Inhibiční působení monoacylglycerolů a esenciálních olejů na dekarboxyláza-pozitivní bakterie

Bc. Aneta Ševčíková

Diplomová práce
2020

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Bc. Aneta Ševčíková**
Osobní číslo:	**T18999**
Studijní program:	**N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia:	**Kombinovaná**
Téma práce:	**Inhibiční působení monoacylglycerolů a esenciálních olejů na dekarboxyláza-pozitivní bakterie**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:
Dekarboxylázová aktivita mikroorganizmů
Monoacylglyceroly a esenciální oleje – charakterizace, vlastnosti a využití
Antimikrobní účinky monoacylglycerolů, mastných kyselin a esenciálních olejů
Praktická část:
Stanovení minimální inhibiční koncentrace vybraných monoacylglycerolů a esenciálních olejů u grampozitivních a gramnegativních bakterií
Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů

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

Seznam doporučené literatury:

Thormar, H., Hilmarsson H. The role of microbicidal lipids in host defense against pathogens and their potential as therapeutic agents. Chem. Phys. Lipids 150: 1-11. 2007.
Sedlaříková, J., Doležalová, M., Egner, P. et al. Effect of oregano and marjoram essential oils on the physical and antimicrobial properties of chitosan based systems. International Journal of Polymer Science, Article Number: 2593863. 2017.
Sagalowicz, L., Leser M.E., Watzke H.J., Michel M. Monoglyceride self-assembly structures as delivery vehicles. Trends Food Sci. Technol. 17: 204-214. 2006.
Buňková, L., Buňka, F., Janiš, R., Krejčí, J., Doležálková, I., Pospíšil, Z., Růžička, J., Tremlová, B. Comparison of antibacterial effect of seven 1-monoglycerides on food-borne pathogens or spoilage bacteria. Acta Veterinaria Brno, 80: 29-39. 2011.
Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Ricke, S.C. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. Food Control, 54: 111-119. 2015.
Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně

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

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2020

PROHLÁŠENÍ AUTORA
DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta: Aneta Ševčíková

……..
podpis studenta

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá inhibičním působením vybraných monoacylglycerolů a esenciálních olejů na bakterie s dekarboxylázovou aktivitou. Teoretická část zahrnuje čtyři kapitoly, které pojednávají o problematice biogenních aminů, dekarboxylázové aktivitě mikroorganizmů, monoacylglycerolech či esenciálních olejích. Tyto teoretické poznatky jsou dále uplatněny v praktické části, ve které byly sledovány inhibiční účinky vybraných 1-monoacylglycerolů a esenciálních olejů na růst grampozitivních a gramnegativních bakterií.

Klíčová slova: biogenní aminy, monoacylglyceroly, esenciální oleje, dekarboxylázová aktivita, inhibiční působení

ABSTRACT

The diploma thesis deals with the inhibitory effect of selected monoacylglycerols and essential oils on bacteria with decarboxylase activity. The theoretical part includes four chapters which deal with the issue of biogenic amines, decarboxylase activity of microorganisms, monoacylglycerols or essential oils. These theoretical findings are further applied in the practical part, in which the inhibitory effects of selected 1-monoacylglycerols and essential oils on the growth of gram-positive and gram-negative bacteria were monitored.

Keywords: biogenic amines, monoacylglycerols, essential oils, decarboxylase activity, inhibitory effect

Tímto bych ráda poděkovala doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při realizaci mé diplomové práce.

Za podporu během studia chci poděkovat rovněž mé rodině a blízkým.

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

OBSAH

ÚVOD **9**

I. TEORETICKÁ ČÁST **10**

1 BIOGENNÍ AMINY **11**

1.1 Charakteristika a vznik biogenních aminů 11
1.2 Rozdělení biogenních aminů 11
1.3 Výskyt biogenních aminů v potravinách 13
1.4 Význam biogenních aminů v organizmu a jejich toxicita 15

2 MIKROORGANIZMY S DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITOU **18**

2.1 Dekarboxylázová aktivita mikroorganizmů 18
2.2 Charakteristika vybraných bakterií 19
2.2.1 Rod *Lactococcus* *19*
2.2.2 Rod *Enterococcus* *20*
2.2.3 Rod *Salmonella* *21*
2.2.4 Rod *Proteus* *22*
2.3 Růst bakterií 23
2.3.1 Stanovení růstu bakterií v tekuté půdě *23*
2.3.2 Růstová křivka *24*

3 MONOACYLGLYCEROLY **27**

3.1 Charakteristika monoacylglycerolů 27
3.2 Výroba monoacylglycerolů 28
3.2.1 Esterifikace vyšších mastných kyselin s glycerolem *28*
3.2.2 Interesterifikace *28*
3.2.3 Parciální hydrolýza triacylglycerolů *30*
3.2.4 Adice mastné kyseliny na glycidol *30*
3.3 Vlastnosti a využití monoacylglycerolů 31
3.4 Antimikrobní účinky mastných kyselin a monoacylglycerolů 33

4 ESENCIÁLNÍ OLEJE **36**

4.1 Charakteristika esenciálních olejů 36
4.2 Výroba esenciálních olejů 38
4.2.1 Lisování za studena *38*
4.2.2 Extrakce rozpouštědlem *38*
4.2.3 Enfleuráž *39*
4.2.4 Destilace *39*
4.3 Vlastnosti a využití esenciálních olejů 40
4.4 Antimikrobní účinky esenciálních olejů 43

II. PRAKTICKÁ ČÁST **46**

5 CÍL PRÁCE **47**

6 POUŽITÁ ZAŘÍZENÍ A MATERIÁLY **48**

6.1 Použité přístroje a pomůcky 48
6.2 Použité bakteriální kmeny 48
6.3 Živná média 49
6.4 Chemikálie 49

7 METODIKA **50**

7.1 Příprava zásobních roztoků 1-monoacylglycerolů a esenciálních olejů 50
7.2 Příprava kultivačních půd a fyziologického roztoku 50
7.3 Resuscitace mikroorganizmů 50
7.4 Příprava bakteriální suspenze 50

7.5 DEKONTAMINACE POUŽITÉHO MATERIÁLU 51
7.6 SLEDOVÁNÍ INHIBIČNÍHO ÚČINKU 1-MONOACYLGLYCEROLŮ A ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA RŮST BAKTERIÍ 51

8 VÝSLEDKY 55

8.1 VLIV 1-MONOACYLGLYCEROLŮ NA RŮST BAKTERIÍ 55
8.1.1 Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 ..... *55*
8.1.2 Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 ..... *56*
8.1.3 Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 ..... *57*
8.1.4 Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 ..... *58*
8.1.5 Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 ..... *59*
8.1.6 Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Enterococcus durans* CCDM 53 ..... *60*
8.1.7 Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Enterococcus faecalis* CCM 2665 ..... *61*
8.1.8 Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224 ..... *62*
8.1.9 Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 ..... *63*
8.1.10 Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188 ..... *64*
8.2 VLIV ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA RŮST BAKTERIÍ 65
8.2.1 Vliv esenciálních olejů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 ..... *65*
8.2.2 Vliv esenciálních olejů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 ..... *66*
8.2.3 Vliv esenciálních olejů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 ..... *67*
8.2.4 Vliv esenciálních olejů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 ..... *68*
8.2.5 Vliv esenciálních olejů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 ..... *69*
8.2.6 Vliv esenciálních olejů na růst *Enterococcus durans* CCDM 53 ..... *70*
8.2.7 Vliv esenciálních olejů na růst *Enterococcus faecalis* CCM 2665 ..... *71*
8.2.8 Vliv esenciálních olejů na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224 ..... *72*
8.2.9 Vliv esenciálních olejů na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 ..... *73*
8.2.10 Vliv esenciálních olejů na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188 ..... *74*

9 DISKUZE 76

ZÁVĚR 78

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 79

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 87

SEZNAM OBRÁZKŮ 88

SEZNAM TABULEK 90

SEZNAM PŘÍLOH 91

ÚVOD

Biogenní aminy jsou bazické dusíkaté sloučeniny odvozené od aminokyselin. Běžně se podílejí na metabolických procesech v živých tkáních a vykazují různé biologické účinky. Mohou být syntetizovány mikrobiálním, rostlinným nebo živočišným metabolizmem. V potravinách a nápojích jsou biogenní aminy produkovány především mikrobiální dekarboxylací aminokyselin. Pro jejich vznik je nutná přítomnost volných aminokyselin, bakterií obsahujících dekarboxylázy a zajištění podmínek, při kterých mohou bakterie růst a syntetizovat dekarboxylázy. Ve vyšších koncentracích se tyto sloučeniny vyskytují ve fermentovaných výrobcích. Příliš vysoké hladiny biogenních aminů v potravinách jsou známkou kažení a mohou vést k otravám. Jejich nadměrná konzumace může u člověka způsobit několik zdravotních problémů, jako je např. hypertenze, bolest hlavy a nevolnost.

Monoacylglyceroly patří mezi parciální estery glycerolu, u nichž je jedna hydroxylová skupina esterifikována mastnou kyselinou se středně dlouhým či dlouhým řetězcem. Vzhledem k jejich povaze jsou řazeny mezi amfifilní látky, které nachází uplatnění především jako emulgátory a stabilizátory v potravinářství. Tyto sloučeniny se využívají rovněž v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Monoacylglyceroly jsou známy také pro jejich antimikrobní účinky. Bylo zjištěno, že grampozitivní bakterie jsou k těmto látkám citlivější než gramnegativní bakterie.

Esenciální oleje jsou koncentrované vonné těkavé látky, které jsou získávány nejčastěji z rostlin. Jejich složky spadají především do dvou odlišných chemických tříd – terpenů a fenylpropanoidů. Tyto látky jsou používány zejména v kosmetickém, farmaceutickém či potravinářském průmyslu. Esenciální oleje, stejně jako monoacylglyceroly, vykazují antimikrobiální aktivitu, která úzce souvisí s jejich chemickým složením a obsahem jednotlivých složek. Obecně jsou účinnější proti grampozitivním bakteriím.

Praktická část je zaměřena na studium účinků monoacylglycerolů a esenciálních olejů jako antimikrobiálních látek, které mohou být použity v oblasti potravinářského či kosmetického průmyslu.

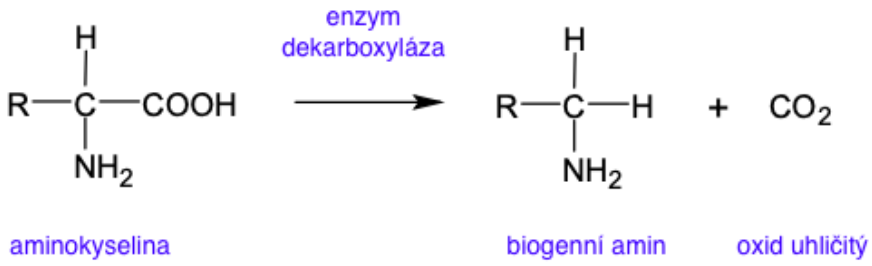
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

1.1 Charakteristika a vznik biogenních aminů

Biogenní aminy (BA) jsou bazické dusíkaté sloučeniny tvořené především dekarboxylací aminokyselin nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů. Jedná se o organické báze s nízkou molekulovou hmotností, které jsou syntetizovány mikrobiálním, rostlinným nebo živočišným metabolizmem. Vzhledem k tomu, že jsou tyto aminy tvořeny působením živých organizmů, označují se jako biogenní. V potravinách a nápojích jsou BA produkovány převážně mikrobiální dekarboxylací aminokyselin [1, 2, 3].

Při dekarboxylaci se uplatňují jako katalyzátory enzymy dekarboxylázy a během této reakce dochází k odstranění karboxylové skupiny z příslušných aminokyselin. Princip dekarboxylace je znázorněn na Obrázku 1. Dekarboxylázy jsou tedy buď přirozenou součástí živočišných a rostlinných organizmů, nebo jsou mikrobiálního původu, což je častější. Mikroorganizmy, které vykazují dekarboxylázovou aktivitu, se dostávají do potravin spontánně, nebo jsou do potravin přidávány záměrně [2, 4].



Obrázek 1 Dekarboxylace aminokyselin [5]

Důležitými předpoklady pro tvorbu biogenních aminů mikroorganizmy jsou:

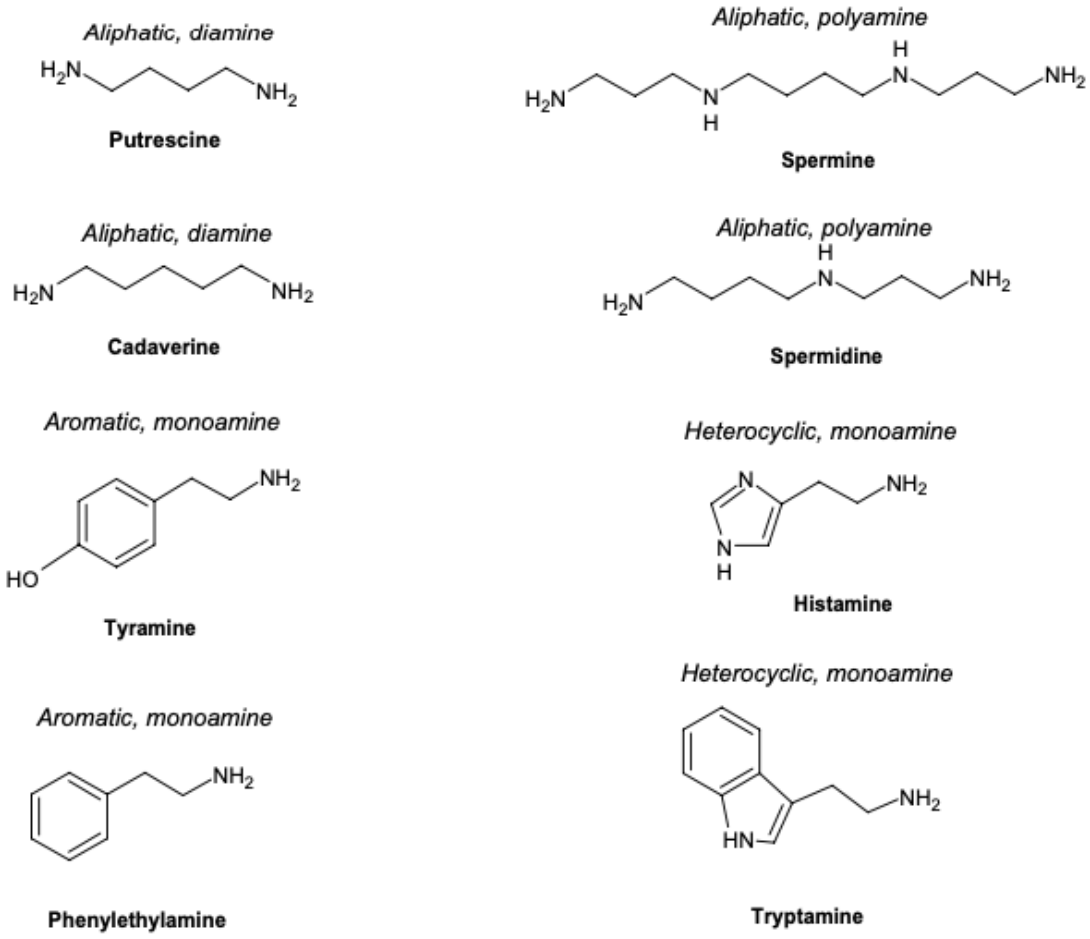
- dostupnost volných aminokyselin (ne vždy ale vede k produkci aminů),
- přítomnost dekarboxyláza-pozitivních mikroorganizmů,
- podmínky, které umožňují růst bakterií, dekarboxylázovou syntézu a dekarboxylázovou aktivitu [1].

1.2 Rozdělení biogenních aminů

Aminy jsou organické deriváty amoniaku, které se odvozují náhradou jednoho či více atomů vodíku za uhlíkaté zbytky (alkylové nebo arylové skupiny). Vzhledem k počtu uhlíkatých

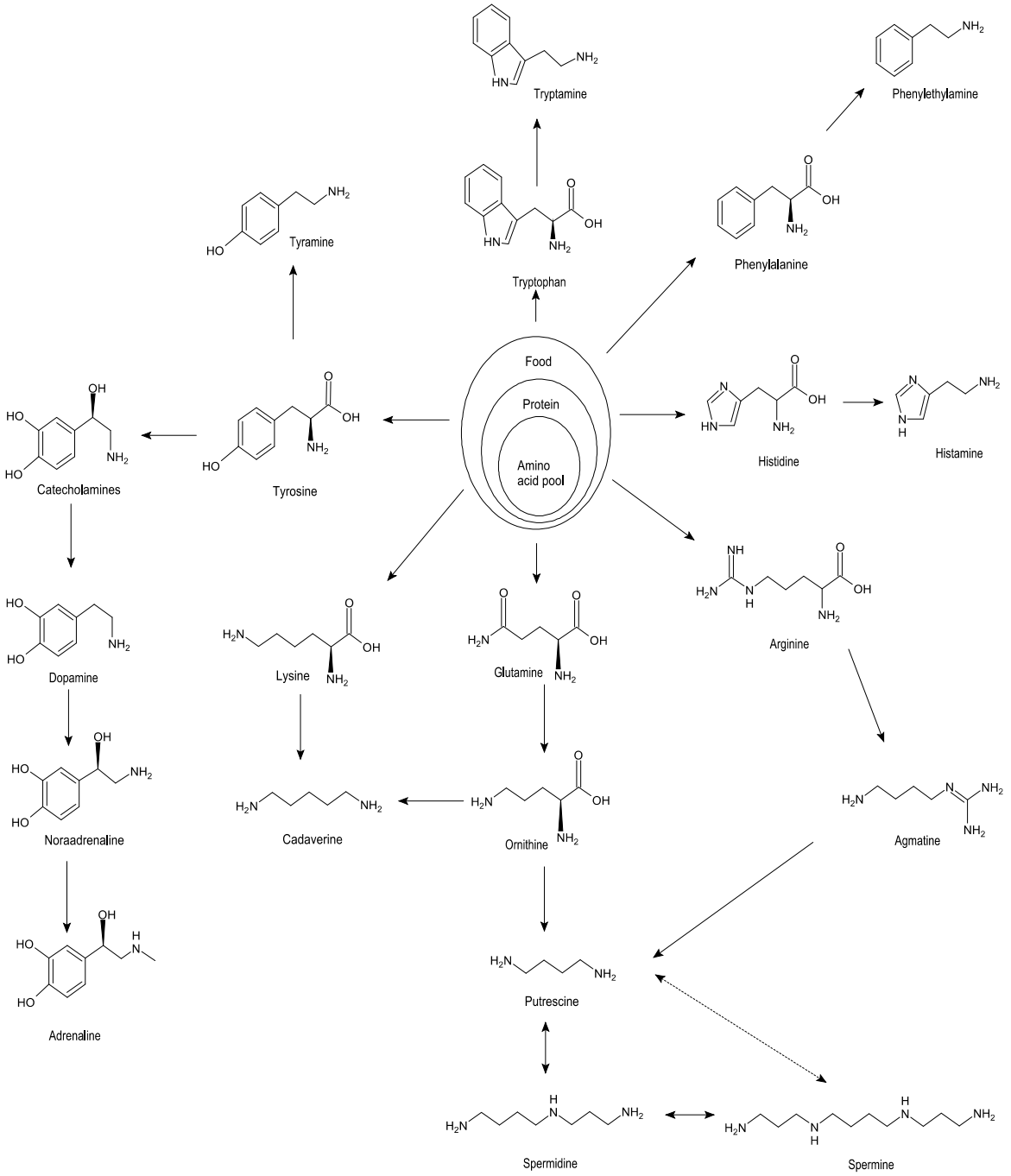
substituentů připojených k atomu dusíku je můžeme dělit na primární, sekundární a terciární [3, 6].

Na základě chemické struktury můžeme BA rozdělit na alifatické (např. putrescin, kadaverin, spermin a spermidin), aromatické (např. tyramin a fenylethylamin) a heterocyklické (např. histamin a tryptamin). Také však mohou být klasifikovány podle počtu aminových skupin jako monoaminy (fenylethylamin, tyramin, histamin a tryptamin), diaminy (kadaverin a putrescin), či polyaminy (spermidin a spermin). Rozdělení vybraných BA v souladu s jejich chemickou strukturou je uvedeno na Obrázku 2 [3, 7].



Obrázek 2 Klasifikace vybraných biogenních aminů na základě jejich chemické struktury [7]

Názvy mnoha biogenních aminů odpovídají názvům jejich původní aminokyseliny. Například histamin vzniká z histidinu, tyramin z tyrosinu, agmatin z argininu, fenylethylamin z fenylalaninu a tryptamin z tryptofanu. Na Obrázku 3 je znázorněna metabolická cesta tvorby BA [3].



Obrázek 3 Mechanizmus vzniku biogenních aminů [3]

1.3 Výskyt biogenních aminů v potravinách

Biogenní aminy jsou v nízkých koncentracích přirozenými složkami různých potravin, ale vznikají rovněž vlivem některých procesů během zpracování potravin, například působením enzymů či vysokých teplot. Vyskytují se také ve větším množství ve fermentovaných potravinách a jsou výsledkem činnosti mikroorganizmů. Mezi potravinářské výrobky

s obsahem BA lze zařadit rybí produkty, masné výrobky, mléčné výrobky, víno, pivo, zeleninu, ovoce, oříšky a čokoládu [1, 8].

Celkové množství a rozmanitost vytvořených aminů silně závisí na povaze potraviny a přítomnosti mikroorganizmů. Během přípravy fermentovaných potravin se do potravin záměrně přidávají různé druhy mikroorganizmů a některé z nich mají schopnost tyto aminy produkovat. V čerstvých potravinářských výrobcích se vyskytují BA endogenního původu a pouze v nízkých koncentracích. Jejich přítomnost je však úzce spojena s mikrobiální aktivitou. Když je hladina BA v potravinách příliš vysoká, jedná se o známku kažení a může docházet k otravám. Biogenní aminy mohou vznikat působením kontaminující mikroflóry během skladování především v rybách a mase, ale také při nevhodném skladování ovoce, zeleniny a hub. Množství BA je proto možné využít jako tzv. indikátor čerstvosti [1, 3, 8].

Nejvýznamnějšími BA vyskytujícími se v potravinách jsou histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, tryptamin a fenylethylamin, které pochází z prekurzorových aminokyselin histidinu, tyrosinu, ornithinu, lysinu, tryptofanu a fenylalaninu v příslušném pořadí. Tvorba BA je specifická pro jednotlivé druhy. Putrescin a kadaverin byly zjištěny ve významných koncentracích ve fermentovaném mase a rybách. Tyramin je údajně příčinou intoxikace jídlem, která je běžně spojená se zrajícími sýry. Histamin, putrescin, kadaverin, tyramin, fenylethylamin a tryptamin jsou často detekovány ve fermentovaných výrobcích [3].

Příjem nízkého množství BA skrze potraviny obvykle nemá škodlivý účinek na zdraví a tyto aminy mohou být detoxikovány aminooxidázami přítomnými ve střevě. Také však může docházet k jejich transformaci na toxické metabolity, které jsou zodpovědné za závažné problémy u člověka. To nastává, když je jejich množství v potravinách příliš vysoké, nebo když je detoxikační schopnost inhibována či narušena. Požití BA v množství nad 40 mg v jídle může výrazně zvýšit riziko otravy jídlem. Otravy jídlem jsou obecně toxikologicky spojovány s histaminem a tyraminem. Další aminy, jako například putrescin, kadaverin a fenylethylamin, jsou ale také důležité, protože mohou zesilovat nežádoucí účinky histaminu. Ostatní aminy mohou tvořit karcinogenní nitrosaminy, které vznikají reakcí sekundárních nebo terciárních aminů s nitrosačním činidlem. Obecně lze N-nitroso sloučeniny vytvářet během skladování, konzervace a vaření interakcí aminokyselin s nitrosačními činidly, jako jsou dusitany a oxidy dusíku [1, 2, 3].

Přestože jsou v potravinářství BA považovány za nebezpečné, v evropských právních předpisech neexistuje prahová hodnota pro tyto biomolekuly s výjimkou histaminu v produktech rybolovu. Pokud jsou přítomny ve vysokých koncentracích, mohou mít

toxikologické účinky, což způsobuje zdravotní problémy u spotřebitelů, zejména u citlivých jedinců. Proto je pro zlepšení kvality a bezpečnosti potravin důležitá znalost těchto dusíkatých sloučenin [3].

1.4 Význam biogenních aminů v organizmu a jejich toxicita

Biogenní aminy jsou zdroje dusíku a prekurzory pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů. Mají mnoho důležitých biologických funkcí. V nervovém systému člověka slouží jako neurotransmitery, které se podílí na nervovém přenosu. Nedostatek těchto neurotransmiterů může způsobit duševní poruchy, jako je dětský autizmus, poruchy spánku, deprese a Parkinsonova nemoc. Stanovení specifických rolí aminů je obtížné vzhledem k jejich komplikovaným interakcím a složitosti nervového systému. Mnoho jejich funkcí tedy nebylo zcela vysvětleno. Biogenní aminy nachází uplatnění rovněž v kardiovaskulárním systému při řízení krevního tlaku, v regulaci tělesné teploty a trávení. Mimo jiné hrají zásadní roli ve stabilizaci buněčné membrány, imunitních funkcích či prevenci chronických onemocnění, díky podílu na syntéze výše zmíněných nukleových kyselin a bílkovin. Tyto sloučeniny se realizují kromě toho i v regulaci růstu a plní úlohu mediátorů zánětu [3, 9].

Spermin a spermidin se nacházejí především vázané na polyanionické molekuly jako je DNA, RNA, ATP a fosfolipidy. Podílí se na regulaci růstu a proliferaci buněk, na regulaci transkripce DNA, translaci RNA, biosyntéze proteinů a dalších. Hrají roli při růstu, zrání a regeneraci střevních buněk. Spermidin dále řídí intracelulární pH a objem. Bylo zjištěno, že spermin i spermidin jsou škodlivé pro zdraví. U laboratorních zvířat vedlo jejich podávání k akutnímu poklesu krevního tlaku, respiračním potížím a nefrotoxicitě. Podílejí se také na karcinogenezi, invazi nádoru a metastázách. Ačkoliv jsou vysoké hladiny sperminu a spermidinu spojeny s těmito potenciálními zdravotními riziky, nebyly dosud stanoveny jejich zákonné limity v potravinách [3, 9].

Kromě sperminu a spermidinu jsou do syntézy DNA, RNA a proteinů zapojeny také kadaverin a putrescin. Putrescin přispívá k růstu buněk, buněčnému dělení a rovněž ke vzniku nádoru, protože předchází sperminu a spermidinu. Kadaverin se taktéž ujímá vzniku diaminů či polyaminů a slouží k regulaci růstu. Ačkoliv má každá buňka určitou schopnost syntetizovat polyaminy, zdá se, že tělo také spoléhá na nepřetržitý přísun polyaminů z potravin. Většina z nich není zachována ve střevní tkáni, ale distribuována do různých

orgánů v těle. Je pravděpodobné, že existuje tzv. pool pro polyaminy, z něhož jsou v případě potřeby kontrolovaným způsobem uvolňovány [1, 3, 9].

Histamin se ujímá některých funkcí souvisejících s vyrovnáváním tělesné teploty a regulací objemu žaludku, pH žaludku a mozkových aktivit, protože se podílí na základních funkcích, jako je neurotransmise a vaskulární propustnost. Hraje však také roli při zahájení alergické reakce a snižuje krevní tlak. Tyramin řídí několik fyziologických reakcí, jako je zvýšení krevního tlaku, vazokonstrikce. Histamin i tyramin patří mezi mediátory zánětu [1, 9].

Serotonin, jeden z klíčových neurotransmiterů centrálního nervového systému (CNS), se uplatňuje v mnoha kritických fyziologických mechanizmech, jako jsou poruchy nálady, spánek, regulace chuti k jídlu, sexuální chování či regulace průtoku krve v mozku. Jako neurotransmiter v lidském CNS funguje i fenylethylamin a tryptamin, který zároveň slouží i jako neuromodulátor. Fenylethylamin i tryptamin zvyšují krevní tlak [1, 9].

Agmatin má několik funkcí, jako je regulace syntézy oxidu dusnatého, účastní se metabolizmu polyaminů a další [9].

Ikdyž se BA podílejí na několika biologických činnostech, nadměrný perorální příjem těchto molekul může způsobit u člověka několik zdravotních problémů, zejména pokud jsou užívány v kombinaci s alkoholem a antidepresivy. Rovněž mohou být tyto sloučeniny rizikem při dalších zdravotních komplikacích, například při zhoršené funkci jater, kdy je porušen proces štěpení BA. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (The European Food Safety Authority, EFSA) považuje z toxikologického hlediska za nejdůležitější BA histamin a tyramin, protože jejich konzumace ve vysokých koncentracích může u určitých jedinců způsobit zdravotní problémy jako je hypertenze, bolest hlavy, bušení srdce a zvracení. Mezi další potíže lze zařadit nevolnost, průjem či bolesti břicha a vyvolávají rovněž vyrážku a svědění. Pro kontrolu koncentrace BA v potravinách může být regulována aktivita dekarboxyláz aminokyselin. Úroveň toxicity se liší v závislosti na množství požitých biogenních aminů a citlivosti člověka. Existují dva způsoby detekce biogenních aminů. Prvním způsobem se detekují mikroorganizmy, které mají schopnost produkovat BA a druhým způsobem je přímá kvantifikace [2, 8, 10].

Lidské tělo je vybaveno speciálním detoxikačním systémem. Hlavní systém se skládá ze dvou odlišných enzymů, monoaminooxidázy (MAO) a diaminooxidázy (DAO). Biogenní aminy přijaté potravou v malém množství jsou tímto systémem metabolizovány ve střevech. Histamin však může být detoxikován i metylací či acetylací. Míra schopnosti detoxikace BA

je velmi individuální. Pokud dojde k selhání detoxikačního systému (nadměrné množství v potravě, oslabení vlivem inhibitorů monoaminooxidáz), BA se dostanou do krevního oběhu a dochází k mnoha nežádoucím účinkům v organizmu [4, 10].

2 MIKROORGANIZMY S DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITOU

2.1 Dekarboxylázová aktivita mikroorganizmů

Přestože se dekarboxylázy aminokyselin u bakterií příliš nevyskytují, pro některé mikroorganizmy byla popsána schopnost tvořit BA. Druhy mnoha rodů, jako je *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas, Salmonella*, *Shigella*, *Photobacterium* a mléčné bakterie – například *Lactobacillus*, jsou schopny dekarboxylovat jednu nebo více aminokyselin [1, 11].

Pro vznik BA je nutná přítomnost volných aminokyselin, bakterií obsahujících dekarboxylázy a nezbytné je také zajištění podmínek, při kterých bakterie mohou růst a syntetizovat dekarboxylázy. Jelikož jsou druhy a kmeny různorodé, jsou různé i optimální podmínky pro tvorbu BA, jako je například teplota, pH, přístup kyslíku či obsah soli. Množství a typ vzniklých aminů v potravinách závisí na povaze výrobku a na přítomných mikroorganizmech [11, 12].

Produkce BA byla popsána u některých mikrobiálních skupin souvisejících s potravinami, zejména fermentovanými potravinami, jako jsou sýry. Hlavními producenty BA v sýrech jsou grampozitivní bakterie, například bakterie mléčného kvašení (BMK) (*Lactobacillus, Enterococcus*), většina gramnegativních bakterií popsaných jako obvyklé kontaminanty mléka – *Enterobacteriaceae* (*Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter*) a psychrotrofní bakterie (*Pseudomonas*) [13].

Obecně jsou mezi gramnegativními bakteriemi nejvýznamnějšími producenty histaminu, kadaverinu a putrescinu mikroorganizmy způsobující kažení, řadící se k enterobakteriím či pseudomonádám. Rod *Photobacterium* se často společně s *Aeromonas hydrophila* a enterobakteriemi, jako je například *Morganella morganii* a *Enterobacter aerogenes,* podílí na akumulaci histaminu v rybách a mořských produktech. Biogenní aminy produkované enterobakteriemi mohou být také nalezeny ve fermentovaných klobásách, mase a sýrech [14].

Schopnost produkovat BA je rozšířená i mezi grampozitivními bakteriemi. Dekarboxylázová aktivita byla nalezena u kmenů patřících do rodů *Staphylococcus* a *Bacillus*. Pozornost se však zaměřuje zejména na BMK, které jsou běžně přítomny ve zrající mikrobiotě několika fermentovaných potravin. Ve skutečnosti BMK mohou produkovat histamin, kadaverin, putrescin, ale jsou především nejvýznamnějšími

producenty tyraminu. Tyrosin-dekarboxyláza BMK je často schopna dekarboxylovat také fenylalanin (produkující 2-fenylethylamin), ale s menší účinností ve srovnání s tyrosinem. Tato schopnost byla potvrzena několika autory, kteří také zdůraznili, že fenylalanin byl použit enzymem jako substrát pouze v případě, že tyrosin nebyl k dispozici. Dekarboxylační kmeny *Lactobacillus curvatus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus paracasei* byly izolovány ze sýra, masa a klobás s vysokým obsahem BA [14].

2.2 Charakteristika vybraných bakterií

2.2.1 Rod *Lactococcus*

Laktokoky jsou grampozitivní, mezofilní, fakultativně anaerobní koky o velikosti 0,5 až 1,5 μm, které se vyskytují ve dvojicích nebo řetízcích. Řadí se k homofermentativním bakteriím mléčného kvašení, protože hlavním produktem jejich metabolizmu je L (+) kyselina mléčná. Jsou hojně rozšířeny v přírodě, především tam, kde probíhá spontánní kvašení biologického materiálu (mléko, rostliny). Využití nachází v mlékařském průmyslu, kde se používají jako zákysové kultury při výrobě zakysaných mlék, smetan, másla, tvarohů či sýrů [15, 16].

Rod *Lactococcus* byl vyčleněn z rodu *Streptococcus* a zahrnuje nehemolyzující, nepatogenní druhy. Mezi laktokoky se řadí sedm druhů – *Lactococcus lactis* (poddruhy *cremoris*, *lactis* a *hordniae*), *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis*, *L. chungangensis* a *L. fujiensis*. Druhová identifikace je založena na fyziologických, chemotaxonomických a molekulárně biologických kritériích. V praxi je často obtížné rozlišovat mezi *L. lactis* a *L. garvieae*, proto je pro spolehlivé určení nezbytná molekulárně biologická identifikace [16, 17].

Mezi nejvýznamnější zástupce patří *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *L. lactis* subsp. *lactis* a *L. lactis* subsp. *cremoris* jsou laktokoky tradičně používané v mléčných aplikacích. Hlavním rozdílem mezi danými poddruhy je tolerance soli a schopnost hydrolyzovat arginin. Oba tyto znaky jsou typické pro *L. lactis* subsp. *lactis*, ale chybí v případě poddruhu *cremoris*. Diacetyl produkující varianty *L. lactis* subsp. *lactis* jsou často označovány jako biovar. *diacetylactis* [15, 16].

Některé druhy mají schopnost produkovat bakteriociny, které inhibují grampozitivní bakterie. Nisin je širokospektrální lantibiotický bakteriocin produkovaný *L. lactis* a jediný

bakteriocin, který byl přijat jako potravinářská přídatná látka (E234) pro kontrolu kontaminujících grampozitivních bakterií [15, 16].

Mikroorganizmy testované v diplomové práci:

- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis,*
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris.*

2.2.2 Rod *Enterococcus*

Enterokoky patří mezi grampozitivní, nesporulující, fakultativně anaerobní koky o velikosti 0,8 až 1 μm, vyskytující se buď samostatně, ve dvojicích či ve formě krátkých řetězců. Některé jejich druhy mohou být pohyblivé. Vzhled buněk je od oválných až po protáhlé koky na základě použitého kultivačního média. Enterokoky mají pouze anaerobní katabolický metabolizmus a vytváří kyselinu mléčnou jako skoro jediný produkt metabolizmu cukrů. Proto se řadí mezi homofermentativní mléčné bakterie, stejně jako laktokoky. Enterokoky byly dříve zařazeny do rodu *Streptococcus* pod skupinou D, jelikož některé z nich nesou ve své buněčné stěně skupinový antigen D [15, 17, 18, 19].

Rod *Enterococcus* se vyznačuje svou odolností vůči nepříznivým podmínkám zevního prostředí. Zástupci tohoto rodu rostou v teplotním rozmezí 10 až 45 °C, rovněž na půdách s obsahem 6,5 % NaCl či 40 % žluči a při pH 9,6. Obvykle je snášeno také zahřátí na 60 °C po dobu 30 min [18].

Enterokoky se vyskytují především v trávicím traktu lidí a zvířat a jsou pravidelnou součástí střevní flóry. Jsou však přítomny rovněž v mléce a mléčných výrobcích. V pitné vodě mají funkci jako indikátory čerstvého fekálního znečištění. Obvyklými zástupci jsou *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*. *Enterococcus faecalis* se vyskytuje ve střevě, nicméně je i důležitým patogenem, který má poměrně vysokou rezistenci na antibiotika. Je původcem cystitid, vaginitid, hnisavých procesů na kůži a dalších. *Enterococcus durans* je zodpovědný za typickou tvorbu chuti v sýrech [15, 16, 19].

Mikroorganizmy testované v diplomové práci:

- *Enterococccus durans,*
- *Enterococcus faecalis.*

2.2.3 Rod *Salmonella*

Rod *Salmonella* se řadí mezi gramnegativní, nesporulující, fakultativně anaerobní tyčinky, které jsou většinou pohyblivé. Tyčinky mají rovný tvar a dosahují velikosti 0,7 – 1,5 × 2 – 5 μm. Rostou v rozmezí teplot 5 až 47 °C. Pro množení je vyžadována aktivita vody minimálně 0,93, ale přežívají i v sušených potravinách. V mražených potravinách mohou přežívat dokonce i několik měsíců. K jejich zničení je potřeba záhřev po dobu 15 až 20 minut na teplotu 60 °C. Nízké pH a dusitany ($NaNO_2$) vykazují pro tento rod inhibiční účinky. Salmonely nejsou náročné na kultivační média [15, 18].

Vnější membrána salmonel nese nepřehledné množství antigenů (O-antigeny) a značné množství antigenů bičíků (H-antigeny). Pro vyjádření nepravidelnosti v taxonomii se pro praxi zachovává označení sérovarů, ale nepíší se kurzivou a na začátku názvu nesou velké písmeno. Salmonely se tedy rozdělují na sérovary podle antigenů. Ze stovek izolovaných salmonel nakonec zbyly dva druhy, ze kterých je významná *Salmonella enterica* subspecies *enterica*, která má 1443 sérovarů. Z praktického hlediska jsou nejdůležitější sérovary Typhi (*S. enterica* subsp. *enterica* ser. Typhi), Paratyphi A, Paratyphi B, Enteritidis a Typhimurium. Mezi nejrozšířenější sérovar se zařazuje *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis [15, 20].

Veškeré druhy tohoto rodu vykazují pro člověka patogenitu. Některé jsou příčinou tyfových onemocnění, jiné způsobují otravy z potravin. Jednotlivé sérovary obvykle nesou název právě podle onemocnění, které způsobují. Kromě toho může být odvozen i z místa izolace a další. Salmonely zodpovídají za produkci několika typů toxinů. Mezi endotoxiny patří lipopolysacharidový endotoxin, který se váže na buněčnou stěnu. Dále produkují dva typy exotoxinů, prvním z nich je cytotoxin (shigalike toxin) a druhým je enterotoxin (choleralike) [15].

Zdrojem nákazy jsou nejčastěji divoká zvířata (ptáci, hlodavci), či krmiva. Přenos na člověka bývá zprostředkován potravinami živočišného původu. Jedná se o kontaminované nedostatečně tepelně opracované potraviny živočišného původu, kdy při výrobě bylo použito maso, mléko nebo vejce nemocných zvířat. Suroviny však mohou být kontaminovány také jiným způsobem a k namnožení salmonel může přispět nevhodné skladování potravin při zvýšených teplotách (paštiky, majonézy cukrárenské krémy apod.) [15].

Salmonely jsou původci gastroenteritid a rovněž alimentárních systémových infekcí. Gastroenteritidy jsou běžně spojovány se *Salmonella* Enteritidis a Typhimurium. Akutní

gastroenteritida se projevuje prudkým zánětem střevní sliznice, silnými průjmy, bolestmi břicha, zvracením, bolestmi hlavy, vysokou teplotou a zimnicí. Příznaky však odeznívají většinou během několika dní. Těžký průběh se může objevit u lidí s oslabených, starých, ale také u kojenců. Salmonely jsou přítomny ve stolici, nikoli v krvi [15, 20].

Za systémové alimentární infekce obvykle zodpovídá *Salmonella* Typhi a Paratyphi. Tyto bakterie způsobují onemocnění břišní tyfus a paratyfus. Příznaky zahrnují silnou bolest hlavy, zprvu zácpu, později krvavý průjem, zduření sleziny a jater. Salmonely jsou ve stolici, následně v krvi, a nakonec v moči. Onemocnění trvá několik týdnů. Jedinec se může nakazit kontaktem s nemocným člověkem, bacilonosičem, ale i nepřímo fekáliemi skrze kontaminované potraviny, vodu a sociální zařízení a další. Vzhledem k našim podmínkám je výskyt takových infekcí výjimečný [15, 20].

Mikroorganizmus testovaný v diplomové práci:

- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis.

2.2.4 Rod *Proteus*

Rod *Proteus*, stejně jako rod *Salmonella*, patří mezi gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinky. Pro rod *Proteus* je charakteristický plazivý růst na pevných živných půdách a výsledkem jsou silně se rozrůstající kolonie s dlouhými výběžky. Tyto organizmy jsou obvykle považovány za mezofilní, ale u několika kmenů bylo prokázáno, že rostou psychrotrofně. Největší pohyblivosti je zpravidla dosaženo při teplotě 20 °C. Při teplotě 37 °C pohyblivost mizí a následkem toho se při takové teplotě vytváří pouze malé kruhovité kolonie. U některých kmenů nejsou přítomny bičíky. Tvar buněk je proměnlivý, v kultuře jsou zastoupeny tyčinky, kulovité i vláknité tvary [15, 17, 19, 21].

Zástupci tohoto rodu se vyskytují v lidském trávicím traktu či u zvířat. Izolace je možná z kazící se zeleniny a masa, kde dochází k rozkladu bílkovin za vzniku silného zápachu (tvorba sirovodíku a indolu). Rod *Proteus* patří mezi nejrozšířenější hnilobné bakterie. Některé druhy mohou být patogenní a mohou být příčinou onemocnění močových cest [15, 17].

V potravinářství jsou důležité dva druhy – *Proteus mirabilis* a *Proteus vulgaris*. Tyto organizmy se nacházejí v zelenině, mase, drůbeži, sladkovodních rybách a syrovém mléce, jak bylo uvedeno výše. Jejich vstup do potravinového řetězce může být spojen s potravinami prostřednictvím fekální kontaminace, nejsou však nutně spolehlivým ukazatelem tohoto

typu kontaminace. Pro rozpoznání těchto dvou druhů se využívají biochemické testy. Důležitým znakem pro jejich rozlišení je i to, zda tvoří či netvoří indol. *Proteus mirabilis* patří mezi indol negativní. *Proteus mirabilis* je buď závažným patogenním mikroorganizmem v močovém traktu nebo se vyskytuje jako součást flóry u bércových vředů apod. U novorozenců může způsobit průjmy [19, 20, 21].

Mikroorganizmus testovaný v diplomové práci:

- *Proteus mirabilis.*

2.3 Růst bakterií

2.3.1 Stanovení růstu bakterií v tekuté půdě

Jednou z možností, jak sledovat velikost populace bakterií živých i mrtvých v tekuté půdě, je přímo počítání buněk v daném (malém) objemu pomocí mikroskopu. Mezi další způsoby patří měření zákalu, který například v jednotkovém objemu kultivační půdy způsobí nejméně statisíce buněk, či vážení sušiny buněk odebraných z kultivační půdy. Při měření zákalu či vážení sušiny je nutné zákal/hmotnost bakterií kalibrovat na počet buněk. Odběry a měření mohou být opakovány ve vybraných časových intervalech a na základě toho lze poznat průběh růstu bakteriální kultury [20].

Nejběžnějším způsobem pro hodnocení mikrobiálního růstu v roztoku je měření optické denzity při 600 nm (zkráceně OD600). Metoda je založena na detekci absorbance a v podstatě určuje, jaká část světla prochází vzorkem, konkrétně skrz suspenzi mikroorganizmů. Částice v roztoku rozptylují světlo a čím více částic (mikroorganizmů) je v roztoku obsaženo, tím více světla je rozptýleno. Proto replikující se populace bakterií nebo kvasinek zvyšují rozptyl světla a naměřené hodnoty absorbance. Nutno poznamenat, že absorbance je využívána pouze k určení rozsahu rozptylu světla a nikoli k měření fyzické absorbance. Během měření optické denzity při 600 nm se tedy měří rozptyl světla a ne absorbance [22].

Jak bylo vysvětleno, měření OD600 je metoda založená na množství světla rozptýleného danou kulturou a nejedná se o množství světla, které bylo absorbováno. V souladu s tím se pro měření OD600 teoreticky nepoužívá Lambert-Beerův zákon, který definuje lineární vztah mezi absorbancí a koncentrací absorbující molekuly. V praxi se však ukázalo, že navzdory absenci absorbance, lze Lambert-Beerův zákon použít pro kultury s nízkou hustotou. Hodnota OD600 tedy může přímo souviset s počtem mikroorganizmů, avšak pouze

v suspenzi s velmi nízkou hustotou. U kultur s vyšší hustotou má měření OD600 za následek spíše parabolickou křivku. Počet organizmů v takové kultuře lze vypočítat po kalibraci hodnot OD600 na počet organizmů [22, 23].

Hodnota OD600 poskytuje informace o růstu mikroorganizmů, jako jsou bakterie a kvasinky. Přesněji řečeno, mikrobiální růst koreluje s počtem organizmů v populaci a informuje, jak se mění v průběhu času. Pro sledování nepřetržitého mikrobiálního růstu jsou hojně využívané mikrodestičky. Vyžadují pouze 200 µl suspenze a automaticky měří pokrok v růstu ve zvoleném intervalu. Vzhledem k tomu, že je v mikrodestičce obvykle 96 jamek, je vhodná i pro porovnání různých kmenů. Informace o mikrobiálním růstu jsou potřebné v různých oblastech biologického a lékařského výzkumu. Měření optické denzity při 600 nm se využívá při experimentech s minimální inhibiční koncentrací (MIC), například při testování rezistence mikroorganizmů vůči antibiotikům, kde se testuje jejich účinnost. Dalším odvětvím, kde nachází OD600 využití, je například mikrobiální výroba. Mikroorganizmy mohou být samy o sobě průmyslovými výrobky, které se používají například při výrobě pečiva nebo sýra. Může se však jednat i o průmyslové produkty, jako jsou enzymy, antibiotika, vitamíny a mnoho dalších. Na počátku je vyžadována optimalizace organizmu včetně růstových charakteristik. Jakmile je organizmus a výrobní proces stanoven, je třeba tento proces sledovat. To zahrnuje monitorování mikrobiálního růstu pomocí OD600 pro kontrolu stavu výrobního procesu [22, 23].

Účinek monoacylglycerolů a esenciálních olejů na růst bakterií byl v diplomové práci sledován pomocí optické denzity (OD).

2.3.2 Růstová křivka

Růstovou křivku získáme zaznamenáváním počtu buněk po naočkování do tekuté půdy v čase. Počet buněk je uveden v logaritmické stupnici. Z této křivky lze rozeznat jednotlivé fáze množení – lag-fázi, exponenciální fázi, stacionární fázi, fázi odumírání a smrti buněk. Mezi jednotlivými fázemi existují pozvolné přechody [20, 24].

- **Lag-fáze**

Po naočkování se buňky nejdříve musí adaptovat na nové podmínky a metabolizmus se musí přepnout z klidové fáze na aktivní. Během této přípravné fáze se buňky nerozmnožují, ale zvětšuje se jejich objem a aktivuje se jejich enzymový systém. Délka lag-fáze je závislá na druhu mikroorganizmu, fyziologickém stavu buněk, velikosti inokula (nepřímá úměra)

a také na složení nového růstového prostředí. Na konci lag-fáze se buňky začínají dělit, ale ne však ještě stálou rychlostí – fáze zrychlení růstu [17, 20, 24].

- **Exponenciální fáze**

Během fáze zrychlení růstu se tedy buňky začínají pomalu a nesynchronně dělit, dochází k ohýbání křivky a následuje přechod do fáze vyrovnaného růstu, kdy je dosaženo konstantní a maximální rychlosti množení. Všechny buňky se dělí stejnou rychlostí, rovněž bílkoviny a nukleové kyseliny se syntetizují stejným tempem. Počet buněk roste exponenciálně, proto se tento časový úsek označuje jako exponenciální fáze. Někdy se tento interval označuje také jako logaritmická fáze, což je odvozeno z lineárního průběhu této části křivky po vynesení logaritmu počtu buněk v čase. Rychlost dělení buněk závisí na druhu mikroorganizmu, na teplotě a na složení kultivačního prostředí a uvádí se zpravidla jako generační doba. V uzavřeném systému (například nádobka s bujónem) postupně dochází v kultivačním médiu k úbytku živin a příbytku zplodin metabolizmu ovlivňujících hlavně pH prostředí. Následkem toho dochází ke zpomalování rychlosti dělení buněk – fáze zpomalení růstu [20, 24].

- **Stacionární fáze**

Rychlost množení buněk se postupně snižuje a po fázi zpomalení se dostává do úseku stacionární fáze. Stacionární fáze je charakterizována zastavením přírůstku živých buněk. Může zde docházet ještě k velmi pomalému rozmnožování a tím se kompenzuje počet odumírajících buněk. Ve stacionární fázi tedy životaschopných buněk nepřibývá ani neubývá. Vzhledem k nedostatku živin mohou být buňky v této fázi menší. Maximální délka stacionární fáze se u jednotlivých mikroorganizmů liší, je závislá na jejich citlivosti k hladovění a charakteru prostředí [17, 20, 24].

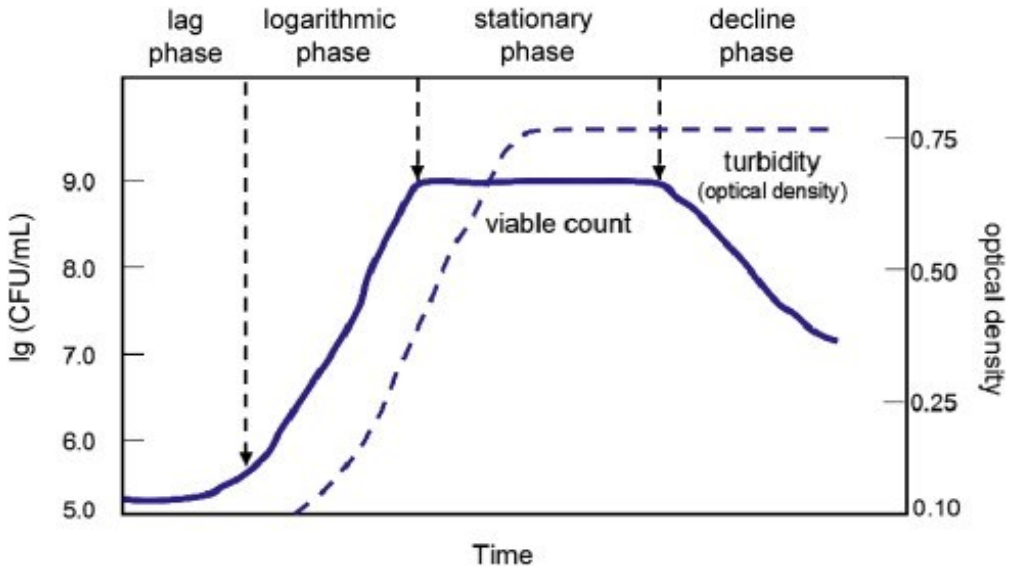
- **Fáze odumírání**

Jakmile začne po určité době živých buněk ubývat, jedná se o fázi hynutí. Rychlost, s jakou populace buněk hyne, závisí na druhu mikroba a charakteru prostředí. Někdy může být rychlost odumírání populace konstantní a křivka, která vyjadřuje počet přežívajících buněk v čase, má exponenciální tvar, ale opačného směru oproti křivce ve fázi logaritmické. Toto nastává, když buňku usmrtí jediný zásah nepříznivého faktoru. Nicméně v buňce obvykle dochází ke kumulaci několika těchto zásahů a kinetika odumírání nemá exponenciální

charakter. Fáze postupného odumírání buněk může u některých mikroorganizmů trvat týdny až měsíce [17, 20, 24].

V jednotlivých fázích růstové křivky jsou fyziologické vlastnosti buněk značně odlišné. Buňky pozdní lag-fáze a také růstových fází jsou více citlivé k nepříznivým podmínkám (zvýšená teplota, vysoký osmotický tlak, antimikrobiální látky) oproti buňkám stacionární fáze a na počátku lag-fáze [17].

Průběh růstové křivky a křivky při měření OD je vyobrazen na Obrázku 4.



Obrázek 4 Růstová křivka (plná čára) a měření optické denzity (čárkovaně) [25]

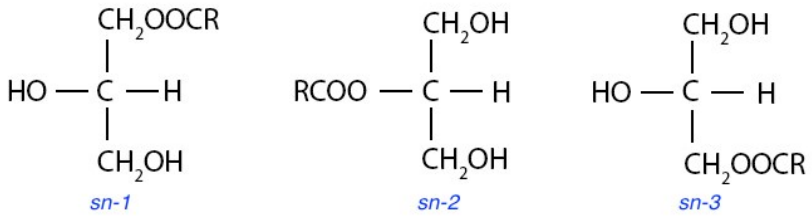
Pro sledování antimikrobiálních účinků různých látek je zjišťována minimální inhibiční koncentrace (MIC), která je charakterizována jako nejnižší koncentrace dané látky, která zabrání růstu příslušného mikroba. Určitý obraz o účinnosti antimikrobiální látky na příslušný mikroorganizmus dává kromě stanovení MIC také stanovení minimální baktericidní koncentrace (MBC). Minimální baktericidní koncentrace vystihuje nejnižší koncentraci antimikrobiální látky, která během 24 hodin usmrtí 99,9 % původní populace mikrobů [24].

3 MONOACYLGLYCEROLY

3.1 Charakteristika monoacylglycerolů

Tuky (acylglyceroly) jsou estery vyšších mastných kyselin a trojsytného alkoholu glycerolu (propan-1,2,3-triol). Na základě počtu esterifikovaných -OH skupin glycerolu se rozlišují na monoacylglyceroly (MAG), diacylglyceroly (DAG) a triacylglyceroly (TAG). Monoacylglyceroly jsou společně s diacylglyceroly označovány jako parciální estery glycerolu. Nejvíce rozšířené jsou v přírodě triacylglyceroly, u nichž na jednu molekulu glycerolu připadají tři esterově vázané mastné kyseliny [26, 27, 28].

Monoacylglyceroly jsou tedy estery glycerolu, kde je jedna hydroxylová skupina esterifikována mastnou kyselinou se středně dlouhým či dlouhým řetězcem. Existují ve dvou formách jako 1-acyl nebo 2-acyl izomery. Jednotlivé stereoizomery MAG jsou znázorněny na Obrázku 5. Jelikož se 1-acyl izomer a 3-acyl izomer od sebe vzájemně neliší, označují se jako α-monoacylglyceroly (1-monoacylglyceroly), zatímco 2-acyl izomery nesou označení jako β-monoacylglyceroly (2-monoacylglyceroly) [27, 29, 30, 31].



Obrázek 5 Stereoizomery monoacyl-*sn*-glycerolů [31]

Díky povaze jejich molekulární struktury patří mezi látky amfifilní – glycerolová kostra tvoří polární část a řetězec mastných kyselin představuje část nepolární. Monoacylglyceroly mají jak lipofilní, tak hydrofilní vlastnosti. Výsledná povrchová aktivita jim umožňuje sloužit jako emulgátory a pěnové stabilizátory ve zpracovaných potravinách. Monoacylglyceroly a jejich deriváty představují 75 % světové produkce potravinových emulgátorů. Využití však nenachází pouze v potravinářství, ale také v odvětví kosmetického a farmaceutického průmyslu [29, 32, 33, 34].

Lipidy, jako jsou mastné alkoholy, volné mastné kyseliny a monoacylglyceroly mastných kyselin, jsou také známy jako silné antimikrobiální či mikrobicidní látky in vitro. Při kontaktu zabíjejí obalené viry, houby a grampozitivní, popř. gramnegativní bakterie [35].

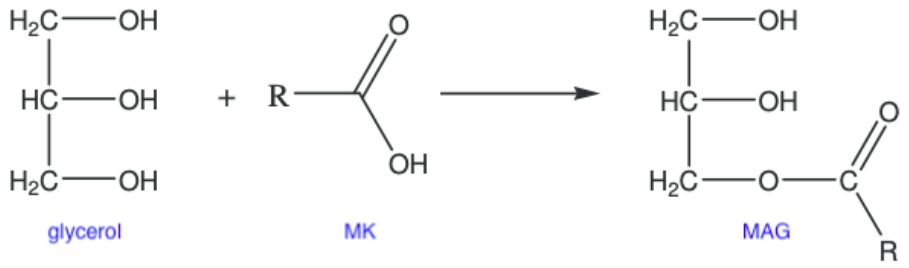
3.2 Výroba monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly lze vyrobit několika způsoby:

- esterifikací vyšších mastných kyselin s glycerolem,
- interesterifikací,
- parciální hydrolýzou triacylglycerolů,
- adicí mastné kyseliny na glycidol (oxiran-2-yl-methanol) [36].

3.2.1 Esterifikace vyšších mastných kyselin s glycerolem

Při esterifikaci volných mastných kyselin s glycerolem dochází nejdříve ke tvorbě MAG, dále DAG a nakonec TAG. Reakční rychlost se odvíjí podle struktury alkoholu, rozvětvenosti mastných kyselin a klesá s rostoucí molekulovou hmotností mastných kyselin. Během reakce se mohou využívat kyselé nebo zásadité katalyzátory. Díky katalyzátorům je dosaženo vysoké výtěžnosti, ale reakce probíhají pomalu. Při esterifikaci mohou vznikat jak 1-monoacylglyceroly, tak i 2-monoacylglyceroly. Na Obrázku 6 je schematicky vyobrazen princip esterifikace [36, 37].



Obrázek 6 Schéma esterifikace mastné kyseliny glycerolem [38, 39]

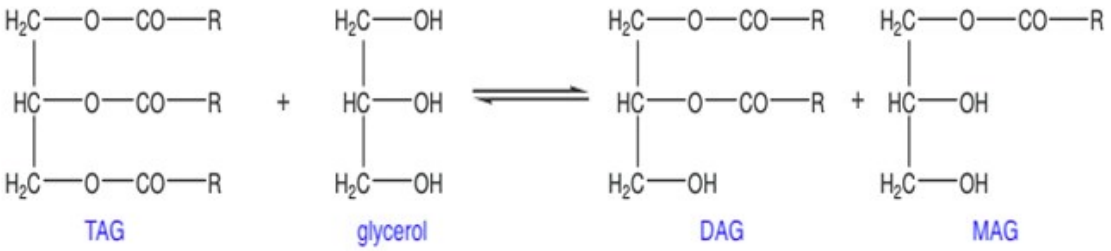
3.2.2 Interesterifikace

Interesterifikaci lze provádět jako alkoholýzu, kdy reaguje ester s alkoholem (glycerolem), dále jako acidolýzu, při níž reaguje ester s mastnou kyselinou, či jako transesterifikaci, ve které reaguje ester s esterem a dojde k výměně acylových zbytků [36].

Alkoholýza je poměrně pomalá reakce a acylglyceroly se rozpouští v alkoholické fázi pouze částečně. Při reakci dochází k výměně alkoholové složky esteru a využívají se zde alkalické katalyzátory při běžné laboratorní teplotě, nebo kyselé katalyzátory při vyšší teplotě (100

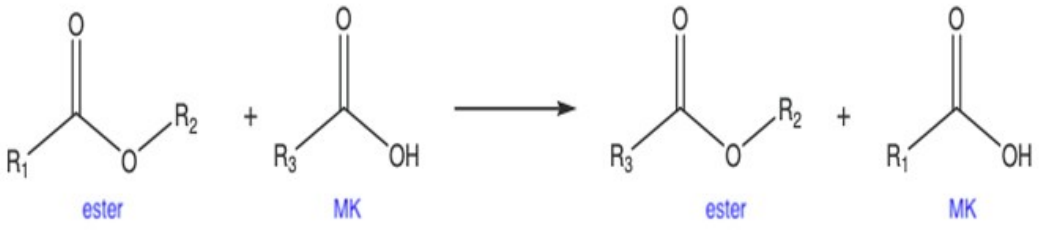
°C). Reakci je možno provést také bez použití katalyzátorů při teplotě přibližně 250 °C [36, 37].

Průmyslově lze MAG vyrobit kontinuální chemickou glycerolýzou přírodních tuků a olejů. Při reakci triacylglycerolů s molekulou glycerolu dochází k postupnému přecházení TAG v DAG a MAG (viz Obrázek 7). Výsledkem je směs volného glycerolu, monoacylglycerolů a diacylglycerolů. K přečišťování se využívá destilace. Výroba je energeticky náročná (vysoké reakční teploty kolem 170 °C) a výtěžnost je relativně nízká (50 – 55 %). Tento způsob výroby se využívá pro emulgátory, které se uplatňují v tukovém průmyslu či jiných potravinářských odvětvích [36].



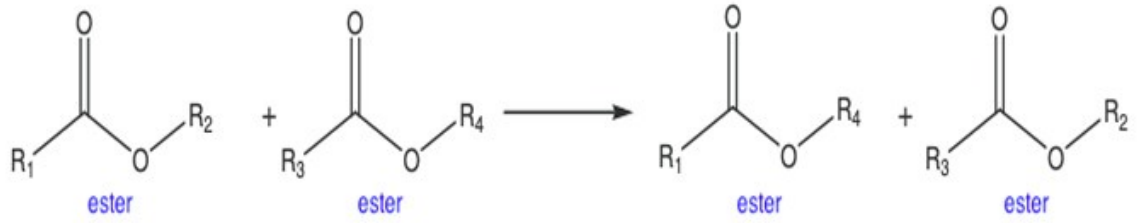
Obrázek 7 Schéma glycerolýzy [38, 39]

Acidolýza je reakce karboxylové skupiny volné kyseliny a příslušného esteru (viz Obrázek 8). Při reakci dochází ke vzniku meziproduktu, ze kterého se uvolní kyselina původně vázaná v esteru a vzniká nový ester. Acylový zbytek jedné mastné kyseliny se vymění za kyselinový zbytek jiné mastné kyseliny a vzniká TAG. Acidolýza probíhá při teplotě 250 °C, za kyselé katalýzy při teplotě 158 °C. Po ukončení reakce následuje hydrolýza, přičemž z TAG vznikají MAG. Acidolýza patří mezi neselektivní reakce [37].



Obrázek 8 Schéma acidolýzy [38, 39]

Transesterifikace je charakterizována výměnou acylové nebo alkoholové skupiny mezi dvěma molekulami esterů. Tato iontová reakce je katalyzována vodíkovými či hydroxylovými ionty. Schéma transesterifikace popisující průběh reakce je uvedeno na Obrázku 9 [37].

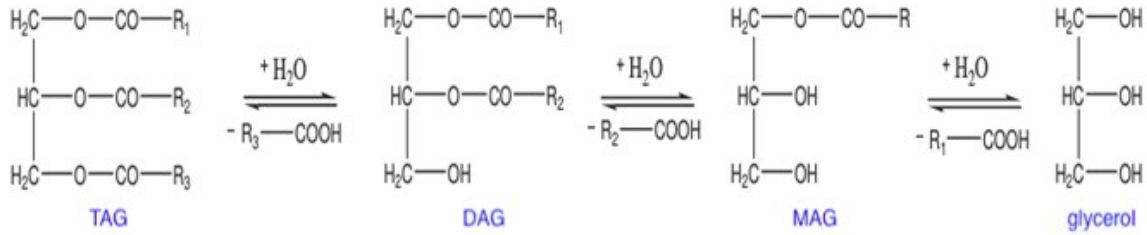


Obrázek 9 Schéma transesterifikace [38, 39]

3.2.3 Parciální hydrolýza triacylglycerolů

Hydrolýza je protikladem esterifikace. Triacylglyceroly se při této reakci štěpí na své původní složky – DAG, poté MAG, a nakonec mastné kyseliny a glycerol (viz Obrázek 10). Při reakci je vyžadována vysoká teplota a provádí se pod tlakem, nejčastěji s použitím zásaditých katalyzátorů. Reakce se využívá především pro výrobu mastných kyselin a MAG jsou vedlejším produktem, který se ze směsi izoluje [36].

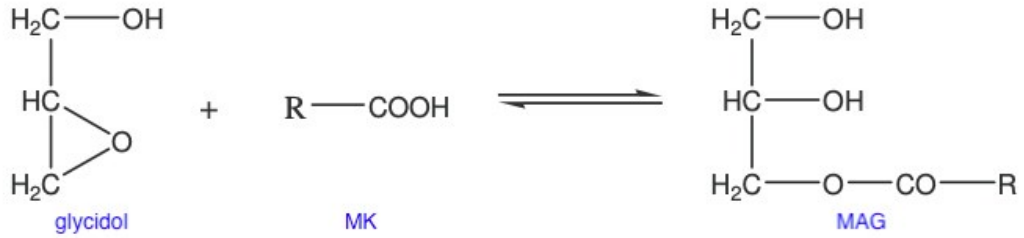
Dalším způsobem přípravy MAG je enzymatická hydrolýza za účasti 1,3-specifických lipáz, která se využívá především pro výrobu 2-monoacylglycerolů [36].



Obrázek 10 Schéma parciální hydrolýzy triacylglycerolů [38, 39]

3.2.4 Adice mastné kyseliny na glycidol

Další možností výroby MAG je adice mastné kyseliny na glycidol (oxiran-2-yl-methanol) nukleofilním otevřením epoxidového kruhu, jak je znázorněno na Obrázku 11. Pro reakci se používají jako katalyzátory terciární aminy, amoniové soli a komplexy tranzitních kovů (chrom, kobalt, titan a jiné). Mezi hlavní výhody patří univerzálnost této reakce, nepřítomnost vedlejších produktů, vysoká konverze (více než 95 %) při teplotě 90 °C a poměrně malé množství katalyzátoru. Nevýhodou je perzistence glycidolu a katalyzátoru (chromitých iontů), které se následně pro potravinářské a farmaceutické účely musí odstraňovat přečištěním [36].



Obrázek 11 Schéma adice mastné kyseliny na glycidol [38, 39]

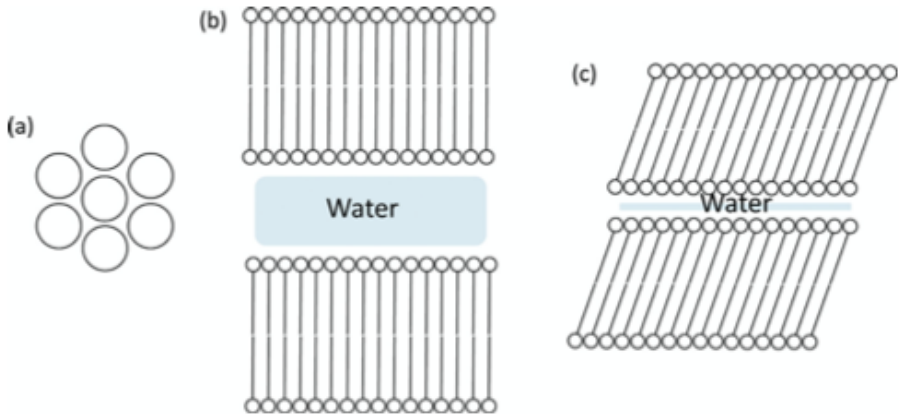
3.3 Vlastnosti a využití monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly jsou vzhledem k jejich amfifilnímu charakteru často používány jako emulgátory a neionické surfaktanty s nízkou hodnotou HLB (hydrofilně-lipofilní rovnováha), která leží mezi 3 a 6. Zájem o tyto sloučeniny vzrostl díky jejich poměrně jednoduché struktuře, dostupnosti, chemické stabilitě, a především kvůli jejich biokompatibilitě, biologické rozložitelnosti a nepřítomnosti iritačních účinků na člověka. Monoacylglyceroly jsou obecně považovány za látky bezpečné a mohou být s důvěrou aplikovány nejen v potravinách a krmivech, ale také ve farmaceutickém průmyslu, medicíně a kosmetice. Kromě toho mohou být použity při výrobě antimykotických materiálů, které se dostávají do kontaktu s kůží, či v produktech zabraňující fermentaci a další. Monoacylglyceroly jsou schopny vytvářet jedinečné struktury samy o sobě, nebo vytváří komplexy s jinými složkami v matrici, což ovlivňuje funkčnost a fyzikální vlastnosti konečného produktu. Funkčnost MAG v emulzních systémech je definována délkou řetězce a stupněm nasycení molekul, stejně jako jejich polymorfními formami [30, 32, 40].

Zajímavou vlastností MAG je jejich schopnost spontánně vytvářet různé tekuté krystalické fáze při kontaktu s vodou. Díky polymorfnímu chování mohou být krystaly MAG přítomny ve formách sub-α, α a β. Tyto polymorfní formy mohou přecházet a pouze krystaly β formy jsou termodynamicky stabilní. Zmíněné krystalické fáze tedy mohou ve skutečnosti koexistovat v termodynamické rovnováze, ale pouze za určitých podmínek prostředí (teplota, obsah vody, pH atd.). V závislosti na krystalické síti MAG a obsahu vody se gely liší pevností. Asymetrické 1-monoacylglyceroly vykazují při krystalizaci komplexní polymorfní chování. Jinak tomu je u symetrických 2-monoacylglycerolů, které krystalizují pouze do stabilních β-krystalů [32, 34, 41, 42].

Při zahřátí systému MAG-voda nad přechodovou Kraftovu teplotu T_k (Kraftův bod), dochází k absorpci vody těmito emulgátory díky hydrataci polárních hlavních skupin a MAG se sám organizuje do lamelární kapalné krystalické struktury (L_α fáze). Při teplotě nižší než T_k, může

L_α fáze přecházet do L_β fáze (nazývané také α-gel), která je vysoce hydratovaná a nestabilní. Ve struktuře α-gelu jsou molekuly emulgátoru v šestiúhelníkové sbalené lamelární struktuře, kde je vrstva vody strukturována mezi dvojvrstvu (viz Obrázek 12). V závislosti na teplotě a koncentraci emulgátorů se mohou také samy sestavit do kubických a šestihranných fází. Tyto struktury mají však vysokou viskozitu a špatnou disperzibilitu ve vodě, a proto nejsou žádoucí v potravinářských aplikacích. Některé emulgátory se mohou z metastabilní α-gelové fáze postupem času přeměňovat na termodynamicky stabilní koagelovou fázi – β-gel. Tento fázový přechod je doprovázen synerézou vody a destabilizací, proto omezuje aplikaci α-gelové fáze [32, 41].



Obrázek 12 Struktura fáze α-gelu (a, b) a koagelu (c) [32]

α-gelová fáze je žádoucí strukturou v potravinách a produktech osobní péče. Struktura α-gelu umožňuje různé chemické a fyzikální interakce mezi molekulami emulgátoru, stejně tak mezi emulgátory a dalšími složkami, jako jsou sacharidy a bílkoviny, které jsou přítomny v komplexních potravinářských, farmaceutických a kosmetických matricích. Navíc α-gely zvyšují provzdušňování, pomáhají stabilizovat pěny a jsou široce používány u pečených výrobků. Některé emulgátory, jako jsou MAG, jsou schopny strukturovat tekutý olej do gelové textury a snižovat celkový obsah trans a nasycených tuků a zároveň se podobat fyzikálním vlastnostem pevných tuků. Jsou také schopny vytvářet emulze s vysokým množstvím vody, čímž se snižuje celkový kalorický obsah potravinářského výrobku. První použití MAG spojené s výrobou potravin sahá až do roku 1930. Dnes jsou široce používány v mnoha potravinářských aplikacích, zejména při výrobě pečiva, nápojů, zmrzlin, šlehaček či margarínů. U pečiva slouží pro zlepšení trvanlivosti (prevence retrogradace škrobu v důsledku tvorby komplexů monoacylglycerolů a amylóz) a pro retenci chuti. Další využití MAG nachází u mléčných výrobků a produktů na bázi oleje, kde se ujímají kontroly stability

emulze a pěny. Všechny tyto aplikace jsou založeny na potenciálu MAG adsorbovat na rozhraních, krystalizovat a kokrystalizovat [32, 34].

V kosmetických emulzích přispívá vysoký obsah vody ve struktuře lamelárního α-gelu k vyšší hydrataci pokožky ve srovnání s nelamelárními strukturami. U výrobků pro osobní péči je lamelární struktura α-gelové fáze podobná struktuře lidského *stratum corneum*. Emulze stabilizované lamelárními α-gelovými strukturami zvyšují dostupnost vody a podporují dodávku účinných látek do pokožky při lokální aplikaci krému. Tyto výrobky mají podobné senzorické, reologické a hydratační vlastnosti jako komerční produkty na bázi ropy a mohou je tak nahrazovat [32].

3.4 Antimikrobní účinky mastných kyselin a monoacylglycerolů

Za určitých podmínek mohou mastné kyseliny a monoacylglyceroly inhibovat růst vegetativních forem patogenních bakterií, virů, bakterií vytvářejících spory nebo kvasinek. Antimikrobní účinky volných mastných kyselin jsou známy již dlouhou dobu, nicméně přesný mechanizmus účinku stále není zcela jasný, stejně jako pro MAG. Mastné kyseliny i MAG jsou lipofilní látky a primárním cílem jejich útoku je cytoplazmatická membrána buněk. Bylo navrženo několik hypotéz, aby se způsob jejich působení vysvětlil. Jedna z teorií popisuje 1-MAG jako povrchově účinné látky, které pronikají a začleňují se do buněčné membrány, čímž mohou narušit propustnost membrány a transport živin. Pomocí elektronového mikroskopu byl zjištěn rozpad cytoplazmatické membrány a narušení integrity bakteriálních buněčných stěn vystavených 1-monoacylglycerolům. Alternativní hypotéza naznačuje, že mastné kyseliny s krátkými a středně dlouhými řetězci mohou pronikat v nedisociované formě do bakteriálních buněk, disociovat uvnitř a způsobovat acidifikaci obsahu buněk. Snížení intracelulárního pH může vést k inaktivaci intracelulárních enzymů a inhibici transportu živin. Inhibiční aktivita 1-MAG může být ovlivněna i jinými látkami. Některé sloučeniny, například albumin, fosfolipidy, škroby nebo cholesterol, mohou tvořit s MAG komplexy a blokovat jejich činnost. Naopak inhibiční účinek 1-MAG může být zvýšen pomocí organických kyselin, vysokých teplot nebo chelatačních činidel [30, 40, 43].

1-monoacylglyceroly patří k bezpečným a účinným antimikrobiálním látkám a jejich použití může být vhodnou alternativou k používání syntetických antimikrobiálních látek. Jedním z omezení pro určité aplikace je však jejich nerozpustnost ve vodných systémech. Tuto nevýhodu lze snížit zapouzdřením 1-MAG do vhodného mikroemulzního systému [30].

Obecně platí, že antimikrobiální účinek mastných kyselin a monoacylglycerolů závisí na délce uhlíkového řetězce mastných kyselin a na přítomnosti dvojných vazeb. Grampozitivní bakterie jsou citlivé na mastné kyseliny s krátkým a středně dlouhým uhlíkovým řetězcem a jejich estery. Tato citlivost je spojena s absencí lipopolysacharidů v buněčné stěně. Gramnegativní bakterie jsou naopak rezistentní vůči inhibičním účinkům 1-MAG. Lze tedy předpokládat, že u grampozitivních bakterií MAG napadají buněčnou (cytoplazmatickou) membránu, která následkem ztrácí svou polopropustnost a dochází k poškození bakteriálních buněk. Zatímco u gramnegativních bakterií může být napadená vnější membrána, ale nedochází k poškození polopropustnosti buněčné membrány a následkem toho jsou bakterie schopny MAG tolerovat. Inhibiční účinek MAG může být pozorován pouze u gramnegativních bakterií, které mají jasně definované životní podmínky a vykazují relativně nízkou odolnost vůči nepříznivým podmínkám prostředí. Mezi takové druhy bakterií mohou být zahrnuty například *Chlamydia trachomatis* nebo *Neisseria gonorrhoeae*. Různé složení buněčné stěny u grampozitivních a gramnegativních bakterií může být příčinou odlišného účinku MAG na tyto dvě skupiny bakterií [30, 43].

Existuje mnoho studií zabývajících se antimikrobním účinkem jednotlivých MAG. Jak již bylo zmíněno obvykle tedy platí, že grampozitivní bakterie jsou náchylnější k antibakteriálnímu účinku lipidů než gramnegativní bakterie, ale existuje mnoho výjimek z tohoto zobecnění. Při testování nasycených mastných kyselin v délce řetězce od C6 do C18 bylo zjištěno, že kyselina laurová (C12) má největší antibakteriální aktivitu proti grampozitivním bakteriím. Aktivity mastných kyselin s dlouhým řetězcem byly zvýšeny přidáním dvojné vazby. Kabara [44] dospěl k závěru, že středně dlouhé řetězce nasycených mastných kyselin, zejména kyselina laurová a nenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, především kyselina palmitolejová (C16:1) a linolenová (C18:2), jsou nejaktivnější proti grampozitivním bakteriím. Monoacylglyceroly se středně dlouhým řetězcem nasycených mastných kyselin, obzvlášť monolaurin, jsou aktivnější než volné mastné kyseliny a volné mastné kyseliny mají velmi nízkou aktivitu proti gramnegativním bakteriím [35].

Ve studii Buňkové et al. [43] byly in vitro porovnány inhibiční účinky sedmi 1-monoacylglycerolů obsahujících mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem na patogeny přenášené potravinami nebo na bakterie způsobující kažení. Testované MAG zahrnovaly mimo jiné i monokaprylin (MAG C8:0), monokaprin (MAG C10:0) a monolaurin (MAG C12:0), které byly rovněž sledovány v praktické části této diplomové práce. V rámci

testovaných 1-MAG vykazovaly nejlepší inhibiční účinky na růst grampozitivních bakterií MAG C10:0, MAG C11:0 a MAG C12:0. MAG C8:0 a MAG C16:0 byly nejméně účinné proti testovaným grampozitivním bakteriím. Dané grampozitivní bakterie byly tedy citlivé zejména na 1-MAG obsahující mastné kyseliny s 10 až 14 uhlíky v řetězci. Inhibiční účinky MAG testovaných na grampozitivních bakteriích byly seřazeny podle minimálních inhibičních koncentrací a indikátorů růstu v následujícím pořadí: MAG C12:0 > MAG C11:0 > MAG C10:0 > MAG C14:0 > MAG C11:1 > MAG C8:0 > MAG C16:0. Použité 1-MAG neměly žádný účinek na testované gramnegativní bakterie s výjimkou nejvyšších použitých koncentrací (1500 mg/l).

4 ESENCIÁLNÍ OLEJE

4.1 Charakteristika esenciálních olejů

Esenciální oleje (neboli éterické oleje) jsou koncentrované, vonné, vysoce těkavé látky přítomné v rostlinách. Vzhledem k jejich těkavosti mohou být tyto látky izolovány například pomocí parní destilace z aromatické rostliny jediného botanického druhu a mohou být detekovány jak vůní, tak chutí [45, 46].

Jednotlivé éterické oleje jsou známy názvem rostliny, ze které jsou odvozeny a vůně je podobná části rostliny, ze které jsou získány, i když je obecně více intenzivní. Při extrakci se používá část rostliny, ze které lze získat největší množství oleje – květy, listy, stonky, kůra, semena nebo kořeny keřů, bylin či stromů. Aromatická látka, která je obsažena v rostlině se nazývá esence a po destilaci z rostliny se označuje jako esenciální olej. Tyto jemné, vysoce aromatické extrakty rostlin jsou obsažené v jejich speciálních buňkách či žlázách. Éterické oleje se mohou kromě aromatických rostlin vyskytovat rovněž v živočišných zdrojích (např. pižmo, cibet), nebo mohou být produkovány mikroorganizmy [45, 46, 47].

Příkladem rostlinných čeledí bohatých na esenciální oleje jsou:

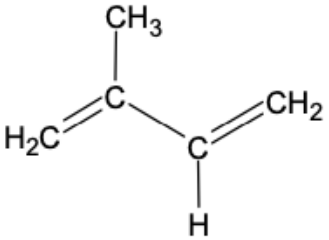
- *Apiaceae* – miříkovité,
- *Asteraceae* – hvězdnicovité,
- *Cupressaceae* – cypřišovité,
- *Hypericaceae* – třezalkovité,
- *Lamiaceae* – hluchavkovité,
- *Lauraceae* – vavřínovité,
- *Myrtaceae* – myrtovité,
- *Pinaceae* – borovicovité,
- *Piperaceae* – pepřovníkovité,
- *Rutaceae* – routovité,
- *Santalaceae* – santálovité,
- *Zingiberaceae* – zázvorníkovité,

- *Zygophyllaceae* – kacibovité [47].

Existují dvě hlavní skupiny metabolitů, které lze nalézt v přírodě – primární a sekundární metabolity. Primární metabolity jsou univerzální sloučeniny přítomné ve všech živých organizmech a zahrnují bílkoviny, sacharidy, lipidy či nukleové kyseliny. Sekundární metabolity se nacházejí pouze u některých druhů a jsou klasifikovány jako terpenoidy, šikimáty, polyketidy a alkaloidy [48].

Esenciální oleje se skládají z různých chemických sloučenin. Složky rostlinných esenciálních olejů spadají především do dvou odlišných chemických tříd – terpenů a fenylpropanoidů. Ačkoli jsou terpeny a jejich oxoderiváty (terpenoidy) v esenciálních olejích častější a hojnější, některé druhy obsahují také velké množství šikimátů, konkrétně fenylpropanoidů. Přítomnost těchto sloučenin poskytuje rostlině specifickou vůni a chuť [48].

Složky esenciálních olejů lze klasifikovat jako terpenoidní a neterpenoidní ulovodíky. Terpenoidní uhlovodíky jsou výsledkem „hlava-pata“ přesmyku jedné nebo více izoprenových jednotek. Terpeny jsou největší a nejrozmanitější třídou těkavých organických sloučenin a jsou rozděleny do různých strukturálních a funkčních tříd. Podle počtu izoprenových jednotek v jejich struktuře jsou rozděleny na hemiterpeny (jedna jednotka), monoterpeny (dvě jednotky), seskviterpeny (tři jednotky), diterpeny (čtyři jednotky) atd. Izopropenová jednotka je znázorněna na Obrázku 13 [47, 48].



Obrázek 13 Izoprenová jednotka (2-methylbuta-1,3-dien) [49]

Fenylpropanoidy jsou syntetizovány metabolickou cestou kyseliny šikimové. Obsahují jeden nebo více C6-C3 fragmentů, kde C6 představuje benzenové jádro. Součástí esenciálních olejů jsou zpravidla jednoduché fenylpropanoidy [47, 48].

Neterpenoidní uhlovodíky, nacházející se v esenciálních olejích, jsou tvořeny metabolickou konverzí či degradací fosfolipidů a mastných kyselin. Jedná se obvykle o alkoholy

a aldehydy s krátkým řetězcem. Kromě uhlíku a vodíku mohou rovněž obsahovat kyslík, dusík nebo síru [47].

4.2 Výroba esenciálních olejů

Esenciální oleje lze získat různými způsoby. Mezi nejčastější patří parní destilace, lisování za studena, extrakce za použití rozpouštědel a jiné. Volba techniky využití aromatických rostlin musí být přizpůsobena přesně požadované sloučenině [46, 50].

4.2.1 Lisování za studena

Lisování za studena je nejstarší extrakční metodou a používá se téměř výhradně pro výrobu citrusových esenciálních olejů. Skládá se buď ze samostatného vyjádření perikarpů pod vodním proudem, nebo z drcení celého plodu mezi kovovými válci. Tento proces má za následek tvorbu vodnaté emulze, která je následně odstřeďována, aby došlo k oddělení esenciálního oleje [50, 51].

Až do počátku dvacátého století byla průmyslová výroba citrusových olejů lisovaných za studena prováděna ručně. Důvodem pro extrakci esenciálních olejů z citrusové kůry pomocí mechanických metod je tepelná nestabilita přítomných aldehydů. Esenciální oleje z necitrusových plodů, jako jsou bobule, nejsou obvykle extrahovány touto metodou [51].

4.2.2 Extrakce rozpouštědlem

Tento způsob lze použít k extrakci éterických olejů, které jsou tepelně labilní (např. esenciální oleje z květu). Během procesu se rostlinný materiál umístí do rozpouštědlové lázně, která jej rozpustí. Po extrakci kapalná směs, která obsahuje éterický olej (spolu s dalšími sloučeninami), prochází filtračním procesem a následnou destilací. Mezi běžně používaná rozpouštědla pro extrakci patří alkohol, hexan, ethanol, petrolether či methanol [51].

Hlavní výhodou extrakce při destilaci je to, že se během procesu používá nižší teplota, čímž se snižuje riziko chemických změn způsobených vysokými teplotami, které se používají při destilaci. Extrakce rozpouštědlem je levná a relativně rychlá metoda. Jelikož je rychlost difúze ovlivňována teplotou, je možné ji podpořit pomocí horkých rozpouštědel [51].

Vyrobený éterický olej obsahuje rovněž malé množství rozpouštědla jako zbytku, a proto jej není možné použít pro potravinářské aplikace. Získaný olej se však považuje za bezpečný

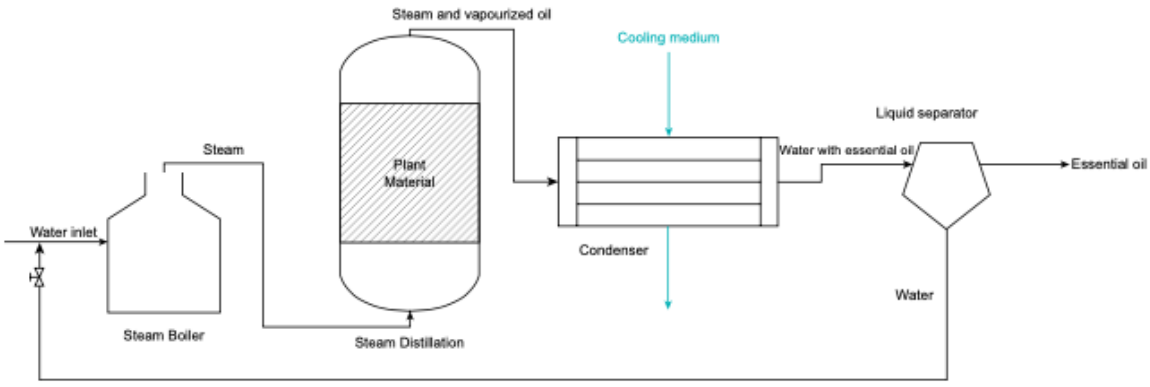
pro spotřebu, když je použitým rozpouštědlem alkohol. Tato metoda se běžně používá v průmyslu parfémů [51].

4.2.3 Enfleuráž

Enfleuráž je další konvenční metoda extrakce, která sahá až do starověku. Používá se hlavně pro extrakci éterických olejů z květů (např. jasmínu). Během této metody se na rostlinný materiál (např. květiny) nanáší vyčištěný studený tuk bez zápachu. Odér je uvolňován květinami a následně rozpuštěn v tuku. Nové květiny nahrazují staré a proces se opakuje velmi dlouhou dobu, dokud není dosaženo saturace tuku. Následně se tuk sbírá a extrahuje alkoholem. Podle dnešních standardů je to časově náročná, pracná a nákladná metoda [51].

4.2.4 Destilace

Nejběžněji používanou metodou extrakce je destilace parou nebo destilace vodou. Destilační procesy jsou založeny na kodestilaci vody a těkavých organických sloučenin. Proces extrakce může trvat 1 až 10 hodin. Množství vyprodukovaného oleje závisí na délce destilační doby, teplotě, tlaku a druhu rostlinného materiálu. Během destilace jsou rostlinné materiály vystaveny vroucí vodě nebo páře, aby došlo k uvolnění éterického oleje odpařením. Jakmile páry a éterický olej kondenzují, shromažďují se a následně se oddělují v nádobě (viz Obrázek 14) [50, 51].



Obrázek 14 Průmyslová extrakce esenciálních olejů (destilace parou) [51]

Extrakce éterického oleje destilací má však i mnoho nedostatků. Vzhledem k tomu, že jsou éterické oleje po dlouhou dobu vystaveny vroucí vodě, může docházet ke tvorbě artefaktů díky působení vysoké teploty nebo kyselosti vody. To může vést k rozdílům ve složení těkavých olejů, které se extrahují. Během destilace může dojít k hydrolýze esterů na alkoholy a kyseliny, což může způsobit vážné důsledky v případě olejů s velkým množstvím esterů.

Některé éterické oleje navíc vyžadují rektifikaci. Tento proces zahrnuje redestilaci oleje, aby se eliminovaly nežádoucí nečistoty (např. vosky), jakož i složky, které mohou dodávat nepřijatelný odér [51].

Tradičně používané extrakční metody (destilace parou či extrakce rozpouštědly) vykazují jisté nevýhody, jako je nízký výtěžek, ztráta těkavých sloučenin, dlouhé doby extrakce či zbytky toxických rozpouštědel. To vedlo k vývoji alternativních technik, jako je například extrakce superkritickou tekutinou, extrakce pomocí mikrovln a další. Ve srovnání s konvenčními postupy tyto nové techniky umožňují zkrácení doby potřebné k ošetření, menší spotřebu energie a poskytují extrakty v lepší kvalitě [50, 51].

Zmíněné metody však nejsou uznány z právního hlediska, protože nesplňují normu definující esenciální olej, ve které je stanoveno, že se musí jednat o výrobek získaný z rostlinné suroviny – buď destilací vodou nebo parou, nebo z epikarpu citrusových plodů mechanickým postupem, či suchou destilací. Proto jsou produkty získané těmito alternativními postupy nazývány jako aromatické extrakty [50, 52].

4.3 Vlastnosti a využití esenciálních olejů

Jak je definováno výše, éterické oleje jsou komplexní směsi tvořené mnoha složkami, obvykle kapalnými, ale někdy tuhými. Při pokojové teplotě mají tyto směsi většinou bezbarvou až mírně nažloutlou barvu, pokud jsou čerstvě destilované a vyznačují se aromatickou vůní. Na dotek jsou velmi čisté a jsou snadno absorbovatelné pokožkou. Na rozdíl od mastných rostlinných, živočišných nebo minerálních olejů kapka éterického oleje na filtrační papír rychle zmizí. Esenciální oleje mají obvykle nízkou hustotu, s výjimkou zvláštních případů, např. oleje ze skořice či hřebíčku, které jsou hustší než voda. Mají špatnou rozpustnost ve vodě (jsou hydrofobní), ale rozpouští se ve většině běžných organických rozpouštědel, včetně ethanolu a diethyletheru. Éterické oleje se dobře mísí s rostlinnými oleji, tuky a vosky [45, 53].

Použití esenciálních olejů je velmi různorodé v závislosti na zdroji, kvalitě, extrakčním postupu atd. Příkladem mohou být jejich průmyslové aplikace při výrobě parfémů, kosmetiky, mýdel, šamponů nebo čisticích gelů. Dalším zajímavým aspektem těchto olejů je jejich potenciál jako terapeutických látek v aromaterapii či jako účinných a pomocných látek v různých léčivých přípravcích [45].

Aromaterapie může být ve skutečnosti hlavní aplikací éterických olejů jako léčivých látek. Podávání éterických olejů získaných z různých zdrojů se provádí prostřednictvím několika aplikačních metod [45].

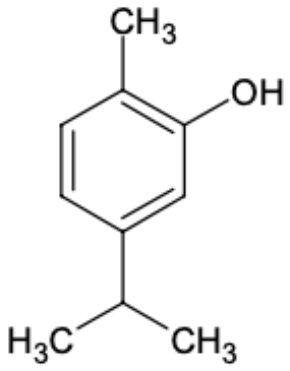
Nejběžnější způsob aplikace éterických olejů je lokální ve zředěných formách, často spolu s nosným olejem, jako součást masážní terapie. Esenciální oleje mohou být také inhalovány po přidání několika kapek do napařovací vody, nebo pomocí rozprašovače či zvlhčovače. Kromě toho mohou být použity jako masti, krémy a obklady. Účinnou metodou pro získání prospěšných účinků těchto látek je rovněž orální aplikace pomocí enkapsulace nebo jiných metod programovaného uvolňování. Mohou se pít ve formě čaje s cukrem nebo v měkkých tobolkách, což umožňuje přesnější dávkování a současně zabraňuje několika nežádoucím účinkům. Toxicita éterických olejů může být při podávání tímto způsobem vyšší [45].

Ve farmacii se esenciální oleje používají jako potenciální léčivé látky. To platí zejména pro éterické oleje z eukalyptu (*E. globulus*), máty peprné (*M. piperita*), anýzu (*P. anisum*), šalvěje (*S. officinalis*), hřebíčku (*S. aromaticum*) a čajovníku (*M. alternifolia*). Tyto oleje se mimo jiné používají k vykašlávání při léčbě kašle a bronchitidy (eukalyptus), jako antimikrobiální látky (šalvěj, čajovník a hřebíček), jako dekongestanty dýchacích cest (máta peprná) a jako léky proti nadýmání (anýz). Hřebíčkový olej se používá ve stomatologii pro své antiseptické a analgetické účinky, zatímco tea tree olej nachází uplatnění v dermatologii v přípravcích proti akné, protože vykazuje antimikrobiální aktivitu proti grampozitivním bakteriím. Kromě toho se některé éterické oleje používají pro aromatizaci farmaceutických přípravků a zlepšení jejich chuti [45].

Významná aplikace esenciálních olejů je také v zemědělsko-potravinářském průmyslu, a to jak pro výrobu nápojů, tak pro ochucení potravin. Používají se v široké škále spotřebního zboží, jako jsou cukrářské výrobky, nealkoholické nápoje a destilované alkoholické nápoje. Pro jejich antibakteriální, antifungální, antivirové, nematocidní, insekticidní a antioxidační vlastnosti se používají jako antioxidanty a konzervační látky potravin. Aplikace esenciálních olejů jako konzervačních látek vyžaduje dobrou znalost jejich vlastností, včetně citlivosti cílových mikroorganizmů. To zahrnuje i jejich specifický způsob účinku, antimikrobiální účinnost a vliv složek potravinové matrice na jejich antimikrobiální vlastnosti [45].

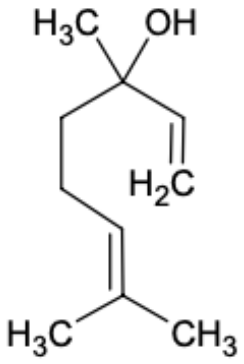
V praktické části diplomové práce byly pozorovány inhibiční účinky karvakrolu, linaloolu a limonenu na vybrané bakterie.

Karvakrol je monoterpenový alkohol, který se vyskytuje ve vysokých koncentracích v esenciálním oleji z *Thymus vulgaris* či *Origanum vulgare*. Karvakrol se používá jako chuťová přísada v řadě potravin a nápojů. Jeho struktura je znázorněna na Obrázku 15 [52, 54].



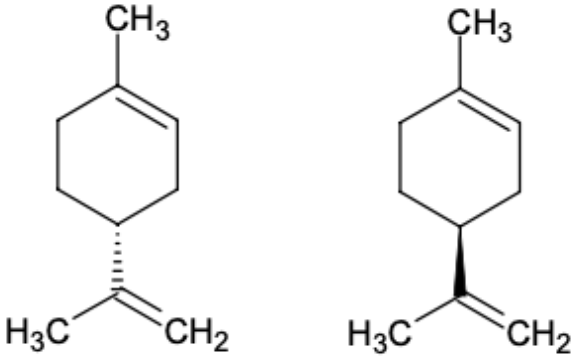
Obrázek 15 Chemická struktura karvakrolu [55]

Linalool je hlavní složkou oleje z *Ocimum basilicum*, ale patří také mezi nejhojnější komponenty v oleji získaném z *Lavandula angustifolia*. Čistý linalool má svěží lehkou květinovou vůni s jemným citrusovým efektem a používá se ve velkém množství v mýdlech a pracích prostředcích. Chemická struktura linaloolu je vyobrazena na Obrázku 16 [52, 54].



Obrázek 16 Chemická struktura linaloolu [56]

Limonen je nejhojnější složkou esenciálního oleje z *Citrus aurantium* a *Citrus limon*. Tato sloučenina existuje ve dvou enantiomerech a bylo zjištěno, že mezi jejich účinky existují mírné rozdíly. (R)-(+)-limonen je více biologicky aktivní než jeho isomer (S)-(-)-limonen. Limonen se používá jako vůně v domácích produktech a složkách umělých éterických olejů. Na Obrázku 17 je představena jeho chemická struktura [47, 52, 54].



Obrázek 17 Chemická struktura R-limonenu (vlevo) a S-limonenu (vpravo) [57]

4.4 Antimikrobní účinky esenciálních olejů

Antimikrobní nebo jiné biologické aktivity esenciálních olejů přímo korelují s přítomností jejich bioaktivních těkavých složek. Esenciální oleje se chemicky skládají z terpenoidních sloučenin (mono-, seskvi- a diterpenů), alkoholů, kyselin, esterů, epoxidů, aldehydů, ketonů, aminů a sulfidů. Lipofilní charakter jejich uhlovodíkové kostry a hydrofilní charakter obsažených funkčních skupin má zásadní význam pro antimikrobiální působení složek esenciálních olejů [47, 58].

Ačkoli byly antimikrobiální účinky těchto látek sledovány dlouhou dobu, mechanizmy účinku nejsou stále zcela pochopeny. Bylo navrženo několik mechanizmů, které by vysvětlily účinek sloučenin obsažených v esenciálních olejích. Éterické oleje se však skládají z několika složek a jejich antimikrobiální aktivita nemůže být potvrzena pouze na základě působení jedné sloučeniny. Několik výzkumníků navrhlo, že může být antimikrobiální účinek esenciálních olejů přičítán jejich schopnosti proniknout přes bakteriální membránu dovnitř buňky. Esenciální oleje vykazují inhibiční aktivitu na funkční vlastnosti buňky a jejich lipofilní vlastnosti [58].

Fenolická povaha esenciálních olejů také vyvolává antimikrobiální odezvu proti patogenům přenášených potravinami. Fenolické sloučeniny narušují buněčnou membránu, což vede k inhibici funkčních vlastností buňky, a nakonec způsobují vytékání vnitřního obsahu buňky. Mechanizmy účinku mohou být spojovány se schopností fenolických sloučenin měnit propustnost mikrobiálních buněk, poškozovat cytoplazmatické membrány, zasahovat do systému výroby buněčné energie (ATP) a další. Narušená propustnost cytoplazmatické membrány může mít za následek buněčnou smrt [58].

Důležitou vlastností esenciálních olejů a jejich složek je hydrofobicita. Ta jim umožňuje oddělit lipidy bakteriální buněčné membrány, mitochondrií a bakteriální buňka se stává propustnější. Interakce těchto látek s mikrobiálními buněčnými membránami má za následek inhibici růstu některých grampozitivních a gramnegativních bakterií. Obecně se předpokládá, že jsou esenciální oleje účinnější proti grampozitivním bakteriím, v důsledku přímé interakce buněčné membrány s hydrofobními složkami těchto olejů. Na základě tohoto předpokladu jsou gramnegativní buňky odolnější vůči rostlinným esenciálním olejům, protože mají hydrofilní buněčné stěny. Tato vnější vrstva pomáhá zabránit pronikání hydrofobních sloučenin [58].

Na antimikrobní působení karvakrolu, linaloolu a limonenu či jednotlivých olejů, ve kterých jsou tyto složky obsaženy, bylo provedeno několik studií. Často je poměrně obtížné porovnat výsledky získané z různých studií, jelikož složení esenciálních olejů se může značně lišit v závislosti na zeměpisných oblastech, odrůdě, věku rostlin a metodách sušení či extrakce oleje. Obvykle jsou ve většině éterických olejů za antibakteriální aktivitu zodpovědné hlavní složky, existují však studie, ve kterých mají esenciální oleje jako celek vyšší antibakteriální aktivitu než kombinace hlavních izolovaných složek. To naznačuje, že i minoritní složky jsou pro aktivitu esenciálních olejů důležité, protože pravděpodobně vyvolávají synergický účinek [47, 53].

Soković et al. [54] izolovali a testovali esenciální oleje z deseti bylin, které jsou běžně konzumovány a působí proti řadě potravinářských patogenů a mikroorganizmů způsobujících kažení. Zjistili, že největší aktivitu proti mikroorganizmům vykazoval esenciální olej, který byl získán z *Origanum vulgare* (oregano). Složkou s nejvyšší aktivitou byl karvakrol. Všechny testované oleje vykazovaly lepší aktivitu proti grampozitivním bakteriím než bakteriím gramnegativním, přičemž nejodolnější byly mikroorganizmy způsobující kažení – *Pseudomonas aeruginosa* a *Proteus mirabilis*. Ze studie je zřejmé, že uhlovodíkové monoterpeny projevují nejnižší antibakteriální aktivitu, zatímco oxosloučeniny mají vyšší potenciál (zejména sloučeniny fenolu jako thymol a karvakrol). Bylo zjištěno, že deriváty uhlovodíků vykazují nižší antimikrobiální vlastnosti díky jejich nízké rozpustnosti ve vodě, která omezuje jejich difúzi prostřednictvím média. Ketony, aldehydy a alkoholy jsou aktivní, ale s odlišnou specifičností a úrovní aktivity, která souvisí s přítomnou funkční skupinou. Výsledky ukázaly, že větší antimikrobiální potenciál by mohl být připisován oxygenovaným terpenům, zejména fenolickým sloučeninám. Z esenciálních olejů, které mají souvislost s touto diplomovou prací, se v jejich studii ukázal nejvíce aktivní

olej získaný z *O. vulgare*, dále z *Ocimum basilicum*, *Lavandula angustifolia* a v poslední řadě olej z *C. limon* a *C. aurantinum*. Z jednotlivých složek esenciálních olejů, rovněž vztažených k této diplomové práci, vykazoval nejslabší antibakteriální potenciál limonen, silnější účinky měl linalool, avšak úplně nejsilnější proti testovaným mikroorganizmům byl karvakrol.

Silná antibakteriální aktivita některých olejů (druhy *Mentha*, *T. vulgaris*, *O. vulgare*) a jejich složek (menthol, thymol, karvakrol) může být vysvětlena vysokým procentem těchto složek v daných olejích. U zbývajících olejů nebyla zjištěna žádná významná korelace mezi antibakteriální aktivitou a procentuálním zastoupením hlavních složek. To naznačuje, že složky přítomné ve vysokých poměrech nemusí být nutně zodpovědné za převážnou část celkové antimikrobní činnosti. Různé antibakteriální aktivity olejů ve srovnání s jejich hlavními složkami lze vysvětlit buď synergickým účinkem různých složek v daném oleji, jak bylo zmíněno výše, či přítomností jiných složek, které mohou být aktivní i v malých koncentracích [54].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cíle předložené práce byly vymezeny následovně:

- Stanovit inhibiční účinky vybraných 1-monoacylglycerolů v různých koncentracích na růst grampozitivních a gramnegativních bakterií.
- Stanovit inhibiční účinky vybraných esenciálních olejů v různých koncentracích na růst grampozitivních a gramnegativních bakterií.

6 POUŽITÁ ZAŘÍZENÍ A MATERIÁLY

6.1 Použité přístroje a pomůcky

- Autokláv Systec 2540EL
- Autokláv Varioklav H+P
- Biologický termostat Memmert INE 600
- Flow Box Clean Air
- Fotometr TECAN Sunrise TW/TC
- Vortex Mixer Labnet
- Densi-la-meter
- Laboratorní předvážky KERN
- Analytické váhy Sartorius BA 110 S
- Chladnička Electrolux
- Plynový kahan
- Automatické mikropipety Biohit, Nichyrio
- Bakteriologické kličky
- Laboratorní sklo (Petriho misky, kádinky, zkumavky, odměrné nádoby)
- Laboratorní plastové pomůcky (Petriho misky, mikrotitrační destičky, špičky pro automatické pipety, zkumavky, stojany)
- Ostatní běžně používané laboratorní vybavení a pomůcky

6.2 Použité bakteriální kmeny

V diplomové práci bylo testováno deset bakterií, které byly získány ze Sbírky mlékařských mikroorganizmů Laktoflora (CCDM) nebo z České sbírky mikroorganizmů (CCM).

- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946
- *Enterococcus durans* CCDM 53
- *Enterococcus faecalis* CCM 2665
- *Enterococcus faecalis* CCM 4224
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420
- *Proteus mirabilis* CCM 7188

6.3 Živná média

- Kultivační půda M17 Broth (HiMedia) – pro bakteriální kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, CCDM 141, CCDM 1004, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, CCDM 946, *Enterococcus durans* CCDM 53 a *Enterococcus faecalis* CCM 2665, CCM 4224
- Kultivační půda Nutrient Broth (HiMedia) – pro bakteriální kmeny *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 a *Proteus mirabilis* CCM 7188

6.4 Chemikálie

- 1-monoacylglycerol kyseliny kaprylové – monokaprylin (MAG C8:0)
- 1-monoacylglycerol kyseliny kaprinové – monokaprin (MAG C10:0)
- 1-monoacylglycerol kyseliny laurové – monolaurin (MAG C12:0)

  Monoacylglyceroly byly vyrobeny adicí příslušné mastné kyseliny (Sigma-Aldrich) na glycidol (Sigma-Aldrich) za katalytického působení chromitých iontů (chromium III acetát hydroxid – Sigma-Aldrich) na pracovišti Fakulty technologické, UTTTK.
- Karvakrol (Sigma-Aldrich)
- Linalool (Sigma-Aldrich)
- Limonen (Sigma-Aldrich)
- Ethanol denaturovaný (LachNer)
- Chlorid sodný (LachNer)

7 METODIKA

7.1 Příprava zásobních roztoků 1-monoacylglycerolů a esenciálních olejů

Zásobní roztoky 1-monoacylglycerolů byly připraveny následujícím způsobem. V 10 ml absolutního ethanolu byla rozpuštěna navážka 0,5 g příslušného MAG. Tímto postupem byl zásobní roztok připraven v koncentraci 5 % (w/v).

Zásobní roztoky esenciálních olejů o koncentraci 5 % (w/v) byly připraveny obdobným způsobem. Všechny připravené roztoky byly uchovány při laboratorní teplotě.

7.2 Příprava kultivačních půd a fyziologického roztoku

Tekutá půda M17 Broth

Bylo naváženo 21,25 g půdy M17 Broth a poté bylo přidáno 500 ml destilované vody. Takto připravená půda byla autoklávována při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

Tekutá půda Nutrient Broth

Navážka 3,25 g půdy Nutrient Broth byla smíchána s 250 ml destilované vody. Připravená půda byla rovněž autoklávována při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

Fyziologický roztok

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

7.3 Resuscitace mikroorganizmů

Zásobní kultury mikroorganizmů byly připraveny přeočkováním zmražených kultur na pevnou agarovou půdu M17 Broth resp. Nutrient Broth (či Plate Count agar, PCA) na Petriho miskách. Následně byly bakterie ponechány ke kultivaci při 30 °C po dobu 24 hodin.

Po celou dobu byly vyizolované bakterie uchovávány na Petriho miskách s příslušnými agary. Po 3 – 4 týdnech byly jednotlivé bakteriální kmeny přeočkovány a dále uchovávány při teplotě 4 ± 2 °C.

7.4 Příprava bakteriální suspenze

K vlastnímu experimentu byla použita suspenze bakterií. Z vyizolovaných bakteriálních kmenů pomocí frakcionovaného křížového roztěru byla sterilně očkovací kličkou odebrána

vyizolovaná kolonie příslušné bakterie. Bakteriální kolonie byla naočkována do zkumavky se 4 ml daného tekutého bujónu. Tekuté živné médium M17 Broth a Nutrient Broth sloužilo k pomnožení bakterií. Připravená bakteriální suspenze byla kultivována při 30 °C do druhého dne.

Suspenze bakterií byla po kultivaci v další zkumavce naředěna fyziologickým roztokem na hodnotu cca 0,5 dle stupnice McFarlanda.

7.5 Dekontaminace použitého materiálu

Veškerý použitý materiál byl dekontaminován v autoklávu při teplotě 132 °C po dobu 20 minut.

7.6 Sledování inhibičního účinku 1-monoacylglycerolů a esenciálních olejů na růst bakterií

Diluční metody se řadí mezi kvantitativní metody, kterými je možné stanovit minimální inhibiční koncentraci, což je nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která inhibuje růst testovaného mikroorganizmu. V předložené diplomové práci byla zvolena tzv. mikrodiluční metoda.

Účinek 1-monoacylglycerolů a esenciálních olejů na růst bakterií byl sledován s použitím přístroje TECAN Sunrise TW/TC. Růst bakterií byl pozorován na mikrotitračních destičkách po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C a byl hodnocen jako změna optické denzity suspenze buněk. Nárůst bakterií byl měřen při vlnové délce 600 nm v intervalech 60 minut. Před každým měřením byl vzorek protřepán po dobu 15 sekund. Přístroj byl řízen pomocí software Magellan.

Růst mikroorganizmů byl sledován v několika koncentracích jednotlivých monoacylglycerolů a esenciálních olejů. Pro monoacylglyceroly byly zvoleny koncentrace 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 mg/l a pro esenciální oleje 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 250, 500 mg/l. Použité koncentrace monoacylglycerolů a esenciálních olejů byly připraveny následujícím způsobem. Do zkumavky se 4 ml tekutého bujónu bylo sterilně napipetováno spočtené množství zásobního roztoku příslušného MAG, resp. esenciálního oleje. Konkrétní množství zásobních roztoků MAG a esenciálních olejů na přípravu použitých koncentrací je znázorněno v Tabulce 1 a 2.

Tabulka 1 Množství přídavku monoacylglycerolu pro získání dané koncentrace

Koncentrace MAG (mg/l)	Množství MAG (µl)	Množství bujónu (ml)
25	2	4
50	4	4
100	8	4
250	20	4
500	40	4
1000	80	4
1500	120	4

Tabulka 2 Množství přídavku esenciálního oleje pro získání dané koncentrace

Koncentrace es. oleje (mg/l)	Množství es. oleje (µl)	Množství bujónu (ml)
6,25	0,5	4
12,5	1	4
25	2	4
50	4	4
100	8	4
250	20	4
500	40	4

Na jedné mikrotitrační destičce byl sledován růst pěti bakteriálních kmenů v sedmi různých koncentracích monoacylglycerolů nebo esenciálních olejů. U všech koncentrací inhibičních látek, včetně kontrol, byl růst sledován duplicitně, tedy ve dvou jamkách mikrotitrační destičky.

Rozvržení vzorků v mikrotitrační destičce je představeno v Tabulce 3 pro monoacylglyceroly a v Tabulce 4 pro esenciální oleje.

Tabulka 3 Rozvržení vzorků v mikrotitrační destičce při testování různých koncentrací monoacylglycerolů

		Bez MO		M1		M2		M3		M4		M5	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0 mg/l	**A**	NK	NK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK
25 mg/l	**B**	NK	NK										
50 mg/l	**C**	NK	NK										
100 mg/l	**D**	NK	NK										
250 mg/l	**E**	NK	NK										
500 mg/l	**F**	NK	NK										
1000 mg/l	**G**	NK	NK										
1500 mg/l	**H**	NK	NK										

M1 – M5 představují použité bakteriální kmeny, NK – negativní kontrola, PK – pozitivní kontrola

Tabulka 4 Rozvržení vzorků v mikrotitrační destičce při testování různých koncentrací esenciálních olejů

		Bez MO		M1		M2		M3		M4		M5	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0 mg/l	**A**	NK	NK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK
6,25 mg/l	**B**	NK	NK										
12,5mg/l	**C**	NK	NK										
25 mg/l	**D**	NK	NK										
50 mg/l	**E**	NK	NK										
100 mg/l	**F**	NK	NK										
250 mg/l	**G**	NK	NK										
500 mg/l	**H**	NK	NK										

M1 – M5 představují použité bakteriální kmeny, NK – negativní kontrola, PK – pozitivní kontrola

Do každé z jamek mikrotitrační destičky byl pipetován vzorek v celkovém objemu 205 µl, a to 200 µl kultivačního média (M17 Broth nebo Nutrient Broth) s příslušnou koncentrací monoacylglycerolu, či esenciálního oleje a 5 µl suspenze bakterií. Jako pozitivní kontrola byly použity jamky, do kterých bylo pipetováno 200 µl kultivačního média bez příslušné inhibiční látky a 5 µl suspenze bakterií. V případě negativní kontroly bylo do jamek pipetováno 200 µl bujónu obsahujícího MAG v příslušné koncentraci bez buněčné suspenze.

Z naměřených hodnot optické denzity byly po 24 hodinové kultivaci sestrojeny růstové křivky pomocí závislosti optické denzity na čase. Tyto křivky jsou součástí příloh. Změny růstu bakterií v prostředí s monoacylglyceroly a esenciálními oleji byly hodnoceny jako index růstu (IR) podle Blaszyk a Holley [59]:

$$IR = \frac{(OD_{600} - NK)}{PK} \cdot 100$$

– kde IR je index růstu, OD600 optická denzita testované kultury v médiu s příslušnou koncentrací inhibiční látky, NK optická denzita negativní kontroly pro příslušnou koncentraci inhibiční látky a PK optická denzita pozitivní kontroly.

8 VÝSLEDKY

8.1 Vliv 1-monoacylglycerolů na růst bakterií

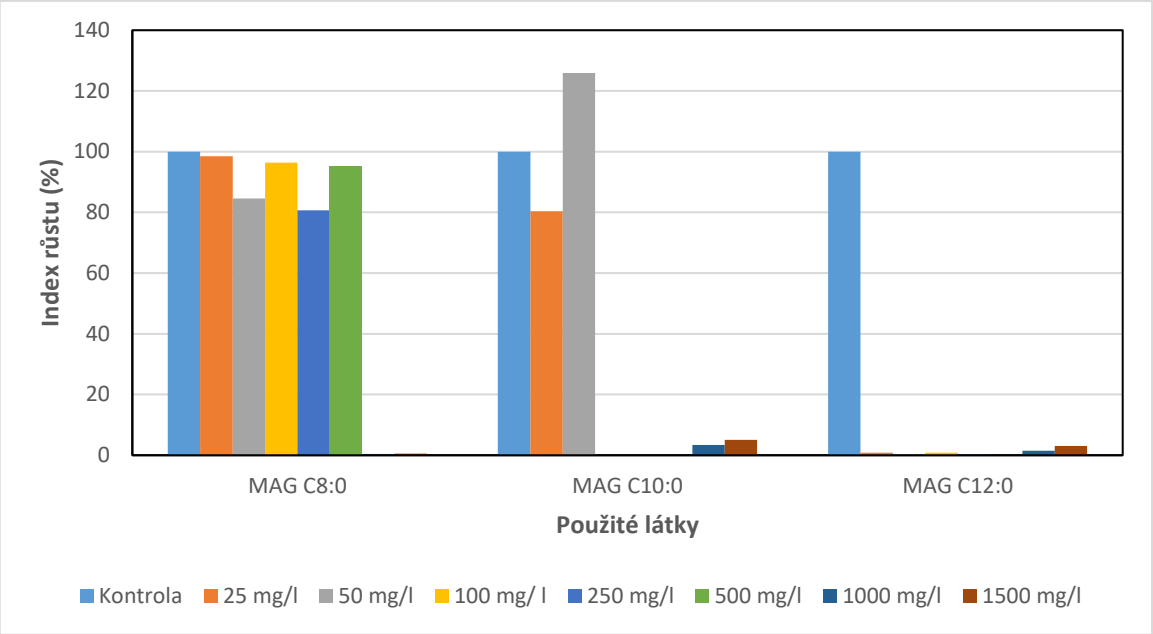
Pro sledování vlivu 1-monoacylglycerolů na růst bakterií byly zvoleny následující MAG – MAG kyseliny kaprylové (MAG C8:0), MAG kyseliny kaprinové (MAG C10:0) a MAG kyseliny laurové (MAG C12:0). Všechny monoacylglyceroly byly použity v koncentracích 25 až 1500 mg/l.

Účinky monoacylglycerolů byly sledovány u osmi grampozitivních bakterií (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, CCDM 141, CCDM 1004, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, CCDM 946, *Enterococcus durans* CCDM 53 a *Enterococcus faecalis* CCM 2665, CCM 4224) a dvou gramnegativních bakterií (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 a *Proteus mirabilis* CCM 7188).

8.1.1 Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

Z Obrázku 18 je patrné, že největší inhibiční účinek proti *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 vykazoval po 24 hodinách kultivace MAG C12:0. Index růstu buněk byl při použití tohoto MAG nižší než 5 % a při koncentraci 500 mg/l došlo k úplné inhibici růstu. Dobré inhibiční účinky prokázal také MAG C10:0 při jeho použití v koncentracích 100 mg/l a výše, kdy docházelo ke snížení indexu růstu na 5 % a méně, či nastala úplná inhibice růstu (100, 250 a 500 mg/l). Při koncentraci 50 mg/l naopak bakterie rostly ještě lépe než u kontrolního vzorku. V případě MAG C8:0 byly za inhibici růstu odpovědné až vysoké koncentrace (1000 a 1500 mg/l), které způsobily téměř úplné zastavení růstu testovaného mikroorganizmu.

Z růstových křivek (Příloha P I) byly odečteny následující minimální inhibiční koncentrace – pro MAG C8:0 1000 mg/l, MAG C10:0 100 mg/l a pro MAG C12:0 25 mg/l. Tyto hodnoty souhlasí s Obrázkem 18.

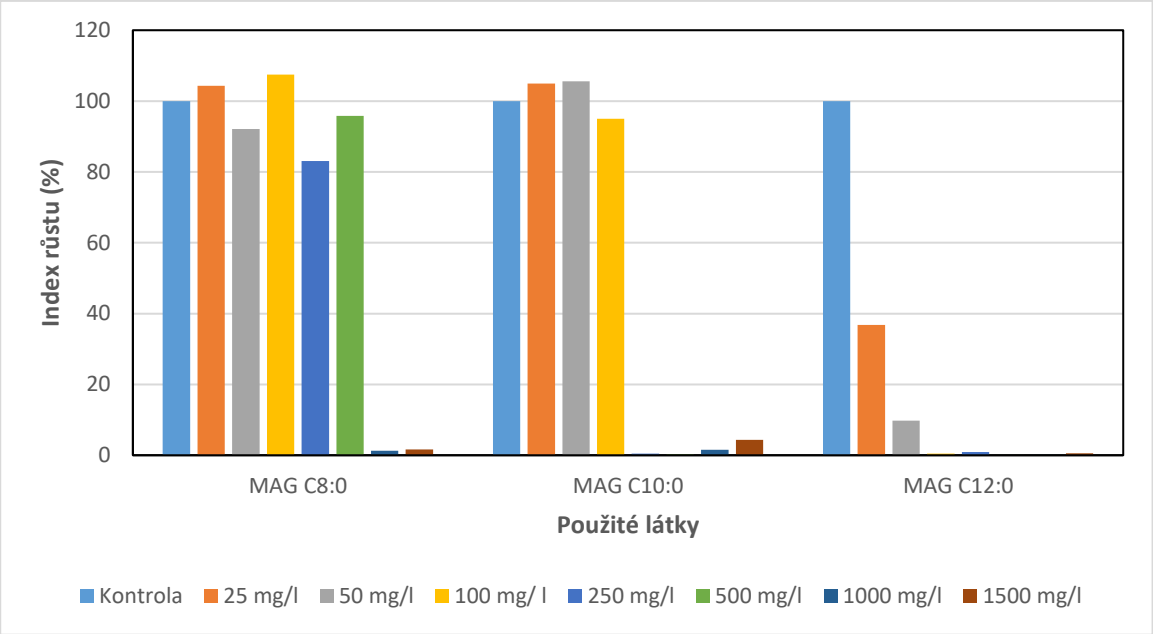


Obrázek 18 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 po 24 hodinách kultivace

8.1.2 Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

Největší inhibiční účinek na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 prokázal opět MAG C12:0 od koncentrace 100 mg/l a více, kde byl index růstu udržován pod hodnotou 5 %. Z Obrázku 19 lze pozorovat, že se zvyšující se koncentrací tohoto MAG docházelo k postupnému snižování hustoty bakteriální suspenze. Při nejnižších použitých koncentracích (25 a 50 mg/l) došlo ke snížení indexu růstu pod 40 %. Při použití monokaprinu došlo k výraznému snížení indexu růstu (pod 5 %) při koncentracích 250 – 1500 mg/l. U některých nižších koncentrací byl pozorován vyšší index růstu oproti kontrolnímu vzorku. Inhibiční potenciál ukázal rovněž monokaprylin, avšak pouze ve vysokých koncentracích (1000 a 1500 mg/l). U žádné z testovaných látek nedošlo k úplné inhibici růstu daného mikroorganizmu.

Z růstových křivek (Příloha P II) byly odečteny následující minimální inhibiční koncentrace – pro MAG C8:0 1000 mg/l, MAG C10:0 250 mg/l a pro MAG C12:0 100 mg/l.

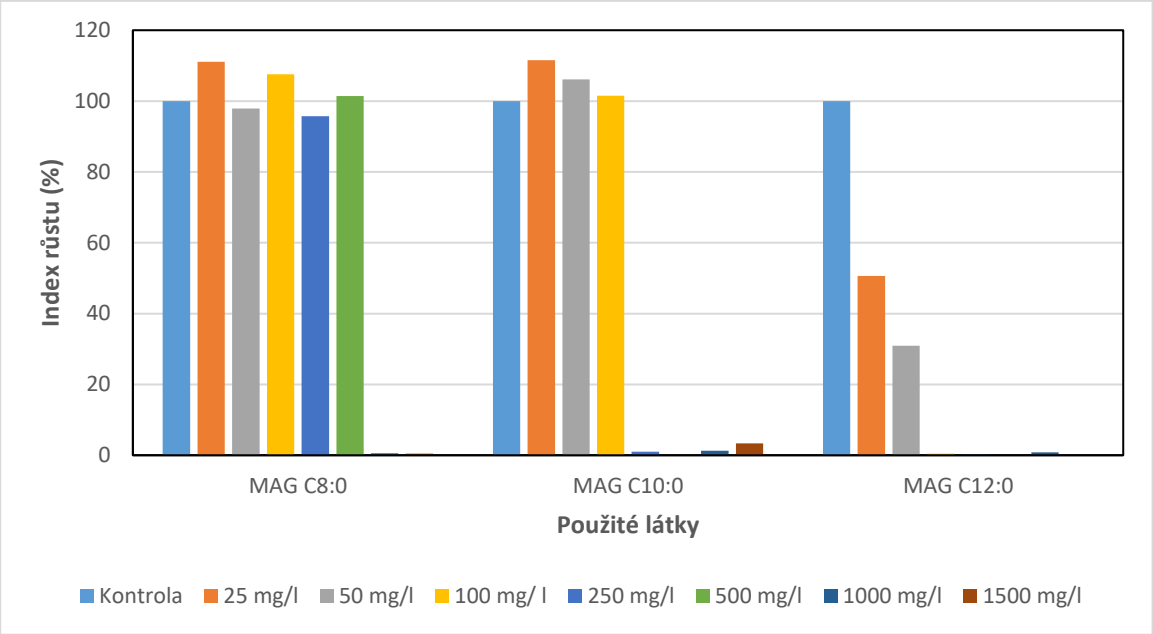


Obrázek 19 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 po 24 hodinách kultivace

8.1.3 Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

Dalším testovaným mikroorganizmem byl *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004, u kterého byla zjištěna největší inhibice růstu při použití monolaurinu, stejně jako v předchozích případech. Tento monoacylglycerol působil nejvíce inhibičně v rozmezí koncentrací 100 – 1500 mg/l a docházelo buď k úplné inhibici či k nepatrnému růstu. Při použití nižších koncentrací byl viděn nárůst buněk pod 50 %. Monoacylglycerol kyseliny kaprinové od koncentrace 250 mg/l způsobil snížení indexu růstu pod 5 %. Při nižších koncentracích této látky docházelo k podpoře růstu daného mikroorganizmu. Monokaprylin způsoboval výraznou inhibici růstu při koncentracích 1000 a 1500 mg/l. Při nižších koncentracích nebyl prokázán významný inhibiční účinek, nebo docházelo k podpoře růstu této bakterie. Index růstu tohoto mikroorganizmu pro jednotlivé monoacylglyceroly je znázorněn na Obrázku 20.

Z růstových křivek (Příloha P III) byly odečteny následující minimální inhibiční koncentrace – pro MAG C8:0 1000 mg/l, MAG C10:0 250 mg/l a pro MAG C12:0 100 mg/l. Tyto hodnoty lze odečíst také z Obrázku 20.

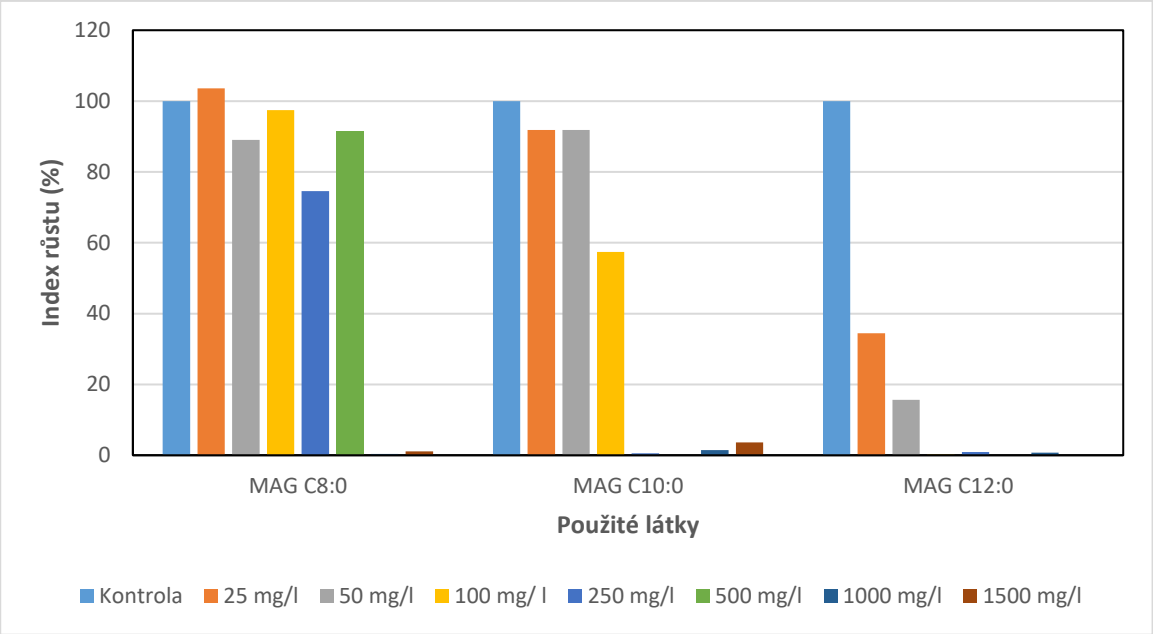


Obrázek 20 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 po 24 hodinách kultivace

8.1.4 Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

Dalším sledovaným laktokokem byl *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824. Bylo zjištěno, že všechny testované látky vykazovaly inhibiční účinky na růst této bakterie, avšak při různých koncentracích (viz Obrázek 21). Monolaurin prokázal v tomto případě největší inhibiční potenciál, kdy i nejnižší koncentrace této látky způsobila pokles indexu růstu pod 40 %. V rozmezí koncentrací 100 až 1500 mg/l došlo buď k úplnému zastavení růstu, nebo byl růst minimální. U monoacylglycerolu kyseliny kaprinové bylo zjištěno, že při koncentraci 100 mg/l došlo ke snížení růstu pod 60 %. Při koncentraci 500 mg/l byl růst zcela inhibován. U koncentrací 250, 1000 a 1500 mg/l byl viděn nárůst bakterie, ale index růstu byl zachován na hodnotě pod 5 %. Monoacylglycerol kyseliny kaprylové vykázal největší inhibiční účinky opět v jeho nejvyšších koncentracích, konkrétně 1000 a 1500 mg/l. Při těchto koncentracích byl index růstu nepatrný.

Z růstových křivek (Příloha P IV) byly odečteny následující minimální inhibiční koncentrace – pro MAG C8:0 1000 mg/l, MAG C10:0 250 mg/l a pro MAG C12:0 100 mg/l.

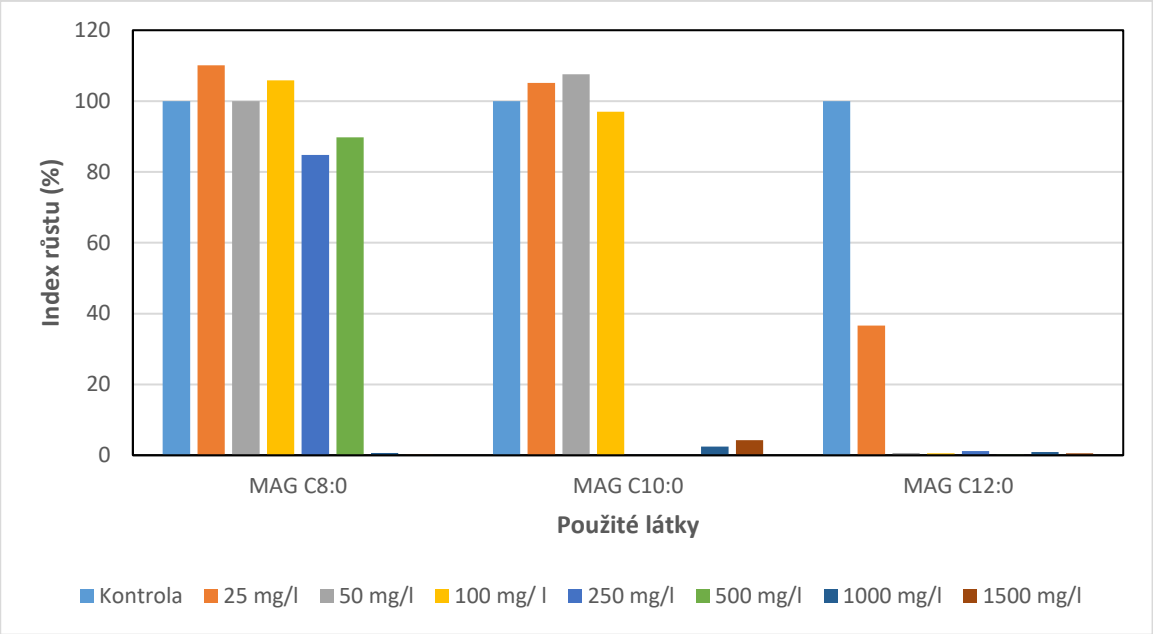


Obrázek 21 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 po 24 hodinách kultivace

8.1.5 Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 946

Posledním z testovaných laktokoků byl *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, u kterého byl sledován významný pokles růstu při použití MAG C12:0. Tato látka již v nejnižší koncentraci snížila index růstu pod 40 %. Od koncentrace 50 mg/l byl zaznamenán růst nejvýše kolem 1 %. V přítomnosti MAG C10:0 nebyl zaznamenán žádný růst při koncentraci 500 mg/l. Při nejvyšších koncentracích (1000 a 1500 mg/l) došlo k růstu dané bakterie, ale index růstu se udržoval pod hodnotou 5 %. Pro koncentraci 250 mg/l byla vypočtena nízká hodnota indexu růstu. V rozmezí koncentrací 25 až 50 mg/l byl pozorován lepší růst oproti kontrolní kultuře. V případě monokaprylinu byl zjištěn největší inhibiční potenciál při koncentraci 1000 a 1500 mg/l, kdy byl zaznamenán pouze nepatrný nárůst (viz Obrázek 22).

Z růstových křivek (Příloha P V) byly odečteny následující minimální inhibiční koncentrace – pro MAG C8:0 1000 mg/l, MAG C10:0 250 mg/l a pro MAG C12:0 50 mg/l.

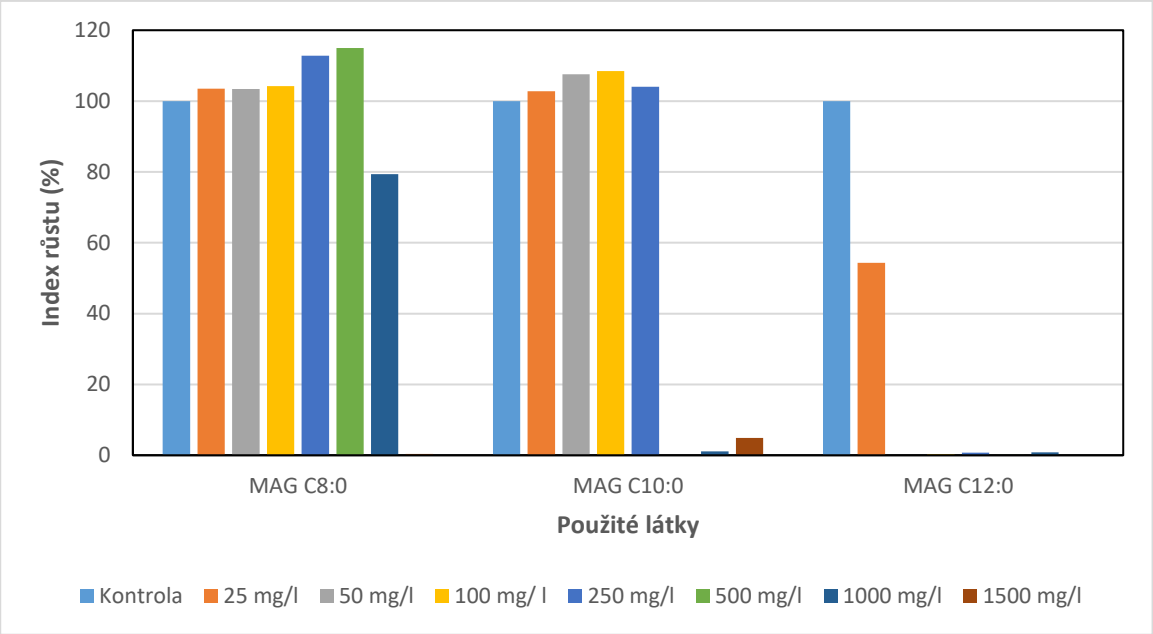


Obrázek 22 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 po 24 hodinách kultivace

8.1.6 Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Enterococcus durans* CCDM 53

U bakterie *Enterococcus durans* CCDM 53 byla prokázána nejvyšší inhibiční aktivita také pro monoacylglycerol kyseliny laurové. Při koncentracích 50 mg/l a 1500 mg/l došlo k úplnému zastavení růstu a v rozmezí koncentrací 100 až 1000 mg/l byl zaznamenán jen nepatrný růst (viz Obrázek 23). Při použití monoacylglycerolu kyseliny kaprinové byla nejvíce účinná koncentrace 500 mg/l, která zastavovala růst této bakterie. Při vyšších koncentracích byl sledován růst pod 5 %. Nižší koncentrace této látky naopak podporovaly růst testovaného enterokoka. Monokaprylin působil proti růstu pouze v nejvyšší koncentraci (1500 mg/l). Při této koncentraci došlo k výrazné inhibici růstu. Zbylé koncentrace (kromě 1000 mg/l) spíše přispívaly k růstu.

Z růstových křivek (Příloha P VI) byly odečteny následující minimální inhibiční koncentrace – pro MAG C8:0 1500 mg/l, MAG C10:0 500 mg/l a pro MAG C12:0 50 mg/l. Stejné hodnoty lze pozorovat z Obrázku 23.

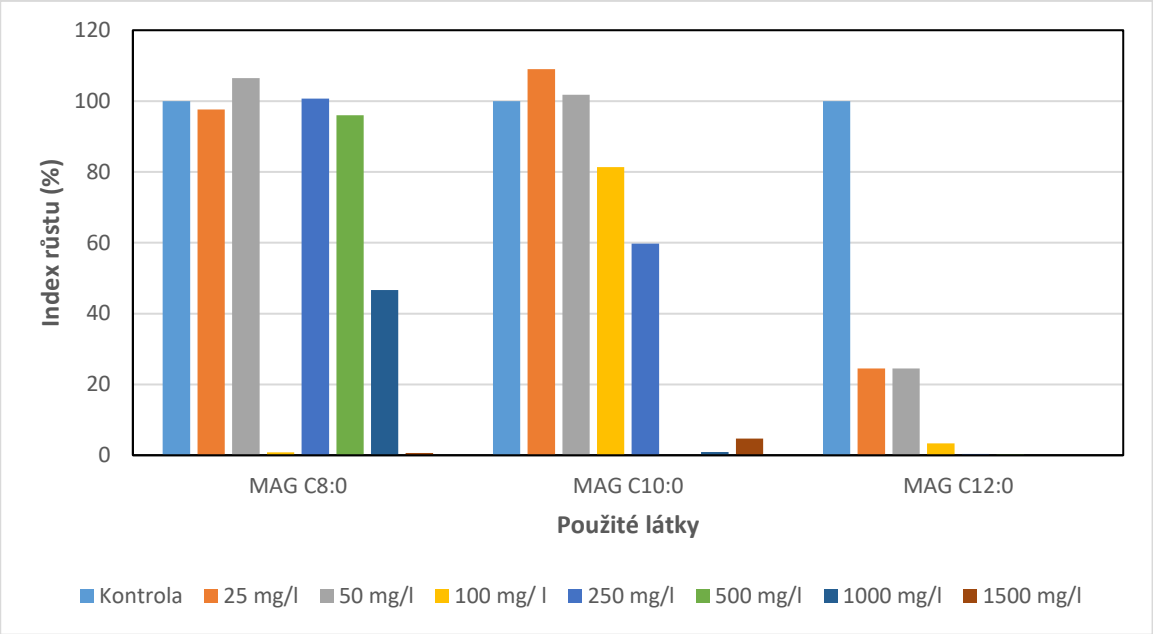


Obrázek 23 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Enterococcus durans* CCDM 53 po 24 hodinách kultivace

8.1.7 Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Enterococcus faecalis* CCM 2665

Dalším sledovaným enterokokem byl *Enterococcus faecalis* CCM 2665, na nějž vykazoval největší inhibiční efekt monolaurin v koncentracích 250 mg/l a výše. Účinné však byly také nižší koncentrace. Při koncentracích 25 až 50 mg/l byl zaznamenán index růstu pod 25 %. Pro koncentraci 100 mg/l pak byla zjištěna hodnota růstu pod 5 %. Monokaprin projevil nejvyšší potenciál při koncentraci 500 mg/l, kdy nebyl zaznamenán žádný růst. Při vyšších koncentracích byl vypočítán index růstu pod 5 %. Z nižších testovaných koncentrací měla opačný účinek koncentrace 25 mg/l, která podpořila růst této bakterie. V případě monokaprylinu se ukázala účinná koncentrace 100 mg/l a 1500 mg/l. Při těchto koncentracích byl pozorován velmi nízký index růstu. Při koncentraci 1000 mg/l byl index růstu snížen pod 50 %. Index růstu pro tento mikroorganizmus s jednotlivými monoacylglyceroly je znázorněn na Obrázku 24.

Z růstových křivek (Příloha P VII) byly odečteny následující minimální inhibiční koncentrace – pro MAG C8:0 1500 mg/l, MAG C10:0 500 mg/l a pro MAG C12:0 100 mg/l.

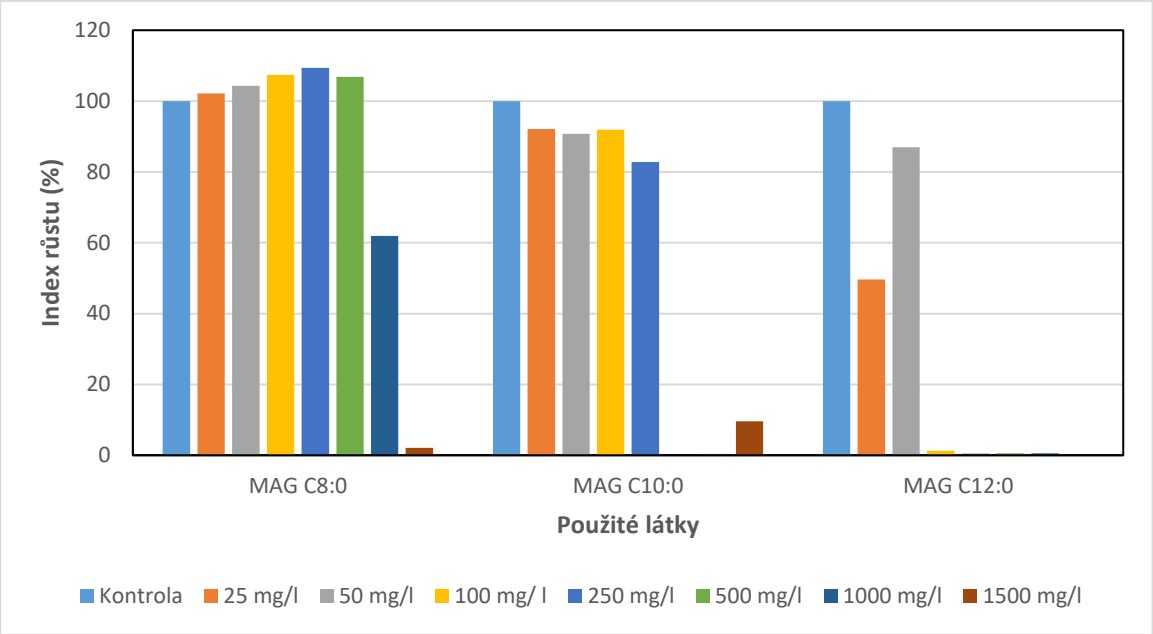


Obrázek 24 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Enterococcus faecalis* CCM 2665 po 24 hodinách kultivace

8.1.8 Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224

Posledním testovaným enterokokem byl *Enterococcus faecalis* CCM 4224. Z použitých monoacylglycerolů vykazoval nejvyšší inhibiční potenciál MAG C12:0, stejně jako v předešlých případech (viz Obrázek 25). Při koncentracích 250 mg/l až 1500 mg/l došlo k významné inhibici růstu, kdy hodnota indexu růstu dosahovala maximálně 1,5 %. Monoacylglycerol kyseliny kaprinové prokázal nejvyšší účinnost proti této bakterii při koncentracích 500 a 1000 mg/l. Nárůst buněk byl buď zcela zastaven nebo byl pouze nepatrný. Při koncentraci 1500 mg/l index růstu činil necelých 10 %. Monokaprylin projevil nejvyšší inhibiční aktivitu při koncentraci 1500 mg/l, ale růst nebyl zcela potlačen. Nižší koncentrace (kromě 1000 mg/l) naopak podpořily růst tohoto mikroorganizmu.

Z růstových křivek (Příloha P VIII) byly odečteny následující minimální inhibiční koncentrace – pro MAG C8:0 1500 mg/l, MAG C10:0 500 mg/l a pro MAG C12:0 100 mg/l.

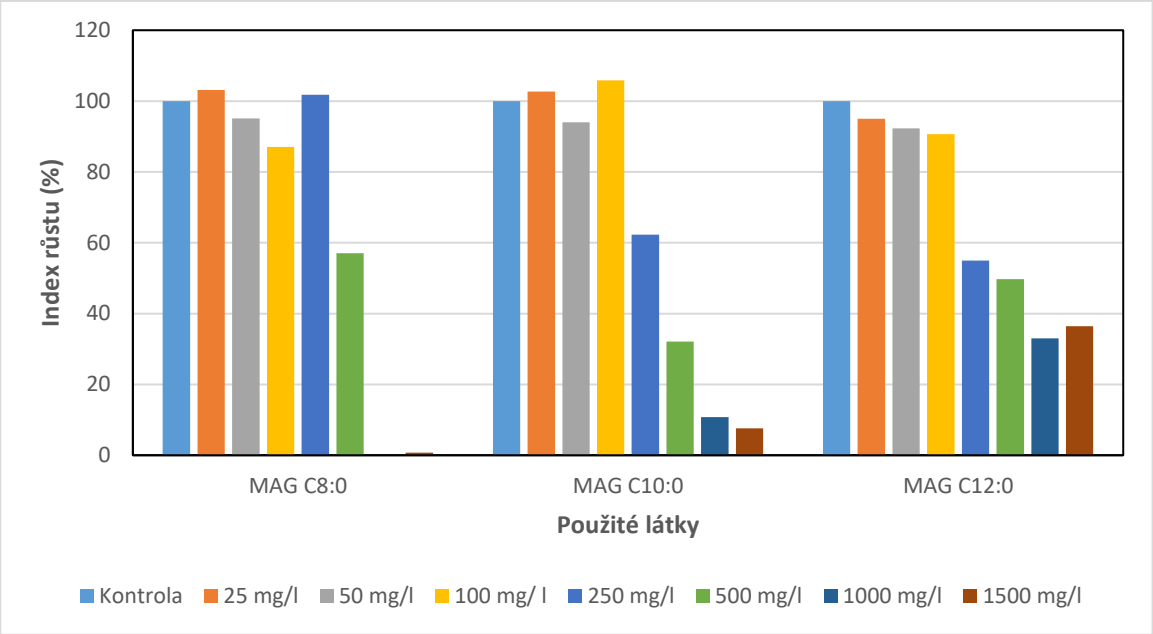


Obrázek 25 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Enterococcus faecalis* CCM 4224 po 24 hodinách kultivace

8.1.9 Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

Další testovanou bakterií byla *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420, která se oproti předešlým bakteriím liší svou buněčnou stěnou gramnegativního typu. V tomto případě se nejvíce účinným monoacylglycerolem ukázal MAG C8:0, který při koncentraci 1000 mg/l zcela potlačil její růst. Účinná byla rovněž koncentrace 1500 mg/l, při které byl zaznamenán jen nízký index růstu (viz Obrázek 26). Monoacylglycerol kyseliny kaprinové vykázal inhibiční účinky zejména při koncentracích 500 mg/l a více. Index růstu zde činil 32 % a méně. U žádné z koncentrací nedošlo k úplnému zastavení růstu dané bakterie. U monolaurinu bylo pozorováno, že se zvyšující se koncentrací MAG (až na výjimku při koncentraci 1500 mg/l) dochází ke snížení indexu růstu. Od koncentrace 250 mg/l a výše došlo ke snížení růstu pod 60 %. Stejně jako u monokaprinu však nedošlo k úplné inhibici.

Z růstových křivek (Příloha P IX) byla odečtena minimální inhibiční koncentrace pro MAG C8:0 1500 mg/l. V případě MAG C10:0 a MAG C12:0 nedošlo k úplné inhibici, jak můžeme vidět i na Obrázku 26.

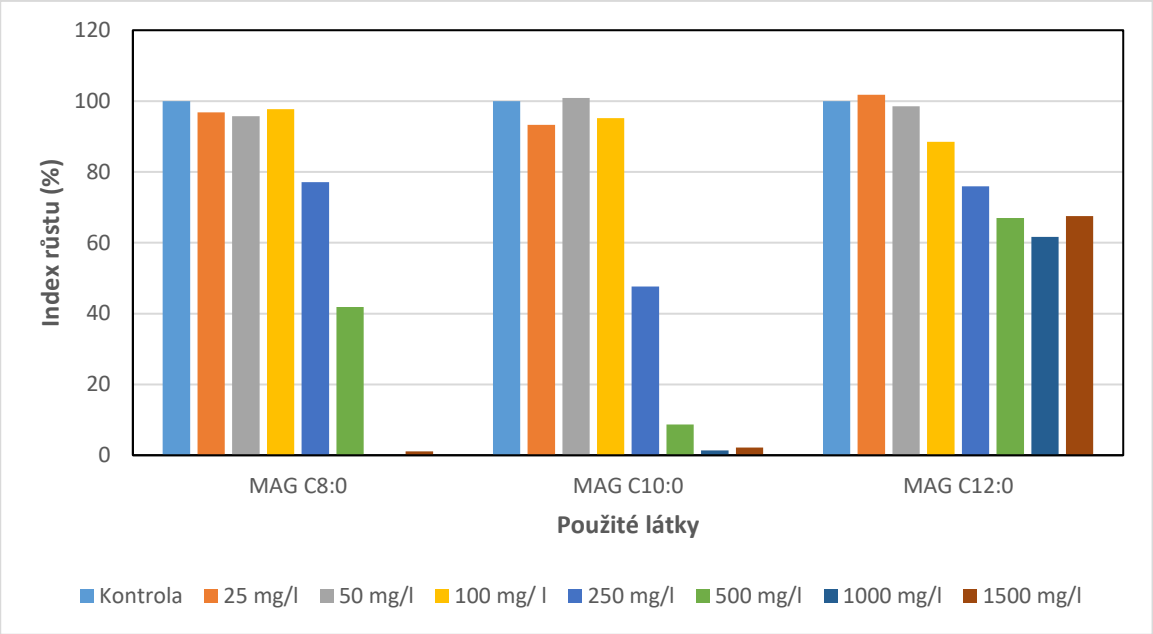


Obrázek 26 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 po 24 hodinách kultivace

8.1.10 Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188

Posledním sledovaným mikroorganizmem byl *Proteus mirabilis* CCM 7188, který patří stejně jako zástupci rodu *Salmonella* mezi gramnegativní bakterie. Obdobně jako v přechozím případě byl prokázán nejvyšší inhibiční účinek u monokaprylinu (viz Obrázek 27). Při koncentraci 1000 a 1500 mg/l byla hodnota indexu růstu velmi nízká, a to kolem 1 %. Index růstu byl však snížen pod 50 % již u koncentrace 500 mg/l. Monokaprin byl v tomto případě nejvíce účinný při koncentracích 500 až 1500 mg/l, avšak k úplnému zastavení růstu nedošlo. Tyto koncentrace snížily index růstu pod 10 %. Monolaurin na tento mikroorganizmus nevykazoval významné inhibiční účinky. Při koncentraci 1000 mg/l bylo dosaženo nejnižší hodnoty indexu růstu, která činila přibližně 60 %.

Z růstových křivek (Příloha P X) byla odečtena minimální inhibiční koncentrace pro MAG C8:0 i MAG C10:0 1000 mg/l. V případě MAG C12:0 nedošlo k úplné inhibici.



Obrázek 27 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Proteus mirabilis* CCM 7188 po 24 hodinách kultivace

8.2 Vliv esenciálních olejů na růst bakterií

Pro studium vlivu esenciálních olejů na růst bakterií byly zvoleny následující látky – karvakrol, linalool a limonen. Všechny tyto složky esenciálních olejů byly použity v koncentracích 6,25 až 500 mg/l.

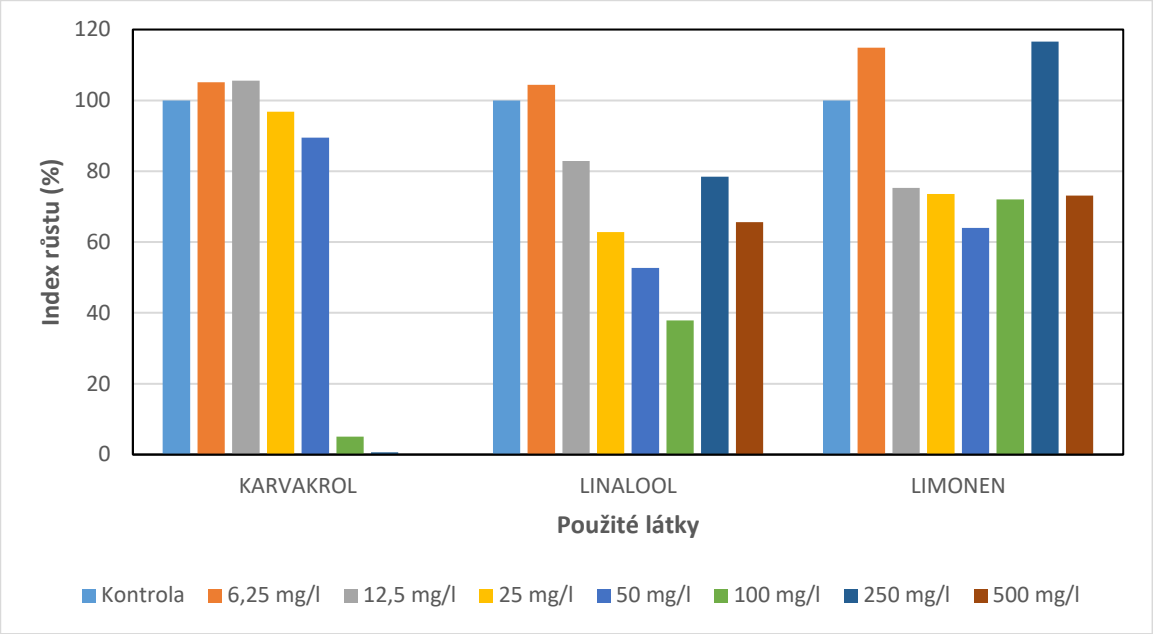
Účinky esenciálních olejů byly rovněž zkoumány u osmi grampozitivních bakterií (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, CCDM 141, CCDM 1004, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, CCDM 946, *Enterococcus durans* CCDM 53 a *Enterococcus faecalis* CCM 2665, CCM 4224) a dvou gramnegativních bakterií (*Salmonella enterica* subsp. *ente*rica ser. Enteritidis CCM 4420 a *Proteus mirabilis* CCM 7188).

8.2.1 Vliv esenciálních olejů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

Z použitých látek měl na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 nejvyšší inhibiční efekt karvakrol v koncentracích 100 mg/l a výše (viz Obrázek 28). Při koncentracích 100 a 250 mg/l došlo ke snížení indexu růstu přibližně pod 5 %. Při použití nejvyšší koncentrace, tedy 500 mg/l, došlo k úplné inhibici růstu. Zbylé koncentrace neměly výrazný inhibiční účinek, nebo růst daného mikroorganizmu ještě podporovaly. Při sledování účinku linaloolu bylo zjištěno, že jedinou koncentrací, která sníží růst pod 40 % je 100 mg/l. Koncentrace 25, 50 a 1500 mg/l způsobily snížení růstu přibližně pod 65 %. Limonen vykázal nejnižší inhibiční

účinky proti této bakterii. Při koncentraci 50 mg/l došlo ke snížení indexu růstu pod 65 %. Koncentrace 6,25 a 250 mg/l naopak výrazně podpořily růst testovaného mikroorganizmu.

Z růstových křivek (Příloha P XI) byla odečtena minimální inhibiční koncentrace pro karvakrol 100 mg/l. Při použití linaloolu nenastala inhibice, ale při koncentraci 500 mg/l došlo k prodloužení doby lagu skoro až na 20 hodin. U limonenu také nedošlo k inhibici růstu, ale při koncentracích 250 a 500 mg/l doba lagu činila přibližně 12 hodin.

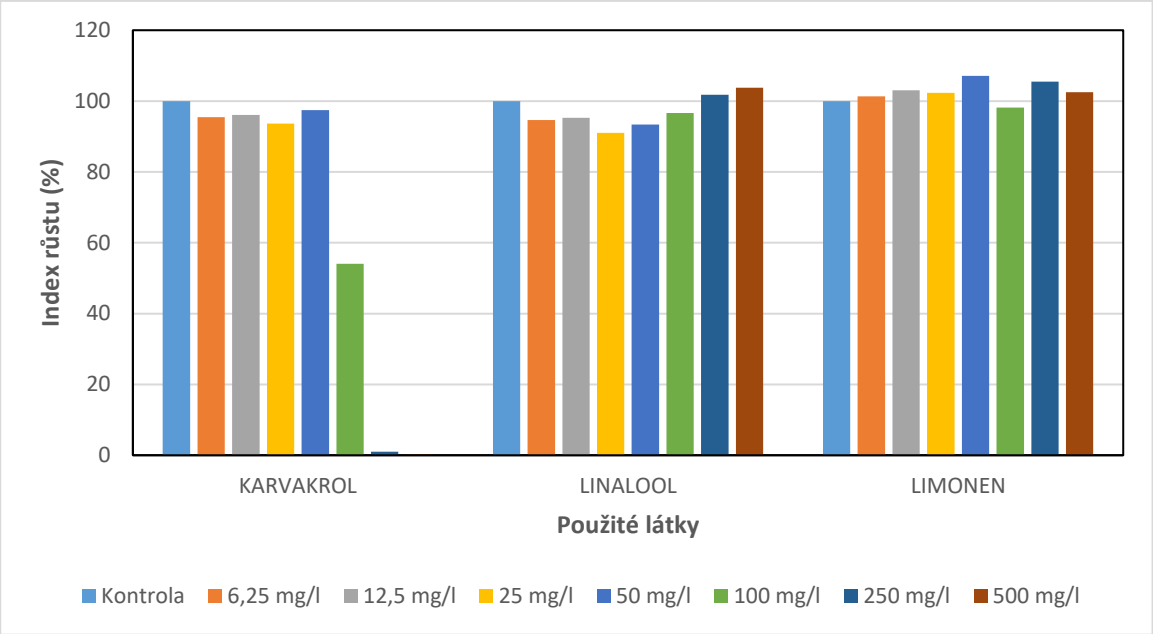


Obrázek 28 Účinky vybraných esenciálních olejů na růst buněk *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 po 24 hodinách kultivace

8.2.2 Vliv esenciálních olejů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

Dalším sledovaným laktokokem byl *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141. Nejvíce účinný byl opět karvakrol, který při koncentraci 250 a 500 mg/l snížil index růstu na velmi nízkou hodnotu. K úplné inhibici růstu však nedošlo. Při koncentraci 100 mg/l došlo k poklesu růstu pod 60 %. Linalool neprokázal výrazné inhibiční účinky na danou bakterii v žádných koncentracích. Limonen, obdobně jako linalool, nevykázal téměř žádný inhibiční potenciál. Některé koncentrace dokonce podpořily růst bakterie. Hodnoty indexu růstu pro jednotlivé testované koncentrace látek jsou znázorněny na Obrázku 29.

Z růstových křivek (Příloha P XII) byla odečtena minimální inhibiční koncentrace pro karvakrol 250 mg/l. Při použití linaloolu ani limonenu nenastala inhibice, ale při jejich koncentraci 500 mg/l došlo k prodloužení doby lagu asi na 6 hodin.

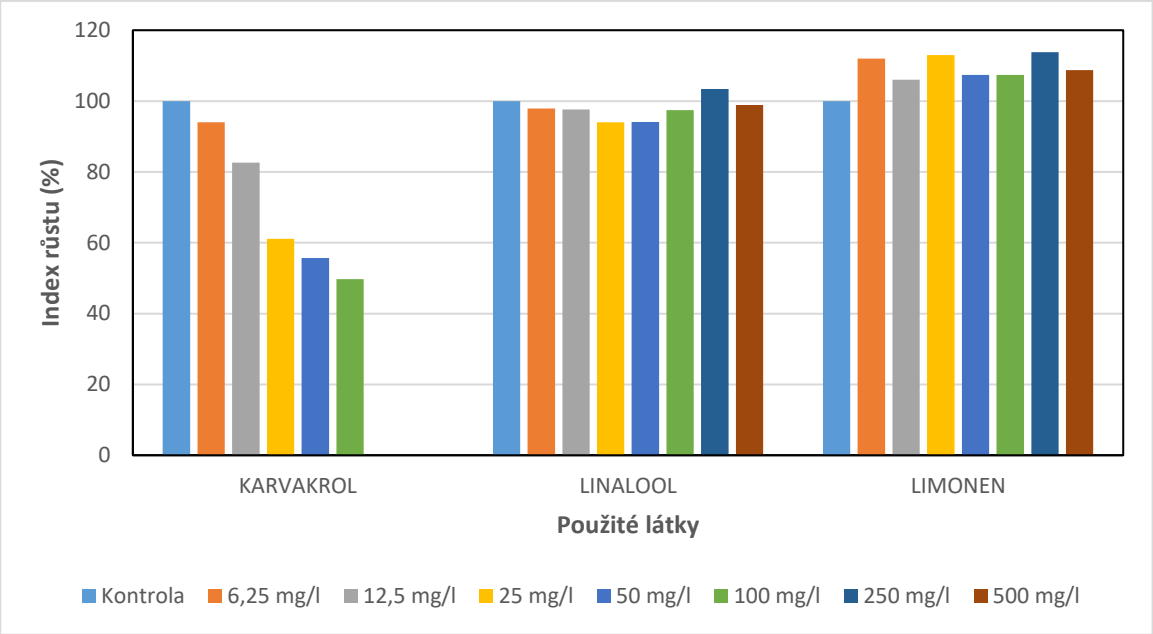


Obrázek 29 Účinky vybraných esenciálních olejů na růst buněk *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 po 24 hodinách kultivace

8.2.3 Vliv esenciálních olejů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

Z Obrázku 30 je možné pozorovat, že při použití karvakrolu na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004, došlo postupně ke snížení indexu růstu se zvyšující se koncentrací. Při koncentraci 500 mg/l byla zaznamenána úplná inhibice růstu. Velmi účinná byla rovněž koncentrace 250 mg/l, kdy byl pozorován nárůst kolem 1 %. Linalool nevykázal zásadní inhibiční účinky proti testované bakterii. Limonen ve všech koncentracích naopak podporoval růst tohoto laktokoka a inhibiční účinek tedy nebyl zaznamenán.

Z růstových křivek (Příloha P XIII) byla odečtena minimální inhibiční koncentrace pro karvakrol 250 mg/l. Při použití linaloolu ani limonenu nenastala inhibice, ale při jejich koncentraci 500 mg/l došlo k prodloužení doby lagu asi na 6 hodin, stejně jako u *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141.

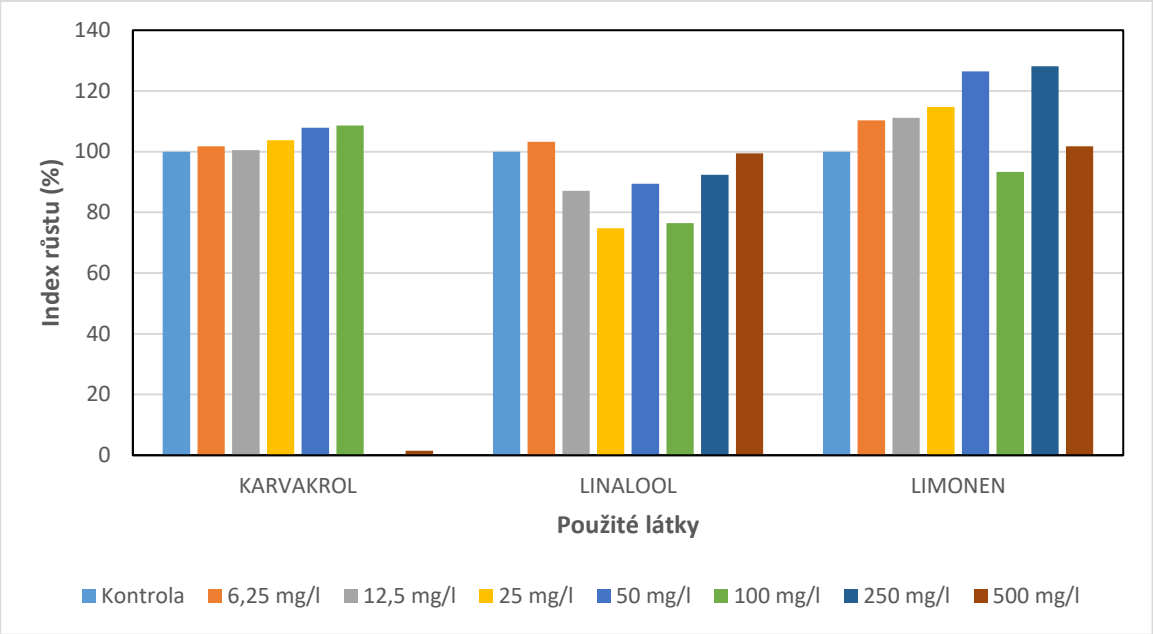


Obrázek 30 Účinky vybraných esenciálních olejů na růst buněk *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 po 24 hodinách kultivace

8.2.4 Vliv esenciálních olejů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

Dalším testovaným mikroorganizmem byl *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824. Karvakrol potvrdil nejvyšší inhibiční potenciál i v tomto případě. Koncentrace 250 a 500 mg/l snížily index růstu na hodnotu maximálně 1,5 %. Při některých nižších koncentracích bakterie rostly lépe než v kontrolním vzorku bez inhibiční látky. Použití linaloolu při koncentraci 25 a 100 mg/l způsobilo pokles růstu přibližně na 75 %. U ostatních koncentrací nebyla pozorována významná změna. Limonen také nepůsobil příliš inhibičně a v mnoha případech spíše podpořil růst mikroorganizmu (viz Obrázek 31).

Z růstových křivek (Příloha P XIV) byla odečtena minimální inhibiční koncentrace pro karvakrol 250 mg/l. Inhibiční účinky linaloolu ani limonenu nebyly prokázány.

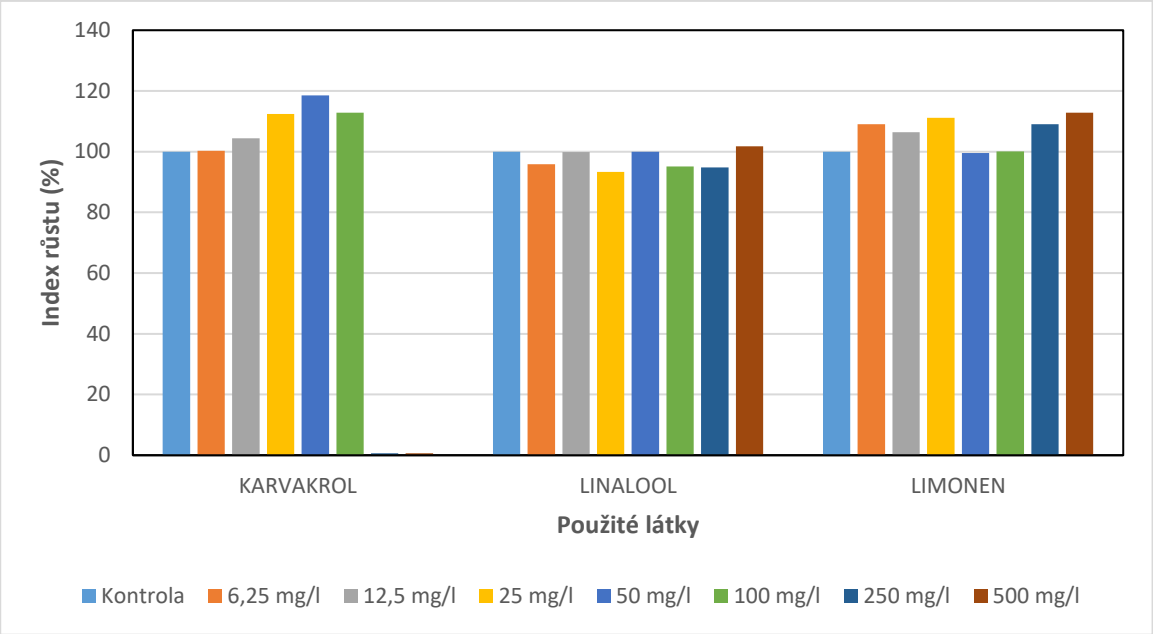


Obrázek 31 Účinky vybraných esenciálních olejů na růst buněk *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 po 24 hodinách kultivace

8.2.5 Vliv esenciálních olejů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

Posledním sledovaným laktokokem byl *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946. Proti růstu této bakterie se nejvíce uplatnil karvakrol, který ji při koncentraci 250 a 500 mg/l téměř zcela potlačil. Při nižších koncentracích docházelo často ke zlepšení růstu (viz Obrázek 32). U linaloolu ani limonenu nebyl znovu prokázán významný inhibiční účinek na danou bakterii. U některých koncentrací byl stejně jako v předchozích případech podpořen růst oproti kontrolnímu vzorku.

Z růstových křivek (Příloha P XV) byla odečtena minimální inhibiční koncentrace pro karvakrol 250 mg/l. Inhibiční účinky linaloolu a limonenu nebyly prokázány ani v tomto případě.

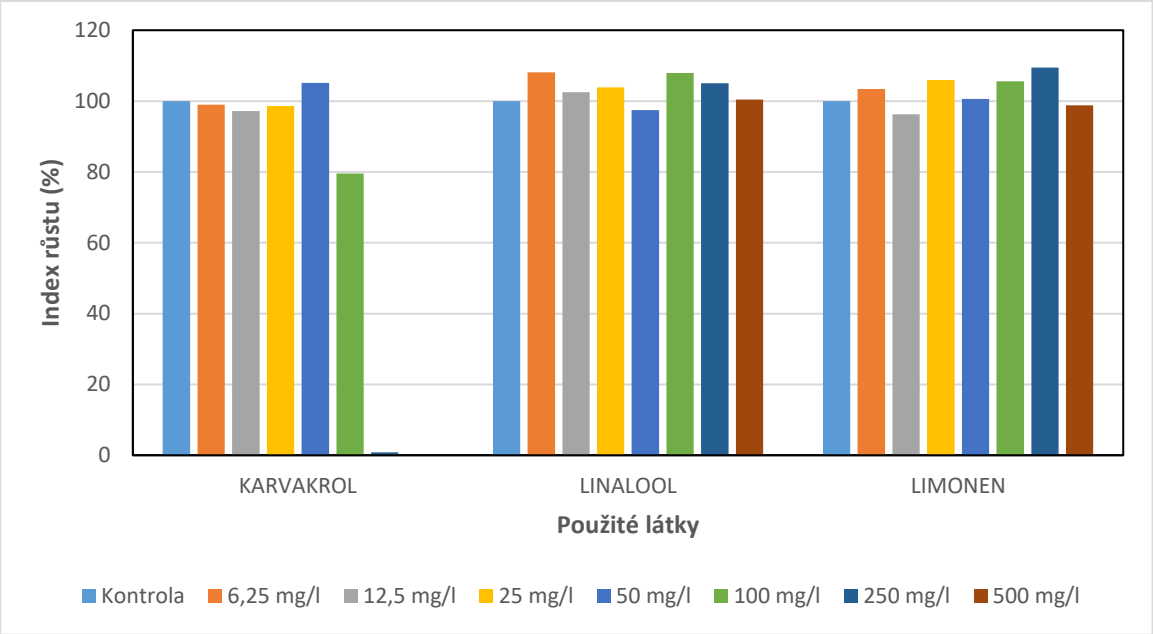


Obrázek 32 Účinky vybraných esenciálních olejů na růst buněk *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 po 24 hodinách kultivace

8.2.6 Vliv esenciálních olejů na růst *Enterococcus durans* CCDM 53

Mezi další testované bakterie patřil *Enterococcus durans* CCDM 53. Při použití karvakrolu došlo k výraznému snížení růstu při koncentraci 250 mg/l a při 500 mg/l byl růst zcela zastaven (viz Obrázek 33). Látky linalool a limonen neprokázaly výrazné změny v růstu této bakterie. Často naopak docházelo k podpoře růstu tohoto enterokoka v přítomnosti zkoušených látek.

Z růstových křivek (Příloha P XVI) byla odečtena minimální inhibiční koncentrace pro karvakrol 250 mg/l. Inhibiční účinky linaloolu nebyly prokázány, ale při koncentraci 500 mg/l došlo k výraznému prodloužení lagu přibližně na 15 hodin. U limonenu bylo dospěno k podobným závěrům, ale doba lagu při 250 a 500 mg/l činila asi 6 hod.

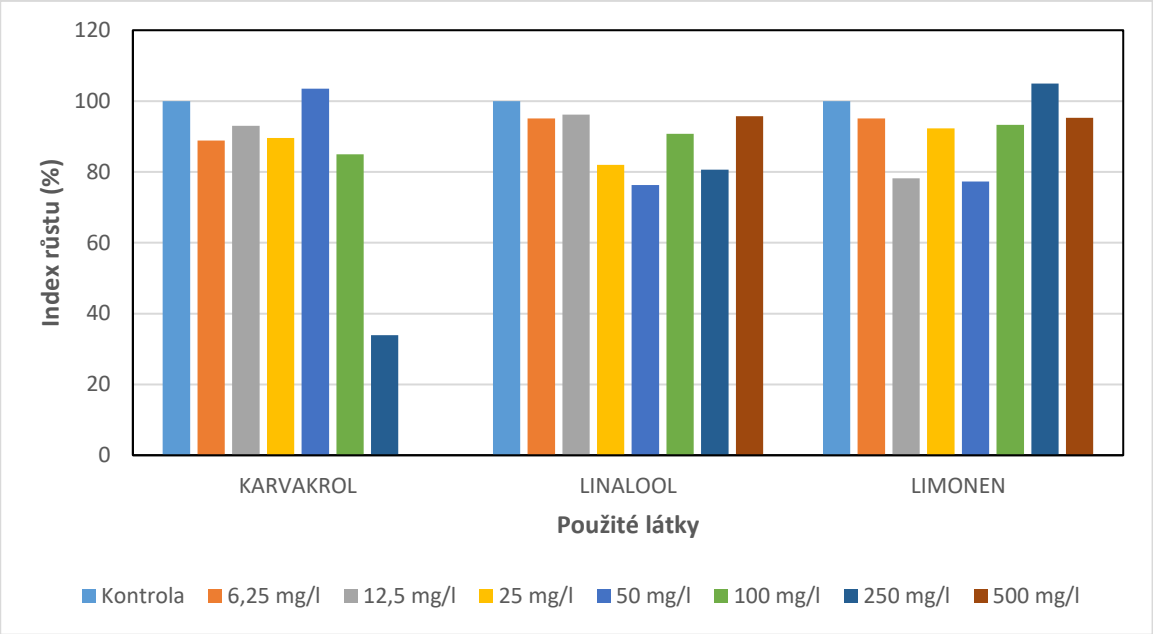


Obrázek 33 Účinky vybraných esenciálních olejů na růst buněk *Enterococcus durans* CCDM 53 po 24 hodinách kultivace

8.2.7 Vliv esenciálních olejů na růst *Enterococcus faecalis* CCM 2665

Na snížení růstu *Enterococcus faecalis* CCM 2665 měl největší vliv rovněž karvakrol. Při koncentraci 250 mg/l došlo ke snížení růstu pod 40 % a při nejvyšší testované koncentraci této látky (500 mg/l) již nebyl zaznamenán žádný nárůst. Linalool snížil růst pod 80 % při jeho použití v koncentraci 50 mg/l. Ostatní koncentrace nebyly příliš účinné (viz Obrázek 34). Limonen byl účinný v koncentracích 12,5 a 50 mg/l. Při těchto koncentracích však došlo ke snížení růstu pouze pod 80 %.

Z růstových křivek (Příloha P XVII) byla odečtena minimální inhibiční koncentrace pro karvakrol 500 mg/l. Inhibiční účinky linaloolu ani limonenu nebyly prokázány.

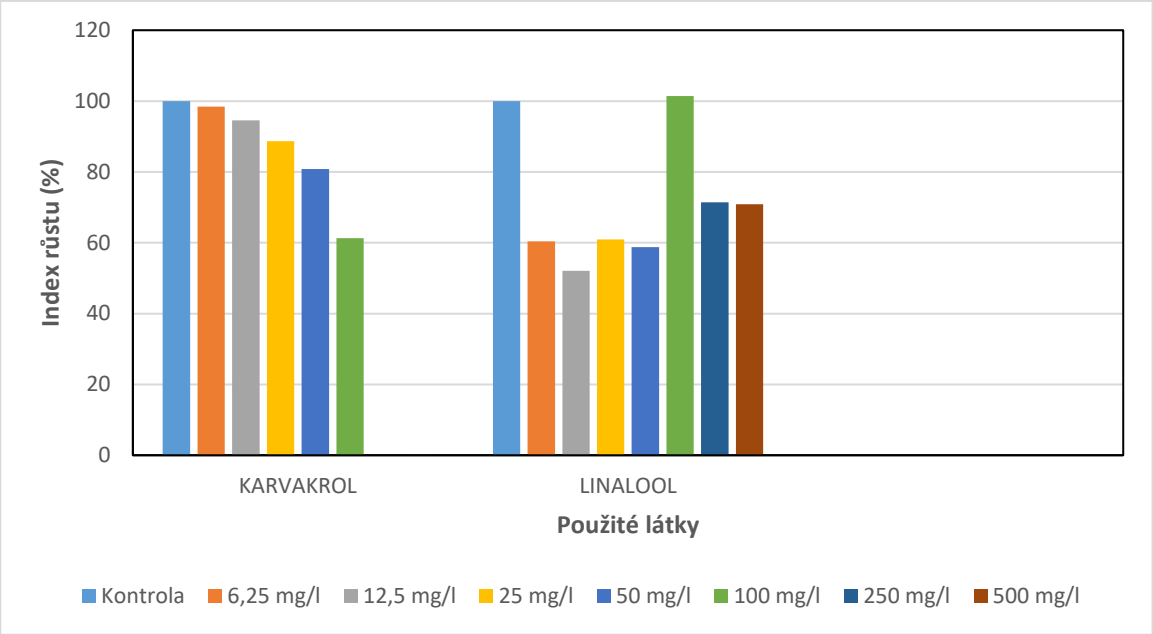


Obrázek 34 Účinky vybraných esenciálních olejů na růst buněk *Enterococcus faecalis* CCM 2665 po 24 hodinách kultivace

8.2.8 Vliv esenciálních olejů na růst *Enterococcus fae*calis CCM 4224

Poslední sledovanou grampozitivní bakterií byl *Enterococcus faecalis* CCM 4224. Karvakrol v koncentracích 250 a 500 mg/l téměř zastavil nárůst tohoto mikroorganizmu. Méně účinný byl linalool, který při koncentracích 6,25 až 50 mg/l snížil index růstu přibližně na 60 % a méně. Účinnost limonenu v tomto případě nemohla být vyhodnocena, jelikož daný mikroorganizmus nevyrostl ani v kontrolních jamkách bez této inhibiční látky. Lze však předpokládat, že by linalool nepůsobil příliš inhibičně, stejně jako na ostatní enterokoky.

Z růstových křivek (Příloha P XVIII) byla odečtena minimální inhibiční koncentrace pro karvakrol 250 mg/l. Inhibiční účinky linaloolu nebyly prokázány.

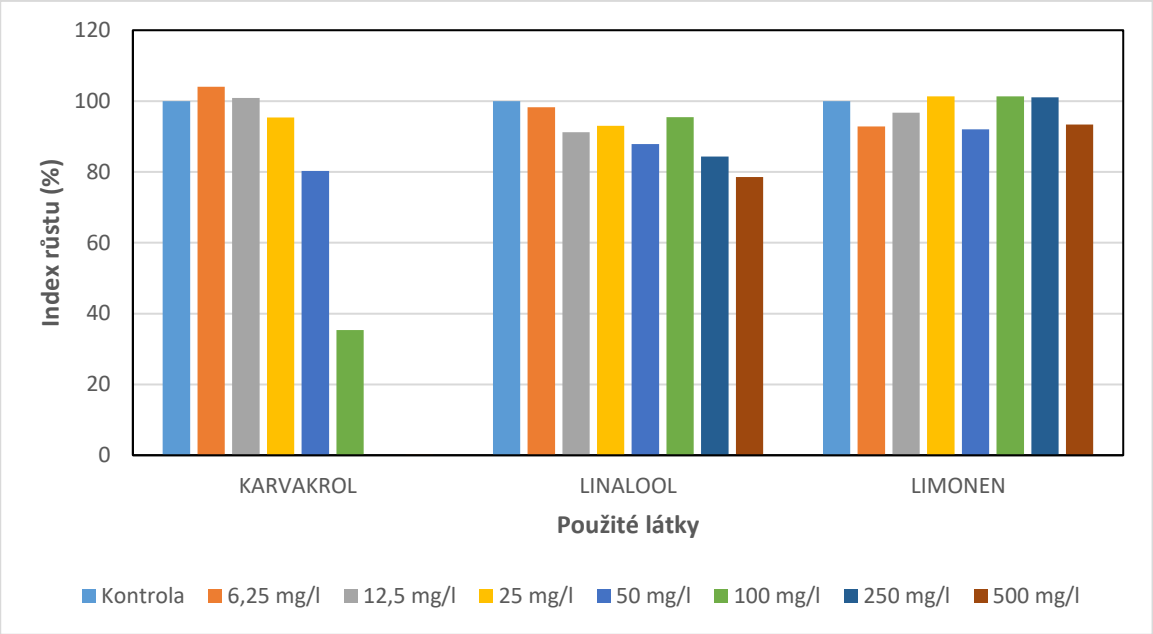


Obrázek 35 Účinky vybraných esenciálních olejů na růst buněk *Enterococcus faecalis* CCM 4224 po 24 hodinách kultivace

8.2.9 Vliv esenciálních olejů na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

Nejvíce účinný na bakterii *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 byl stejně jako u grampozitivních bakterií karvakrol. Při jeho koncentraci 100 mg/l došlo ke snížení růstu pod 40 % a při vyšších koncentracích (250 a 500 mg/l) byl růst pouze nepatrný, nebo byl zcela zastaven. Linalool na tuto bakterii nebyl příliš účinný. Ke snížení indexu růstu pod 80 % došlo pouze u nejvyšší koncentrace, tedy při 500 mg/l. Limonen byl nejméně efektivní z těchto látek, jelikož žádná z koncentrací nezpůsobila snížení růstu ani pod 80 %. Index růstu vypočtený pro tento mikroorganizmus v závislosti na koncentracích jednotlivých látek je znázorněn na Obrázku 36.

Z růstových křivek (Příloha P XIX) byla odečtena minimální inhibiční koncentrace pro karvakrol 250 mg/l. Inhibiční účinky linaloolu nebyly prokázány, ale lag při koncentraci 500 mg/l činil 4 hodiny. Limonen rovněž nevykázal účinek proti této bakterii. Stejné výsledky můžeme sledovat pomocí indexu růstu na obrázku níže.

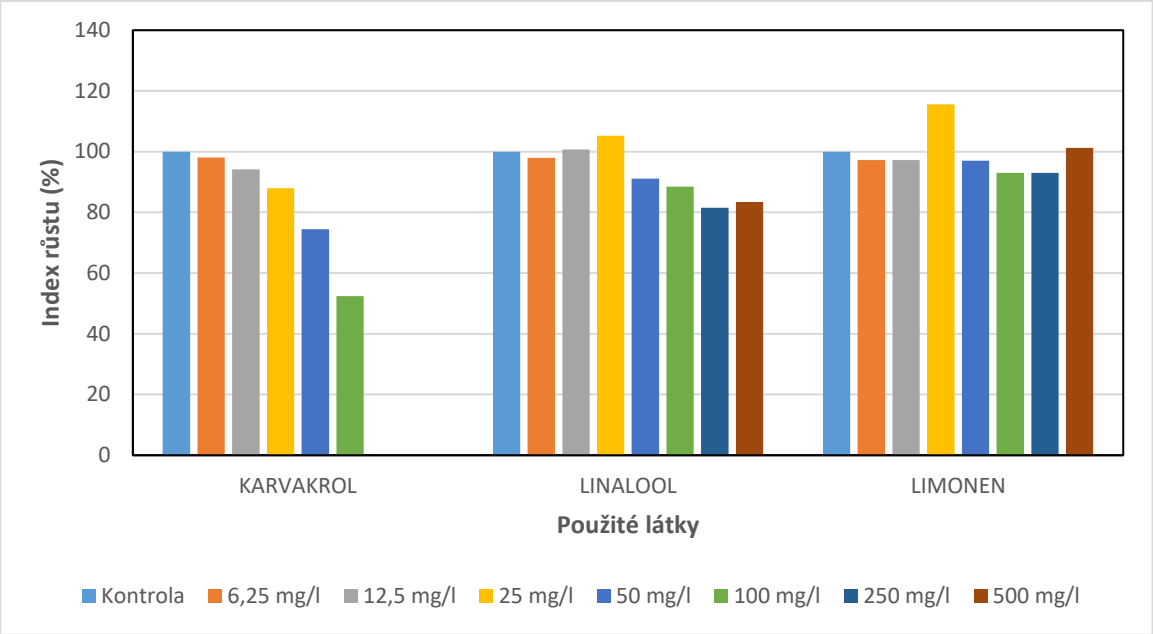


Obrázek 36 Účinky vybraných esenciálních olejů na růst buněk *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 po 24 hodinách kultivace

8.2.10 Vliv esenciálních olejů na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188

Posledním sledovaným mikroorganizmem byl *Proteus mirabilis* CCM 7188. Bylo zjištěno, že nejvyšší inhibiční účinky na tuto bakterii vykazoval karvakrol. Z Obrázku 37 lze pozorovat, že se zvyšující se koncentrací karvakrolu došlo k postupnému snížení indexu růstu. Koncentrace 100 mg/l způsobila snížení růstu pod 60 %, koncentrace 250 mg/l zcela potlačila růst a při nejvyšší koncentraci index růstu dosahoval maximálně 1 %. Látky linalool a limonen nebyly příliš účinné proti růstu této bakterie. U žádných z použitých koncentrací v obou případech nedošlo ke snížení růstu pod 80 %. Koncentrace 25 mg/l naopak podpořila růst bakterie oproti kontrolnímu vzorku.

Z růstových křivek (Příloha P XX) byla odečtena minimální inhibiční koncentrace pro karvakrol 250 mg/l. Inhibiční účinky linaloolu nebyly prokázány, lag trval při koncentraci 500 mg/l asi 5 hodin. Limonen rovněž nebyl účinný v žádné z koncentrací.



Obrázek 37 Účinky vybraných esenciálních olejů na růst buněk *Proteus mirabilis* CCM 7188 po 24 hodinách kultivace

9 DISKUZE

Cílem této práce bylo zhodnotit antimikrobiální účinky vybraných 1-monoacylglycerolů a esenciálních olejů pomocí mikrodiluční metody. Za tímto účelem bylo vybráno celkem deset kmenů bakterií s dekarboxylázovou aktivitou. Osm z testovaných kmenů patří mezi grampozitivní bakterie (zástupci rodu *Lactococcus* a *Enterococcus*) a dva kmeny mezi gramnegativní bakterie (zástupci rodu *Salmonella a Proteus*).

Pro studium inhibičních účinků 1-monoacylglycerolů byl zvolen monoacylglycerol kyseliny kaprylové, kaprinové a laurové. Všechny byly testovány při koncentracích 25 – 1500 mg/l. Bylo zjištěno, že na testované grampozitivní bakterie měl nejvyšší inhibiční účinek monolaurin. Proti růstu gramnegativních bakterií naopak působil nejvíce monokaprylin. Monokaprin vykazoval určitý inhibiční potenciál proti oběma skupinám. U všech testovaných 1-monoacylglycerolů byla tedy prokázána antimikrobiální aktivita proti vybraným bakteriím, která však závisela na koncentraci dané inhibiční látky a na typu bakteriální buněčné stěny. Bylo zde potvrzeno, že gramnegativní bakterie jsou odolnější proti inhibičním účinkům 1-monoacylglycerolů než grampozitivní bakterie.

Ve studii Buňkové et al. [43], kde byly porovnány antimikrobiální účinky sedmi 1-monoacylglycerolů na patogeny přenášené jídlem, či bakterie způsobující kažení, dospěli k tomu, že v přítomnosti MAG C8:0 ve vyšších koncentracích (1000 a 1500 mg/l) nebyl po 24 hodinové kultivaci zaznamenán žádný růst. Monokaprin ovlivnil testované grampozitivní bakterie na nižších koncentracích oproti MAG C8:0. Monoacylglycerol kyseliny laurové vykázal nejlepší inhibiční efekt proti grampozitivním bakteriím. U některých bakterií stačila nejnižší koncentrace (25 mg/l) k úplné inhibici růstu. Například *Enterococccus faecalis* CCM 4224 byl inhibován při koncentracích MAG C12:0 100 mg/l. Proti růstu gramnegativních bakterií nejvíce působil MAG C10:0 při koncentraci 1500 mg/l. K výraznému snížení růstu *Salmonella* Enteritidis CCM 4420 došlo po přidání MAG C8:0 do kultivačního média v koncentraci 500 mg/l a výše. Stejné výsledky byly získány i v této práci, ale s tím rozdílem, že na gramnegativní bakterie působil nejvíce MAG C8:0 od koncentrace 1000 mg/l.

V další části byly sledovány inhibiční účinky karvakrolu, linaloolu a limonenu, jakožto důležitých složek esenciálních olejů. Použité koncentrace těchto látek byly zvoleny v rozmezí 6,25 – 500 mg/l. Z výsledků lze pozorovat, že proti růstu všech vybraných bakterií

byl nejvíce účinný karvakrol. Linalool a limonen naopak neprokázaly zásadní inhibiční účinky.

Podobných výsledků bylo dosaženo ve studii Soković et al. [54], kde složkou s nejvyšší inhibiční aktivitou byl karvakrol. Naopak látkou s nejnižším antimikrobním potenciálem byl limonen.

Z literárních zdrojů vyplývá, že antimikrobní účinky esenciálních olejů více ovlivňují grampozitivní než gramnegativní bakterie, což se v tomto případě nepotvrdilo. Důvodem mohou být nízké koncentrace testovaných látek, jelikož nebyla zaznamenána významná inhibiční aktivita ani v případě linaloolu, ani limonenu. Karvakrol působil na bakterie s buněčnou stěnou grampozitivního i gramnegativního typu přibližně ve stejných koncentracích.

ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývá inhibičním působením monoacylglycerolů a esenciálních olejů na bakterie s dekarboxylázovou aktivitou.

Na základě získaných výsledků lze vyvodit tyto závěry:

- U všech testovaných 1-monoacylglycerolů byla prokázána inhibiční aktivita.
- Proti růstu grampozitivních bakterií nejvíce působil monoacylglycerol kyseliny laurové (MAG C12:0). Nejcitlivějším mikroorganizmem k tomuto monoacylglycerolu byl *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48. K výrazné inhibici růstu všech testovaných grampozitivních bakterií při použití monolaurinu docházelo nejčastěji při koncentracích 50 a 100 mg/l.
- Monoacylglycerol kyseliny kaprinové (MAG C10:0) inhiboval růst všech testovaných grampozitivních bakterií při koncentracích 250 a 500 mg/l.
- Monoacylglycerol kyseliny kaprylové (MAG C8:0) vykazoval inhibiční účinky až při vyšších koncentracích. Růst laktokoků byl tedy inhibován při koncentraci 1000 mg/l, zatímco růst enterokoků při 1500 mg/l.
- Proti gramnegativním bakteriím naopak nejvíce působil monoacylglycerol kyseliny kaprylové při vysokých koncentracích 1000 a 1500 mg/l.
- Monoacylglycerol kyseliny kaprinové také vykazoval výraznou, ale o trochu nižší inhibici růstu gramnegativních bakterií při koncentracích 1000 a 1500 mg/l.
- Monoacylglycerol kyseliny laurové byl proti gramnegativním bakteriím z testovaných monoacylglycerolů nejméně účinný.
- Nejvíce účinnou složkou esenciálních olejů byl karvakrol, který způsoboval inhibici růstu jak grampozitivních, tak i gramnegativních bakterií. Karvakrol projevoval nejvyšší inhibiční potenciál při koncentracích 250 a 500 mg/l.
- Látky linalool a limonen nebyly příliš účinné proti růstu testovaných bakterií.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] SANTOS, M. H. Silla. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1996, **29**(2-3), s. 213-231 [cit. 2020-04-03]. ISSN 0168-1605. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00032-1. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168160595000321

[2] DOEUN, Dara, Munkhtugs DAVAATSEREN a Myung-Sub CHUNG. Biogenic amines in foods. *Food Science and Biotechnology* [online]. 2017, **26**(6), s. 1463-1474 [cit. 2020-04-03]. ISSN 1226-7708. DOI: 10.1007/s10068-017-0239-3. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s10068-017-0239-3

[3] ÖZOGUL, Yesim a Fatih ÖZOGUL. Biogenic Amines Formation, Toxicity, Regulations in Food. In: SAAD, Bahruddin a Rosanna TOFALO. *Biogenic Amines in Food: Analysis, Occurrence and Toxicity* [online]. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2019, s. 1-17 [cit. 2020-04-03]. ISBN 978-1-78801-581-3. DOI: 10.1039/9781788015813-00001. Dostupné z: http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781788015813-00001

[4] BUŇKOVÁ, Leona, Pavel BUDINSKÝ, Gabriela ADAMCOVÁ et al. Monitoring výskytu biogenních aminů ve fermentovaných mléčných výrobcích v ČR. In: *Mlékařské listy* [online]. 2012, **134** [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2012/134_s.i-iii.pdf

[5] Bílkoviny. In: *E-ChemBook* [online]. ©2020 [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: http://e-chembook.eu/bilkoviny

[6] MCMURRY, John. *Organická chemie* [online]. Brno: VUTIUM, 2007 [cit. 2020-04-03]. ISBN 978-80-214-3291-8.

[7] PERIN, Luana M. a Luís A. NERO. The Relevance of Biogenic Amines in Dairy Products. In: WATSON, Ronald Ross, Robert J. COLLIER a Victor R. PREEDY. *Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan* [online]. Elsevier, 2017, s. 169-182 [cit. 2020-04-03]. ISBN 978-0-12-809868-4. DOI: 10.1016/B978-0-12-809868-4.00012-1. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128098684000121

[8] Biogenní aminy. In: *Informační centrum bezpečnosti potravin*. Bezpečnost potravin A-Z [online]. Praha: Ministerstvo zemědělství, ©2018 [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76472.aspx

[9] ERDAG, Dincer, Oguz MERHAN a Baris YILDIZ. Biochemical and Pharmacological Properties of Biogenic Amines. In: PROESTOS, Charalampos. *Biogenic Amines* [online]. IntechOpen, 2018 [cit. 2020-04-03]. ISBN 978-1-78984-133-6. DOI: 10.5772/intechopen.81569. Dostupné z: https://www.intechopen.com/books/biogenic-amines/biochemical-and-pharmacological-properties-of-biogenic-amines

[10] TITTARELLI, Fabrizia, Giorgia PERPETUINI, Paola DI GIANVITO et al. Biogenic amines producing and degrading bacteria: A snapshot from raw ewes' cheese. *LWT – Food Science and Technology* [online]. 2019, **101**, s. 1-9 [cit. 2020-04-03]. ISSN 0023-6438. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.11.030. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643818309812

[11] STANDAROVÁ, E., I. BORKOVCOVÁ a L. VORLOVÁ. Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. In: *Veterinářství* [online]. Brno: Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2008 [cit. 2020-04-13]. Dostupné z: https://www.vetweb.cz/obsah-biogennich-aminu-v-syrech-z-ceske-obchodni-site/

[12] HALÁSZ, Anna, Ágnes BARÁTH, Livia SIMON-SARKADI et al. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology* [online]. 1994, **5**, s. 42-49 [cit. 2020-04-13]. ISSN 0924-2244. DOI: 10.1016/0924-2244(94)90070-1. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0924224494900701

[13] DEL VALLE, Luis J., Marta GINOVART, Elena GORDÚN et al. Histidine decarboxylase-positive lactic acid bacteria strains and the formation of histamine in ripened cheeses. *Journal of Food Processing and Preservation* [online]. 2018, **42**, s. 1-9 [cit. 2020-04-08]. ISSN 0145-8892. DOI: 10.1111/jfpp.13708. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1111/jfpp.13708

[14] GARDINI, Fausto, Yesim ÖZOGUL, Giovanna SUZZI et al. Technological Factors Affecting Biogenic Amine Content in Foods: A Review. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, **7**, s. 1-18 [cit. 2020-04-13]. ISSN 1664-302X. DOI:

10.3389/fmicb.2016.01218. Dostupné z: http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.01218/abstract

[15] TOMÁNKOVÁ, Eva, Vojtěch RADA a Jiří KILLER. *Potravinářská mikrobiologie.* Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2006. ISBN 80-213-1583-0.

[16] VINDEROLA, Gabriel, Arthur OUWEHAND, Seppo SALMINEN et al. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* [online]. 5th ed. Boca Raton: CRC Press, 2019 [cit. 2020-04-14]. ISBN 978-0-4290-5746-5. DOI: 10.1201/9780429057465. Dostupné z: https://www-taylorfrancis-com.proxy.k.utb.cz/books/e/9780429057465

[17] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potraviná̊ře a biotechnology.* 3. opr. a dopl. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.

[18] MOSIO, Petra. *Atlas bakterií*. Pardubice: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2012. ISBN 978-80-7395-467-3.

[19] KRAMÁŘ, Radim. *Lékařská mikrobiologie.* České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, 2007. ISBN 978-80-7394-021-8.

[20] SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: Pro studenty zdravotnických oborů.* Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3170-4.

[21] WAREING, Peter, Felicity STUART a Rhea FERNANDES. *Micro-Facts: The Working Companion for Food Microbiologists* [online]. 7th ed. Royal Society of Chemistry, 2010 [cit. 2020-04-14]. ISBN 978-1-62198-175-6. Dostupné z: https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMFTWCFM1/micro-facts-working-companion/micro-facts-working-companion

[22] KRUMM, Andrea. Measure microbial growth using the „OD600“. In: *BMG LABTECH* [online]. 2019 [cit. 2020-04-13]. Dostupné z: https://www.bmglabtech.com/measure-microbial-growth-using-the-od600/

[23] MATLOCK, Brian C., Richard W. BERINGER, David L. ASH et al. Analyzing Differences in Bacterial Optical Density. In: *Thermo Fisher Scientific* [online]. ©2020 [cit. 2020-04-13]. Dostupné z: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/posters/nanodroptryPOSTER.pdf

[24] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná.* 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-868-5000-5.

[25] ZHOU, Xuedong a Yuqing LI. *Atlas of Oral Microbiology: From Healthy Microflora to Disease* [online]. Elsevier, 2015, s. 15-40 [cit. 2020-04-09]. ISBN 978-0-12-802234-4. DOI: 10.1016/B978-0-12-802234-4.00002-1. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128022344000021

[26] ODSTRČIL, Jaroslav a Milada ODSTRČILOVÁ. *Chemie potravin*. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2006. ISBN 80-701-3435-6.

[27] WAN, Peter J. Properties of Fats and Oils. In: O'BRIEN, Richard D., Walter E. FARR a Peter J. WAN. *Introduction to Fats and Oils Technology* [online]. 2nd ed. AOCS Press, 2000, s. 20-48 [cit. 2020-04-18]. ISBN 978-1-61583-198-2. Dostupné z: https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpIFOTE00J/introduction-fats-oils/introduction-fats-oils

[28] HOZA, Ignác a Danieal SUMCZYNSKI. *Potravinářská biochemie I*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005. ISBN 978-80-7318-295-3.

[29] CHEONG, Ling-Zhi, Zheng GUO, Bena-Marie LUE et al. Surface active lipids as encapsulation agents and delivery vehicles. In: AHMAD, Morgis U. *Lipids in Nanotechnology* [online]. AOCS Press, 2012, s. 15-51 [cit. 2020-04-18]. ISBN 978-1-61344-996-7. Dostupné z: https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpLN000001/lipids-in-nanotechnology/lipids-in-nanotechnology

[30] ŠEVČÍKOVÁ, Petra, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Iva HAUERLANDOVÁ et al. Formulation, antibacterial activity, and cytotoxicity of 1-monoacylglycerol microemulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2014, **116**(4), s. 448-457 [cit. 2020-04-22]. ISSN 1438-7697. DOI: 10.1002/ejlt.201300171. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201300171

[31] CHRISTIE, William W. Monoacylglycerols. In: *The LipidWeb* [online]. 2019 [cit. 2020-04-22]. Dostupné z: https://www.lipidhome.co.uk/lipids/simple/mg/index.htm

[32] WANG, Fan C. a Alejandro G. MARANGONI. Advances in the application of food emulsifier α-gel phases: Saturated monoglycerides, polyglycerol fatty acid esters, and their derivatives. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2016, **483**, s. 394-403 [cit. 2020-04-22]. ISSN 0021-9797. DOI: 10.1016/j.jcis.2016.08.012. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979716305677

[33] HUDSON, B. J. F. Fatty acids. In: MACRAE, R., Richard Kenneth ROBINSON a Michèle J. SADLER. *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition* [online]. Academic Press, 1993, s. 2297-2300 [cit. 2020-04-21]. ISBN 0-12-226850-4. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0308814694902666

[34] SAGALOWICZ, L., M. E. LESER, H. J. WATZKE et al. Monoglyceride self-assembly structures as delivery vehicles. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2006, **17**(5), s. 204-214 [cit. 2020-04-20]. ISSN 0924-2244. DOI: 10.1016/j.tifs.2005.12.012. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224406000082

[35] THORMAR, Halldor a Hilmar HILMARSSON. The role of microbicidal lipids in host defense against pathogens and their potential as therapeutic agents. *Chemistry and Physics of Lipids* [online]. 2007, **150**(1), s. 1-11 [cit. 2020-04-20]. ISSN 0009-3084. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2007.06.220. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009308407003817

[36] BUŇKOVÁ, Leona. *Účinky přídatných látek používaných v potravinářství a kosmetice na růst vybraných bakterií* [online]. Brno, 2008 [cit. 2020-04-22]. Rigorózní práce. Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/muleq/Rigorozni_prace_Bunkova.pdf

[37] PLEVA, Pavel. *Inhibiční vliv monoacylglycerolů na bakterie rodu Lactococcus* [online]. Zlín, 2010 [cit. 2020-04-23]. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Leona Buňková. Dostupné z: http://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/13069/pleva_2010_dp.pdf?sequence=1&isAlisAll=y

[38] GUNSTONE, F. D. *The Chemistry of Oils and Fats: Sources, Composition, Properties, and Uses*. Blackwell Pub., 2004. ISBN 978-0849323737.

[39] POKORNÝ, Jan a Ludmila DUBSKÁ. *Technologie tuků*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1986.

[40] DOLEŽALOVÁ, Magda, Rahula JANIŠ, Hana SVOBODOVÁ et al. Antimicrobial properties of 1-monoacylglycerols prepared from undecanoic (C11:0) and undecenoic (C11:1) acid. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online].

2010, **112**(10), s. 1106-1114 [cit. 2020-04-21]. ISSN 1438-7697. DOI: 10.1002/ejlt.200900295. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.200900295

[41] MAO, Like, Sonia CALLIGARIS, Luisa BARBA et al. Monoglyceride self-assembled structure in O/W emulsion: formation, characterization and its effect on emulsion properties. *Food Research International* [online]. 2014, **58**, s. 81-88 [cit. 2020-04-26]. ISSN 0963-9969. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.01.042. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996914000489

[42] VEREECKEN, Jeroen, Wouter MEEUSSEN, Imogen FOUBERT et al. Comparing the crystallization and polymorphic behaviour of saturated and unsaturated monoglycerides. *Food Research International* [online]. 2009, **42**(10), s. 1415-1425 [cit. 2020-04-28]. ISSN 0963-9969. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.07.006. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996909001872

[43] BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Rahula JANIŠ et al. Comparison of antibacterial effect of seven 1-monoglycerides on food-borne pathogens or spoilage bacteria. *Acta Veterinaria Brno* [online]. 2011, **80**(1), s. 29-39 [cit. 2020-04-20]. ISSN 0001-7213. DOI: 10.2754/avb201180010029. Dostupné z: https://actavet.vfu.cz/80/1/0029/

[44] KABARA, Jon J. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents: a review. In: KABARA, Jon J. *Symposium on the Pharmacological Effect of Lipids*. Champaign, IL, U.S.A.: The American Oil Chemists′ Society, 1978, s. 1-14. ISBN 9991817697.

[45] RÍOS, José-Luis. Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined. In: PREEDY, Victor R. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* [online]. Elsevier, 2016, s. 3-10 [cit. 2020-05-04]. ISBN 9780124166417. DOI: 10.1016/B978-0-12-416641-7.00001-8. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124166417000018

[46] STILES, K. G. *Esenciální oleje: kompletní příručka*. Olomouc: ANAG, 2019. ISBN 978-80-7554-235-9.

[47] BERGER, R. G. *Flavour and Fragnances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability* [online]. Germany: Springer, 2007 [cit. 2020-05-04]. ISBN 978-3-540-49338-9. Dostupné z: https://www.academia.edu/27324185/Flavours_and_Fragrances-Chemistry_Bioprocessing_and_Sustainability

[48] MOGHADDAM, Mohammad a Leila MEHDIZADEH. Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. *Soft Chemistry and Food Fermentation* [online]. Elsevier, 2017, s. 379-419 [cit. 2020-05-04]. ISBN 9780128114124. DOI: 10.1016/B978-0-12-811412-4.00013-8. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128114124000138

[49] Isoprene. In: *Alchetron: Free Social Encyclopedia for the World* [online]. 2018 [cit. 2020-05-04]. Dostupné z: https://alchetron.com/Isoprene

[50] BOUTEKEDJIRET, Chahrazed, Amina HELLAL, Anne-Sylvie FABIANO-TIXIER et al. Essential oils for preserving foods. *Green Food Processing Techniques* [online]. Elsevier, 2019, s. 369-390 [cit. 2020-05-04]. ISBN 9780128153536. DOI: 10.1016/B978-0-12-815353-6.00013-6. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128153536000136

[51] STRATAKOS, Alexandros Ch. a Anastasios KOIDIS. Methods for Extracting Essential Oils. In: PREEDY, Victor R. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* [online]. Elsevier, 2016, s. 31-38 [cit. 2020-05-04]. ISBN 9780124166417. DOI: 10.1016/B978-0-12-416641-7.00001-8. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124166417000018

[52] CAN BASER, K. Husnu a Gerhard BUCHBAUER. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications* [online]. Boca Raton, FL: CRC Press, 2010 [cit. 2020-05-04]. ISBN 978-1-4200-6315-8.

[53] MEHDIZADEH, Leila a Mohammad MOGHADDAM. Essential Oils: Biological Activity and Therapeutic Potential. *Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods* [online]. Elsevier, 2018, s. 167-179 [cit. 2020-05-04]. ISBN 9780128146255. DOI: 10.1016/B978-0-12-814625-5.00010-8. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128146255000108

[54] SOKOVIĆ, Marina, Jasmina GLAMOČLIJA, Petar D. MARIN et al. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model. *Molecules* [online]. 2010, **15**(11), s. 7532-7546 [cit. 2020-05-04]. ISSN 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules15117532. Dostupné z: http://www.mdpi.com/1420-3049/15/11/7532

[55] ZHANG, Dan, Ren-You GAN, Ying-Ying GE et al. Research progress on the antibacterial mechanisms of carvacrol: a mini review. *Bioactive Compounds in Health*

and Disease [online]. 2018, **1**(6), s. 71-81 [cit. 2020-05-04]. ISSN 2574-0334. DOI: 10.31989/bchd.v1i6.551. Dostupné z: https://ffhdj.com/index.php/BioactiveCompounds/article/view/551

[56] TAHERIAN, Abbas Ali, Abbas VAFAEI a Javad AMERI. Opiate System Mediate the Antinociceptive Effects of Coriandrum sativum in Mice. *Iranian journal of pharmaceutical research* [online]. 2012, **11**(2), s. 679-688 [cit. 2020-05-04]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/258703868_Opiate_System_Mediate_the_Antinociceptive_Effects_of_Coriandrum_sativum_in_Mice

[57] XU, Yan-Yan, Feng WEI, Yuan GUO et al. Measurement of Surface Chirality with Nonlinear Spectroscopy: A Quantitative Approach. *Frontiers in Optics* [online]. Washington, D.C., 2009 [cit. 2020-05-04]. ISBN 978-1-55752-878-0. DOI: 10.1364/LS.2009.LSWK2. Dostupné z: https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=LS-2009-LSWK2

[58] CALO, Juliany Rivera, Philip G. CRANDALL, Corliss A. O'BRYAN et al. Essential oils as antimicrobials in food systems: A review. *Food Control* [online]. 2015, **54**, s. 111-119 [cit. 2020-05-04]. ISSN 09567135. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.12.040. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713515000456

[59] BLASZYK, M. a R.A. HOLLEY. Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1998, **39**(3), s. 175-183 [cit. 2020-05-09]. ISSN 01681605. DOI: 10.1016/S0168-1605(97)00134-7. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160597001347

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ATP	adenosintrifosfát
BA	biogenní aminy
BMK	bakterie mléčného kvašení
CNS	centrální nervový systém
DAG	diacylglyceroly
DAO	diaminoooxidáza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
HLB	hydrofilně-lipofilní rovnováha
IR	index růstu
MAG	monoacylglyceroly
MAO	monoaminooxidáza
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace
OD	optická denzita
OD600	měření optické denzity při 600 nm
RNA	ribonukleová kyselina
TAG	triacylglyceroly

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Dekarboxylace aminokyselin 11

Obrázek 2 Klasifikace vybraných biogenních aminů na základě jejich chemické struktury 12

Obrázek 3 Mechanizmus vzniku biogenních aminů 13

Obrázek 4 Růstová křivka (plná čára) a měření optické denzity (čárkovaně) 26

Obrázek 5 Stereoizomery monoacyl-*sn*-glycerolů 27

Obrázek 6 Schéma esterifikace mastné kyseliny glycerolem 28

Obrázek 7 Schéma glycerolýzy 29

Obrázek 8 Schéma acidolýzy 29

Obrázek 9 Schéma transesterifikace 30

Obrázek 10 Schéma parciální hydrolýzy triacylglycerolů 30

Obrázek 11 Schéma adice mastné kyseliny na glycidol 31

Obrázek 12 Struktura fáze α-gelu (a, b) a koagelu (c) 32

Obrázek 13 Izoprenová jednotka (2-methylbuta-1,3-dien) 37

Obrázek 14 Průmyslová extrakce esenciálních olejů (destilace parou) 39

Obrázek 15 Chemická struktura karvakrolu 42

Obrázek 16 Chemická struktura linaloolu 42

Obrázek 17 Chemická struktura R-limonenu (vlevo) a S-limonenu (vpravo) 43

Obrázek 18 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 po 24 hodinách kultivace 56

Obrázek 19 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 po 24 hodinách kultivace 57

Obrázek 20 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 po 24 hodinách kultivace 58

Obrázek 21 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 po 24 hodinách kultivace 59

Obrázek 22 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 po 24 hodinách kultivace 60

Obrázek 23 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Enterococcus durans* CCDM 53 po 24 hodinách kultivace 61

Obrázek 24 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Enterococcus faecalis* CCM 2665 po 24 hodinách kultivace 62

Obrázek 25 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Enterococcus faecalis* CCM 4224 po 24 hodinách kultivace 63

Obrázek 26 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 po 24 hodinách kultivace 64

Obrázek 27 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Proteus mirabilis* CCM 7188 po 24 hodinách kultivace 65

Obrázek 28 Účinky vybraných esenciálních olejů na růst buněk *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 po 24 hodinách kultivace 66

Obrázek 29 Účinky vybraných esenciálních olejů na růst buněk *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 po 24 hodinách kultivace 67

Obrázek 30 Účinky vybraných esenciálních olejů na růst buněk *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 po 24 hodinách kultivace 68

Obrázek 31 Účinky vybraných esenciálních olejů na růst buněk *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 po 24 hodinách kultivace 69

Obrázek 32 Účinky vybraných esenciálních olejů na růst buněk *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 po 24 hodinách kultivace 70

Obrázek 33 Účinky vybraných esenciálních olejů na růst buněk *Enterococcus durans* CCDM 53 po 24 hodinách kultivace 71

Obrázek 34 Účinky vybraných esenciálních olejů na růst buněk *Enterococcus faecalis* CCM 2665 po 24 hodinách kultivace 72

Obrázek 35 Účinky vybraných esenciálních olejů na růst buněk *Enterococcus faecalis* CCM 4224 po 24 hodinách kultivace 73

Obrázek 36 Účinky vybraných esenciálních olejů na růst buněk *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 po 24 hodinách kultivace 74

Obrázek 37 Účinky vybraných esenciálních olejů na růst buněk *Proteus mirabilis* CCM 7188 po 24 hodinách kultivace 75

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Množství přídavku monoacylglycerolu pro získání dané koncentrace.....52

Tabulka 2 Množství přídavku esenciálního oleje pro získání dané koncentrace.....52

Tabulka 3 Rozvržení vzorků v mikrotitrační destičce při testování různých koncentrací monoacylglycerolů.....53

Tabulka 4 Rozvržení vzorků v mikrotitrační destičce při testování různých koncentrací esenciálních olejů.....53

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

Příloha P II: Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

Příloha P III: Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

Příloha P IV: Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

Příloha P V: Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

Příloha P VI: Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Enterococcus durans* CCDM 53

Příloha P VII: Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Enterococcus faecalis* CCM 2665

Příloha P VIII: Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224

Příloha P IX: Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

Příloha P X: Vliv 1-monoacylglycerolů na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188

Příloha P XI: Vliv esenciálních olejů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

Příloha P XII: Vliv esenciálních olejů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

Příloha P XIII: Vliv esenciálních olejů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

Příloha P XIV: Vliv esenciálních olejů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

Příloha P XV: Vliv esenciálních olejů na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

Příloha P XVI: Vliv esenciálních olejů na růst *Enterococcus durans* CCDM 53

Příloha P XVII: Vliv esenciálních olejů na růst *Enterococcus faecalis* CCM 2665

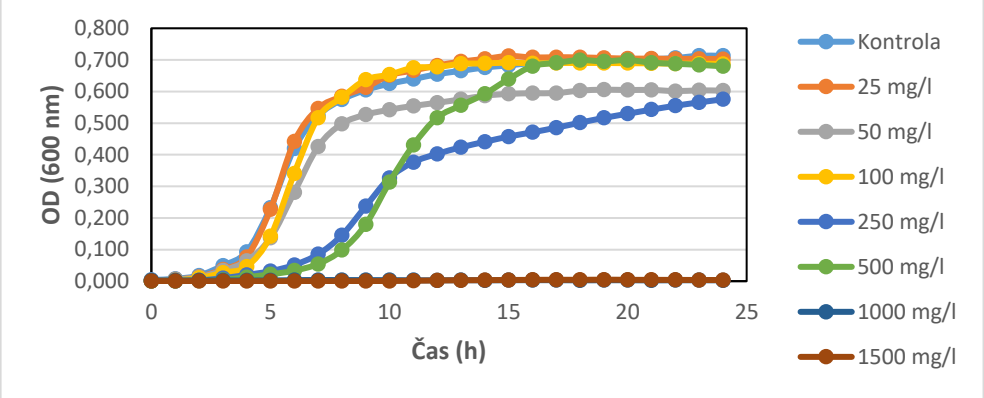
Příloha P XVIII: Vliv esenciálních olejů na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224

Příloha P XIX: Vliv esenciálních olejů na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

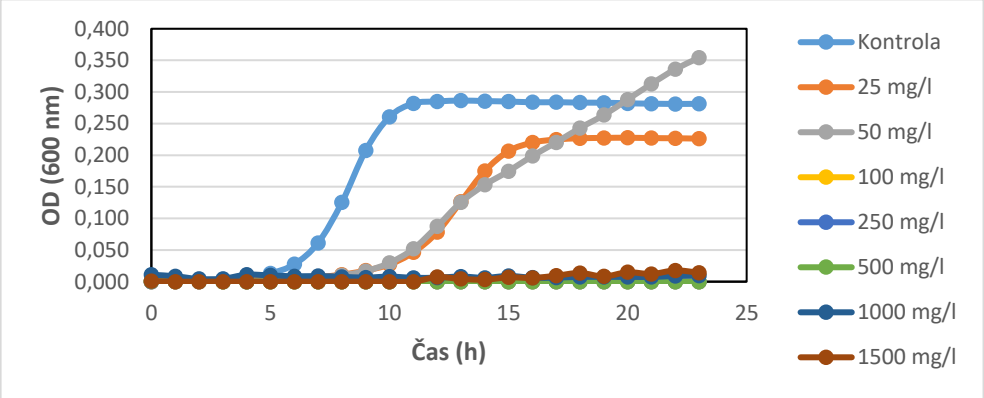
Příloha P XX: Vliv esenciálních olejů na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188

PŘÍLOHA P I: VLIV 1-MONOACYLGLYCEROLŮ NA RŮST *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* CCDM 48

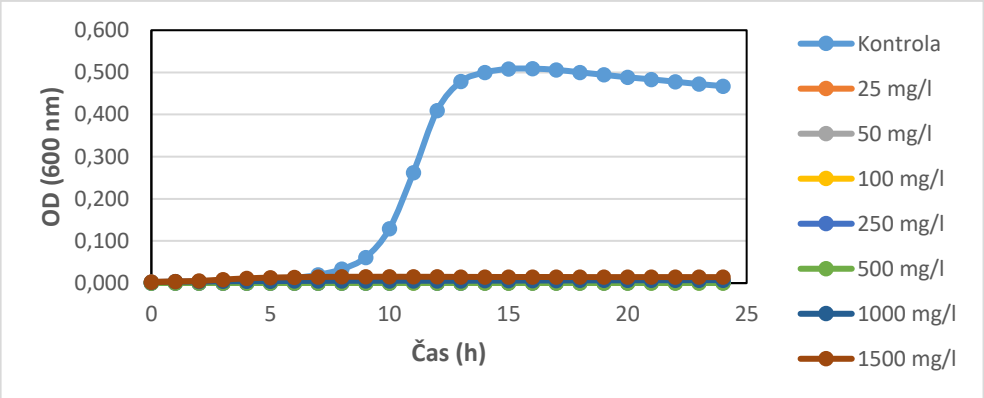
P I A: Vliv MAG kyseliny kaprylové na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48



P I B: Vliv MAG kyseliny kaprinové na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

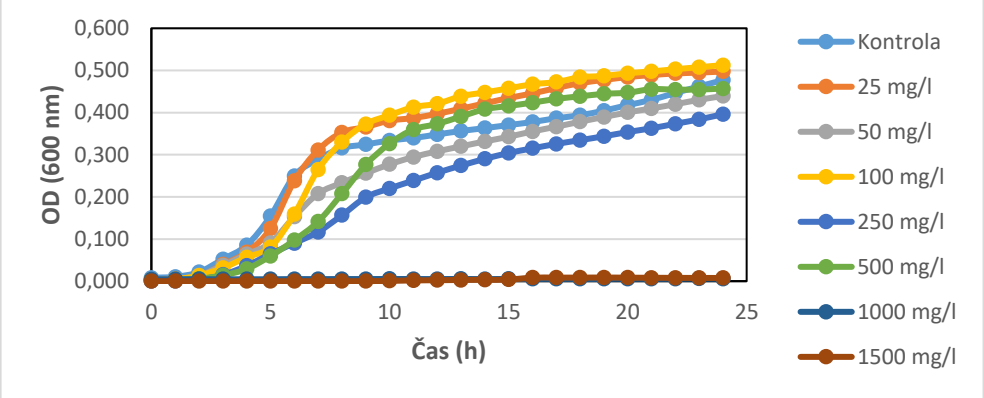


P I C: Vliv MAG kyseliny laurové na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

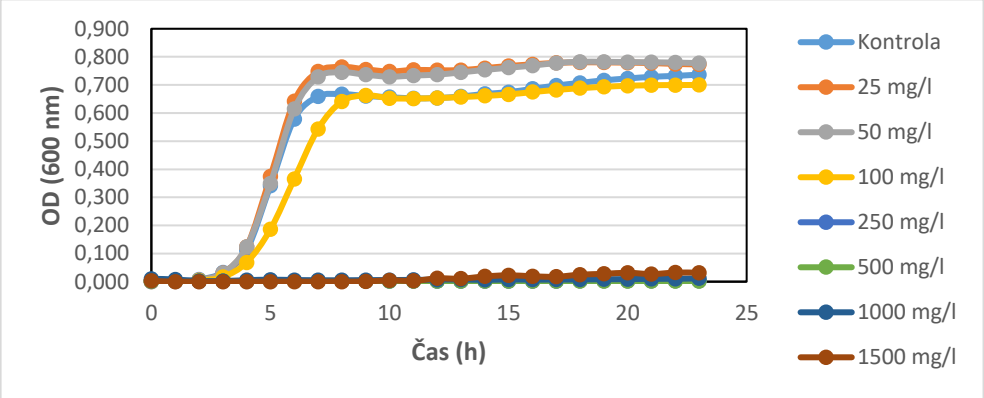


PŘÍLOHA P II: VLIV 1-MONOACYLGLYCEROLŮ NA RŮST *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* CCDM 141

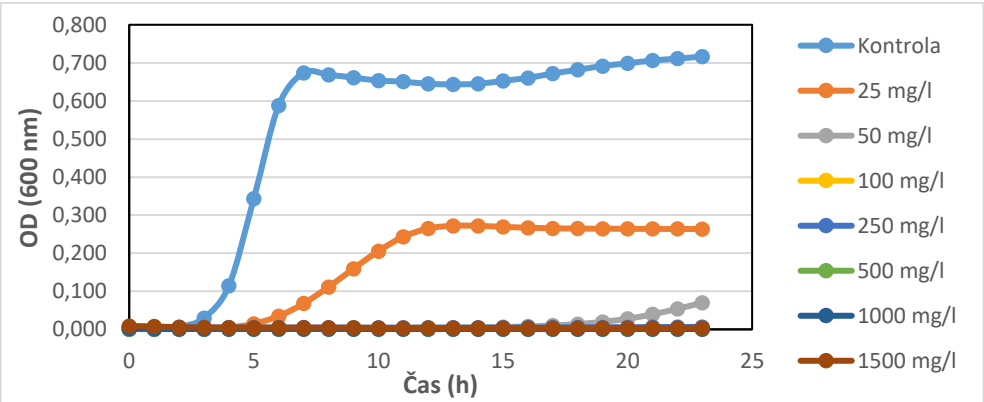
P II A: Vliv MAG kyseliny kaprylové na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141



P II B: Vliv MAG kyseliny kaprinové na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

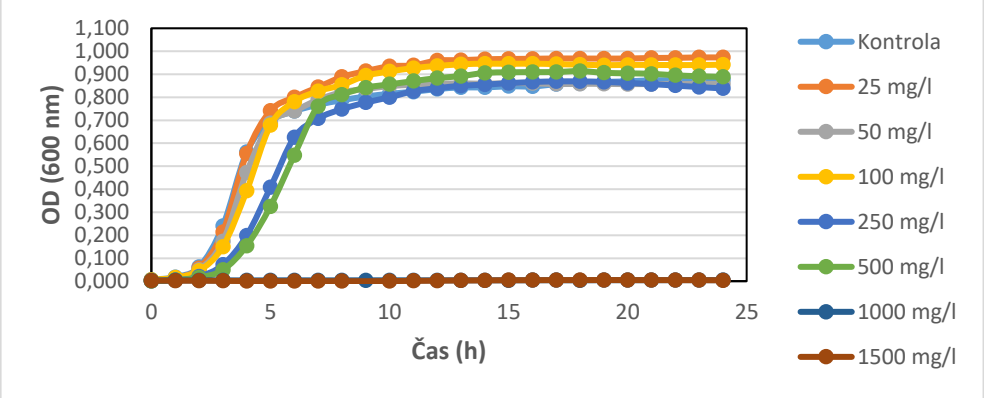


P II C: Vliv MAG kyseliny laurové na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

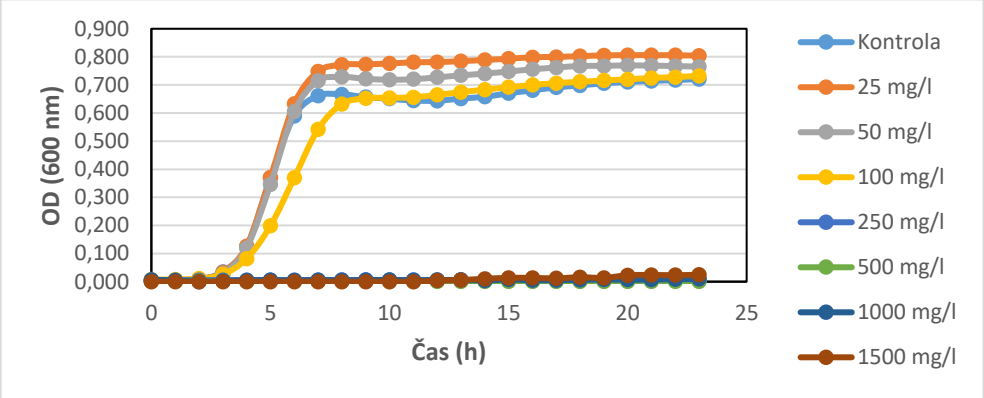


PŘÍLOHA P III: VLIV 1-MONOACYLGLYCEROLŮ NA RŮST *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* CCDM 1004

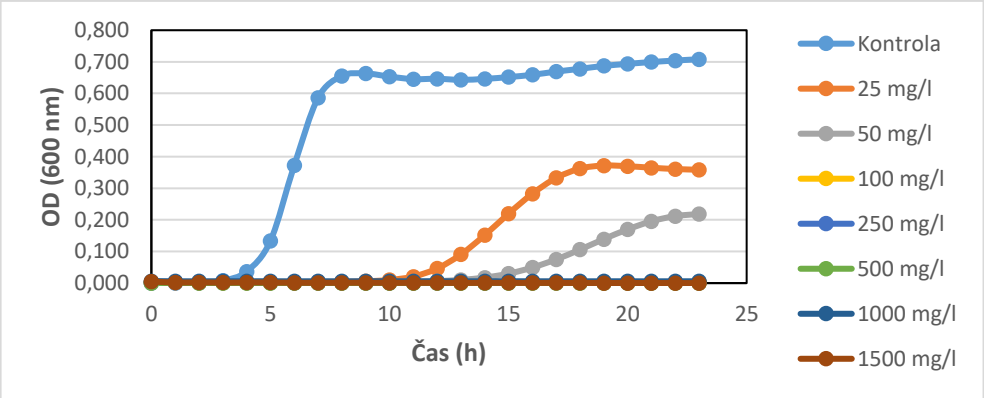
P III A: Vliv MAG kyseliny kaprylové na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004



P III B: Vliv MAG kyseliny kaprinové na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

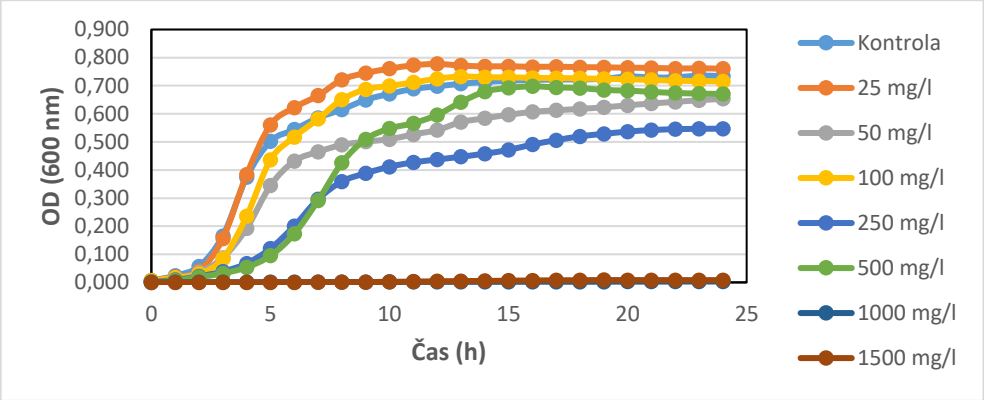


P III C: Vliv MAG kyseliny laurové na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

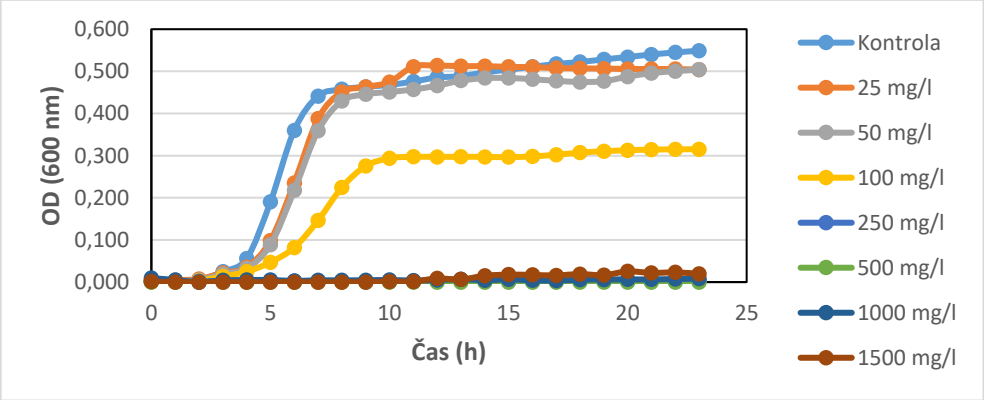


PŘÍLOHA P IV: VLIV 1-MONOACYLGLYCEROLŮ NA RŮST *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *CREMORIS* CCDM 824

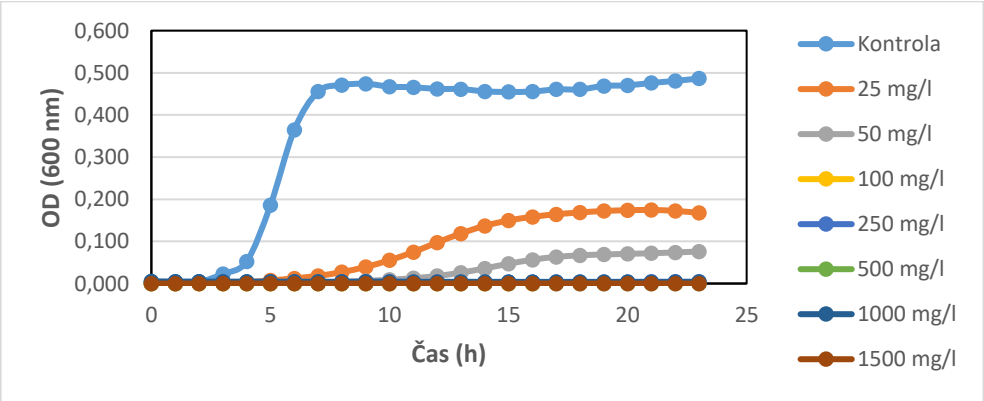
P IV A: Vliv MAG kyseliny kaprylové na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824



P IV B: Vliv MAG kyseliny kaprinové na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

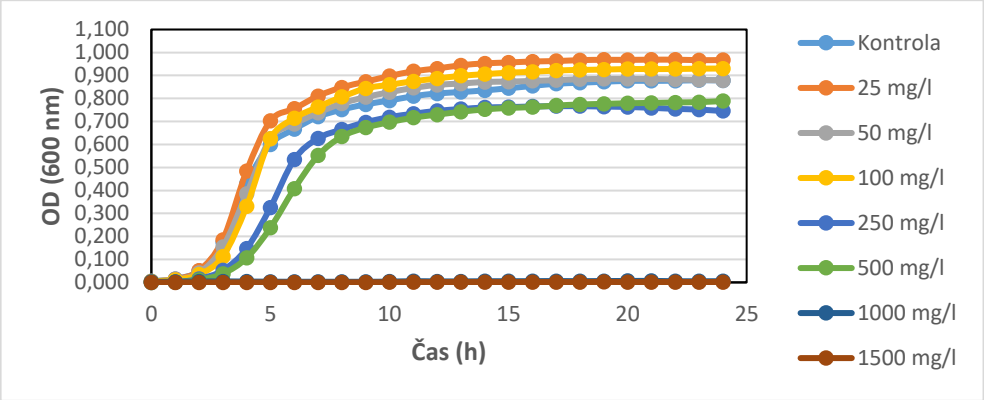


P IV C: Vliv MAG kyseliny laurové na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

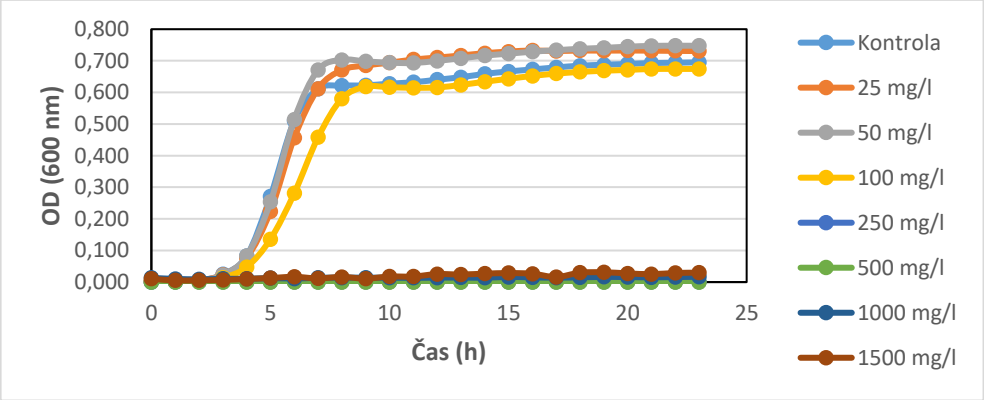


PŘÍLOHA P V: VLIV 1-MONOACYLGLYCEROLŮ NA RŮST *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *CREMORIS* CCDM 946

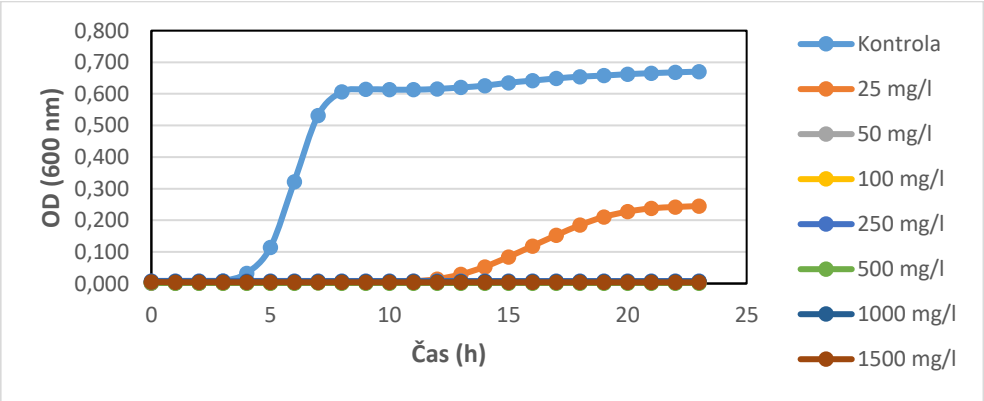
P V A: Vliv MAG kyseliny kaprylové na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946



P V B: Vliv MAG kyseliny kaprinové na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

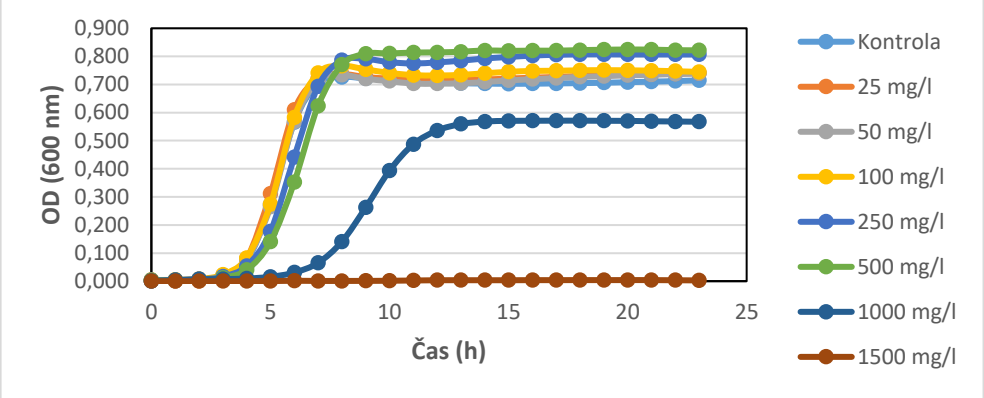


P V C: Vliv MAG kyseliny laurové na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

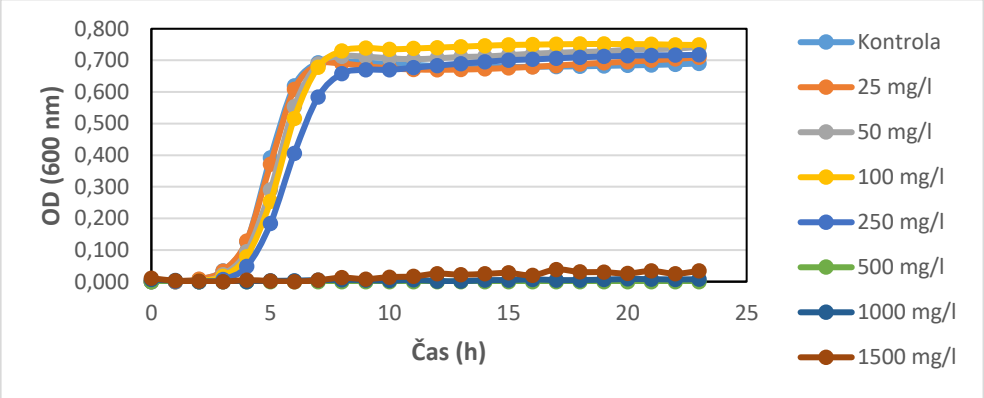


PŘÍLOHA P VI: VLIV 1-MONOACYLGLYCEROLŮ NA RŮST *ENTEROCOCCUS DURANS* CCDM 53

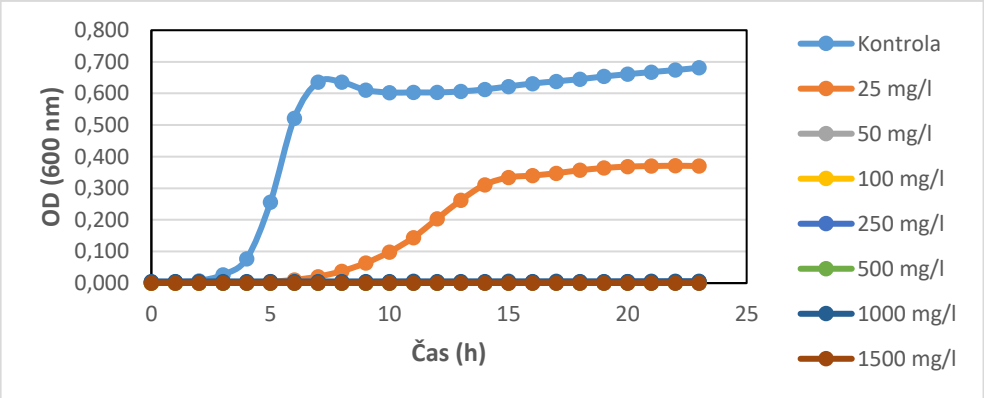
P VI A: Vliv MAG kyseliny kaprylové na růst *Enterococcus durans* CCDM 53



P VI B: Vliv MAG kyseliny kaprinové na růst *Enterococcus durans* CCDM 53

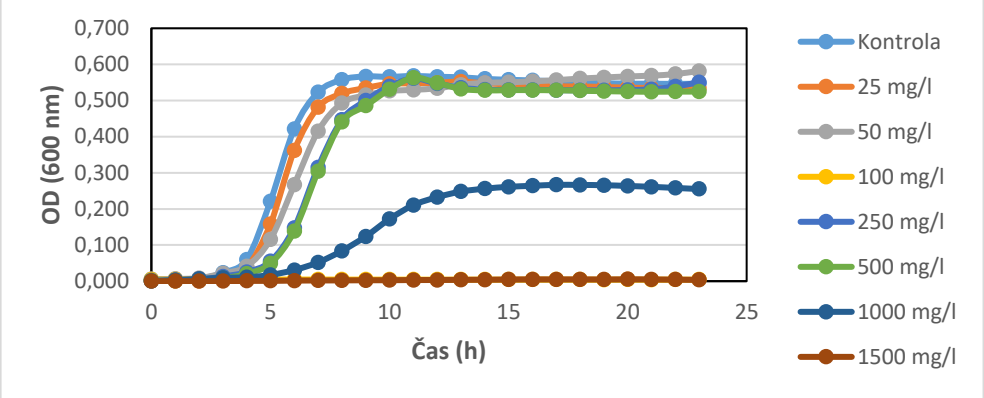


P VI C: Vliv MAG kyseliny laurové na růst *Enterococcus durans* CCDM 53

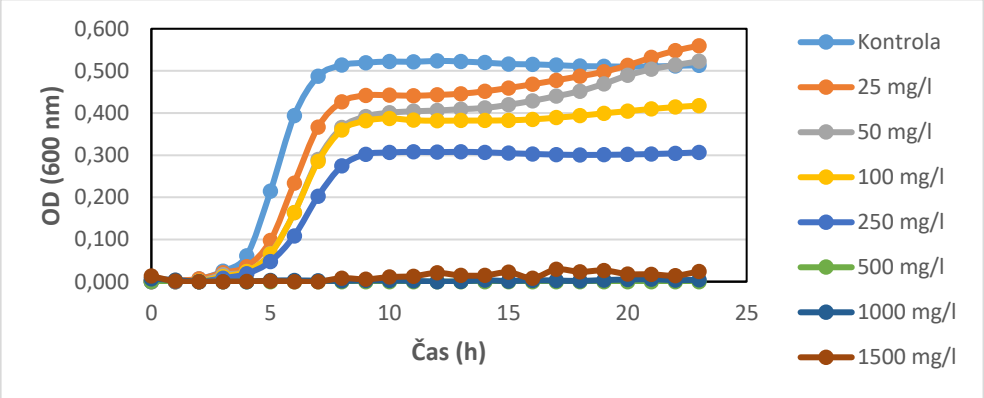


PŘÍLOHA P VII: VLIV 1-MONOACYLGLYCEROLŮ NA RŮST *ENTEROCOCCUS FAECALIS* CCM 2665

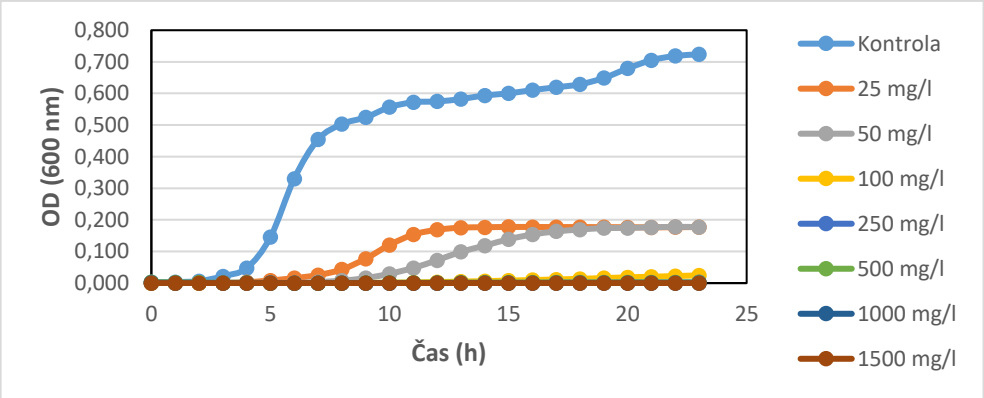
P VII A: Vliv MAG kyseliny kaprylové na růst *Enterococcus faeclis* CCM 2665



P VII B: Vliv MAG kyseliny kaprinové na růst *Enterococcus faeclis* CCM 2665

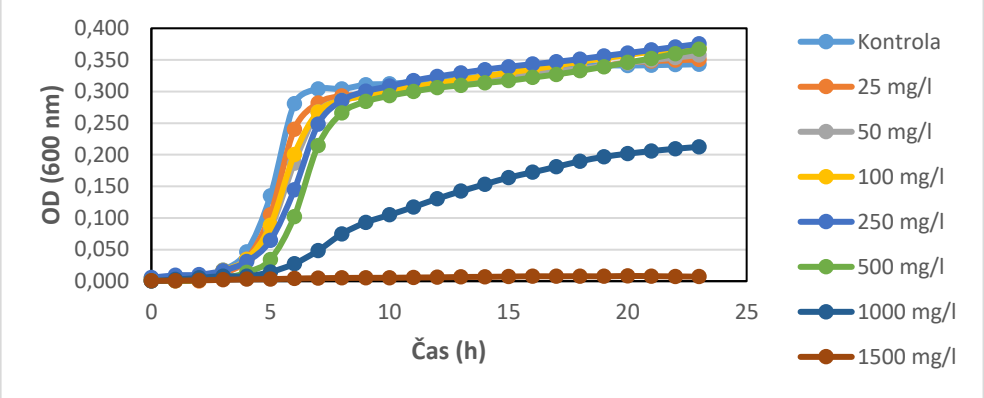


P VII C: Vliv MAG kyseliny laurové na růst *Enterococcus faeclis* CCM 2665

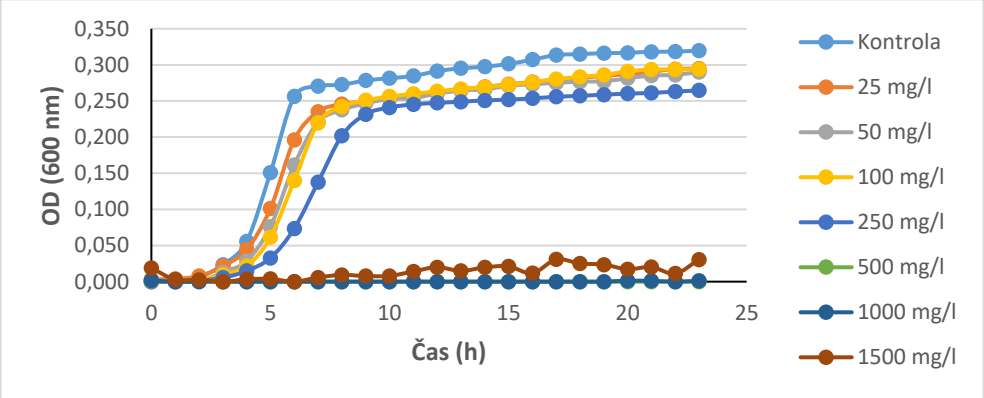


PŘÍLOHA P VIII: VLIV 1-MONOACYLGLYCEROLŮ NA RŮST *ENTEROCOCCUS FAECALIS* CCM 4224

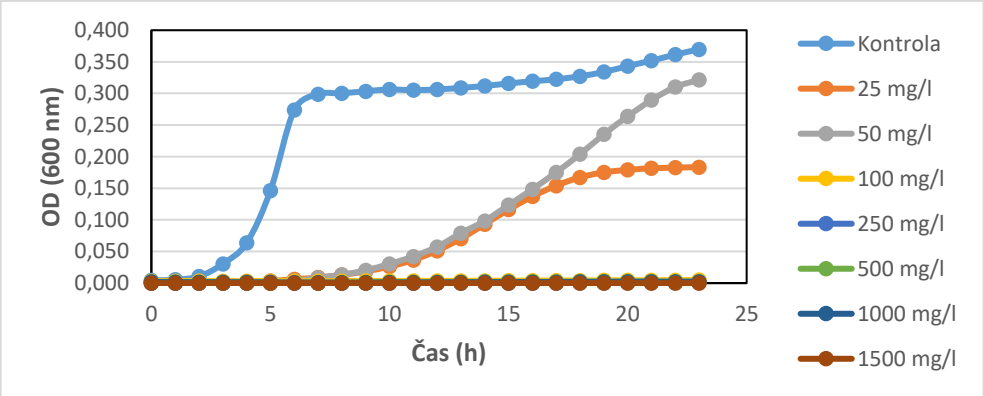
P VIII A: Vliv MAG kyseliny kaprylové na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224



P VIII B: Vliv MAG kyseliny kaprinové na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224

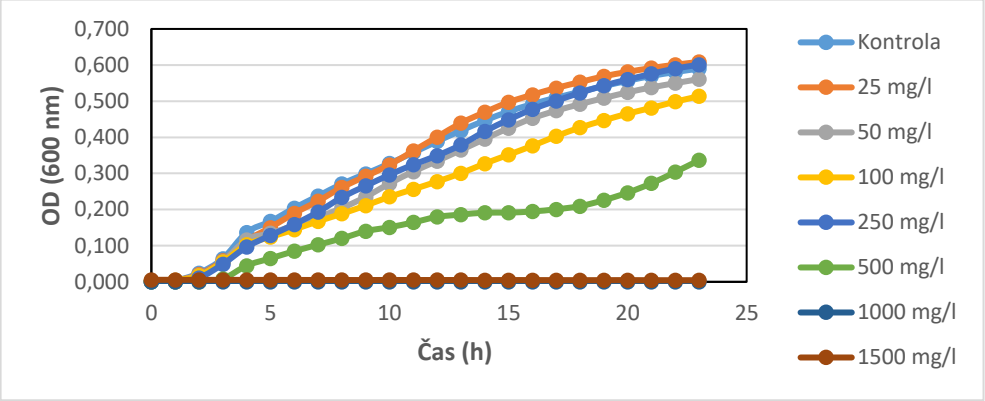


P VIII C: Vliv MAG kyseliny laurové na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224

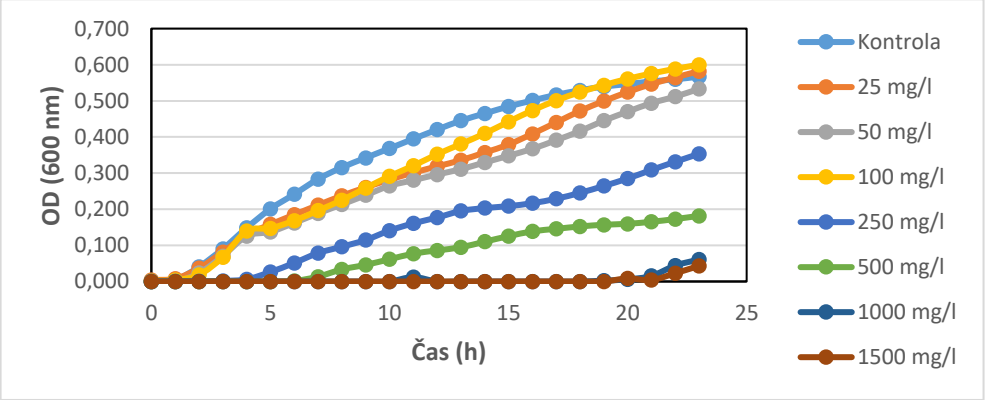


PŘÍLOHA P IX: VLIV 1-MONOACYLGLYCEROLŮ NA RŮST *SALMONELLA ENTERICA* SUBSP. *ENTERICA* SER. ENTERITIDIS CCM 4420

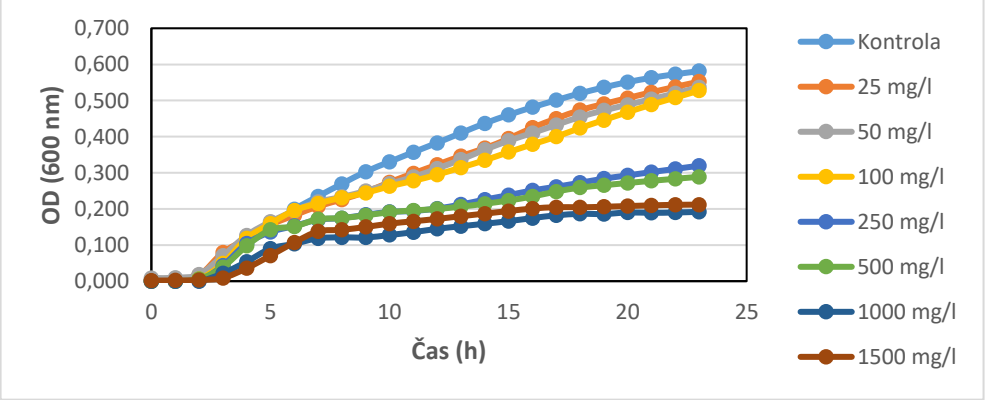
P IX A: Vliv MAG kyseliny kaprylové na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420



P IX B: Vliv MAG kyseliny kaprinové na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

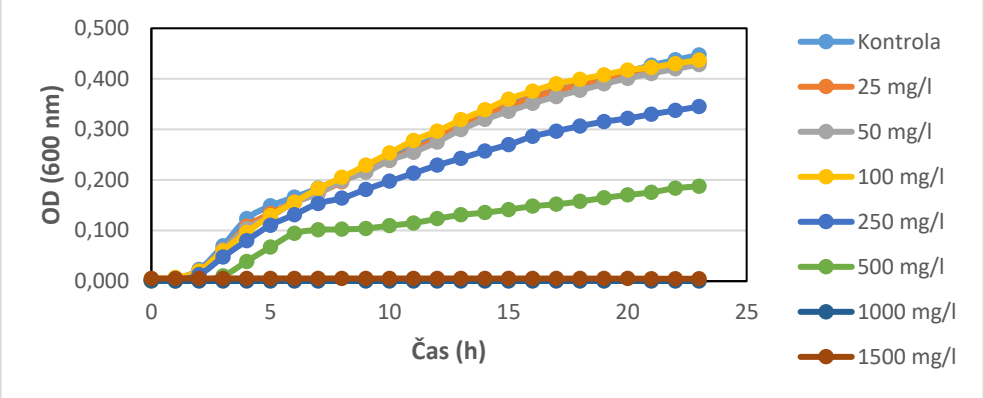


P IX C: Vliv MAG kyseliny laurové na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

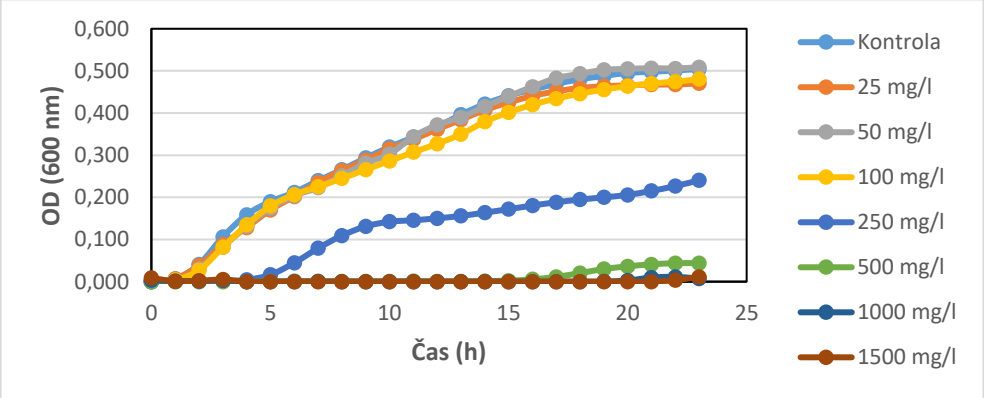


PŘÍLOHA P X: VLIV 1-MONOACYLGLYCEROLŮ NA RŮST *PROTEUS MIRABILIS* CCM 7188

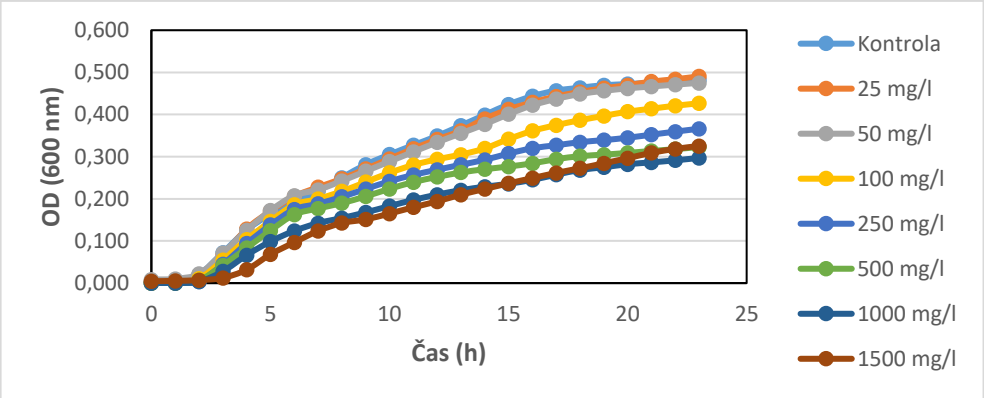
P X A: Vliv MAG kyseliny kaprylové na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188



P X B: Vliv MAG kyseliny kaprinové na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188

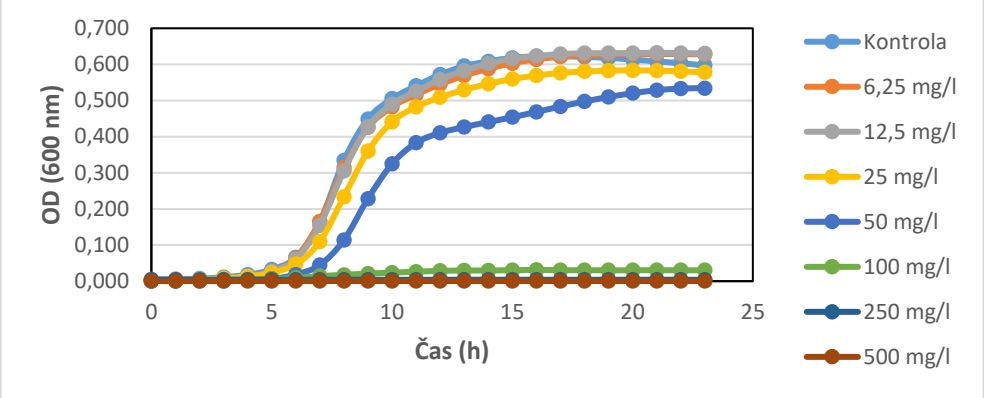


P X C: Vliv MAG kyseliny laurové na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188

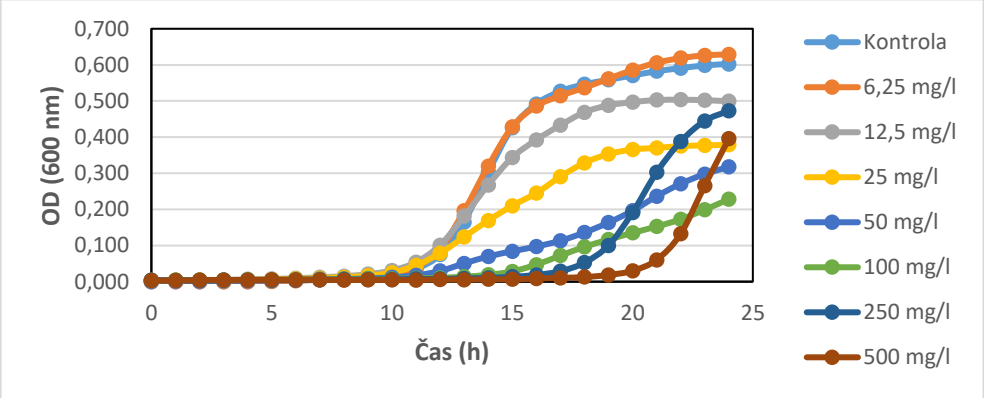


PŘÍLOHA P XI: VLIV ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA RŮST *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* CCDM 48

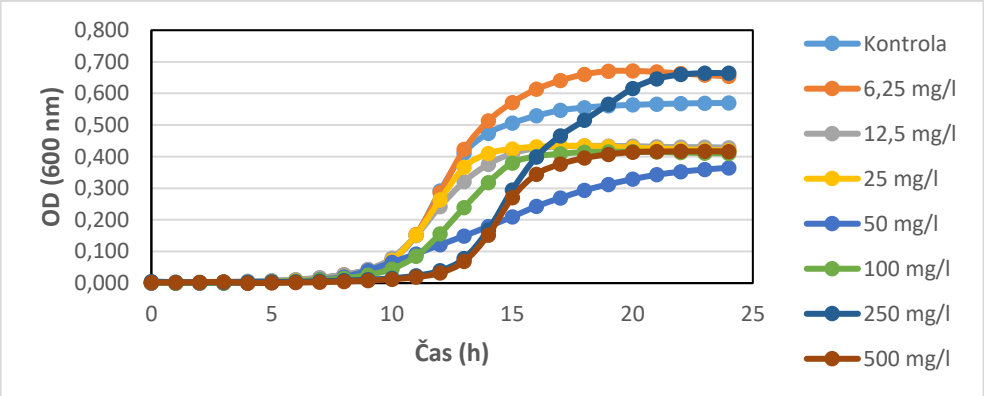
P XI A: Vliv karvakrolu na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48



P XI B: Vliv linaloolu na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

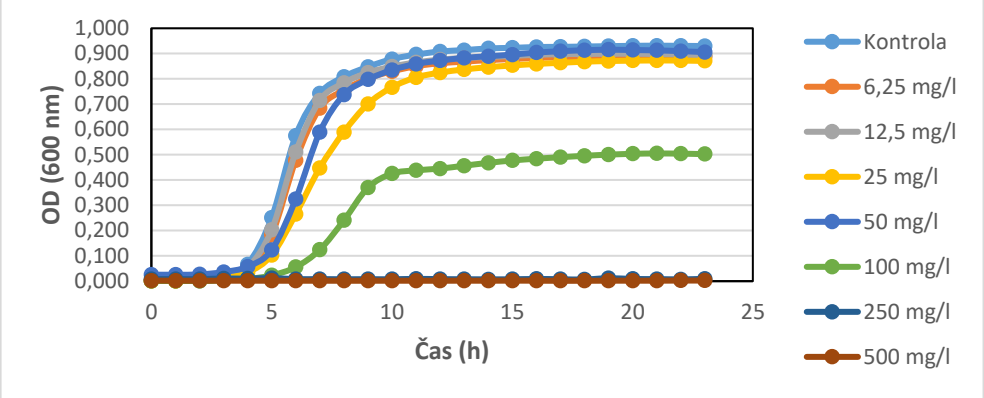


P XI C: Vliv limonenu na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 48

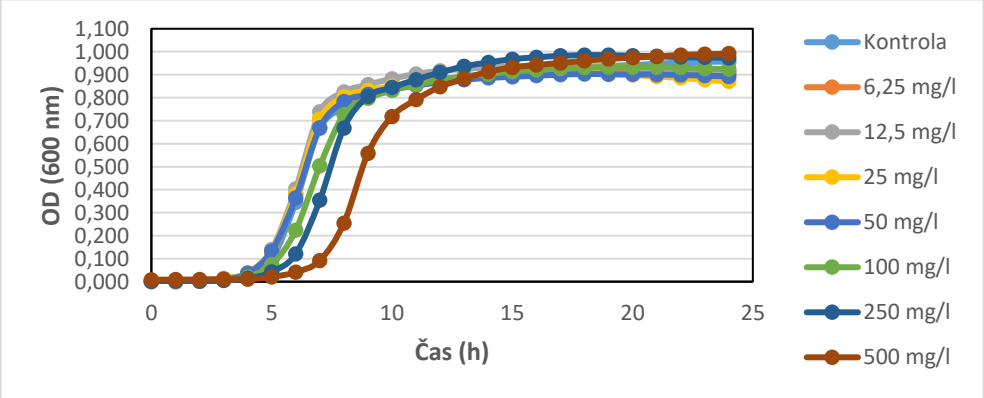


PŘÍLOHA P XII: VLIV ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA RŮST *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* CCDM 141

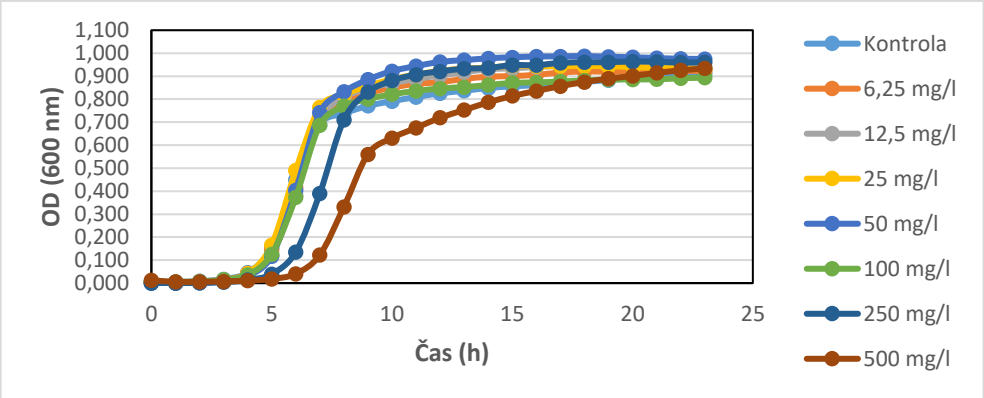
P XII A: Vliv karvakrolu na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141



P XII B: Vliv linaloolu na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

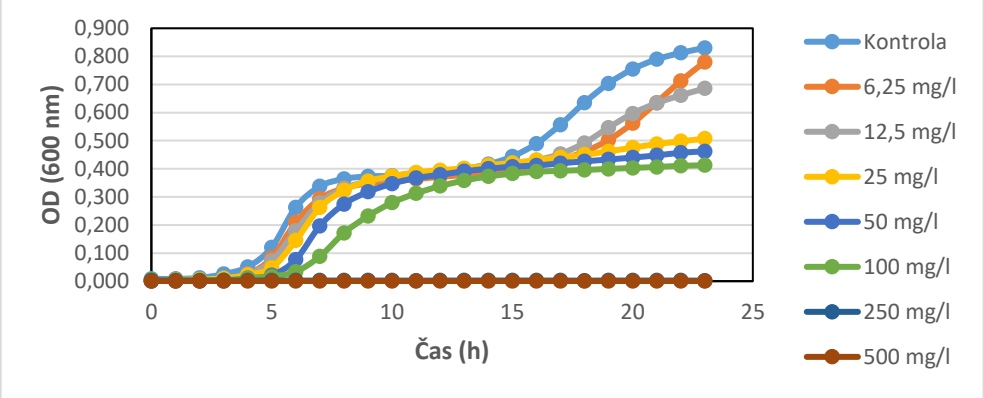


P XII C: Vliv limonenu na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

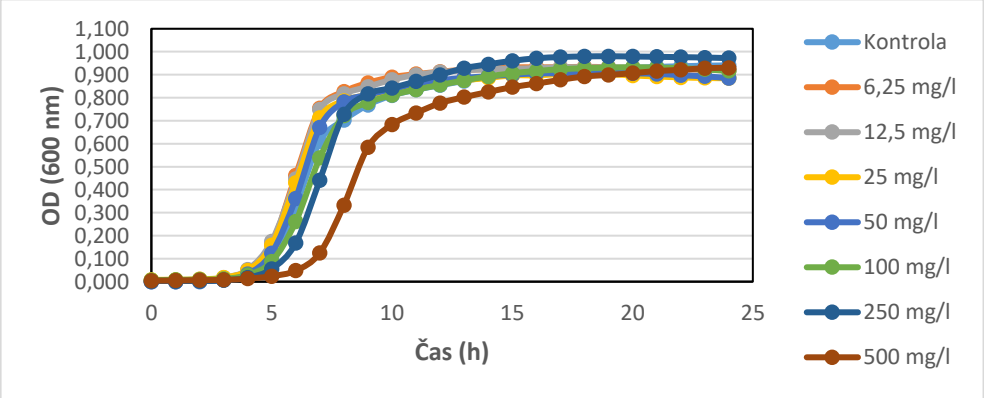


PŘÍLOHA P XIII: VLIV ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA RŮST *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* CCDM 1004

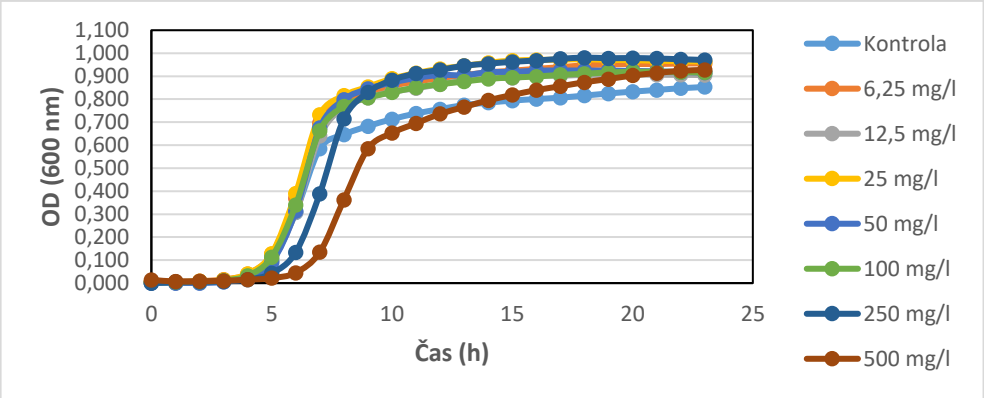
P XIII A: Vliv karvakrolu na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004



P XIII B: Vliv linaloolu na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

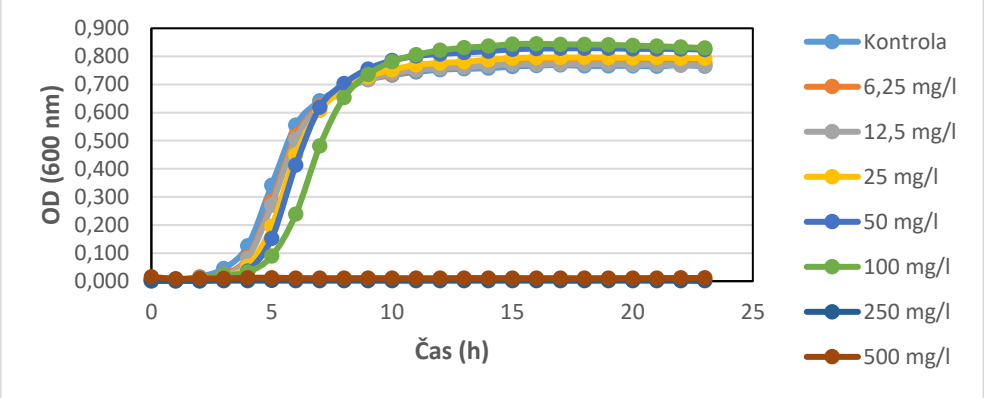


P XIII C: Vliv limonenu na růst *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

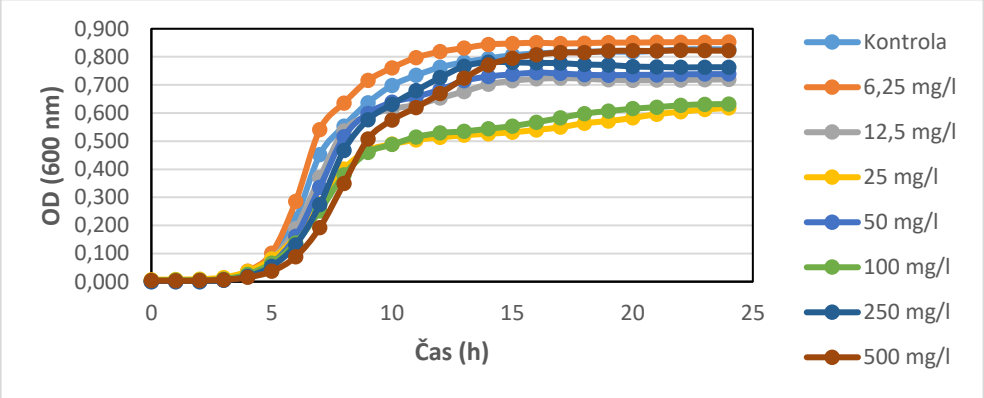


PŘÍLOHA P XIV: VLIV ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA RŮST *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *CREMORIS* CCDM 824

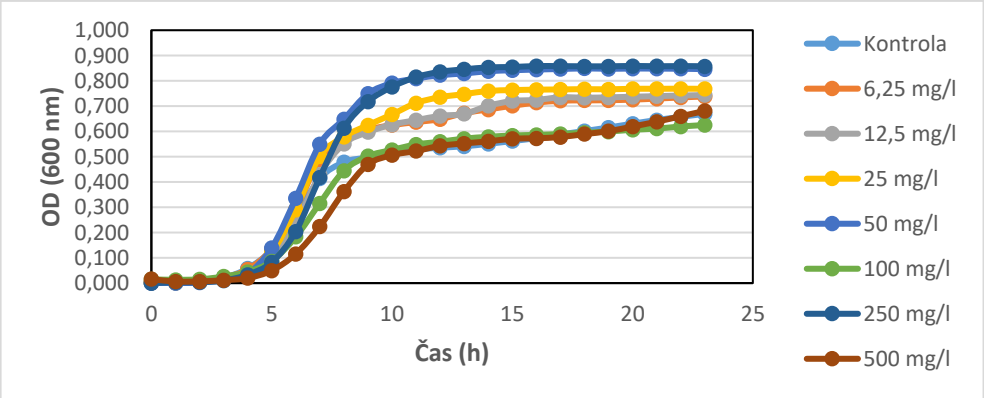
P XIV A: Vliv karvakrolu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824



P XIV B: Vliv linaloolu na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

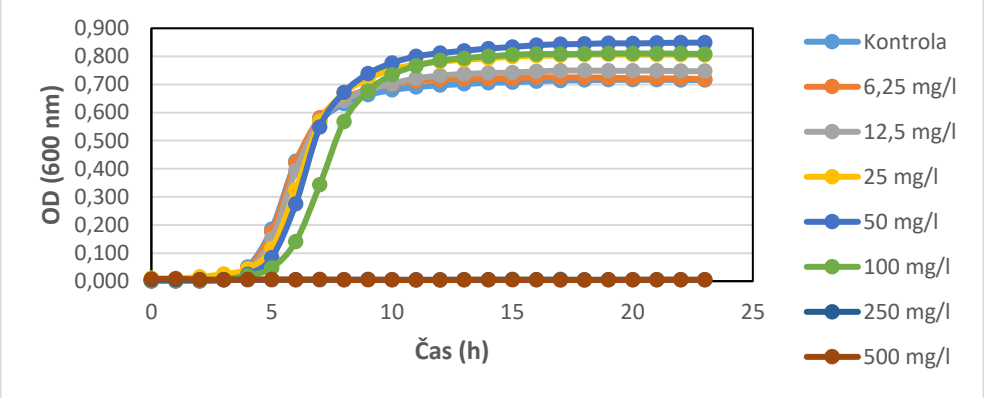


P XIV C: Vliv limonenu na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

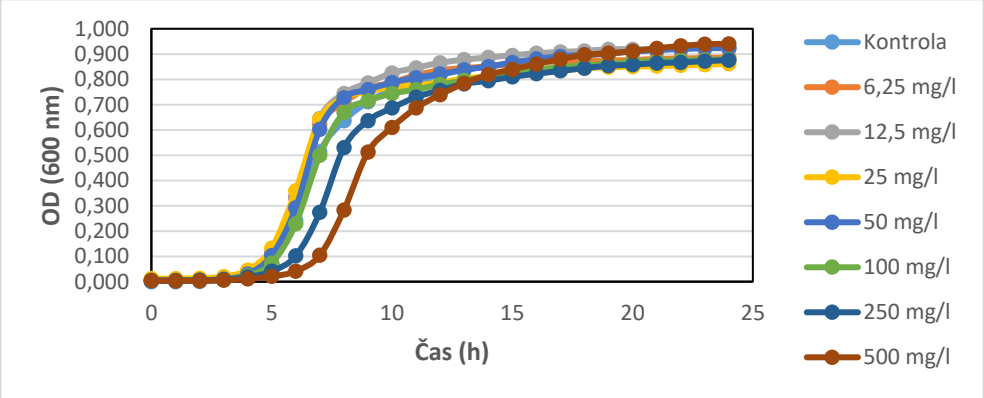


PŘÍLOHA P XV: VLIV ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA RŮST *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *CREMORIS* CCDM 946

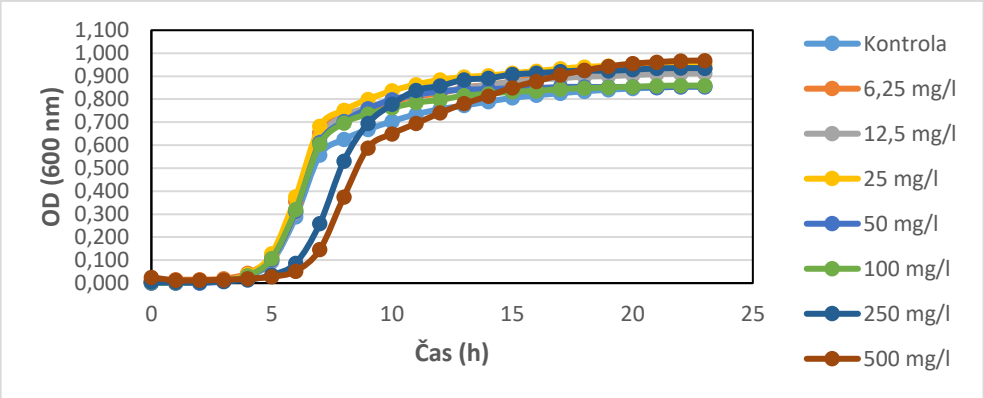
P XV A: Vliv karvakrolu na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946



P XV B: Vliv linaloolu na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

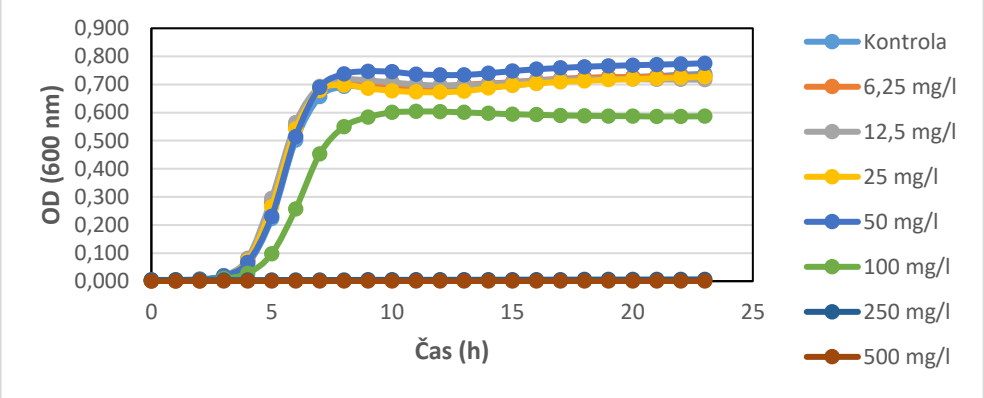


P XV C: Vliv limonenu na růst *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

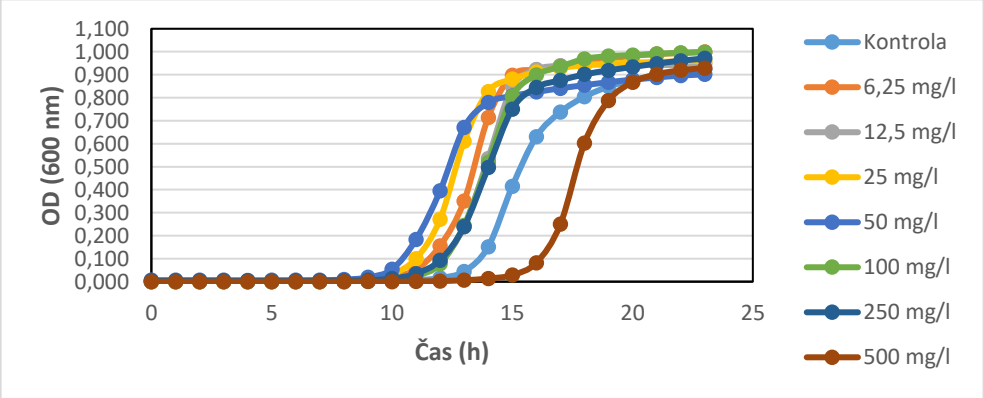


PŘÍLOHA P XVI: VLIV ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA RŮST *ENTEROCOCCUS DURANS* CCDM 53

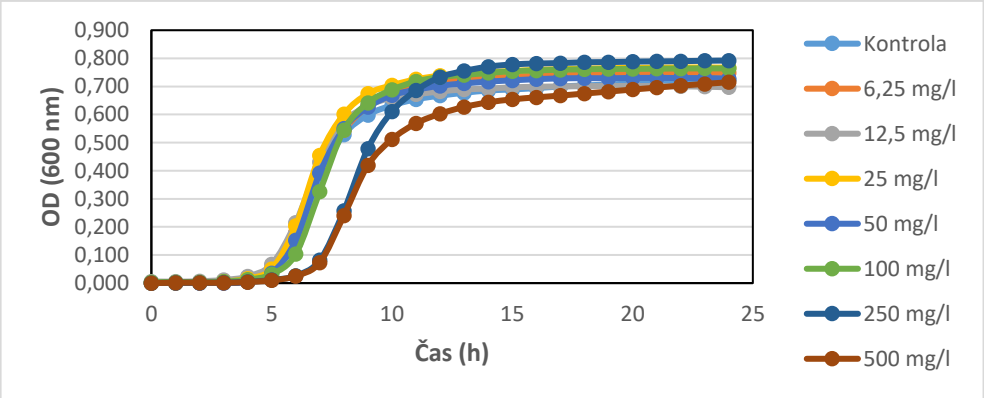
P XVI A: Vliv karvakrolu na růst *Enterococcus durans* CCDM 53



P XVI B: Vliv linaloolu na růst *Enterococcus durans* CCDM 53

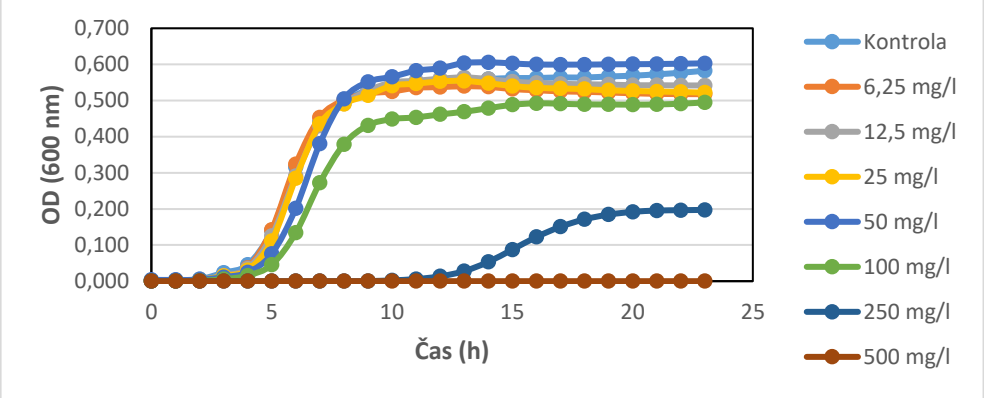


P XVI C: Vliv limonenu na růst *Enterococcus durans* CCDM 53

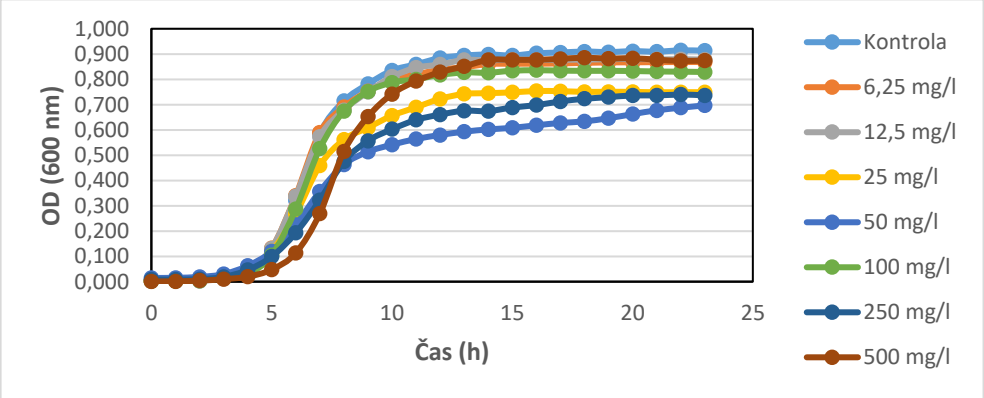


PŘÍLOHA P XVII: VLIV ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA RŮST *ENTEROCOCCUS FAECALIS* CCM 2665

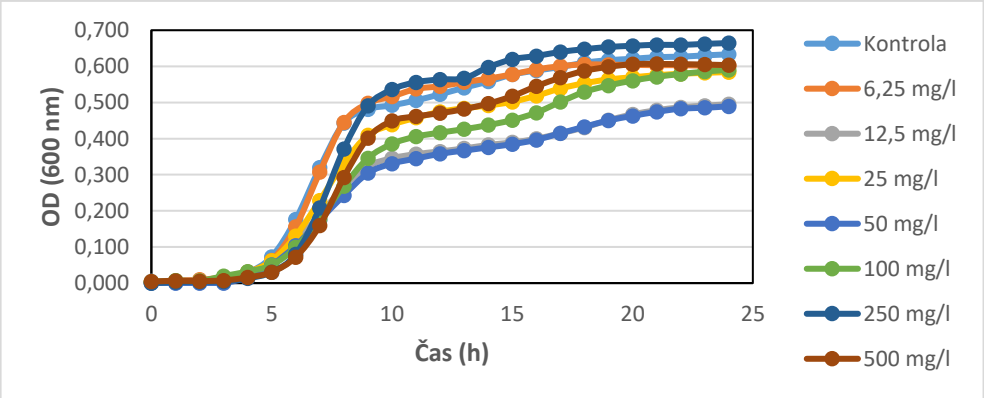
P XVII A: Vliv karvakrolu na růst *Enterococcus faeclis* CCM 2665



P XVII B: Vliv linaloolu na růst *Enterococcus faeclis* CCM 2665

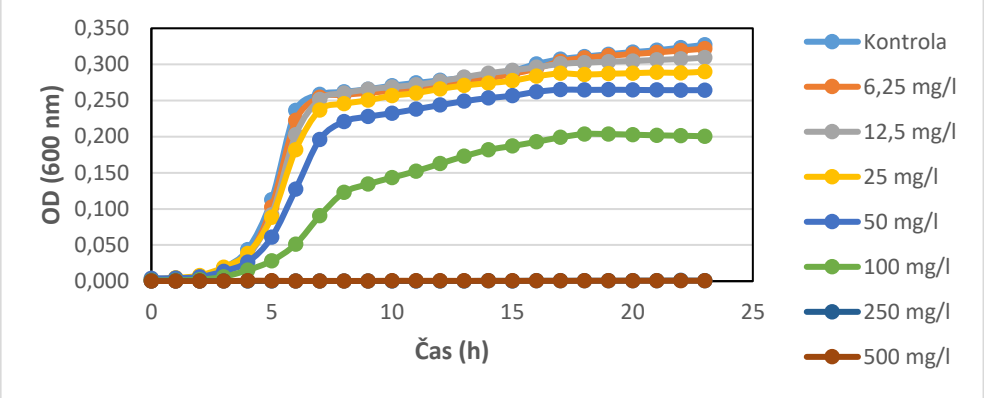


P XVII C: Vliv limonenu na růst *Enterococcus faeclis* CCM 2665

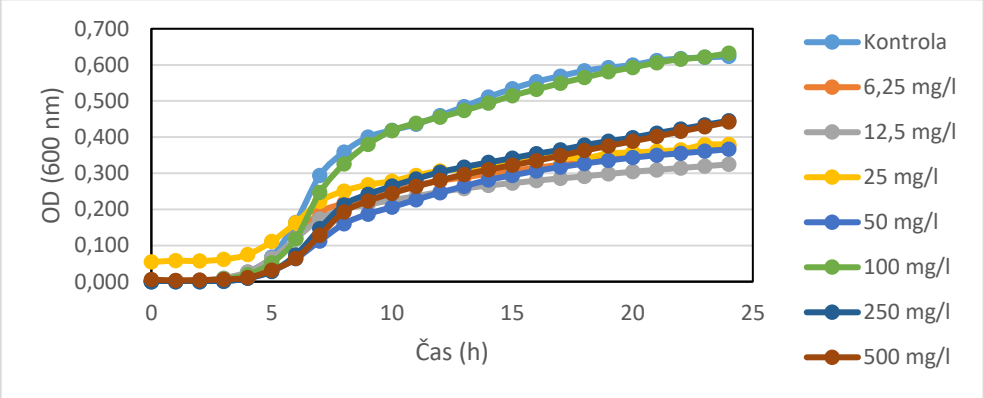


PŘÍLOHA P XVIII: VLIV ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA RŮST *ENTEROCOCCUS FAECALIS* CCM 4224

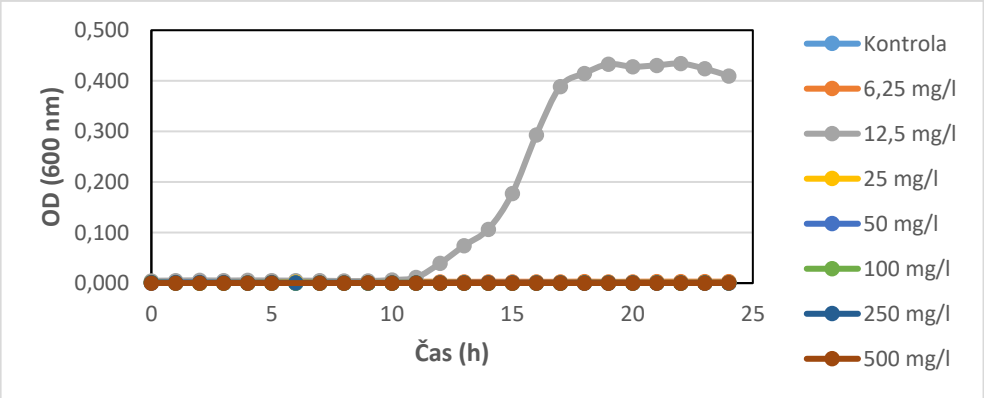
P XVIII A: Vliv karvakrolu na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224



P XVIII B: Vliv linaloolu na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224

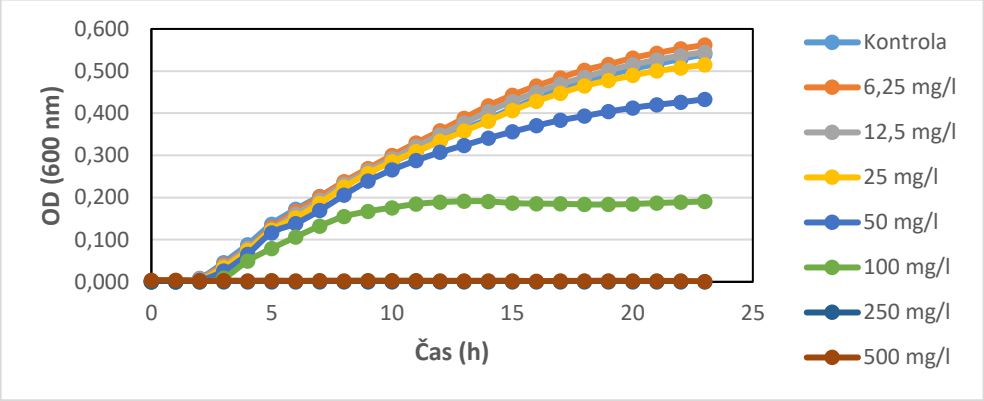


P XVIII C: Vliv limonenu na růst *Enterococcus faecalis* CCM 4224

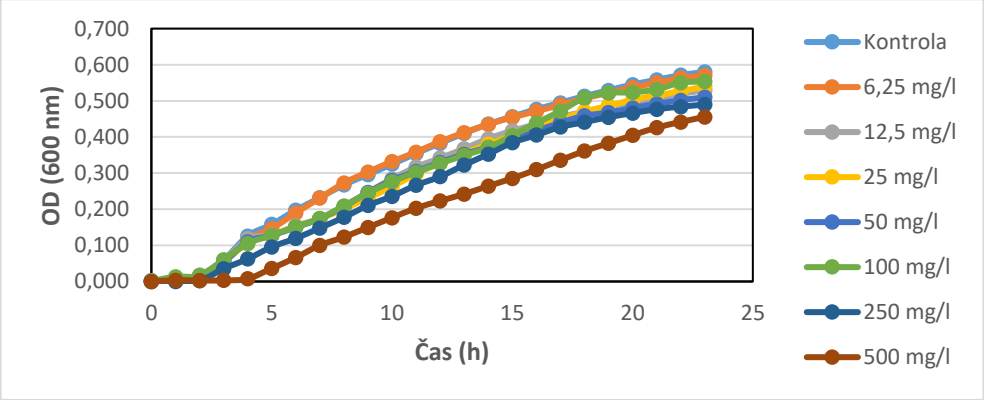


PŘÍLOHA P XIX: VLIV ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA RŮST *SALMONELLA ENTERICA* SUBSP. *ENTERICA* SER. ENTERITIDIS CCM 4420

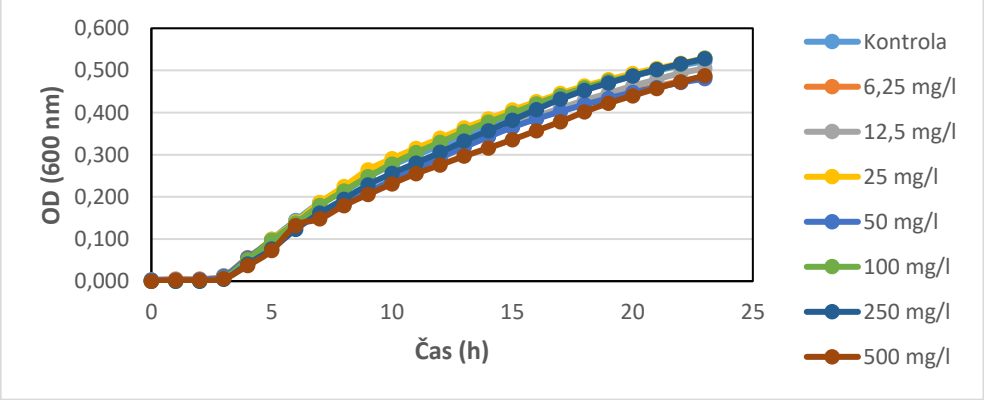
P XIX A: Vliv karvakrolu na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420



P XIX B: Vliv linaloolu na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

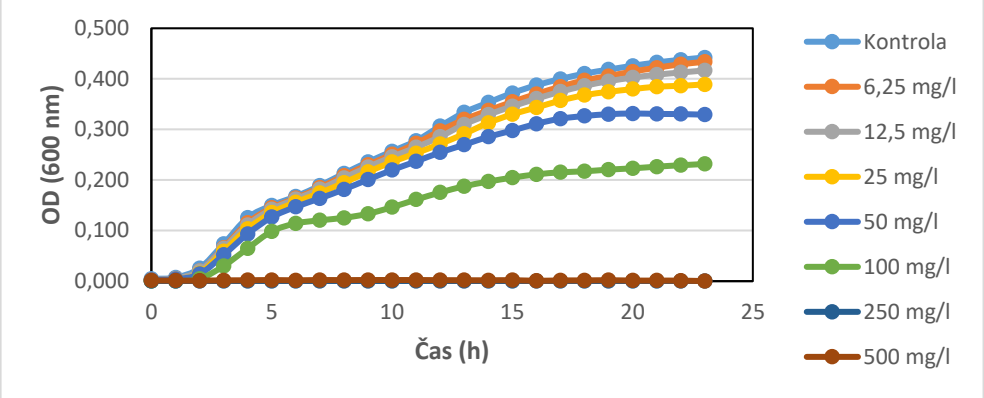


P XIX C: Vliv limonenu na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

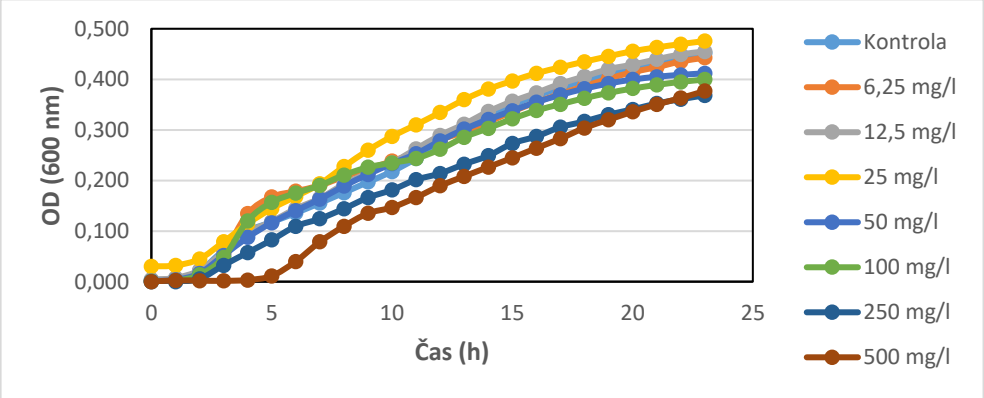
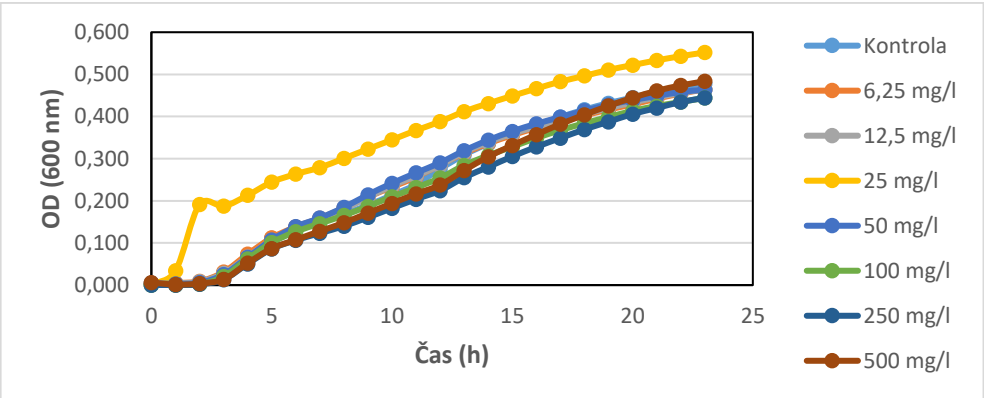


PŘÍLOHA P XX: VLIV ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ NA RŮST *PROTEUS MIRABILIS* CCM 7188

P XX A: Vliv karvakrolu na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188



P XX B: Vliv linaloolu na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188



P XX C: Vliv limonenu na růst *Proteus mirabilis* CCM 7188