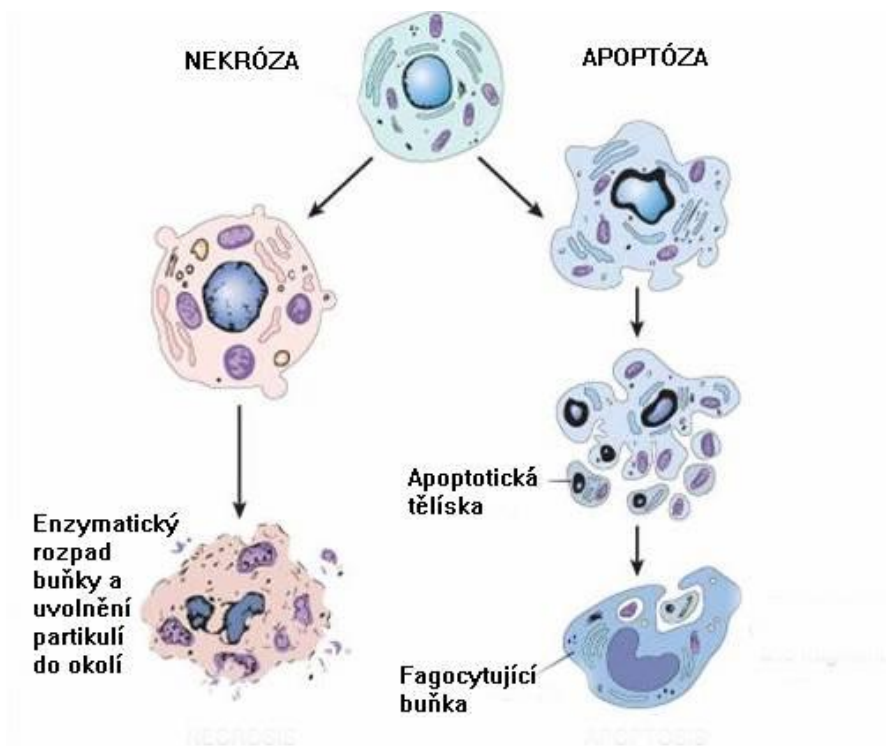
Buňky samy mají mnohé mechanismy, kterými mohou volné radikály odstraňovat či mírnit důsledky oxidačního stresu. Existuje celá řada látek, které mají antioxidační účinky. Mnohé složky esenciálních olejů lze považovat za velice účinné antioxidy. Flavonoidy, terpenoidy a fenolové složky esenciálních olejů vykazují významné antioxidační účinky.

Ocimum sp. (bazalka) a *Mentha sp.* (máta) mají potenciální antioxidační aktivitu. U dvou hlavních složek tymiánového a oregánového oleje, thymolu a karvakrolu, je prokázáno, že působí jako silné antioxidy [34]. Podobně *Cuminum cyminum* (šabrej kmínovitý) a *Petroselinum* (petržel) mají silnou aktivitu vůči volným radikálům. Mezi EO s antioxidačními účinky patří například olej hřebíčkový, skořicový nebo tymiánový. Velmi účinné jsou i oleje získané ze muškátového oříšku, bazalky či oregana [35].

4.1.6 Toxicita esenciálních olejů

V předchozím textu jsou zmíněny různé biologické účinky esenciálních olejů a jejich komponent. Pro případné využití olejů k terapeutickým účelům je však třeba znát i potenciální rizika a tedy toxicitu těchto látek.

Esenciální oleje představují různě aktivní molekuly, jež ovlivňují několik cílových míst v buňce [36]. Jejich hlavním cílem je cytoplazmatická membrána. Přerušení a permeabilizace buněčné membrány vede ke ztrátě důležitých buněčných funkcí, jako je udržení iontové homeostázy a fungování elektronového transportního řetězce. Esenciální oleje mohou působit cytotoxicky na eukaryotické buňky. Permeabilizace vnější a vnitřní mitochondriální membrány způsobí buněčnou smrt nekrotou a apoptózu, jejichž průběh je možné sledovat na Obr. 5 [37].



Obr. 5. Nekróza (vlevo) a apoptóza (vpravo) buňky [37].

Alkoholy, aldehydy a fenolové složky jsou zodpovědné za cytotoxicitu esenciálních olejů. Tato cytotoxická vlastnost je důležitá pro chemoterapeutické aplikace EO proti různým virům, bakteriím a plísním [38]. Nicméně, toxicita pro eukaryotické buňky je také zodpovědná za nežádoucí vedlejší účinky vůči hostiteli. Riziko různých toxických účinků, jako jsou podráždění a citlivost buněk, percutánní absorpce, akutní toxicita pro orgánové soustavy, cytotoxicita, karcinogenita, teratogenita, omezuje léčebné použití EO.

V následující kapitole budou popsány a blíže charakterizovány esenciální oleje, které byly použity v praktické části předkládané diplomové práce. Jedná se o olej konopný, hřebíčkový, skořicový a mátový [39].

5 CHARAKTERISTIKA POUŽITÝCH ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ

5.1 Konopný olej

Konopí seté (*Cannabis sativa*) je jednoletá dvoudomá rostlina, která se zemědělsky pěstuje již po mnoho staletí a to pro její vlákna a olej. Z taxonomického hlediska řadíme konopí do čeledi konopovitých (*Cannabaceae*) [40]. Konopí pochází ze střední Asie. Velkým pozitivem konopí je jeho flexibilita a odolnost k různým klimatickým podmínkám. Konopí při dostatečném příjmu živin, vláhy a slunečního svitu rychle roste, během 110 dnů mohou rostliny vyrůst až do výšky 2 - 4,5 m [41].

Od roku 1938 bylo pěstování konopí v Kanadě zakázáno z důvodu přítomnosti fytochemické konstrukční drogy δ -9-tetrahydro-cannabinolu (THC). Nyní je již v Kanadě legální pěstovat takzvané průmyslové konopí s nízkým obsahem THC. Pro Evropskou unii platí hraniční hodnota obsahu THC v konopí setém 0,3%, takže tento limit platí taktéž pro Českou republiku. Semena konopí sama o sobě neobsahují THC složku, ta je uložena v pestících a plodech samičí rostliny. Může se ale stát, že trocha pryskyřice s obsahem THC ulpí na semenech [42].

V konopném esenciálním oleji je obsažena asi stovka dosud identifikovaných složek (většinou mono a sesquiterpenů). Signifikantní vliv na kvalitu esenciálního oleje má i to, zda byla výchozí surovina čerstvě sklizená nebo suchá.

Z procentuálního zastoupení obsahuje esenciální konopný olej nejvíce seskviterpenu, kdy karyofylen tvoří 28 – 35 %, humulen 10 – 12% a aromadendren 4%. Zastoupení monoterpenů v tomto esenciálním oleji je podstatně nižší, kdy α , β pineny tvoří 8 %, cca 8 % tvoří myrcen. V esenciálním konopném oleji je podstatné zastoupení i terpenických oxidů a epoxycaryophylenu ze 4,5 – 10 % [2, 10, 15].

5.1.1 Získávání konopného oleje

Konopný olej je silně aromatický olej s výraznými terapeutickými účinky, který se vyrábí parní destilací ze zralých a zdravých samičích rostlin s minimálním obsahem semene. Čím vyšší je obsah pryskyřice a nižší obsah semene výchozí suroviny, tím výnosnější je produkce esenciálního oleje.

Další variantou zisku konopného esenciálního oleje je zisk ze semen, protože konopí seté patří mezi siličnaté rostliny obsahující vonné silice. Proto lze z jeho semen získat

také esenciální olej, jež má velmi efektivní využití v aromaterapii. Při získávání esenciálního oleje je využita metoda destilace vodní párou za vzniku oleje světle žluté barvy a nahořklé kořeněné vůně [1, 2].

Technické konopí se pro účel výroby esenciálních olejů nepoužívá, jelikož nemá dostatečný obsah aromatických složek. Důvodem je, že technické konopí je pěstováno pro vlákna či semena a nikoliv pro aroma [36].

5.1.2 Využití konopného oleje

Esenciální konopný olej je využíván jako aromatická přísada v potravinářství, kosmetickém průmyslu, ale i při aromaterapiích v léčbě astmatu je vyobrazen na obrázku 6 [43].

Tento esenciální olej v kosmetických přípravcích může mít pozitivní vliv na hojení ran, popálenin, ekzémů, lupénky, akné nebo křečových žil [43].

Důležitými složkami EO z konopí je například karyofylen, humulen nebo alloaromanren. Typická pro tento esenciální olej je kořenitá nahořklá vůně podobná vůni oleje z chmelových šištic. Olej má protizánětlivé účinky, zejména na procesy dýchací soustavy, uvolňuje stagnace, působí proti stresu, je uklidňující a protialergický. Konopný olej taktéž pomáhá zklidňovat podrážděnou pokožku. Pomáhá při alergických reakcích či atopickém ekzému, lupénce nebo akné [10, 43].

Bylo zjištěno, že esenciální oleje získané z konopí setého významně inhibují mikrobiální růst v takové míře, že může mít zajímavé aplikace pro kontrolu a kažení potravinových patogenů a fytopatogenních mikroorganismů [44].



Obr. 6. Esenciální konopný olej v komerčním balení.

5.2 Esenciální olej z plodů hřebíčku

Hřebíček, *Syzygium aromaticum*, patří do čeledi *Myrtaceae*, což jsou vyšší dvouděložné rostliny. Původem pochází ze sopečných ostrovů ve východní Indonésii. Strom je střední velikosti, celoročně zelený, dosahující výšky až 20 metrů. Průměr kmenu může dosáhnout až 30 cm, listy jsou podlouhlé vejčitého tvaru. Z počátku jsou nově vytvořené listy světlé růžové, ale poté tyto listy přecházejí v tmavě zelenou barvu [1,10].

Hlavními produkty hřebíčku jsou hřebíčkové plody, esenciální oleje z plodů a listů hřebíčku. Plod obsahuje 15 až 20 hmotnostních % esenciálního oleje. Mezi hlavní komponenty hřebíčkového esenciálního oleje patří eugenol (70 - 95 %), eugenol acetát (až 17 %) a β -karyofylen (12 – 15 %) [15, 40].

Esenciální olej hřebíčku je perzistentní, silný a charakteristický svým oděrem. Je to kapalina žluté až žluto-hnědé barvy. V momentě čerstvě vydestilovaného hřebíčkového esenciálního oleje je kapalina světle žlutě zbarvená. Avšak po kontaktu se železem dochází ke změně zbarvení na průhlednou až žluto-hnědou [1, 37].

5.2.1 Získávání hřebíčkového oleje

Hřebíčkové pupeny se sbírají, když dosáhnou své plné velikosti a mají barvu do červena. Po jejich sběru jsou pupeny odděleny od stonků, a to buď ručně, nebo za použití mlátičky. Sušené pupeny jsou obvykle baleny v pytlích a jsou skladovány v čistém, suchém prostoru s dobrou ventilací. Skladování často způsobuje ztrátu oleje odpařováním. Obsah esenciálního oleje a eugenol acetátu mírně klesá s uskladněním delším než 6 měsíců, zatímco obsah eugenolu se zvyšuje [45]. Výnos a kvalita olejů jsou ovlivněny původem, odrůdou, jakostí suroviny, metodou destilace a způsobem ošetření po destilaci. Materiál se destiluje za použití vodní nebo parní destilace po dobu mezi 8 - 24 hodin. Nejvyšší výnos pro získání vysoce kvalitního hřebíčkového oleje je 17 % [45].

Pokud jsou plody hřebíčku destilovány nerozmělněné, tak je produkován esenciální hřebíčkový olej s vysokým obsahem eugenolu. Z rozmělněných plodů hřebíčku je produkován olej s mírně nižším obsahem eugenolu [1, 45].

5.2.2 Využití hřebíčkového oleje

Hřebíčkový esenciální olej není vhodný pro dochucování a to kvůli své výrazné chuti. Vůně oleje je typicky eugenolová. Vyrábí se hlavně pro výrobu eugenolu a karyofylenu [46].

Hřebíčkový olej a především jeho nejdůležitější složka eugenol má antiseptické vlastnosti, a proto bývá využíván při výrobě mýdel, detergentů, zubních past, parfémů a farmaceutických výrobků. Maximální obsah hřebíčkového oleje je 0,25 % v mýdlech, 0,7 % až 1,0 % v parfémech. Vyobrazené balení hřebíčkového esenciálního oleje bez etikety je znázorněno na Obr. 7.

Hřebíčkový olej se velmi často používá při zánětech dutiny ústní a hltanu, je také využíván při lokální anestezii ve stomatologii. Jedná se o antiseptický a prohřívající olej, který podporuje trávení, je protiinfekční v zažívacím a dýchacím ústrojí. Pozitivní účinky má také při únavě, průjmů, chladu, svalových, kloubních a neuralgických bolestech. Používá se pro zmírnění bolesti způsobené revmatismem. Olej je také účinný baktericid a fungicid [46, 47].



Obr. 7. Grafické vyobrazení hřebíčkového EO ve skleněných nádobách a plodů hřebíčku [47].

Předpokládá se, že hřebíček má antioxidační vlastnosti, které mohou neutralizovat volné radikály. Antioxidační aktivita tohoto oleje je však závislá na původu oleje, kvalitě suroviny a způsobu získání oleje z hřebíčku. Obsah antioxidantů se pohybuje v rozmezí 1,4 – 1,8 hmotnostních % [46, 47].

5.3 Skořicový olej

Skořicový esenciální olej je získáván z tropického stromu skořicovníku cejlonského (*Cinnamomum zeylanicum*). Koření skořice je získáváno sušením centrální části kůry. Růst skořicovníku je mnohdy limitován vlhkými nížinatými oblastmi jihovýchodní Asie. Skořice se pěstuje v nadmořské výšce až 500 metrů, kde průměrná teplota je 27 °C a srážky jsou 2000-2400 mm.

Skořicovník dává přednost písčitém typům půdy obohacených o organické látky. Skořice je zařazena do botanické oddělení *Magnoliophyta*, třídy *Magnoliopsida*, řádu *Magnoliales* a čeledi *Lauraceae* [47].

Strom roste do výšky 7 do 10 m a má velmi znatelně žilkované vejčité listy, které jsou tmavě zelené na horní části a světle zelené ze spodní části. Jak listy, tak kůra jsou aromatické. Skořicovník má žluto-bílé květy nepříjemného zápachu, plodem jsou tmavě fialové bobule vejčitého tvaru [1, 10, 41].

Kůra skořice kůra obsahuje asi 9,9 % vody, obsah bílkovin je 4,65 %, obsah sacharidů je 59,55 %. Esenciální olej v kůře tvoří přibližně 2,2 %. Dále jsou zde obsaženy minerální prvky, především vápník (1,6 %), fosfor (0,05 %), sodík (0,01 %), draslík (0,4 %), stopové množství vitamínů (mg / 100 g) a dvě insekticidní sloučeniny (cinnezalin a cinnzelanol).

Skořicový olej je žluté až nahnědlé barvy s poměrně výrazným oděrem. Tento EO obsahuje eugenol (80-88 %), kafr, cinnamaldehyd, acetát kyseliny skořicové, pinen, linalool, eugenol acetát a některé další minoritní složky jako je například fenyl propylacetát, kumaraldehyd nebo kyselina třísllová [47].

5.3.1 Získávání skořicového oleje

Esenciální olej ze skořice může být získáván jak z listů, tak z kůry. Olej z listů skořice je typický hořkým oděrem s lehkým ovocným nádechem, který je charakteristický svoji žluto-hnědou barvou.

Pokud jde o olej získaný z kůry, tak se jedná o olej s výrazným kořenitým oděrem, červeno-hnědé barvy. Olej z kůry skořice se získává pomocí destilace, kde kůra skořice pro získání oleje by neměla být ponechána ve vlhku, protože by mohlo dojít k fermentaci, která přímo ovlivňuje složení oleje [46].

5.3.2 Využití skořicového oleje

Extrakty ze skořice jsou využívány pro své léčivé účinky už tisíce let a to především proti bolesti zubů, infekcím, pro zklidnění podrážděného žaludku, léčbě průjmu a artritidy. V alternativní medicíně a aromaterapii je olej používán k léčbě zánětu průdušek, nachlazení, přetížení, průjmu, edému, chřipky, zažívacích potíží a zvracení. U externích aplikací je silice používána proti bolestem hlavy a bolesti obecně. Extrakt ze skořice je často obsažen v zubních pastách a to nejen kvůli své chuti, ale rovněž kvůli svému antiseptickému působení na viry, bakterie a plísně. Vyobrazené balení skořicového esenciálního oleje bez etikety je znázorněno na Obr. 8 [48].



Obr. 8. Grafické vyobrazení skořicového oleje [48].

Skořicový olej je velmi dobrým a silným antiseptikem. Tento olej obsahuje relativně velké množství fenolických látek (5 - 10 % eugenolu) a mezi esenciálními oleji je považován za jedno z nejsilnějších antivirotik a antiseptik. Dále je skořicový olej vhodný k prevenci onemocnění pankreatu a artritidy [48].

Skořicový olej napomáhá štěpení tuků v trávicím systému, případně podporuje aktivitu trávicích enzymů. Skořice obsahuje látky, které mohou snížit hladinu glukózy v krvi. Skořicový olej má protizánětlivé, antimikrobiální, antioxidační, protinádorové, kardiovaskulární a imunomodulační účinky. *In vitro* studie prokázaly, že skořicový olej může působit jako stimulant buněčného metabolismu glukózy. Studie na zvířatech prokázaly i silné hypoglykemické vlastnosti tohoto esenciálního oleje [10, 48].

5.4 Mátový olej

Máta (rodu *Mentha*) patří do čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*) a zahrnuje 18 různých druhů a 11 hybridů. Je to víceletá rostlina keříčkovitého tvaru, která dorůstá do výšky až 80 cm. Máta má vejčité až eliptické listy, jež jsou zeleně zbarvené (Obr. 9). Ideálním prostředím pro mátu je vlhký slunný nebo polostinný prostor. Máta kvete od července do srpna a to zejména v Evropě a Asii [1, 10].



Obr. 9. Tvar listů máty [45].

Listy a stonky, které obsahují esenciální mátový olej, jsou hojně využívány v lékařství v kosmetice a potravinách. Čerstvé listy máty se podle druhu máty využívají v kuchyni především k ochucování různých omáček, ale i do sladkých pokrmů. Mátový olej je velmi oblíbený k domácí léčbě křečí, nadýmání a trávicích potíží. Mátový olej také může být využitý při revmatických potížích, svědění a bolestech hlavy.

Příkladem některých druhů máty, ze kterých se esenciální olej získává, je máta peprná, máta kadeřavá, máta luční, máta klasnatá, máta čokoládová či máta pomerančová [49].

5.4.1 Získávání mátového oleje

Parní vysokotlaká destilace se často používá pro izolaci esenciálního oleje z máty. Kondenzovaný destilát, skládající se ze směsi vody a oleje, je obvykle oddělen ve skleněné nádobě nebo nově v nádobě z nerezové oceli s jedním výstupem u dna a dalším v horní části nádoby [1, 49].

5.4.2 Využití mátového oleje

Esenciální oleje, jenž obsahují terpenoid mentol, se používají k inhalaci při onemocnění z nachlazení a k aromatizaci žvýkacích gum či ústních vod. Nevýhodou mátového esenciálního oleje může být alergická reakce, která se však vyskytuje velmi vzácně [10, 49].

U kyslíkatých monoterpenů, jako je mentol a alifatické alkoholy (např. linalol) byly zjištěny silné až středně silné inhibiční účinky vůči různým druhům bakterií. Bylo zjištěno, že antimikrobiální aktivita je u těchto alkoholů ovlivněna strukturou molekuly, konkrétně polohou alkoholové funkční skupiny. Například terpinen-4-ol má proti *Pseudomonas aeruginosa* značnou inhibiční aktivitu, zatímco α -terpineol je neaktivní [41, 49].

5.4.3 Máta peprná

Máta peprná (*Mentha piperita*), populární příchuť pro žvýkacích gum, zubní pasty a čaje, se také používá k uklidnění podrážděného žaludku nebo na podporu trávení.

Esenciální olej máty peprné, s jeho hlavní složkou mentolem, je známý svým účinkem na sliznice dýchacích cest. Mentol napomáhá odhlenění, je to uklidňující látka při bolesti v krku (faryngitida) a suchém kašli [50].

Vzhledem k tomu, že má olej uklidňující a znečítlivující účinky, lze jej použít ke zmírnění bolesti hlavy, podráždění kůže, úzkosti spojené s depresí, nevolností, průjmu, menstruačních křečí a nadýmání. Mátový olej se používá k potěrům hrudníku při léčbě příznaků nachlazení. U oleje máty peprné byly *in vitro* prokázány inhibiční účinky vůči některým druhům bakterií, plísní a virů, což naznačuje antibakteriální, antifungální a antivirové vlastnosti [15, 50].

5.4.4 Máta kadeřavá

Máta kadeřavá (*Mentha spicata*) je stále zelená rostlina, která je pěstována napříč celou Evropou a USA. Esenciální olej z máty kadeřavé se extrahuje z kadeřavých listů. Olej má velký potenciál pro aplikaci v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu [51].

Máta kadeřavá se používá jako žaludeční lék, dále proti nadýmání, proti křečím, jako lokální anestetikum, protizánětlivé přírodní léčivo, antibakteriální, antimykotická, antioxidantní a diuretická látka.

Esenciální oleje získané z máty kadeřavé jsou bohaté na karvon, mentol, cineol, linalol, piperiton a piperiton oxid.

Poměrně rozsáhlá studie účinků tohoto oleje byla provedena tureckým farmakologickým a medicínským ústavem v roce 2011. Byly zjištěny významné antimikrobiální účinky máty kadeřavé při testování antimikrobní aktivity oleje *in vitro*. U diskového difúzního testu výsledky ukázaly, že olej z máty kadeřavé má silnou inhibiční aktivitu na *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Na druhé straně ale olej neprokázal antimikrobiální aktivitu u *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterococcus faecalis* [52].

5.4.5 Máta luční

Máta luční (*Mentha arvensis*) je aromatická, vytrvalá, středně vysoká bylina, která byla původně pěstována v Číně, Koreji, Japonsku a Vietnamu. Největší množství mentolu je možné izolovat právě z máty luční, kdy silice obsahuje až 90 % tohoto terpenu [10]. Mezi další složky, které jsou zde obsaženy, se řadí furfural, limonen, piperiton, izomentol nebo izometyl acetát. V podstatě jsou tyto složky obsaženy i u máty peprné, avšak ve stopových množstvích. Jediným rozdílem mezi olejem získaným z máty peprné a olejem získaným z máty luční je mentofuran, který u máty luční není obsažen [53].

Kvůli své hořké pachuti není používán v potravinářství, ale hojně se využívá ve farmacii nebo v kosmetickém průmyslu. Stejně jako u ostatních druhů olejů získaných z rostlin rodu *Mentha*, tak i u EO máty luční byl zjištěn značný antimikrobiální účinek [1, 53].

6 EMULZE

Emulze je termodynamicky nestabilní dvoufázový systém, který je tvořený alespoň dvěma omezeně mísitelnými nebo nemísitelnými kapalinami, kde jedna kapalina je ve formě kapek rozptýlená v druhé kapalině.

Při přípravě emulze je nutná přítomnost látky (emulgačního činidla), která zabraňuje rozpadu daného systému. Dispergovaná kapalina je označována jako vnitřní (diskontinuální) fáze a disperzní médium je označována jako externí (kontinuální) fáze.

Emulze je možno rozdělit podle polaritý disperzního prostředí a dispergované látky to na emulze typu „olej ve vodě“ (o/v) a „voda v oleji“ (v/o). Další variantou je i emulze smíšená, a to „voda v oleji ve vodě“ (v/o/v) nebo „olej ve vodě v oleji“ (o/v/o).

Přímou emulzi typu olej ve vodě (o/v) tvoří organická nepolární látka (tzn. olej) rozptýlená v polárním rozpouštědle (tzn. ve vodě nebo vodném roztoku). Obrácenou emulzí (v/o) se rozumí emulze, u které jsou kapičky vodné fáze rozptýlené v organické fázi nebo-li více polární kapalina je rozprostřena v kapalině méně polární [54].

Během vzniku emulze dochází ke zvětšení plochy fázového rozhraní. K zajištění dostatečné životnosti emulze je zapotřebí ji stabilizovat přidáním příslušných emulgátorů. Emulgátory zajišťují vznik emulze svými fyzikálními a chemickými vlastnostmi a vyznačují se schopností snižovat povrchové napětí mezi vodnou a olejovou fází. Emulgátory zabraňují či zpomalují zánik kapek dispergované fáze takovým způsobem, že na fázovém rozhraní vytváří film, který brání kapkám ve flokulaci a koalescenci. Emulgátory jsou hromaděny na mezifázovém rozhraní kontinuální fáze a kapek, kde dochází k tvorbě elastického filmu.

Molekuly emulgátorů mají amfifilní strukturu, kdy mají jak lipofilní, tak hydrofilní charakter. V emulzích se tyto amfifilní látky orientují na rozhraní mezi polární fází (olej) a fází nepolární (voda) tím způsobem, že hydrofilní (polární) části dané molekuly směřují do vodné fáze a hydrofobní konce daných molekul tvořené převážně mastnými kyselinami směřují do organické fáze. Díky amfifilnímu charakteru molekul dochází ke vzniku orientovaného monomolekulárního nebo vícemolekulárního filmu (stabilizační vrstvy), jež usnadňuje emulgaci a stabilizaci emulze [54, 55].

6.1 Mikroemulze

Termínem mikroemulze se rozumí systémy, jež jsou složené z olejové fáze a vodné fáze, kdy jedna fáze je rozptýlena v druhé fázi tak, aby došlo k vytvoření systému, jehož částice mají velikost řádově v nanometrech.

Mikroemulze jsou čiré roztoky, které jsou termodynamicky stabilní. Jedná se od disperzi vzájemně nemísitelných látek za současného přídátku surfaktantu, který zajistí vzájemné míšení nemísitelných složek [56].

Nemísitelnými látkami je rozuměno olej a voda, které se za nepřítomnosti surfaktantu nemísí. Jedním z hlavních kritérií výběru správné olejové fáze je její schopnost umožnit vysokou rozpustnost ingrediencí lipofilního charakteru. Vhodnou olejovou složkou, která je využívána pro výrobu mikroemulzí, jsou jak nasycené (laurová a myristová), tak nenasyčené kyseliny (linolová nebo linoleová). V praxi je však možné se setkat s použitím esterů mastných kyselin [57].

Vhodným surfaktantem, který je používán pro vznik mikroemulze v/o je takový, který má nízkou hodnotu hydrofilně-lipofilní rovnováhy (HLB). Pro vznik mikroemulze o/v je používán surfaktant, který vykazuje vyšší hodnotu HLB.

Aby vznikla stabilní mikroemulze, je důležité přidat větší množství surfaktantu než u klasické emulze, aby došlo k dostatečnému obalení každé malé kapičky uvnitř disperzního prostředí [56].

7 CÍLE PRÁCE

Jedním z cílů této diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši zaměřenou na esenciální oleje. Větší důraz byl kladen na popis olejů použitých v praktické části této diplomové práce, kdy byla u nich rozebrána nejen jejich antimikrobiální aktivita, ale i další význačné vlastnosti těchto jednotlivých esenciálních olejů. Díky svým vlastnostem, a to především biologické aktivitě, jsou esenciální oleje velice slibnou skupinou látek s možným využitím v oblasti potravinářského, farmaceutického či kosmetického průmyslu.

V praktické části bylo cílem práce studium antimikrobiální aktivity vybraných esenciálních olejů: konopného, hřebíčkového, skořicového a třech mátových olejů (získaných z máty luční, máty kadeřavé a máty peprné). Analýza byla prováděna metodou difúzní a následně také metodou diluční, k níž bylo nutné nejprve připravit stabilní mikroemulze výše jmenovaných olejů. Veškerá získaná data byla následně zpracována formou komentovaných tabulek a grafů, výsledky byly diskutovány a shrnuty formulací závěrů práce.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

8 MATERIÁL, ZAŘÍZENÍ A PŘÍSTROJE

8.1 Použité materiály a chemikálie

Pro srovnání antibakteriálních účinků jednotlivých esenciálních olejů byly použity v této diplomové práci následující oleje:

- skořice kůra (*Cinnamomum zeylanicum*)
 - Nobilis Tilia, Krásná Lípa;
- hřebíček plody (*Syzygium aromaticum*)
 - Nobilis Tilia, Krásná Lípa;
- BIO Máta peprná (BIO *Mentha piperita*)
 - Nobilis Tilia s.r.o., Česká Lípa
 - původem z Indie
- máta kadeřavá (*Mentha spicata*)
 - Nobilis Tilia s.r.o., Česká Lípa
 - původem z Japonska
- máta luční (*Mentha arvensis*)
 - Nobilis Tilia s.r.o., Česká Lípa
 - původem z Nepálu

Mikroemulze obsahující příslušné esenciální oleje byly připraveny za použití následujících chemikálií:

- Tween 20
 - Polyethylenglykol sorbitan monolaurát;
 - Sigma Aldrich;
 - neionický surfaktant;
 - HLB 16.7
- Absolutní ethanol
 - Penta Chrudim;
 - ko-surfaktant

8.2 Přístroje a pomůcky

- Digitální váhy, OHAUS, Švýcarsko
- Laboratorní předvážky KERN

- Chladnička Elektrolux
- Vortex třepačka, Heidolph REAX Top, Německo
- Flow box Hera Safe, Thermo Scientific, Německo
- Microplate reader Benchmark, Bio-Rad, Velká Británie
- Spektrofotometr Sunrise, software Magellan, Tecan, Německo
- Memmert termostat (Verkon, Německo)
- Mikrotitrační destička
- Vertikální autokláv, Tuttnauer, Holandsko
- Stericell sterilizátor, BMT Medical Technology, Brno, Česká republika
- Automatické pipety Biohit a Nichipet ex.
- Automatické mikropipety Biohit
- Hamillton mikrostříkačka o objemu 1 ml
- Biologický termostat Memert INE 600
- Plynový kahan
- Laboratorní plastové pomůcky (tzn. očkovací kličky, Petriho misky, mikrotitrační destičky, špičky pro automatické pipety, zkumavky, stříkačky, stojany)
- Laboratorní sklo (pipety, kádinky, zkumavky, odměrné nádoby, Petriho misky)
- Papírové disky získané z filtračního materiálu
- Stříkačkové filtry o velikosti pórů filtru 0.22 μm , Millipore, Velká Británie
- Ostatní běžně používané laboratorní vybavení a pomůcky.

8.3 Kultivační média

Během praktické části diplomové práce byla použita kultivační média vhodná pro růst mikroorganismů zvolených pro praktickou část diplomové práce. Výčet těchto kultivačních médií je uveden v následujících podkapitolách.

8.3.1 Fyziologický roztok

V experimentální části diplomové práce byl použit fyziologický roztok pro přípravu kalibrovaných suspenzí mikroorganismů, které byly využity při testech inhibičních účinků esenciálních olejů. Složení fyziologického roztoku je uvedeno v Tab. 2. Fyziologický roztok byl následně rozpipetován do skleněných zkumavek a sterilizován v autoklávu.

Tab. 1. *Hmotnostní složení fyziologického roztoku.*

Obsažená složka	Hmotnost [g]
Chlorid sodný	4,3
Destilovaná voda	500,0

8.3.2 Masopeptonový agar

Masopeptonový agar (MPA) byl používán pro uchování zásobních kultur použitých bakteriálních kmenů. Složení agaru je uvedeno v Tab. 2.

Jednotlivé složky média byly naváženy a rozpuštěny ve 400 ml destilované vody. Obsažená směs byla dostatečně promíchána a poté ponechána sterilizovat v autoklávu při teplotě 132 °C po dobu 20 minut. Nakonec byl takto připravený MPA rozlit do skleněných sterilních Petriho misek.

Tab. 2. *Hmotnostní složení předem připravené směsi MPA.*

Obsažená složka	Hmotnost [g]
Agar	6,0
Pepton	2,0
Beef Extract	1,2
Chlorid sodný	1,2
Destilovaná voda	400,0

8.3.3 Masopeptonový bujón

Masopeptonový bujón (MPB) byl použit pro testování antimikrobiální aktivity esenciálních olejů diluční metodou. Složení MPB je uvedeno v Tab. 3. Jednotlivé složky byly naváženy, rozpuštěny v destilované vodě a rozpipetovány do skleněných zkumavek, které byly zazátkovány a ponechány sterilizovat v autoklávu při teplotě 132 °C po dobu 15 minut.

Tab. 3. Hmotnostní složení MPB.

Obsažená složka	Hmotnost [g]
Pepton	2,0
Beef Extract	1,2
Chlorid sodný	1,2
Destilovaná voda	400,0

8.3.4 Mueller Hinton Agar

Tato půda byla použita pro diskovou difúzní metodu stanovení inhibiční aktivity esenciálních olejů. Složení Mueller Hinton Agarů je uvedeno v Tab. 4.

Médium bylo sterilizováno při teplotě 132 °C po dobu 20 minut v autoklávu. Poté byl Mueller Hinton Agar (MHA) rozlit do skleněných sterilních Petriho misek.

Tab. 4. Hmotnostní složení MHA.

Obsažená složka	Hmotnost [g]
Hovězí masová infuze	120,0
Hydrolyzát kaseinu - kyselý	7,0
Škrob	0,6
Agar	6,8
Destilovaná voda	400,0

8.4 Použité mikroorganismy

Antimikrobiální aktivita esenciálních olejů byla hodnocena na základě růstu mikroorganismů v přítomnosti esenciálních olejů za využití diluční a difúzní metody.

Pro stanovení antimikrobiální aktivity olejů byly využity bakterie jak grampozitivní, tak gramnegativní, které jsou uvedeny v seznamu níže. Zásobní kultury bakterií byly uchovávány na masopeptonovém agarů na skleněných Petriho miskách při teplotě 4 ± 2 °C.

Grampozitivní bakterie:

- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953
- *Bacillus cereus* CCM 2010
- *Bacillus subtilis* susp. *spizizenii* CCM 4062
- *Micrococcus luteus* CCM 732

Gramnegativní:

- *Pseudomonas fluorescens* CCM 1969
- *Escherichia coli* CCM 3954
- *Citrobacter freundii* CCM 7187
- *Salmonella enterica* ssp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420
- *Serratia marcescens* CCM 303
- *Enterococcus faecalis* CCM 3954

9 METODIKA

Experimentální část této diplomové práce je tvořena dvěma částmi. V první části byla pomocí difúzní diskové metody sledována schopnost jednotlivých EO inhibovat růst vybraných mikroorganismů. Použity byly neředěné oleje a oleje ředěné v etanolu.

V druhé části této diplomové práce byla směřována pozornost na antimikrobiální aktivitu mikroemulzí obsahujících studované esenciální oleje. K tomu byla využita metoda diluční za použití mikrotitračních destiček.

9.1 Příprava bakteriální suspenze

Zásobní kultury mikroorganismů byly připraveny přeočkováním zmražených kultur na pevnou masopeptonovou agarovou půdu na Petriho miskách. Následně byly bakterie ponechány kultivovat při 30 °C nebo při 37 °C po dobu 24 hodin dle teplotního optima daného mikroorganismu:

30 °C:

- *Bacillus cereus* CCM 2010
- *Pseudomonas fluorescens* CCM 1969
- *Bacillus subtilis* susp. *spizizenii* CCM 4062

37 °C:

- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953
- *Micrococcus luteus* CCM 732
- *Escherichia coli* CCM 3954
- *Citrobacter freundii* CCM 7187
- *Salmonella enterica* ssp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420
- *Serratia marcescens* CCM 303
- *Enterococcus faecalis* CCM 3954

Ze zásobních kultur byly připraveny kalibrované suspenze mikroorganismů přenesením inokula do zkumavek se sterilním fyziologickým roztokem. Suspenze byly upraveny tak,

aby počet mikrobiálních buněk v suspenzi odpovídal 1. stupni McFarlandovy zákalové stupnice.

9.2 Příprava roztoků esenciálních olejů

Jednotlivé esenciální oleje byly ředěny etanolem takovým způsobem, aby bylo dosaženo požadovaného poměru. Pipetované množství je uvedeno v tabulce 5.

Tab. 5. Pipetované množství látek při přípravě roztoků esenciálních olejů.

Poměr EO:etanol	Objem oleje [μ l]	Objem etanolu [μ l]
Neředěný EO	100	0
3:1	75	25

9.3 Difúzní metoda

Disková difúzní metoda je jedna z nejstarších metod stanovení citlivosti mikroorganismů vůči antibiotikům, esenciálním olejům či jiným antimikrobiálním látkám. Při této metodě je do sterilních Petriho misek aplikováno horké médium, které po zchladnutí ztuhne v agarovou půdu (nejčastěji používaný je Mueller Hinton agar).

Následně jsou misky s agarem inokulovány zvolenými mikroorganismy. Aplikace inokula může být různého charakteru a to buď aplikace přesně daného objemu inokula mikropipetou a následné rozhokeyování po celé agarové ploše (viz tato diplomová práce) nebo může být použit tampon na tyčince, který je namočen do suspenze mikroorganismů a následně jsou mikroorganismy tamponem rozetřeny po agarové půdě. Nevýhodou druhé možnosti je nepřesné množství inokula na agarových půdách.

Na každou agarovou plotnu bylo v této diplomové práci aplikováno mikropipetou 100 μ l mikrobiálního inokula (kalibrované suspenze). Po zaschnutí inokula na agarových plotnách dochází k aplikaci disků buď sterilní jehlou nebo sterilní pinzetou tak, aby byly disky rovnoměrně rozmístěné a aby byl dostatek prostoru pro vytvoření inhibiční zóny kolem disků.

Následně bylo na disky pipetováno potřebné množství esenciálních olejů za pomoci mikropipety. Na jednotlivé disky byl pipetován neředěný esenciální olej, EO ředěný etanolem (3:1). Na kontrolní disky byl pipetován samotný etanol a demineralizovaná voda.

Zaočkované misky byly kultivovány 24 hodin v termostatu při teplotě zvolené podle druhu mikroorganismu. Po uplynulém čase byly odečítány výsledky pomocí měření průměru inhibiční zóny. Základem metody je difúze testované látky z disku do okolního média. Pokud je na tuto látku naočkovaný mikroorganismus citlivý, dojde kolem disku k vytvoření radiální inhibiční zóny, tedy zóny bez nárůstu buněk.

9.4 Příprava mikroemulzí jednotlivých esenciálních olejů

V diplomové práci bylo použito šest esenciálních olejů, které byly použity pro přípravu mikroemulzí. Tyto mikroemulze obsahovaly nejen esenciální olej, ale i surfaktant Tween 20 a denaturovaný etanol jako ko-surfaktant. Tenzid Tween 20 je schopen velmi dobře tvořit emulze typu olej ve vodě (o/v) a to díky své hodnotě HLB, která odpovídá 16,7. Vodnou fázi tvořila při přípravě emulzí demineralizovaná voda.

Složení jednotlivých mikroemulzí je uvedeno v Tab. 6. K naváženému množství oleje a etanolu bylo přidáno příslušné množství Tweenu 20 a roztok byl důkladně míchán na Vortexu. Následně byla k roztoku přidána voda. Takto připravená mikroemulze byla sterilizována filtrací pomocí stříkačkových filtrů o porozitě 0,22 μm . Stabilní mikroemulze jsou homogenní a čiré. Pro přípravu stabilních mikroemulzí některých olejů byl nutný vyšší přírůstek surfaktantu (Tab. 6).

Tab. 6. Kvantitativní a kvalitativní složení mikroemulzí..

Mikroemulze z EO	Množství oleje [g]	Množství etanolu [g]	Množství surfaktantu [g]	Množství vody [g]
Hřebíček plody	0,1	0,1	0,8	9,0
Máta kadeřavá	0,1	0,1	0,9	9,0
Konopný olej	0,1	0,1	0,8	9,0
Skořice kůra	0,1	0,1	0,9	9,0
BIO m. pepřná	0,1	0,1	0,8	9,0
Máta luční	0,1	0,1	0,8	9,0

9.5 Mikrodiluční metoda stanovení antibakteriální aktivity EO

Diluční metody se řadí mezi kvantitativní metody, kterými je možné stanovit minimální inhibiční koncentraci (MIC), tedy nejnižší koncentraci antimikrobiální látky, která inhibuje růst testovaného mikroorganismu. V předkládané diplomové práci byla zvolena tzv. mikrodiluční metoda využívající mikrotitrační destičky s 96 jamkami.

Pro sledování antimikrobiální aktivity zvolených esenciálních olejů byly připraveny mikroemulze ředěné kultivačním médiem MPB. Testovaná ředění jsou uvedena v Tab. 7.

Tab. 7. Zásobní roztoky mikroemulzí s MPB.

Poměr ME:MPB	Mikroemulze [ml]	MPB [ml]
1:1	1,500	1,500
1:4	0,750	2,250
1:7	0,375	2,625

Následně došlo k rozpipetování takto připravených ředění do jamek mikrotitrační destičky. Do každé jamky bylo pipetováno 200 μ l média s mikroemulzí. Do prvního řádku bylo pipetováno čisté médium MPB, tyto jamky sloužily jako pozitivní kontrola. Do druhého řádku byla pipetována čistá mikroemulze testovaného oleje a následně do dalších řádků byly pipetovány mikroemulze v různém ředění. Pro každé ředění mikroemulze byly na destičce vyhrazeny dvě řady jamek, každá po dvanácti.

Poté byly jednotlivé jamky zaočkovány kalibrovanou suspenzí jednotlivých mikroorganismů a to tak že pro každý mikroorganismus byly vyhrazeny dva sloupce dané destičky (8 jamek). První a druhý sloupec každé destičky zůstal nezačkován a sloužil jako negativní kontrola. Suspenze mikroorganismů byly do jamek pipetovány v objemu 5 μ l.

Takto připravené mikrotitrační destičky byly kultivovány v termostatu při 30 nebo 37°C po dobu 24 hodin. Po skončení kultivace byla pomocí spektrofotometru měřena optická denzita v jednotlivých jamkách. Vlnová délka pro měření denzity byla 660 nm.

Výsledky byly vyjádřeny jako index růstu (%), který byl vypočten pro jednotlivé jamky podle následujícího vztahu.

$$IR = 100 - \left(\frac{OD_x}{OD_{PK} - OD_{NK}} \cdot 100 \right) \quad (1)$$

Kde:

IR – index růstu [%]

OD₆₆₀ – hodnota optické denzity suspenze v médiu s přídavkem mikroemulze

OD_{PK} – hodnota optické denzity pozitivní kontroly

OD_{NK} – hodnota optické denzity negativní kontroly

10 VÝSLEDKY A DISKUZE

Esenciální oleje získané z rostlin často vykazují biologickou aktivitu, antibakteriální, antifungální, antivirové, insekticidní a antioxidační vlastnosti [58, 59]. U esenciálních olejů byla popsána antimikrobiální aktivita proti různým druhům mikroorganismů, grampozitivním a gramnegativním bakteriím, jakož i proti kvasinkám, plísním a virům.

Cílem práce bylo zhodnotit antibakteriální aktivitu pěti esenciálních olejů a pro tuto práci byly zvoleny čtyři druhy grampozitivních a šest druhů gramnegativních bakterií významných v potravinářském a kosmetickém průmyslu.

Antimikrobiální aktivita EO byla sledována pomocí difúzní diskové metody a mikrodiluční metody. V následujícím textu jsou nejprve uvedeny výsledky získané diskovou metodou, a poté jsou popsány výsledky získané mikrodiluční metodou.

10.1 Difúzní metoda

10.1.1 Vliv esenciálních olejů na růst grampozitivních bakterií

Schopnost esenciálních olejů inhibovat růst grampozitivních bakterií byla hodnocena měřením průměru vzniklých inhibičních zón. Hodnoty naměřené pro jednotlivé mikroorganismy a různá ředění esenciálních olejů jsou uvedeny v Tab. 8.

Po provedení diskové difúzní metody bylo zjištěno, že žádný z použitých esenciálních olejů nepůsobí významně inhibičně na všechny použité grampozitivní mikroorganismy, a to ani v neředěné formě. Na základě naměřených inhibičních zón, které jsou uvedeny v tabulce 8 lze soudit, že největší inhibiční účinek měl esenciální olej z kůry skořice a poté olej získaný z máty kadeřavé.

Nejvyšší naměřené hodnoty u esenciálních olejů jsou v tabulce barevně zvýrazněny. Ostatní esenciální oleje měly inhibiční zónu větší než 0,9 cm, což značilo, že alespoň nějaký prokazatelný inhibiční účinek každý z esenciálních olejů měl.

Jediným případem, kde nebyla zjištěna žádná inhibiční zóna byl konopný olej v případě mikroorganismu *Micrococcus luteus* CCM 732.

Tab. 8 Vliv esenciálních olejů na růst grampozitivních bakterií.

Zkoumaný mikroorganismus	Poměr EO:Etanol	Velikost inhibiční zóny [cm]					
		KON	MK	ML	BMP	HP	SK
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953	1:0	1,0	1,9	1,3	1,5	1,3	2,5
	3:1	1,1	1,6	1,2	1,5	1,1	2,4
<i>Bacillus cereus</i> CCM 2010	1:0	1,2	1,8	1,1	1,0	1,1	1,7
	3:1	1,1	1,6	1,0	1,4	1,0	1,5
<i>Bacillus subtilis</i> susp. <i>spizizenii</i> CCM 4062	1:0	1,0	1,3	1,2	1,3	1,1	1,7
	3:1	0,9	1,1	1,2	1,1	1,1	1,6
<i>Micrococcus luteus</i> CCM 732	1:0	-	1,1	1,6	1,1	1,4	2,0
	3:1	-	1,0	1,4	1,2	1,3	1,9

Kde:

KON – konopný olej

MK – máta kadeřavá

ML – máta luční

BMP – Bio máta peprná

HP – hřebíček plody

SK – skořice kůra

Dále je z naměřených výsledků patrné, že velikost inhibiční zóny u ředěných olejů byla menší než u EO, které byly na disky aplikovány v neředěné formě. Rozdíly ve velikosti zón však nebyly příliš velké.

Nejvýraznější inhibiční účinky je možné pozorovat u esenciálního oleje z kůry skořice u mikroorganismů *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 a u *Micrococcus luteus* CCM 732. U ostatních testovaných mikroorganismů byla také naměřena určitá inhibiční zóna, ale nikoliv tak výrazná. U esenciálního oleje z máty kadeřavé byla naměřena největší inhibiční zóna u mikroorganismu *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 a u *Bacillus cereus* CCM 2010. U ostatních mikroorganismů byl taktéž pozorován vznik inhibičních zón kolem disků s olejem, ale tyto zóny nebyly zdaleka tak výrazné.

10.1.2 Vliv esenciálních olejů na růst gramnegativních bakterií

Výsledky získané diskovou difúzní metodou pro gramnegativní bakterie jsou uvedeny v tabulce 9. Stejně jako u grampozitivních bakterií bylo i zde měly jednotlivé oleje rozdílné inhibiční účinky na různé druhy gramnegativních bakterií, které byly pro praktickou část vybrány.

Nejvyšší inhibiční účinky vykazoval esenciální olej z kůry skořice, který působil velmi inhibičně na většinu použitých gramnegativních mikroorganismů. Inhibiční zóny větší než 1,8 cm byly zaznamenány u bakterií *Citrobacter freundii* CCM 7187, *Salmonella enterica* ssp. *enterica* CCM 4420, *Enterococcus faecalis* CCM 3954 a na *Serratia marcescens* CCM 303. V případě *Pseudomonas fluorescens* CCM 1969 došlo k také inhibici růstu tohoto mikroorganismu, avšak ne tak výrazné jako tomu bylo u zbývajících bakterií.

Tab. 9 Působení esenciálních olejů na gramnegativní bakterie.

Zkoumaný mikroorganismus	Poměr EO:Etanol	Inhibiční zóna kolem esenciálního oleje [cm]					
		KON	MK	ML	BMP	HP	SK
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CCM 1969	1:0	-	0,7	-	1,4	1,6	1,4
	3:1	-	-	-	1,4	1,3	1,4
<i>Citrobacter freundii</i> CCM 7187	1:0	-	1,3	1,5	2,2	1,5	2,4
	3:1	-	1,2	1,3	2,2	1,3	2,2
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> CCM 4420	1:0	-	1,4	1,4	2,3	1,4	2,2
	3:1	-	1,2	1,3	2,2	1,3	2,2
<i>Serratia marcescens</i> CCM 303	1:0	-	1,7	1,1	1,9	1,1	1,9
	3:1	-	1,4	1,1	1,8	1,1	1,8
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 3954	1:0	-	1,1	0,8	2,2	0,8	2,2
	3:1	-	1,1	0,8	2,0	0,8	2,2

Kde:

KON – konopný olej

MK – máta kadeřavá

ML – máta luční

BMP – Bio máta peprná

HP – hřebíček plody

SK – skořice kůra

Značné inhibiční účinky vykazoval taktéž esenciální olej získaný z máty luční, který na většinu gramnegativních bakterií působil antibakteriálně. Nejvyšší inhibice byla naměřena u *Salmonella enterica* ssp. *enterica* CCM 4420, poté u *Citrobacter freundii* CCM 7187, *Enterococcus faecalis* CCM 3954 a následně u *Serratia marcescens* CCM 303. Podstatně menší inhibiční zóna byla naměřena u *Pseudomonas fluorescens* CCM 1969.

Nejnižší inhibiční aktivita byla zjištěna u konopného oleje, který u žádné z gramnegativních bakterií nevykazoval žádné známky inhibice růstu testovaných mikroorganismů. Podstatně lépe na tom byl esenciální olej získaný z máty luční a z máty kadeřavé. Kultury, u kterých byly naměřeny nejvyšší hodnoty průměru inhibičních zón pro daný olej, jsou opět v tabulce barevně zvýrazněny.

10.2 Mikrodiluční metoda u grampozitivních mikroorganismů

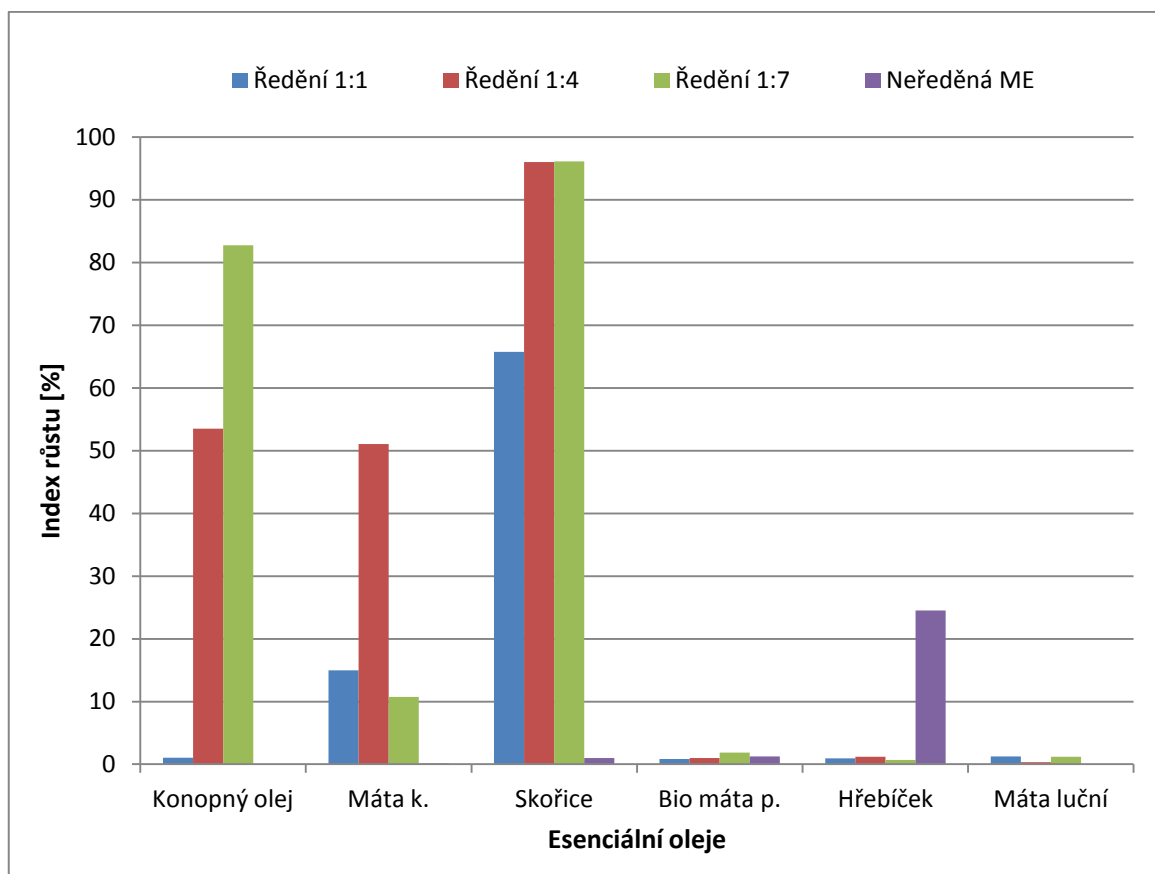
10.2.1 Vliv esenciálních olejů na růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953

Na obrázku 1 je graficky znázorněn vliv mikroemulzí s přidavkem esenciálních olejů na růst *S. aureus*. Z obrázku je patrné, že největšího inhibičního účinku bylo dosaženo u esenciálního oleje máty luční a esenciálního oleje máty peprné v biokvalitě. Mikroemulze těchto olejů ve všech testovaných ředěních způsobily téměř kompletní inhibici růstu *S. aureus* a hodnoty indexu růstu nepřesáhly 2 %.

Obdobné inhibiční účinky měl i hřebíčkový olej, o něco vyšší index růstu byl zaznamenán u tohoto oleje v neředěné mikroemulzi (IR 24,51 %).

Esenciální oleje z máty peprné, máty kadeřavé a hřebíčkový olej lze tedy označit za oleje s vysokou antibakteriální aktivitou vůči *S. aureus*. Citlivost této bakterie k esenciálnímu oleji máty peprné a máty luční byla popsána i ve studii vypracované na půdě centra pro výzkum aromatických a léčivých rostlin [61].

S. aureus se však zdá být velmi odolný vůči působení skořicového oleje. Velmi nízká inhibice byla patrná u skořicového oleje, který pouze při zředění 1:1 (ME:MPB) vykazoval 65,75 %. Při ostatních testovaných ředěních mikroemulze byla inhibice *S. aureus* minimální s indexem růstu okolo 96 %. O něco nižší index růstu než skořicový olej vykazoval konopný olej a poté olej z máty kadeřavé.



Obr. 10 Vliv mikroemulzí esenciálních olejů na růst *Staphylococcus aureus subsp. aureus* CCM 3953.

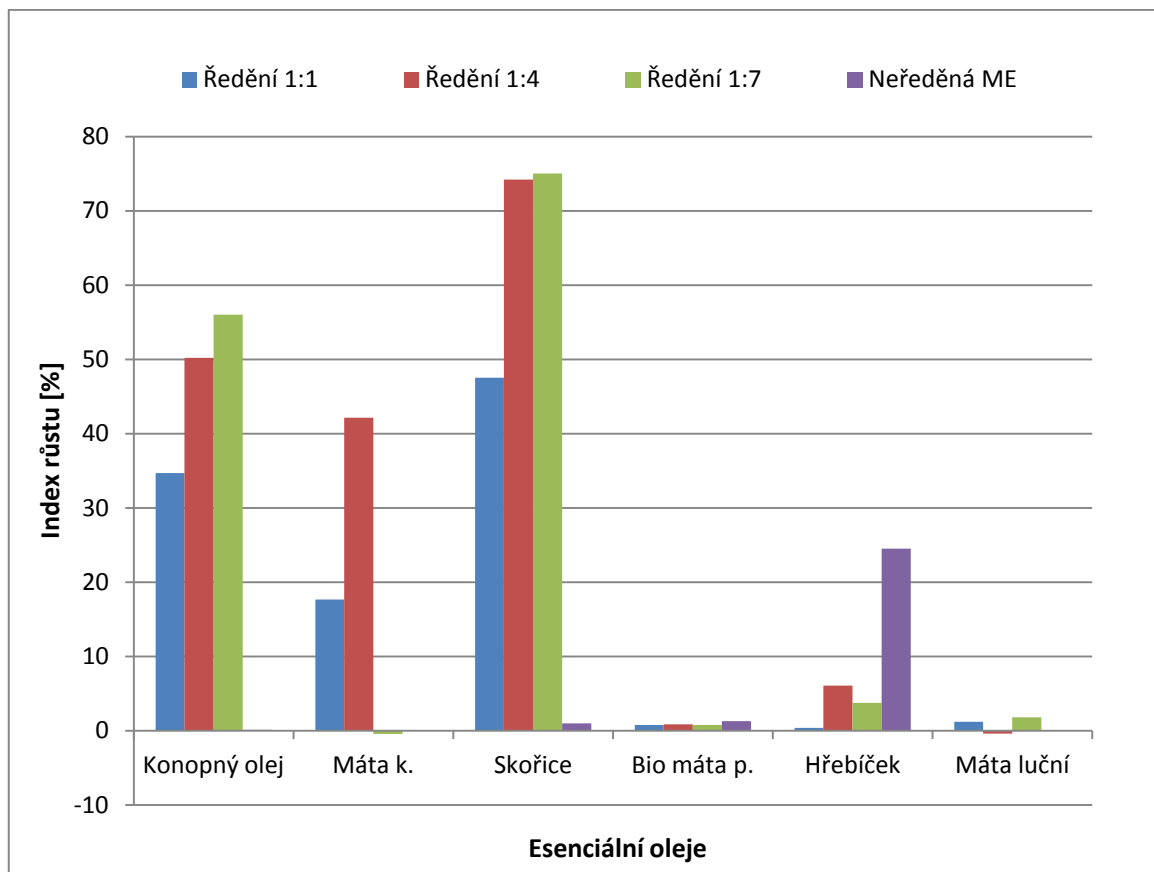
10.2.2 Vliv esenciálních olejů na růst *Bacillus cereus* CCM 2010

Stejně jako tomu bylo u *S. aureus*, i u další grampozitivní bakterie *B. cereus* byly výrazné inhibiční účinky pozorovány u mikroemulzí s přidavkem esenciálního oleje máty luční a máty peprné. Výsledky jsou graficky zpracovány na obrázku 11.

Velmi dobrá inhibiční účinnost se projevila taktéž u hřebíčkového oleje, který vykazoval ve formě mikroemulze velmi dobrou inhibici *B. cereus*.

Podstatně nižší inhibiční účinky byly prokázány u esenciálního oleje z máty kadeřavé, následně u konopného a skořicového oleje.

I u této grampozitivní bakterie byly tedy nejúčinnější mikroemulze s mátovými oleji a olejem hřebíčku, zatímco nižší citlivost bakterie byla zaznamenána u oleje skořicového, konopného a oleje z máty kadeřavé.



Obr. 11 Vliv mikroemulzí esenciálních olejů na růst *Bacillus cereus* CCM 2010.

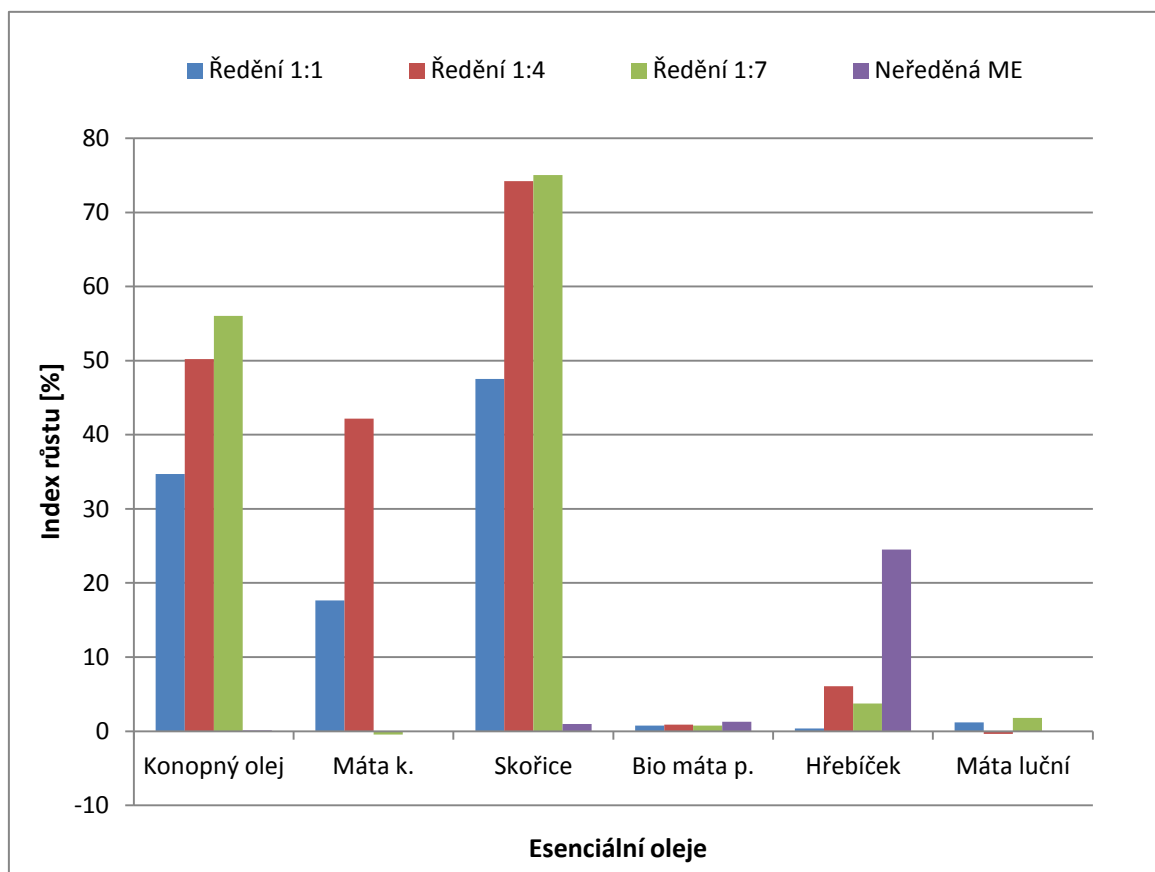
Bacillus cereus je významnou kontaminantou potravin i kosmetiky. Díky schopnosti tvorby odolných endospor jej lze zařadit mezi relativně odolné bakteriální druhy. V citlivosti k antimikrobiálním látkám se však jednotlivé druhy v rámci rodu *Bacillus* mohou významně lišit. V následující podkapitole jsou uvedeny výsledky získané pro *Bacillus subtilis* [61, 62].

10.2.3 Vliv esenciálních olejů na růst *Bacillus subtilis* susp. spizizenii CCM 4062

Na obrázku 12 je graficky znázorněno inhibiční působení esenciálních olejů na bakterii *Bacillus subtilis* susp. spizizenii CCM 4062. Největší inhibiční účinek byl pozorován u mikroemulze obsahující olej máty peprné, velmi účinné byly i mikroemulze hřebíčkového oleje. U obou těchto olejů byla pozorována téměř úplná inhibice růstu této bakterie a hodnoty indexu růstu s výjimkou jednoho ředění hřebíčkového oleje nepřesáhly 2,5 %. Podstatně vyšší index růstu byl zaznamenán u esenciálního oleje z máty luční, máty kadeřavé, konopného oleje a skořicového oleje.

Stejně jako u ostatních testovaných grampozitivních bakterií, i u *B. subtilis* měly největší inhibiční vliv mikroemulze obsahující EO máty peprné a EO hřebíčku. U této grampoziti-

tivní bakterie však nebyl pozorován tak výrazný účinek ostatních mátových olejů, tedy EO máty luční a EO máty kadeřavé. *B. subtilis* byl vůči působení mikroemulzí s EO odolnější než druhý testovaný druh rodu *Bacillus*, *B. cereus*. Lze tedy konstatovat, že míra citlivosti či rezistence k určitým esenciálním olejům je druhově závislá a může se lišit i u zástupců jednoho rodu. Rozdílná účinnost určitého EO na různé druhy téhož rodu, a dokonce i na různé kmeny v rámci jednoho druhu, byla popsána i v odborné literatuře [1].

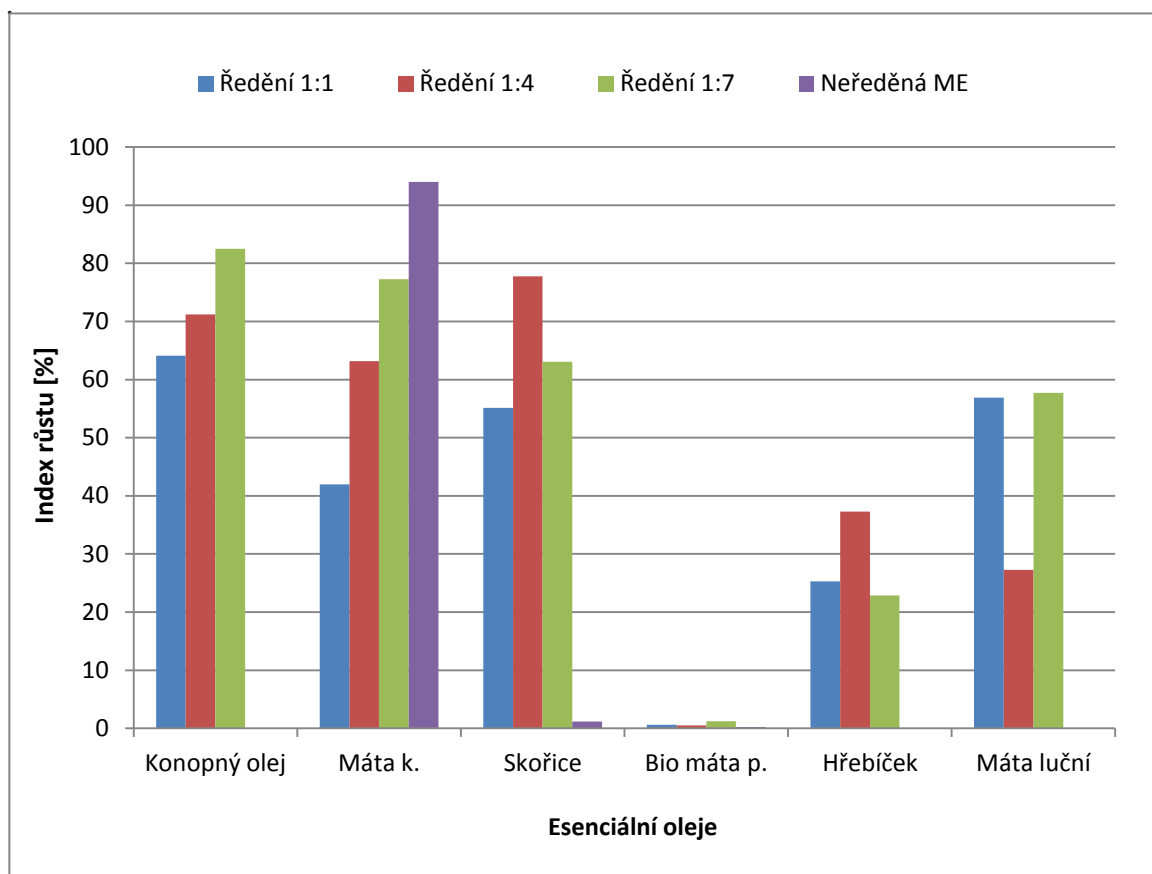


Obr. 12 Vliv mikroemulzí esenciálních olejů na růst *Bacillus subtilis* susp. spizienii CCM 4062.

10.2.4 Vliv esenciálních olejů na růst *Micrococcus luteus* CCM 732

Poslední testovanou grampozitivní bakterií je *Micrococcus luteus*. *Micrococcus spp.* a úzce příbuzné rody jsou obecně považovány za neškodné saprofyty při osídlování kůže či sliznice, nicméně mohou být také oportunními patogeny. Významné jsou mikrokoky zejména z hlediska bezpečnosti kosmetických prostředků, a to díky tomu, že společně se stafylokoky tvoří dominantní složku mikroflóry kůže [63].

Na základě grafu, který je vyobrazen na obrázku č. 13, je patrné, že esenciální olej, který nejvíce inhibuje růst *M. luteus* je olej máty peprné. V přítomnosti mikroemulze tohoto oleje mikrokoky prakticky nerostou, a to dokonce ani při nejvyšším ředění.



Obr. 13. Vliv mikroemulzí esenciálních olejů na růst *Micrococcus luteus* CCM 732.

Inhibice růstu *M. luteus* byla pozorována i v případě mikroemulze s hřebíčkovým olejem, kdy se hodnota indexu růstu pohybuje u všech testovaných ředění mezi 20 – 60 %. I u této bakterie byla sledována významně odlišná inhibiční aktivita různých mátových olejů. EO máty peprné působí téměř kompletní inhibici růstu, u EO máty luční neklesla hodnota indexu růstu pod 50 % a nejmenší antimikrobní působení vykazoval EO máty kadeřavé.

V případě konopného oleje a máty kadeřavé dochází se zvyšujícím se ředěním mikroemulzí MPB médiem k rostoucímu nárůstu bakterií, kdy u konopného oleje při zředění 1:7 dochází k nárůstu až 70,59 %. V porovnání s ostatními grampozitivními bakteriemi se jeví *Micrococcus luteus* CCM 732 jako nejodolnější k mikroemulzím esenciálních olejů.

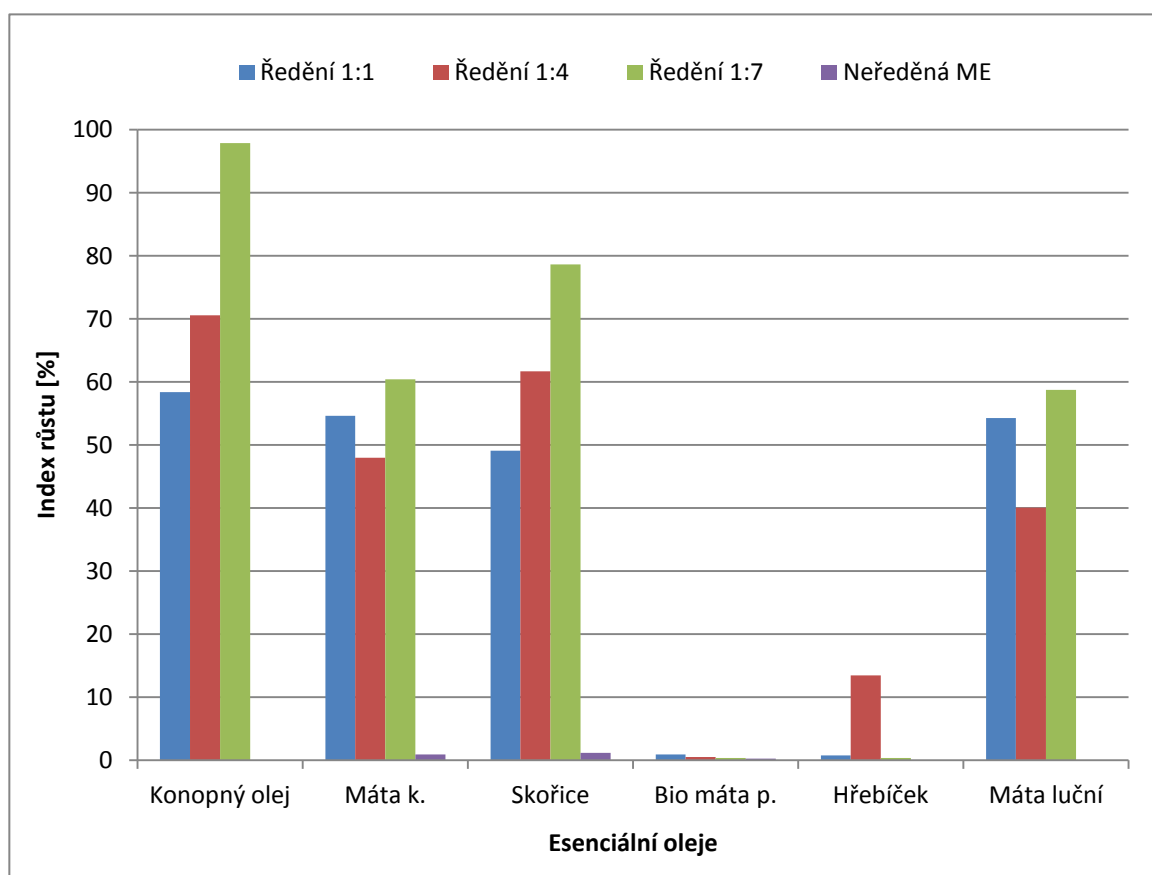
Výsledky získané pro grampozitivní bakterie lze shrnout konstatováním, že tyto bakterie jsou citlivé na přítomnost esenciálních olejů ve formě mikroemulze. Nejúčinnější jsou ole-

je mátové a olej z plodů hřebíčku. Tyto oleje by tedy mohly být využity jako ingredience kosmetických prostředků, které by přispěly k celkově vyšší antimikrobiální ochraně kosmetiky.

10.3 Mikrodiluční metoda u gramnegativních mikroorganismů

10.3.1 Vliv esenciálních olejů na růst *Citrobacter freundii*

Z grafu na obr. 14 je evidentní, že největší inhibice bakterie *Citrobacter freundii* CCM 7187 byla naměřena u mikroemulze mátového oleje, kde se index růstu blížil i při největším zředění nulovým hodnotám. Velmi podobných výsledků bylo dosaženo u hřebíčkového oleje, kde pouze u ředění 1:4 byl zjištěn mírný růst *C. freundii* a index růstu byl 13,48 %. U dalších ředění hřebíčkového oleje byl index růstu blízký nulovým hodnotám.



Obr. 14. Vliv mikroemulzí esenciálních olejů na růst *Citrobacter freundii* CCM 7187.

Citrobacter freundii CM 7187 vykazoval vyšší index růstu u esenciálního oleje získaného z máty luční, máty kadeřavé, skořice kůry a nejvyšší index růstu u konopného oleje.

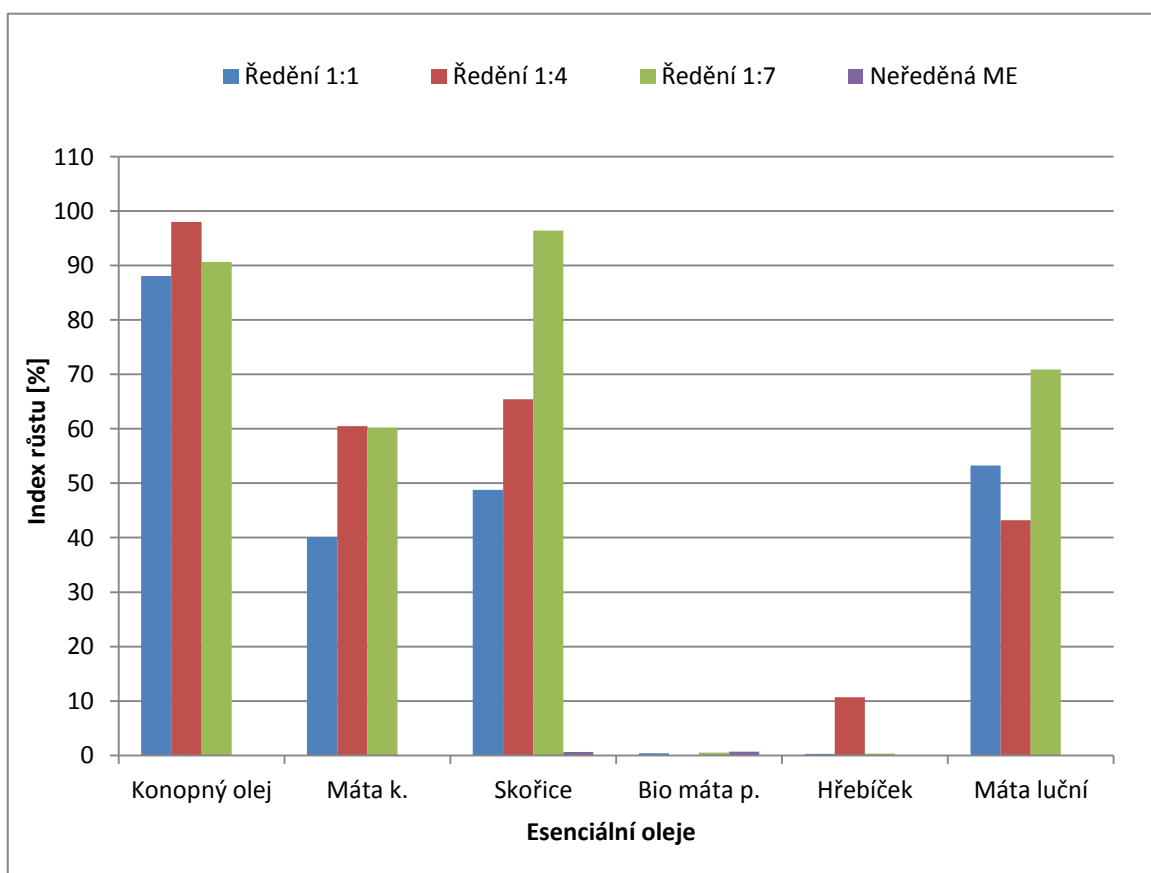
U těchto čtyř zmiňovaných olejů byl nejvyšší index růstu u zředění 1:7 (EO:MPB). To znamená, že u velkého zředění mikroemulzí esenciálních olejů byly bakterie inhibovány méně.

10.3.2 Vliv esenciálních olejů na růst *Escherichia coli* CCM 3954

Escherichia coli je zcela běžný komenzál tlustého střeva. Při fekálním znečištění putuje do vody, kde může přežít až řadu týdnů. *E. coli* slouží jako jeden z nejběžnějších indikátorů fekální kontaminace vody a je významnou kontaminantou potravin i kosmetických prostředků.

Správná hygienická a bezpečná manipulace s potravinami, kosmetickými prostředky či farmaky, stejně tak správně zvolený inhibiční prostředek, jsou klíčem k prevenci šíření *E. coli* [62].

Na obrázku č. 15, který znázorňuje inhibiční vliv mikroemulzí získaných ze šesti druhů esenciálních olejů, je patrné, že nejúčinnějším olejem schopným bránit růstu *E. coli* je olej máty peprné, velmi účinný je i hřebíčkový olej.



Obr. 15. Vliv mikroemulzí esenciálních olejů na růst *Escherichia coli* CCM

V přítomnosti mikroemulze EO máty peprné je růst této bakterie prakticky úplně potlačen, a to ve všech testovaných ředěních.

U hřebíčkového oleje bylo dosaženo obdobných výsledků jako je tomu u EO máty peprné. V případě hřebíčkového oleje dochází k nárůstu mikroorganismů při koncentraci mikroemulze:MPB v poměru 1:4. U konopného oleje nebyl pozorován téměř žádný inhibiční účinek, u ostatních olejů byla prokázána pouze částečná inhibice růstu *E.coli*, a to především v nižších ředění mikroemulze.

U této gramnegativní bakterie byl stejně jako u všech bakterií grampozitivních pozorován výrazný antibakteriální účinek mikroemulze s EO máty peprné. Zdá se tedy, že spektrum účinku tohoto oleje je poměrně široké.

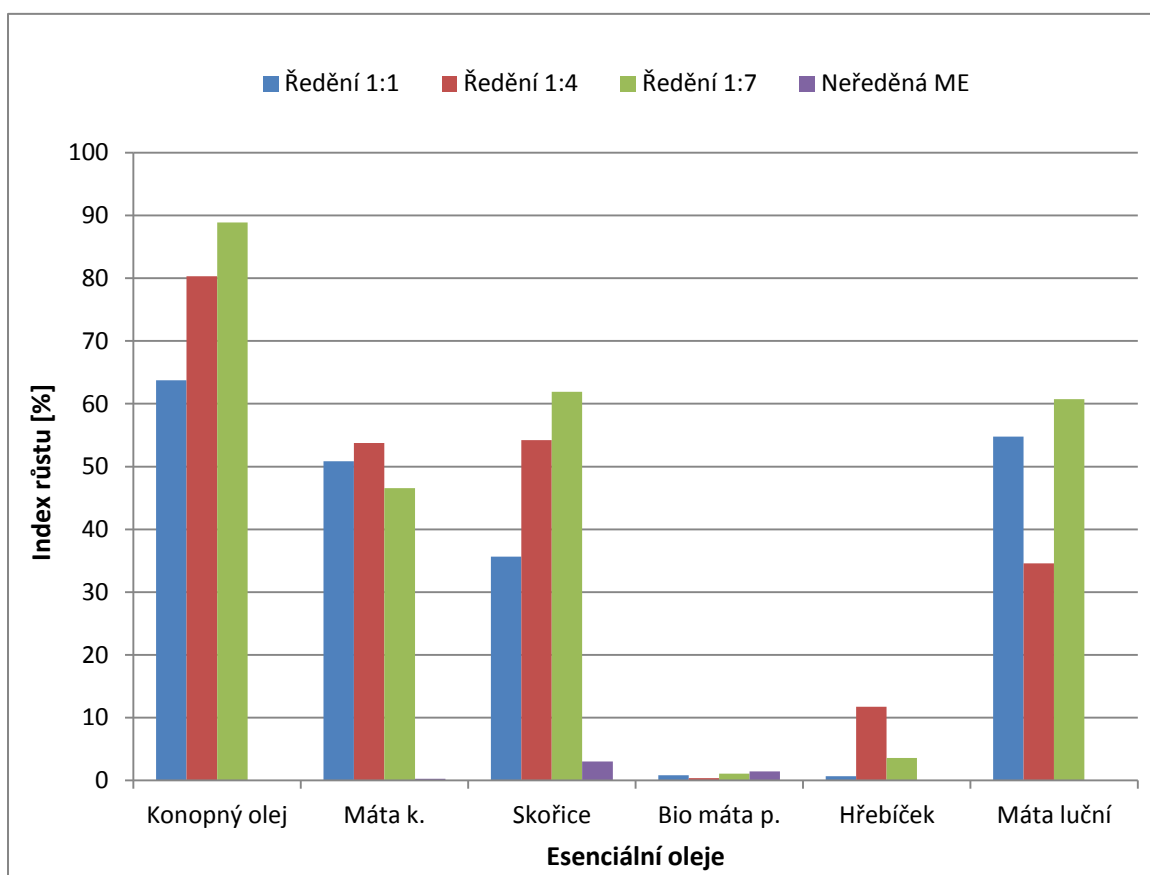
10.3.3 Vliv mikroemulzí esenciálních olejů na růst *Salmonella enterica* ssp. *enterica* ser. *Enteritidis* CCM 4420

Rod *Salmonella* patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o fakultativně anaerobní, nesporulující a gramnegativní tyčinky. Význačnými faktory virulence jsou u salmonel enterotoxin a endotoxin. Endotoxiny jsou součástí povrchové membrány gramnegativních bakterií. U salmonel je endotoxin spojen s antigenním polysacharidem, který je lokalizovaný na vnějším povrchu membrány. Tento antigen chrání salmonely před bakteriolytickým účinkem antimikrobiálních látek [60].

Na obrázku 16 je graficky znázorněn růst bakterie *Salmonella enterica* ssp. *enterica* ser. *Enteritidis* CCM 4420 v přítomnosti mikroemulzí esenciálních olejů. Podobně jako u *E. coli* má nejvyšší inhibiční vliv EO máty peprné.

Značné inhibiční účinky jsou také viditelné u hřebíčkového oleje, kde největší inhibice je prokazatelná u ředění mikroemulze s MPB v poměru 1:1 při indexu růstu 0,68 %. U ostatních ředění byl index růstu také velmi nízký.

Nejvyšší index růstu byl zaznamenán u mikroemulze konopného oleje, kde se index růstu blížil až k hodnotám 90 %. Se zřetelně nižším inhibičním účinkem byl vyhodnocen olej z máty kadeřavé a následně olej z máty luční a skořice. V případě konopného oleje a skořicového oleje dochází k postupnému nárůstu hodnot IR se zvyšujícím se ředěním mikroemulzí esenciálních olejů.



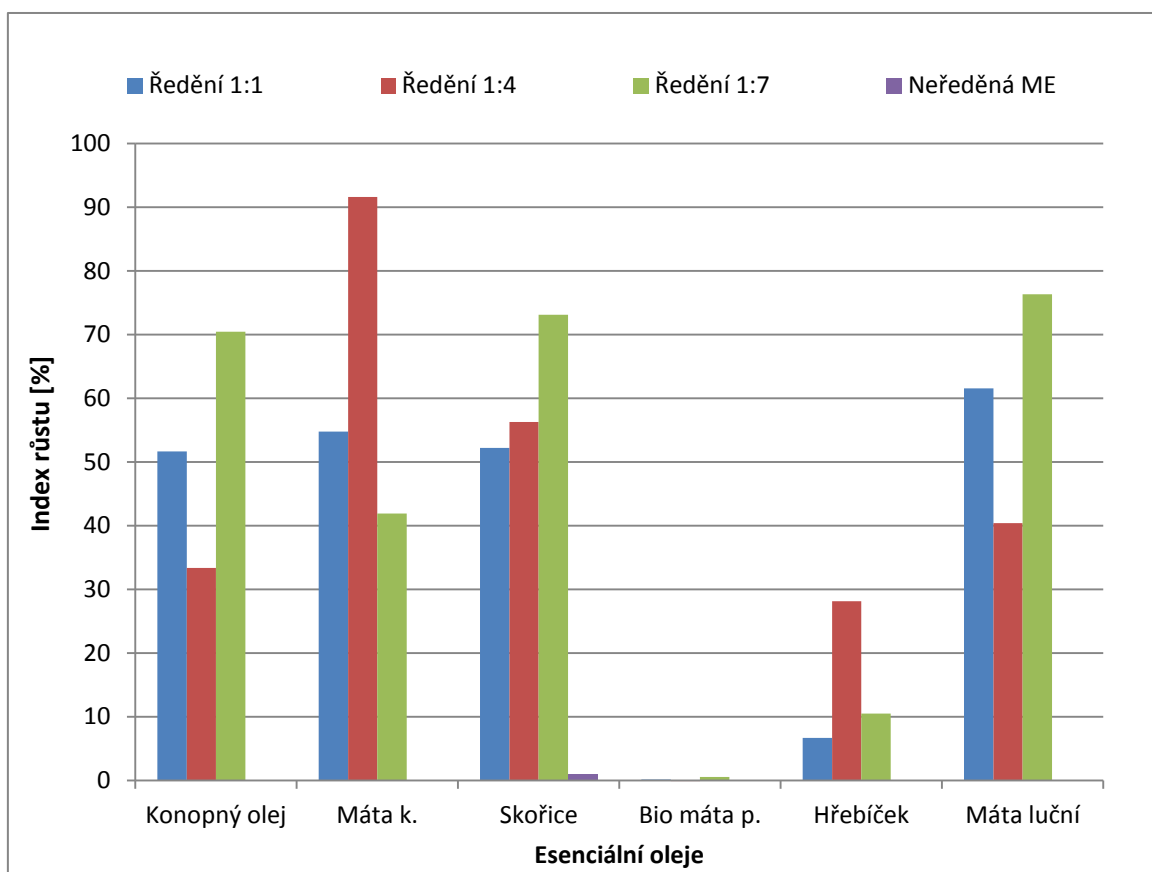
Obr. 16. Vliv mikroemulzí esenciálních olejů na růst *Salmonella enterica* ssp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420.

10.3.5 Vliv esenciálních olejů na růst *Serratia marcescens* CCM 303

Serratia marcescens je gramnegativní bakterie, která je řazena do čeledi *Enterobacteriaceae* stejně jako většina z testovaných gramnegativních druhů [60].

Esenciální olej máty peprné ve formě mikroemulze vykazoval při všech testovaných ředění výrazný inhibiční účinek na růst této bakterie. Mikroemulze připravená z esenciálního oleje hřebíčku měla o něco nižší inhibiční účinky, kdy nejvyšší inibice bylo dosaženo při ředění 1:1, kdy byl vypočten index růstu 6,69 %. Při ředění 1:7 byla hodnota index růstu mírně vyšší, 10,48 %.

Mezi esenciální oleje s nejmenším antibakteriálním účinkem na *S. marcescens* lze zařadit esenciální olej z máty kadeřavé, máty luční a skořice. Přičemž u mikroemulze máty kadeřavé byl při ředění 1:4 index růstu dokonce 91,63 %. U všech bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* bylo dosaženo podobných výsledků, s jediným rozdílem, kterým je mírně vyšší citlivost *S. marcescens* ke konopnému oleji.



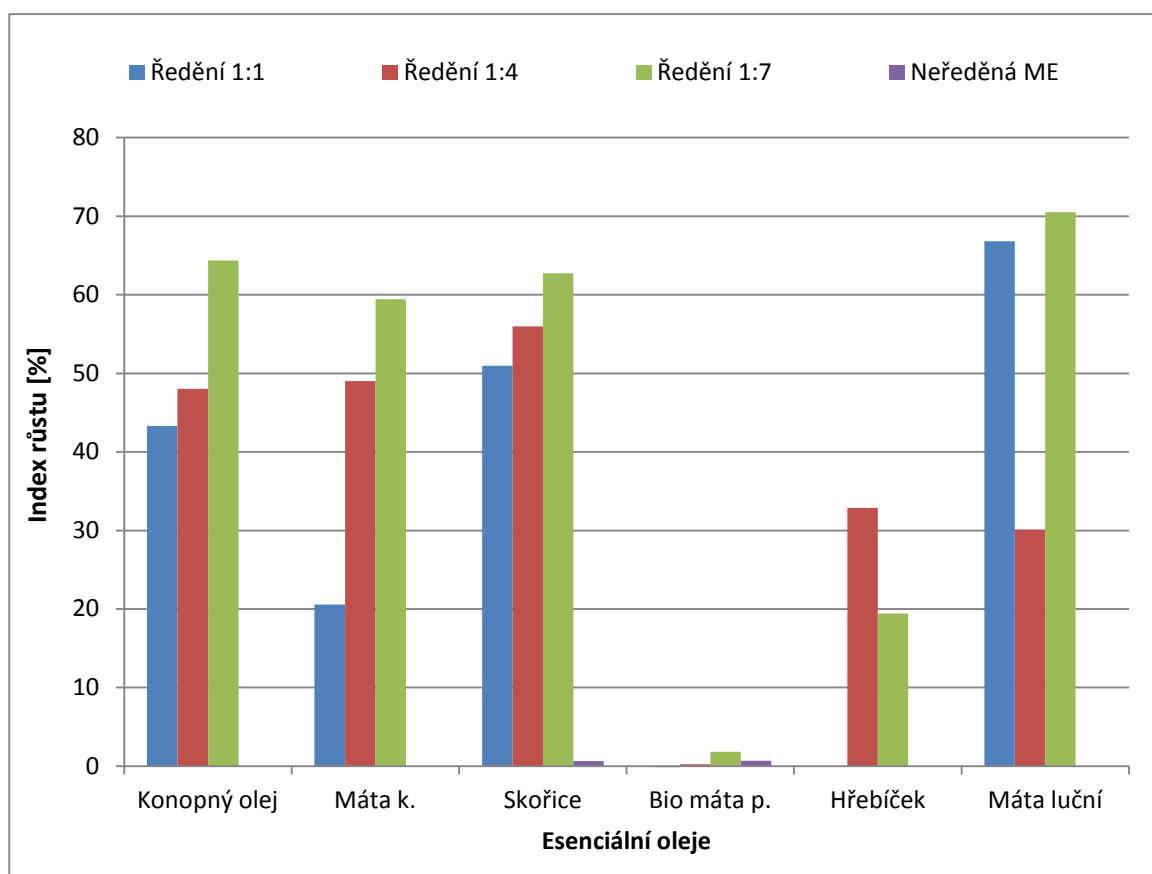
Obr. 17. Vliv esenciálních olejů neředěných a ředěných ve formě mikroemulze na růst *Serratia marcescens* CCM 30.3

10.3.6 Vliv esenciálních olejů na růst *Enterococcus faecalis* CCM 3954

Enterococcus faecalis je gramnegativní bakterie, která se řadí do čeledi *Enterococcaceae*.

Na obrázku 18 je patrné, že mikroemulze s EO máty pepřné vykazuje největší inhibiční účinek na enterokoky. Tento olej je vysoce účinný coby inhibitor růstu testovaných bakterií [60, 61].

U všech grampozitivních i gramnegativních bakterií byly hodnoty indexu růstu vypočtené pro všechna ředění pod hranicí 5%. Velmi silně inhiboval růst *E. faecalis* i olej hřebíčkový, který byl opět velmi účinný i u ostatních bakterií vybraných pro tuto diplomovou práci.



Obr. 18. Vliv esenciálních olejů neředěných a ředěných ve formě mikroemulze na růst *Enterococcus faecalis* CCM 3954.

Ve srovnání s grampozitivními bakteriemi byly gramnegativní mikroorganismy shledány jako o něco méně citlivé k přítomnosti některých esenciálních olejů jako je například EO máty kadeřavé a máty luční. Rozdíly v citlivosti lze přičíst rozdílu ve stavbě buněčné stěny. U gramnegativních bakterií je součástí buněčné stěny i vnější membrána, jež brání prostupu látek hydrofobního charakteru, tedy i složek esenciálních olejů [59, 60, 63].

Mechanismus antimikrobiálního účinku esenciálních olejů může být různý a závisí na konkrétním složení oleje. Cílem ataku mohou být lipidy cytoplazmatické membrány. Narušení lipidové struktury membrány ovlivňuje její základní funkce. Membrána se stává propustnou, což vede k úniku důležitých látek z buněk a k narušení stálého vnitřního prostředí. Fyzikální podmínky, které zlepšují inhibiční aktivitu EO jsou nízké pH, nízká teplota a nízká hladina kyslíku [58, 64]. Antimikrobiální účinek esenciálních olejů může být také způsoben narušením funkce různých enzymatických systémů, jež jsou zapojeny do procesu získávání energie a syntézy strukturních komponent buněk [65].

Získané výsledky naznačují možnost aplikace některých esenciálních olejů coby antimikrobiálních látek v potravinářském a kosmetickém průmyslu. Výraznou antibakteriální akti-

vítu měl především olej máty peprné, ale i olej hřebíčkový a některé další. Tyto oleje účinně potlačovaly růst testovaných bakterií, které představují významné kontaminanty potravin a kosmetických prostředků. Pro takové aplikace by však bylo třeba oleje testovat přímo v reálných podmínkách, tedy v konkrétní potravině či kosmetickém výrobku. Obecně totiž platí, že pro dosažení stejné účinnosti v reálném systému jako v syntetickém médiu, je zpravidla nutná vyšší koncentrace antibakteriální látky [60, 62, 66].

Pro stanovení antimikrobiální aktivity použitých esenciálních olejů byla nejprve použita disková difúzní metoda. Teprve poté byla aplikována mikrodiluční metoda. Obvykle se difúzní metody využívají jako metody orientační, zatímco diluční metody jsou citlivější a přesnější. Výsledky získané těmito metodami v předkládané práci nelze přímo srovnat, vzhledem k tomu, že při diluční metodě byly oleje testovány ve formě mikroemulze. Tato forma byla nutná z důvodu nízké rozpustnosti olejů ve vodném kultivačním médiu. Přesto však lze říci, že oběma metodami byl prokázán inhibiční účinek EO na růst bakterií. Oběma metodami byla také potvrzena antibakteriální aktivita esenciálního oleje máty peprné.

ZÁVĚR

Pomocí naměřených dat zaznamenaných v praktické části této diplomové práce lze vyslovit následující závěrečná tvrzení:

- Esenciální oleje mají vliv na růst bakteriálních kultur a tento vliv je závislý na druhu esenciálního oleje, stejně jako na druhu mikroorganismu, na který olej působí.
- Bylo zjištěno rozdílné antibakteriální působení u esenciálních olejů získaných z různých druhů rostlin stejného rodu. Jednalo se o tři esenciální oleje získané z máty peprné, kadeřavé a máty luční.
- Rozdílnou citlivost k určitému esenciálnímu oleji lze pozorovat u bakterií stejného rodu, avšak různého druhu. Citlivost k olejům je tedy druhově závislá.
- V diplomové práci byla potvrzeno obecné tvrzení, že gramnegativní bakterie jsou o něco méně citlivé vůči působení esenciálních olejů, než grampozitivní bakterie.
- Nejúčinnějším esenciálním olejem z hlediska schopnosti inhibovat růst bakterií byl EO máty peprné v biokvalitě. Tento olej měl významné inhibiční účinky na grampozitivní i gramnegativní bakterie a jeho antibakteriální aktivita byla potvrzena jak při difúzní diskové metodě, tak i při mikrodiluční metodě.
- Při difúzní metodě byl velmi účinným inhibitorem růstu bakterií olej z kůry skořice. Při mikrodiluční metodě však tento olej ve formě mikroemulze tak výraznou inhibiční aktivitu neměl.
- Značné inhibiční účinky na růst bakterií měl i EO z hřebíčku a olej máty luční a kadeřavé.
- Esenciální oleje, a to především oleje mátové a olej hřebíčkový, by mohly mít potenciál pro využití v kosmetickém či potravinářském průmyslu. Pokud by byly tyto oleje součástí kosmetického přípravku v dostatečné koncentraci a vhodné formě, mohlo by to vést ke zvýšení antimikrobiální ochrany výrobku.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BASER, K. Husnu Can. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications* [online]. CRC Press, 2009 [cit. 2015-05-26].
Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=2AEtSKfB2nUC>.
- [2] Dewick P. M. *Medicinal Natural products: A biosynthetic Approach*. 3rd edition, 2009, Wiley, Chichester, ISBN 978-0-470-74168-9.
- [3] TREPKOVÁ, Emilie a František VONÁŠEK. *Vůně a parfémy: tajemství přitažlivosti*. Praha: Ma-xdorf, 1997, 173 s. ISBN 80-858-0048-9.
- [4] LIS-BALCHIN, Maria. *Aromatherapy Science: A Guide for Healthcare Professionals* [online]. Pharmaceutical Press, 2006 [cit. 2015-05-26]. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=rGQps9fQX1YC>.
- [5] KELNAROVÁ, Jarmila. *Psychologie a komunikace pro zdravotnické asistenty 4. ročník* [online]. 2009: 135 [cit. 2015-05-26].
Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=iL63Z4sFBxoC>.
- [6] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, ISBN 46, 446-475.
- [7] WENZEL, Melanie. *Léčivé rostliny: nejlepší využití pro zdraví celé rodiny* [online]. Grada Publishing, a.s., 2014 [cit. 2015-05-27].
Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=IKF9AwAAQBAJ>.
- [8] R. Croteau, *Biochemistry of monoterpenes and sesquiterpenes of the essential oils. Herbs, spices and medicinal plants Recent Adv. Bot. Horticult. Pharmacol.*, 1 (1986), pp. 81–135.
- [9] Thormar (Ed.), *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*, John Wiley & Sons, UK (2011), pp. 203–238.
- [10] BERGER, Ralf G. *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. New York: Springer, 2007, 648 p. ISBN 35-404-9338-7.
- [11] Drašar P., Moravcová J.: *Recent advances in analysis of Chinese medicinal plants and traditional medicines*, *Journal of Chromatography B*, 2004, 812, 3–21.
- [12] CAN BAŞER a DEMIRCI. *Chemistry of Essential Oils*. BERGER, Ralf G. *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. New York: Springer, c2007, s. 43-75. ISBN 978-3-540-49338-9.

- [13] KENNEDY, John F, Nahid TURAN a Jean-Michel KORNPROBST. ROMPP *Encyclopedia Natural Products*. ISBN 10.1002/9783527335855.
- [14] SHAHIDI, F. a P. KOLODZIEJCZYK. *Chemicals via Higher Plant Bioengineering*. 8. vyd. New York: Kluwer/ Springer, 1999. ISBN 978-1-4615-4729-7.
- [15] STREBLOVÁ, Eva. *Souhrnné texty z chemie: pro přípravu k přijímacím zkouškám (přírodovědné obory, lékařství)*. 3., upr. vyd. Praha: Karolinum, 2012, 201 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-802-4621-357.
- [16] SEIGLER, By David S. *Plant Secondary Metabolism*. Boston, MA: Springer US, 1999. ISBN 978-146-1549-130.
- [17] JONGWON, LIM. Total Synthesis of Taxol. 2000. ISBN 0599959991. Dostupné z: http://portal.k.utb.cz.proxy.k.utb.cz/articles/record?id=FETCH-proquest_dll_7283712913&lang=cze.
- [18] HALVORSEN, B.; RANHEIM, T. *Coffee consumption and human health - beneficial or detrimental - Mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus*. *Molecular Nutrition*. 2005, roč. 49, č. 3, s. 274-284. ISSN 1613-4125. DOI: 10.1002/mnfr.200400109.
- [19] Jayaprakasha G.K., Girenavar B., Patil B.S., *Bioresource Technol*, 99, 2008, ISBN: 4484-4494.
- [20] Hayes, A.J.; Leach, D.N.; Markham, J.L.; Markovic, B. *J. Essent. Oil Res.*, 1997, Vyd. 9, 575.
- [21] Santos, F. A.; Cunh, G.M.A.; Viana, G.S.B.; Rao, V.S.N.; Manoel, A.N.; Silveira, E.R. *Phytother. Res.* , 1997, 11 , 67.
- [22] Charai, M.; Mosaddak, M.; Faid, M., *J. Essent. Oil Res.* , 1996 , 8 , 657.
- [23] Riep, B.G.; Bernimoulin J.-P.; Barnett, M.L. *J. Clin. Peridont.*, 1999, 26, 164.
- [24] Pan, P.H.; Finnegan, M.B.; Sturdivant, L.; Barnett, M.L. *J. Clin. Peridont.*, 1999, 26, 474.
- [25] Cox, S.D.; Gustafson, J.E.; Mann, C.M.; Liew, Y.C.; Markham, J.L.; Liew, Y.C.; Hartland, R.P.; Bell, H.C.; Warmington J.R.; Wyllie, S.G. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1998, 26, str. 355.

- [26] M.M. Routh, J.S. Raut, S.M. Karuppayil. *Dual properties of anticancer agents: an exploratory study on the in vitro anti-Candida properties of thirty drugs Chemotherapy*, 57 (2011), str. 372–380.
- [27] M.K. Kathiravan, A.B. Salake, A.S. Chothe, P.B. Dudhe, R.P. Watode, M.S. Mukta, S. Gadhwe. *The biology and chemistry of antifungal agents: a review Bioorg. Med. Chem.*, 20 (2012), str. 5678–5698.
- [28] C.M. Kaefer, J.A. Milner, The role of herbs and spices in cancer prevention *J. Nutr. Biochem.*, 19 (2008), pp. 347–361.
- [29] S. Carnesecchi, R. Bras-Goncalves, A. Bradaia, M. Zeisel, F. Gosse, M.F. Poupon, F. Raul Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts *Cancer Lett.*, 215 (2004), str. 53–59.
- [30] Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaoma, *Biological effects of essential oils – a review Food Chem. Toxicol.*, 46 (2008), pp. 446–475.
- [31] ASTANI, Akram; REICHLING, Jürgen; SCHNITZLER, Paul. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. Evidence-based complementary and alternative medicine, 2011.
- [32] CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties*. *Clinical microbiology reviews*, 2006, 19.1: 50-62.
- [33] A.E. Edris. *Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review*. *Phytother. Res.*, 21. 2007, str. 308–323.
- [34] A.E. Edris *Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review*. *Phytother. Res.*, 21. 2007, str. 308–323.
- [35] B. Tepe, E. Donmez, M. Unlu, F. Candan, D. Daferera, G. Vardar-Unlu, M. Polissiou, A. Sokmen. *Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of Salvia cryptantha (Montbret et Aucher ex Benth.) and Salvia multicaulis (Vahl)*. *Food Chem.*, 84 (2004), str. 519–525.
- [36] A. Tomaino, F. Cimino, V. Zimbalatti, V. Venuti, V. Sulfaro, A. De Pasquale, A. Saija. *Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils*. *Food Chem.*, 89 (2005), str. 549–554.

- [37] C.F. Carson, K.A. Hammer. *Chemistry and bioactivity of essential oils. Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*, UK. 2011, str. 203–238.
- [38] Armstrong, J.S. *Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death*. *Bioessays*, 28 (2006), str. 253–260.
- [39] C. Rota, J.J. Carraminana, J. Burillo, A. Herrera. *In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected food borne pathogens*. *J. Food Prot.*, 67 (2004), str. 1252–1256.
- [40] M. Vigan. *Essential oils: renewal of interest and toxicity*. *Eur. J. Dermatol.*, Vyd. 20. 2010, str. 685–692.
- [41] GEOFFREY, BROOKS; DEBORAH, PIERCE. *Quaternized Hemp Seed Oil*. . 2000, . Dostupné z:
http://portal.k.utb.cz.proxy.k.utb.cz/articles/record?id=FETCH-epo_espacenet_US6063369A2&lang=cze.
- [42] *Potravinářská Revue: odborný časopis pro výživu, výrobu potravin a obchod*. Praha: AGRAL s.r.o. 2/2008. s 31-34. ISSN 1801-9102.
- [43] Theimer, R.R., Mölleken, H., Hoppe, A. (1997). *Oils from Cannabis sativa L. — valuable food and raw materials for pharmaceuticals and other industrial products*. In: *Bioresource Hemp Symposium; Frankfurt/Mai*, str. 56 – 57.
- [44] Chvaleč, J., *Konopí - biomasa pro život*. Konopa, 2007, 26 s. ISBN 978-80-254-1149-0.
- [45] NISSEN, Lorenzo; ZATTA, Alessandro; STEFANINI, Ilaria; GRANDI, Silvia; SGORBATI, Barbara; BIAVATI, Bruno; MONTI, Andrea. *Characterization and Antimicrobial Activity of Essential Oils of Industrial Hemp Varieties (Cannabis Sativa L.)*. *Fitoterapia*. 2010, vol. 81, no. 5 s. 413-419. ISSN:0367-326.
- [46]] TISSERAND, Robert. *Essential Oil Safety. Elsevier Health Sciences*, 2013. Dostupné také z: <https://books.google.cz/books?id=DbEKAQAAQBAJ>.
- [47] WEISS, E.A. (1997) *Essential Oil Crops*. CAB International, Wallingford, Oxon, pp. 235–59.
- [48] NURDJANNAH N., YULIANI S. and YANTI L. (1997) *Pengolahan dan Diversifikasi HasilCengkeh*. Monograf Tanaman Cengkeh. Balai Penelitian Tanaman Rempah danObat. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, str. 118–30.

- [49]] CASTLEMAN, Michael. *The New Healing Herbs: The Classic Guide to Nature's Best Medicines Featuring the Top 100 Time-Tested Herbs*. Rodale, 2001. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=DuUx21ovi90C&pg=PA136&dq=clove+oil&hl=cs&sa=X&ei=8_JFVZTLB4myUYS-gVg&ved=0CCYQ6AEwATgK#v=onepage&q=cinnem&f=false.
- [50] BURKHARD, Bohne. *Bylinková zahrádka: co je skutečně důležité*. Grada Publishing, a.s., 2014. Dostupné také z: <https://books.google.cz/books?id=hHYwBQAAQBAJ>.
- [51] Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J. *Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs*. Newton, MA: Integrative Medicine Communications; 2000:297-303.
- [52] BONAMONTE, Domenico; MUNDO, Lorenzo; DADDABBO, Margherita; FOTI, Caterina. *Allergic Contact Dermatitis from Mentha Spicata (Spear-mint)*. Contact Dermatitis. 2001, vol. 45, no. 5298. ISSN:0105-1873.
- [53] TOPRAK, S; OTLU, B; ŞARER, E; DURMAZ, R. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Mentha Spicata L. Subsp. Spicata. Journal of Essential Oil Research. 2011, vol. 23, no. 1 s. 105-108. ISSN:1041-2905.
- [54] PANDA, H. *Cultivation and Utilization of Aromatic Plants*. ASIA PACIFIC BUSINESS PRESS Inc., 2005. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=EeckAgAAQBAJ&dq=mentha+arvensis&hl=cs&source=gbs_navlinks_s.
- [55] FIALA, Michal. *Chování lubrikační emulze a pryskyřice ve výrobě minerální plsti: Mineral wool and binding agent interaction and behavior study*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 46 l.
- [56] Emulsion. *Civil Engineering*. 1995, vol. 65, no. 996. ISSN:0885-7024.
- [57] GARTI, Nissim. *Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals*. Boca Raton, Fla: CRC Press, 2008. ISBN 978-142-0074-369.
- [58] Nissim. *Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals*. Boca Raton, Fla: CRC Press, 2008. ISBN 978-142-0074-369.
- [59] Burt SA, *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: A review*, International Journal of Food Microbiology, 94, 2004, 223-253.

- [60] Kordali S, Kotan R, Mavi A, Cakir A, Ala A, Yildirim A, *Determinati-on of the che-mical composition and antioxidant activity of the es-sential oil of Artemisia dracun-culus and of the antifungal and anti-bacterial activities of Turkish Artemisia absin-thium, A. dracunculus, Artemisia santonicum and Artemisia spicigera essential oils*, Jour-nal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 2005, ISBN 9452-9458.
- [61] SEOW, YX; YEO, CR; CHUNG, HL; YUK, HG. *Plant Essential Oils as Active An-timicrobial Agents*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2014, vol. 54, no. 5 s. 625-644. ISSN:1040-8398.
- [62] C. Tassou. Inhibition of Salmonella enteritidis and Staphylococcus aureus in nutrient broth by mint essential oil. Scient Direct. 2000. DOI: 10.1016/S0963-9969(00)00047-8. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S0963996900000478>.
- [63] Baytop, T. Türkiye‘de Bitkiler ile Tedavi-Geçmişten Bugüne. *Therapy with Medici-nal Plants in Turkey-Past and Present*, 2. vydání.; Nobel Tıp Basımevi: Istanbul, Turkey, 1999; str. 348–349.
- [64] CHAIBI, A., ABABOUCHE, L. H., BELASRI, K., BOUCETTA, S., BUSTA, F. F. *Inhibition of germination and vegetative growth of Bacillus cereus T and Clostridium botulinum 62A spores by essentials oils*. Food mikrobiology. 1997. r. 14, č. 2, str. 161-174.
- [65] Kocur, M., Kloos, W. E., & Schleifer, K. H. (2006). The Genus Micrococcus. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (3rd ed., pp. 961-971). New York: Springer.
- [66] Bannerman, T. L., & Peacock, S. J. (2007). *Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase- Positive Cocci*. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. 9. vydání, str. 390-404. Washington, USA: ASM Press.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

EO	Esenciální olej.
MPB	Masopeptonový bujón.
MPA	Masopeptonový agar.
KON	Konopný olej.
MK	Máta kadeřavá.
ML	Máta luční.
BMK	Bio máta peprná.
HP	Hřebíček plody.
SK	Skořice kůra.

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Chemická struktura izoprenové jednotky [12].</i>	14
<i>Obr. 2. Schematické znázornění přesmyku hlava-pata (vpravo) [1].</i>	15
<i>Obr. 3. Schematické znázornění cyklizace izoprenových jednotek (vlevo) a příklad cyklického a acyklického monoterpenu [15].</i>	16
<i>Obr. 4 Lisování esenciálního oleje za studena [16].</i>	19
<i>Obr. 5 Nekróza (vlevo) a apoptóza (vpravo) buňky [37].</i>	25
<i>Obr. 6 Esenciální konopný olej v komerčním balení.</i>	27
<i>Obr. 7 Grafické vyobrazení hřebíčkového EO ve skleněných nádobách a plodů hřebíčku [47].</i>	29
<i>Obr. 8 Grafické vyobrazení skořicového oleje [48].</i>	31
<i>Obr. 9 Tvar listů máty [45].</i>	32
<i>Obr. 10 Vliv mikroemulzí esenciálních olejů na růst Staphylococcus aureus subsp. aureus CCM 3953.</i>	53
<i>Obr. 11 Vliv mikroemulzí esenciálních olejů na růst Bacillus cereus CCM 2010.</i>	54
<i>Obr. 12 Vliv mikroemulzí esenciálních olejů na růst Bacillus subtilis susp. spizizenii CCM 4062.</i>	55
<i>Obr. 13. Vliv mikroemulzí esenciálních olejů na růst Micrococcus luteus CCM 732.</i>	56
<i>Obr. 14. Vliv mikroemulzí esenciálních olejů na růst Citrobacter freundii CCM 7187.</i>	57
<i>Obr. 15 Vliv mikroemulzí esenciálních olejů na růst Escherichia coli CCM 3954.</i>	58
<i>Obr. 16. Vliv mikroemulzí esenciálních olejů na růst Salmonella enterica ssp. enterica ser. Enteritidis CCM 4420.</i>	60
<i>Obr. 17. Vliv esenciálních olejů neředěných a ředěných ve formě mikroemulze na růst Serratia marcescens CCM 30.3</i>	61
<i>Obr. 18. Vliv esenciálních olejů neředěných a ředěných ve formě mikroemulze na růst Enterococcus faecalis CCM 3954.</i>	62

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. <i>Hmotnostní složení fyziologického roztoku.</i>	41
Tab. 2. <i>Hmotnostní složení předem připravené směsi MPA.</i>	41
Tab. 3. <i>Hmotnostní složení MPB.</i>	42
Tab. 4. <i>Hmotnostní složení MHA.</i>	42
Tab. 5. <i>Pipetované množství látek při přípravě roztoků esenciálních olejů.</i>	45
Tab. 6. <i>Kvantitativní a kvalitativní složení mikroemulzí.</i>	46
Tab. 7. <i>Zásobní roztoky mikroemulzí s MPB.</i>	47
Tab. 8. <i>Vliv esenciálních olejů na růst gram pozitivních bakterií.</i>	50
Tab. 9. <i>Působení esenciálních olejů na gram negativní bakterie.</i>	51