


Vliv vybraných přírodních látek na bakterie produkující biogenní aminy

Ivana Huňová

Bakalářská práce
2020

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Ivana Huňová**
Osobní číslo: **T17118**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Vliv vybraných přírodních látek na bakterie produkující biogenní aminy**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Biogenní aminy – charakterizace, vlastnosti, výskyt v potravinách
2. Přírodní látky s antimikrobními účinky – charakterizace, vlastnosti, využití v potravinách
3. Antimikrobní účinky vybraných přírodních látek

II. Praktická část

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

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] DAVIDSON, P. M., SOFOS, J.N., BRANEN, A.L. Antimicrobials in food. 3rd ed. Boca Raton: Taylor Francis, 2005, 706 s. ISBN 0-8247-4037-8.
- [2] RAI, M., CHIKINDAS, M. Natural antimicrobials in food safety and quality. Wallingford: CABI, 2011, 368 s. ISBN 978-1-84593-769-0.
- [3] LORENZO, J.M., MUNEKATA, P.E.S., GOMEZ, B. ET AL. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. Trends in Food Science and Technology, 79: 136-147. 2018.
- [4] BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253. 2004.
- [5] Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně.

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

Datum zadání bakalářské práce: **17. února 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

Ve Zlíně dne 17. února 2020

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

V této bakalářské práci byl sledován inhibiční účinek dvou vybraných přírodních látek, a to thymolu a eugenolu. Obě tyto látky patří mezi esenciální oleje. Působení těchto látek bylo testováno na vybraných bakteriích, které tvoří toxické biogenní aminy. Z výsledků vyplývá, že větší inhibiční efekt byl pozorován u thymolu. Thymol vykazoval nejlepší inhibiční účinek u bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, kde byla zjištěna minimální inhibiční koncentrace 30 µg/ml. Pro inhibici testovaných bakterií eugenolem bylo zapotřebí použít vyšší koncentraci, nejlépe působil na *Enterococcus durans* CCDM 2665 s minimální inhibiční koncentrací 150 µg/ml.

Klíčová slova: Bakterie, biogenní aminy, inhibiční efekt, esenciální olej, thymol, eugenol

ABSTRACT

In this bachelor thesis, the inhibitory effect of two selected natural substances, thymol and eugenol, was studied. Both of these substances are essential oils. The action of these substances was tested on selected bacteria that form toxic biogenic amines. From the results, it can be seen that a greater inhibitory effect was observed with thymol. Thymol reported the best inhibitory effect on *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, where minimum inhibitory concentration of 30 µg/ml was found. A higher concentration can be used to inhibit the tested bacteria of eugenol, preferably with *Enterococcus durans* CCDM 2665 with a minimum inhibitory concentration of 150 µg/ml.

Key words: Bacteria, biogenic amines, inhibitory effect, essential oil, thymol, eugenol

Chtěla bych poděkovat paní doc. RNDr. Leoně Buňkové Ph.D. za pomoc při realizaci této práce. Za její odborné vedení, cenné rady a za možnost pracovat v mikrobiologické laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat laborantkám v mikrobiologické laboratoři Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí a všem dalším, kteří mi umožnili a pomohli zrealizovat tuto bakalářskou práci. A nakonec bych chtěla poděkovat svému tatínkovi za morální a finanční podporu při studiu.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/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 VLASTNOSTI	11
1.2 TVORBA BIOGENNÍCH AMINŮ	11
1.3 VÝSKYT V POTRAVINÁCH	11
1.3.1 Voda.....	12
1.3.2 Sýry.....	12
1.3.3 Ryby.....	12
1.3.4 Maso	12
2 ESENCIÁLNÍ OLEJE (SILICE)	13
2.1 CHARAKTERISTIKA A VLASTNOSTI ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	13
2.2 VÝROBA ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	13
2.2.1 Destilace vodní parou	13
2.2.2 Lisování.....	14
2.3 VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSTVÍ.....	14
3 ANTIMIKROBNÍ ÚČINKY ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	15
3.1 INHIBICE RŮSTU BAKTERIÍ	15
3.2 VYBRANÉ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ANTIMIKROBNÍ ÚČINKY ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ	15
3.2.1 Lipidy.....	15
3.2.2 Způsob balení a dostupnost kyslíku.....	16
3.3 THYMOL	16
3.4 EUGENOL.....	16
II PRAKTICKÁ ČÁST	18
4 CÍLE PRÁCE	19
5 MATERIÁL	20
5.1 MIKROORGANISMY:	20
5.2 CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A KULTIVAČNÍ MÉDIA:.....	20
5.2.1 Fyziologický roztok.....	20
5.2.2 Kultivační média	21
5.2.3 Inhibiční látky	21
5.2.4 Sterilizace materiálu	21
5.3 POMŮCKY A VYBAVENÍ	22
6 METODIKA	23
7 VÝSLEDKY	24

7.1	VLIV THYMOLOU NA TESTOVANÉ BAKTERIE	24
7.1.1	Vliv thymolu na bakterii <i>Enterococcus durans</i> CCDM 2665.....	24
7.1.2	Vliv thymolu na bakterii <i>Enterococcus faecalis</i> CCDM 53	24
7.1.3	Vliv thymolu na bakterii <i>Enterococcus faecalis</i> CCDM 4224	25
7.1.4	Vliv thymolu na bakterii <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141.....	26
7.1.5	Vliv thymolu na bakterii <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004.....	26
7.1.6	Vliv thymolu na bakterii <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824	27
7.1.7	Vliv thymolu na bakterii <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946	28
7.1.8	Vliv thymolu na bakterii <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188	28
7.1.9	Vliv thymolu na bakterii <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis CCM 4420.....	29
7.2	VLIV EUGENOLU NA TESTOVANÉ BAKTERIE	30
7.2.1	Vliv eugenolu na bakterii <i>Enterococcus durans</i> CCDM 2665	30
7.2.2	Vliv eugenolu na bakterii <i>Enterococcus faecalis</i> CCDM 53	30
7.2.3	Vliv eugenolu na bakterii <i>Enterococcus faecalis</i> CCDM 4224	31
7.2.4	Vliv eugenolu na bakterii <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141	32
7.2.5	Vliv eugenolu na bakterii <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004	32
7.2.6	Vliv eugenolu na bakterii <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824	33
7.2.7	Vliv eugenolu na bakterii <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946	34
7.2.8	Vliv eugenolu na bakterii <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188.....	34
7.2.9	Vliv eugenolu na bakterii <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis CCM 4420.....	35
8	DISKUZE	36
	ZÁVĚR	39
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	40
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	44
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	45

ÚVOD

Biogenní aminy (BA) jsou látky, které se vyskytují jako metabolické produkty v buňkách mikroorganismů, živočichů a rostlin. [1] BA se mohou tvořit v potravinách za určitých předpokladů, zejména v mase, rybách, sýrech, ve víně, pivě nebo ve fermentovaných rostlinných potravinách, jako je zelí. Tvoří se v potravinách především díky činnosti mikroorganismů. [2]

Esenciální oleje neboli éterické oleje jsou sloučeniny, které jsou produkovány rostlinami. [3] Využití EO se objevuje ve farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu. [4] Některé EO se používají také v medicíně. [3] Byla popsána změna v buněčné stěně některých grampozitivních a gramnegativních mikroorganismů po použití hlavních složek esenciálních olejů. [5] Esenciální oleje se mohou používat za účelem zpomalení růstu patogenních a ostatních mikroorganismů, které mají za důsledek kažení potravin. [4]

Eugenol a thymol, patří mezi esenciální oleje a jsou jedny z nejúčinnějších inhibičních látek. [6] Tato práce se zaměřuje na vliv dvou esenciálních olejů, thymolu a eugenolu, na bakterie produkující biogenní aminy.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

1.1 Charakteristika a vlastnosti

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární biologicky aktivní alkalické látky, které se vyskytují jako metabolické produkty v buňkách živočichů, rostlin i mikroorganismů. [1]

Buněčný i extracelulární organický materiál ze živých organismů obsahuje komplex směsi proteinů, peptidů, aminokyselin a aminů. Mezi nimi i tzv. BA. Tyto sloučeniny mohou být tvořeny různými chemickými reakcemi, jako je například dekarboxylace. [2],[6] Některé BA, jako jsou histamin a tyramin, jsou mírně toxické, a tudíž mohou vyvolat alergickou reakci nebo jiné nežádoucí účinky. [2] Tyto BA působí primárně na cévní systém, protože zvyšují nebo snižují krevní tlak. Taktéž působí na nervový systém jako psychoaktivní látky. BA, zejména diaminy a polyaminy, jsou považovány za indikátory kazivosti potravin.[7] Některé BA jsou rezistentní vůči fyzickým a chemickým procesům, což tvoří velkou výhoda ve srovnání s jinými ukazateli hygienické kvality. [6]

1.2 Tvorba biogenních aminů

Biogenní aminy, např. histamin, tyramin, tryptamin, putrescin, jsou syntetizovány dekarboxylací a hydroxylací aminokyselin za pomoci mikrobiálních enzymů. Výslednou strukturu BA udává struktura, ze které je BA vytvořen. BA mohou mít alifatickou, aromatickou nebo heterocyklickou strukturu. [2]

1.3 Výskyt v potravinách

Pro tvorbu BA v potravinách jsou potřebné určité předpoklady, jako je přítomnost volných aminokyselin (prekurzorů BA), které se vyskytují např. v mase, rybách, sýrech, ve víně, pive nebo ve fermentovaných rostlinných potravinách, jako je zelí. Ve fermentovaných potravinách se BA tvoří během kvašení. [2] Důležitým předpokladem pro tvorbu BA jsou vhodné podmínky pro růst a metabolickou aktivitu bakterií, které disponují dekarboxylázovou aktivitou. Nižší pH je spojeno s tvorbou vyšší hladiny BA. Aby se předešlo tvorbě BA, je potřeba dodržovat některé preventivní opatření, jako je pasteurace syrového mléka a dodržování hygieny práce. [6]

Díky mikrobiologickému původu jsou BA použity jako kritéria pro posouzení hygienické kvality čerstvých potravin. K velké akumulaci BA dochází ještě před výskytem organoleptických změn doprovázejících kažení potravin. [7]

1.3.1 Voda

Vzhledem ke svým organoleptickým vlastnostem (chuť, zápach) mohou být biogenní aminy relevantními ukazateli pro hygienickou kvalitu vod. Aminokyseliny nemohou být účinně odstraněny během úpravy vod, proto v některých vodách mohou být stopy BA detekovány, zejména pokud se pitná voda získává z upravené povrchové vody, které obsahuje vysoké množství sinic a dalšího biologického materiálu. [2]

1.3.2 Sýry

Dlouho zrající sýry vyrobené ze syrového (nepasterovaného) mléka mohou obsahovat vysoké koncentrace biogenních aminů, zejména tyraminu a histaminu. Producenty BA mohou být mikroorganismy, které jsou přítomny již v mléce nebo případně i startovací kultury, které se přidávají při výrobě. [2]

1.3.3 Ryby

Kadaverin, putrescin a histamin jsou aminy, které se tvoří *post mortem* v rybích nebo měkkýšových tkáních. Tvorba těchto BA může probíhat dvěma biochemickými cestami. Za pomoci endogenních enzymů dekarboxyláz, které se přirozeně vyskytují v tkáních ryb nebo měkkýšů. Součástí druhé biochemické cesty jsou exogenní enzymy. Ty jsou uvolňovány různými mikroorganismy, jež jsou součástí mořských produktů. Rybí sval je přirozeně bohatý na volné aminokyseliny, především histidin, které tak mohou být dekarboxylovány za tvorby biogenních aminů. [9]

1.3.4 Maso

Putrescin a kadaverin mají za následek kažení masa, které doprovází hnilobný zápach. Tyto BA jsou zpravidla toxické pouze ve vysokých dávkách. Jejich tvorba během skladování závisí na podmínkách skladování, zejména na složení atmosféry, která je použita při balení. [10]

2 ESENCIÁLNÍ OLEJE (SILICE)

2.1 Charakteristika a vlastnosti esenciálních olejů

Esenciální oleje neboli éterické oleje (EO) jsou aromatické chemické sloučeniny, které jsou produkovány rostlinami. Vzhledem k jejich těkavosti, chuti a toxicitě slouží jako ochranná bariéra rostliny. Také jsou využívány k přilákání opylovačů. Průmyslově vyráběné esenciální oleje se využívají nejvíce díky jejich prospěšnému účinku na lidský organismus. [11]

EO jsou většinou nerozpustné ve vodě, ale rozpouští se v alkoholech, éterech a tucích. Jsou zpravidla složeny ze směsi aldehydů, ketonů, alkoholů a fenolických látek. [3] Kromě uvedených sloučenin jsou EO tvořeny i dalšími látkami, mezi které patří především monoterpeny. Monoterpeny jsou hlavní a nejdůležitější složkou EO v přírodě. Podle konzistence jsou EO klasifikovány jako esence, balzámy nebo pryskyřice. [4]

2.2 Výroba esenciálních olejů

Na výtěžnost EO má dopad i část rostliny, kterou byla použita, její stáří a klimatické podmínky. Největší množství EO je lokalizováno v buňkách okvětních lístků nebo akumulováno v různých anatomických částech rostlin, např. v listech. [4] Nejčastěji se EO získávají pomocí destilace vodní parou. Po kondenzaci páry se oddělí olej a vodní fáze, která se následně odstraní. [12]

2.2.1 Destilace vodní parou

Hydrodestilace je nejběžnější metodou používanou pro extrakci EO. Princip této metody spočívá v tom, že se ponoří rostlinný materiál do vody, ta se následně i s rostlinným materiálem zahřeje při atmosférickém tlaku na bod varu. Molekuly rostlinného materiálu se rozpadnou, čímž se jejich obsah dostane do vody a vznikne azeotropická směs. Díky následnému chlazení tato směs kondenzuje. Směs se rozdělí díky různé hustotě na dvě fáze, přičemž se vodní fáze odstraní. [4] Destilování suché rostliny je levnější, jelikož u sušené rostliny jsou buňky, které obsahují olej, slabší a tím usnadňují vstup páry. Největší výtěžnost mají listy a květenství, asi 2%. [13]

2.2.2 Lisování

Při lisování je část rostliny vystavena extrémnímu teplu a tlaku, čímž se buněčná stěna naruší a obsah vyteče do roztoku. [12] Citrusové EO jsou speciálním typem, protože se izolují lisováním kůry. Tyto EO se skládají především z vysoce těkavých terpenových uhlovodíků a dále z netěkavých, jako jsou např. barviva a vosky. [14]

2.3 Využití v potravinářství

Využití EO si našlo místo ve farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu, a to i díky jednoduchému vstřebávání EO do kůže. [4] Některé EO se používají v medicíně pro kontrolu patogenů ve spojitosti s gastrointestinálním traktem. [3] EO vyšších rostlin a jejich složky získávají využití jako potravinářské přídatné látky. V posledních letech jsou EO a jejich složky využívány zejména díky jejich účinkům na mikrobiální buňky. Vědci popsali změny v buněčné stěně některých grampozitivních a gramnegativních bakterií po aplikaci hlavních složek EO. [5] Obecně jsou na složky EO citlivější grampozitivní bakterie. Možné vysvětlení větší inhibice u grampozitivních bakterií spočívá v tom, že u gramnegativních bakterií nedochází k difúzi těchto látek přes vnější membránu. Nicméně při použití EO z máty byl zjištěn baktericidní účinek u bakterií *Salmonella enterica* ser. Enteritidis a *Listeria monocytogenes*, což je v rozporu s tímto názorem. [12] U EO získaných z koření byly prokázány baktericidní účinky na grampozitivní bakterie. U gramnegativních bakterií byl prokázán pouze bakteriostatický účinek. [4]

3 ANTIMIKROBNÍ ÚČINKY ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ

Už ve středověku byly koření a byliny vědomě přidávány do potravin jako konzervační látky, ale zejména koření přísady vzhledem k jejich organoleptickým vlastnostem. EO jsou v potravinách považovány za bezpečné, avšak pro udržení antimikrobních účinků je potřeba zvýšit jejich koncentraci, což může vést ke změnám organoleptických vlastností, zejména chuti. [15] EO ve společném působení s dalšími látkami antimikrobiálními může vést ke snížení množství použitých EO potřebných k zachování antimikrobních vlastností a tudíž k zachování chuti. EO se mohou používat spolu s dalšími metodami konzervování potravin, jako je chlazení, úprava atmosféry v balení, použití vysokého tlaku, použití pulzního elektrického pole apod., aby se zpomalil růst patogenních a ostatních mikroorganismů, které mají za důsledek kažení potravin. [4]

3.1 Inhibice růstu bakterií

U bakterií *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus* byla zjištěna inhibice EO vyrobeným z oregána. [15] U bakterií druhu *Listeria monocytogenes* a *Salmonella enterica* byl zjištěn baktericidní účinek po použití EO z máty. Tymiánový esenciální olej snižuje životaschopnost *Listeria monocytogenes* v mletém vepřovém mase. [14]

3.2 Vybrané faktory ovlivňující antimikrobní účinky esenciálních olejů

3.2.1 Lipidy

Typ lipidu přítomného v potravine může mít nepříznivý vliv na antimikrobní působení EO. Při použití čtyř EO (bobkového, hřebíčkového, skořicového a EO získaného z tymiánu), které byly použity v nízkotučném a plnotučném měkkém sýru na inhibici proti bakteriím *Listeria monocytogenes* a *Salmonella enterica* bylo zjištěno, že v sýru s nízkým obsahem tuku bylo při použití všech čtyř olejů sníženo množství *Listeria monocytogenes*. Naproti tomu u plnotučného sýra bylo srovnatelného účinku dosaženo pouze u jediného esenciálního oleje, a to EO z hřebíčku. Olej z tymiánu byl neúčinný proti bakterii *Salmonella enterica* v plnotučném sýru. Tymiánový olej byl stejně účinný jako zbývající tři oleje v sýru s nízkým obsahem tuku, kde byl zjištěn snížený počet *Salmonella Enteritidis*. [15]

3.2.2 Způsob balení a dostupnost kyslíku

Dostupnost kyslíku může rovněž ovlivnit antimikrobní účinky EO. Oregánový EO byl použit na dva mikroorganismy (*Staphylococcus aureus* a *Salmonella enterica*) za aerobních a anaerobních podmínek. V podmínkách anaerobního prostředí docházelo v menší míře k oxidativním změnám. Oregánový EO byl nejúčinnější ve vakuu a v ochranné atmosféře, která byla složena z 40% CO₂, 30% O₂, 30% N₂. [16]

Pevné potraviny (ryby a maso), které jsou složeny z více látek a jsou za různých podmínek baleny, vykazují po použití EO rovněž rozdílnou inhibici přítomné mikroflóry. Například *L. monocytogenes* a *Salmonella Typhimurium* byly inhibovány u masa ošetřeného EO z hřebíčku a oregána. *Salmonella Typhimurium* přežila v neošetřeném masu. Po přidání oregánového EO v koncentraci 0,8% se snížila koncentrace o 1–2 log CFU/g. Stejná koncentrace oregánového EO snížila počet *L. monocytogenes* o 2–3 log CFU/g. Rovněž bylo zjištěno výrazné snížení počtu *Aeromonas hydrophila* ve vařeném vepřovém masu ošetřeném EO z hřebíčku nebo EO z koriandru a baleného ve vakuu nebo běžné atmosféře (vzduchu) a skladovaném při 2 °C a 10 °C. Antimikrobní účinek těchto dvou olejů byl více výrazný u potravin balených ve vakuu než v aerobních podmínkách. [15]

3.3 Thymol

Thymol je EO získaný z tymiánu. [6] Tymián obsahuje fenolické monoterpeny thymol a karvakrol. Tyto látky jsou primární sloučeniny, které přispívají k charakteristické vůni EO. [17] Thymol se používá jako aroma, avšak bylo u něj zjištěno, že inhibuje některé bakterie, a proto může být použit jako přírodní konzervační látka a antioxidant. EO z tymiánu má jednu z nejvyšších antimikrobních aktivit. Tyto sloučeniny jsou účinnější proti gram pozitivním bakteriím. Thymol a karvakrol prokázaly schopnost rozpustit lipopolysacharidovou vrstvu bakterií *Escherichia coli* a *Salmonella Typhimurium*. [6] Antimikrobní vlastnosti EO tymiánu mají vyšší účinnost při nízkých koncentracích kyslíku a v prostředí s nízkým pH. [18]

3.4 Eugenol

Eugenol je EO z hřebíčku. [19] Díky antioxidačním a antimikrobním vlastnostem, má eugenol široké spektrum inhibice proti mnoha rodům bakterií a hub. Hřebíčkový extrakt významně inhibuje růst *Aeromonas hydrophila* a *Listeria monocytogenes*. [1]

Eugenol může být potenciálním inhibitorem patogenních mikroorganismů a tak i jejich produktů v potravinách. [18]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍLE PRÁCE

Cíle této bakalářské práce byly stanoveny následovně:

- vypracovat rešerši týkající se biogenních aminů, esenciálních olejů a jejich možného využití k inhibici bakterií produkujících biogenní aminy,
- posoudit vliv dvou esenciálních olejů (thymolu a eugenolu) na vybrané bakterie produkující biogenní aminy,
 - pomocí růstových křivek stanovit minimální inhibiční koncentrace obou látek pro všechny testované bakterie,
- vyhodnotit výsledky a z výsledků formulovat závěry práce.

5 MATERIÁL

5.1 Mikroorganismy:

V této bakalářské práci byl testován vliv dvou esenciálních olejů na vybrané kmeny bakterií (grampozitivní a gramnegativní), u nichž byla zjištěna dekarboxylázová aktivita. Jednalo se o následující kmeny bakterií, se kterými probíhá na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí další výzkum. Bakterie byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM – Czech Collection of Microorganisms) a ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora[®] (CCDM – Czech Collection of Dairy Microorganisms).

- *Enterococcus durans* CCDM 2665
- *Enterococcus faecalis* CCDM 53, CCDM 4224
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, CCDM 1004
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, CCDM 946
- *Proteus mirabilis* CCM 7188
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

Kultivace a příprava suspenze bakterií

Suspenze bakterií byla připravena kultivací bakterií přes noc (20 hodin) za optimálních podmínek doporučených dodavatelem kultur. Bakterie *Enterococcus durans* CCDM 2665; *Enterococcus faecalis* CCDM 53, CCDM 4224; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, CCDM 1004 byly kultivovány v kultivačním médiu M17 při teplotě 37 °C. Bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, CCDM 946 byly kultivovány v kultivačním médiu M17 při teplotě 30 °C. Mikroorganismy *Proteus mirabilis* CCM 7188 a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 byly kultivovány v médiu Nutrient broth při teplotě 37 °C.

5.2 Chemikálie, roztoky a kultivační média:

5.2.1 Fyziologický roztok

Fyziologický roztok byl použit za účelem naředění bakteriální suspenze do nižší koncentrace.

Postup přípravy:

Fyziologický roztok byl připraven rozpuštěním navážky NaCl v destilované vodě tak, aby vznikl 0,9% roztok NaCl.

5.2.2 Kultivační média

5.2.2.1 M17 broth

Toto kultivační médium byla připravena podle pokynu výrobce (uveden na obalu). Tato půda byla použita pro kultivaci bakterií *Enterococcus durans* CCDM 2665; *Enterococcus faecalis* CCDM 53, CCDM 4224; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, CCDM 1004, CCDM 48; *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, CCDM 946.

5.2.2.2 Nutrient broth

Kultivační médium bylo připraveno podle pokynu výrobce, který je uvádí na obalu. Půda byla využita pro kultivaci gramnegativních bakterií *Proteus mirabilis* CCM 7188; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420.

5.2.3 Inhibiční látky

Jako inhibiční látky byly použity roztoky eugenolu a thymolu.

Postup přípravy:

Na analytických vahách bylo naváženo 0,5g inhibiční látky. Toto množství bylo rozpuštěno v 10ml etanolu, aby výsledná koncentrace roztoku byla 5%. Při testování byly u thymolu použity koncentrace 15, 30, 60, 150 a 300 µg/ml. U eugenolu byly testované koncentrace 60, 150, 300, 600 a 900 µg/ml. K ředění obou látek docházelo tak, že příslušné množství zásobního roztoku bylo pipetováno přímo k 30ml kultivačního média. V obou případech jako kontrolní vzorky sloužila média bez přídavku inhibičních látek (koncentrace 0 µg/ml).

5.2.4 Sterilizace materiálu

Fyziologický roztok a kultivační média (M17, Nutrient broth) byly sterilovány v autoklávu.

5.3 Pomůcky a vybavení

- Analytické váhy
- Autokláv
- Biohazard box
- Vortex
- Denzimetr
- Mikropipety
- Záznamník růstu buněk RTS – 1/RTS – 1C
- Sterilní kličky, sterilní zkumavky, sterilní špičky na mikropipety a další spotřební laboratorní materiál

6 METODIKA

Pro stanovení minimální koncentrace inhibiční látky, která by zpomalila nebo zastavila růst bakterií, které produkují biogenní aminy, byl použit záznamník růstu buněk (osobní bioreaktor) RTS-1/RTS-1C (Biosan). Záznamník růstu buněk byl použit jako inkubátor, který měřil optickou denzitu (OD) buněk v čase při vlnové délce 850 nm (OD_{850}). Pro stanovení bylo vždy využito paralelně šesti přístrojů RTS-1/RTS-1C.

Postup stanovení:

- Nejprve bylo připraveno 6x30ml sterilizovaného kultivačního média do zkumavky typu Falcon (zkumavky pro záznamník růstu buněk).
- Z přes noc narostené kultury mikroorganismů byla ve fyziologickém roztoku pomocí denzimetru připravena suspenze buněk o hustotě 0,5 (dle McFarlandovy stupnice).
- 30ml kultivačního média bylo zaočkováno 50 μ l přes noc narostené bakteriální suspenze naředěné na hustotu 0,5.
- Do zkumavky bylo dále pipetováno patřičné množství inhibiční látky, tak aby její výsledná koncentrace byla 0, 15, 30, 60, 150 a 300 μ g/ml pro thymol, respektive 0, 60, 150, 300, 600 a 900 μ g/ml pro eugenol.
- Byly zapnuty přístroje (záznamníky růstu buněk) spolu s příslušným software na počítači. Na přístrojích byly přes počítačový software nastaveny následující parametry:

Rychlost otáček	500 rpm
RSF (frekvence reverzních otáček)	1 s ⁻¹
Teplota	30/37 °C
Objem vzorku	30 ml
Frekvence měření (MF)	30 min

- Zaočkované zkumavky byly vloženy do záznamníku růstu a kultivovány po dobu 24-48 hodin. Po cca 120 – 150 minutách byl zkontrolován grafický průběh kultivace (OD) a rychlost růstu.
- Po uplynutí příslušné doby byly přístroje vypnuty, data uložena a pomocí programu MS Excel vyhodnocena.

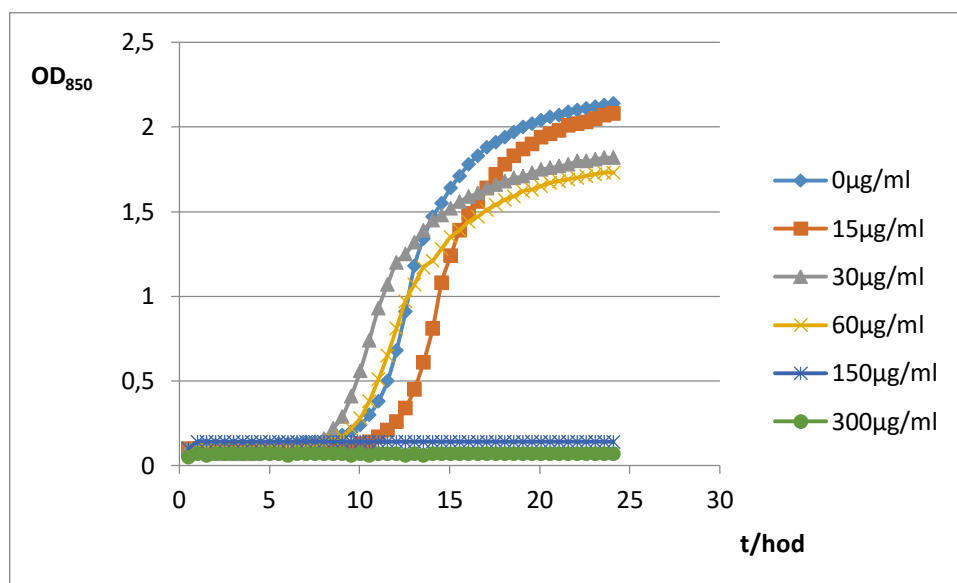
7 VÝSLEDKY

7.1 Vliv thymolu na testované bakterie

U inhibiční látky thymol byly použity koncentrace 0, 15, 30, 60, 150 a 300 $\mu\text{g/ml}$.

7.1.1 Vliv thymolu na bakterii *Enterococcus durans* CCDM 2665

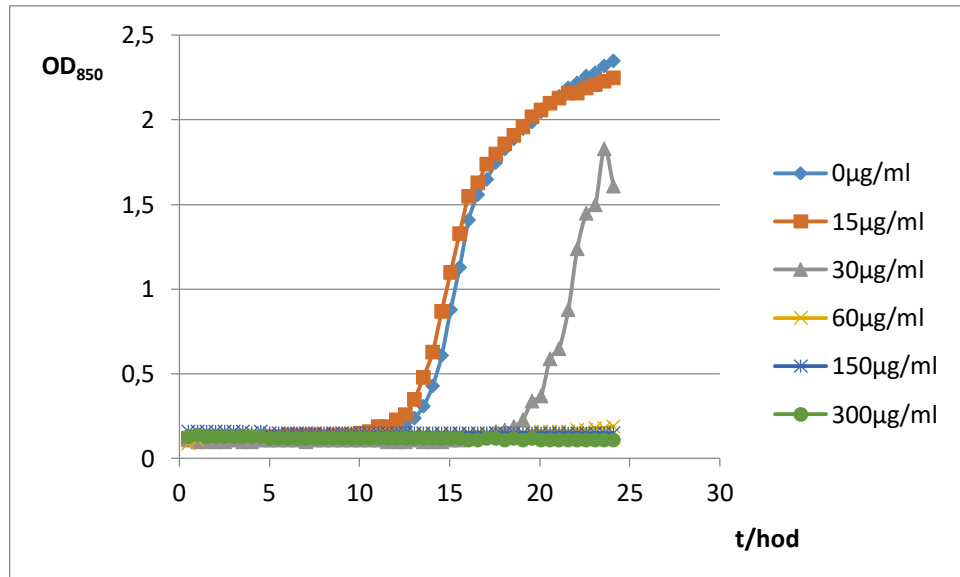
U bakterie *Enterococcus durans* CCDM 2665 byla zjištěna po použití inhibiční látky thymol minimální inhibiční koncentrace 150 $\mu\text{g/ml}$ (obr. 1). Při použití nižších koncentrací inhibiční látky bakterie rostla podobně, jako bez inhibiční látky. Po přidání vyššího množství inhibiční látky bakterie zastavila svůj růst. Měření probíhalo za teploty 37 °C po dobu 24 hodin.



Obrázek 1: Vliv thymolu na bakterii *Enterococcus durans* CCDM 2665

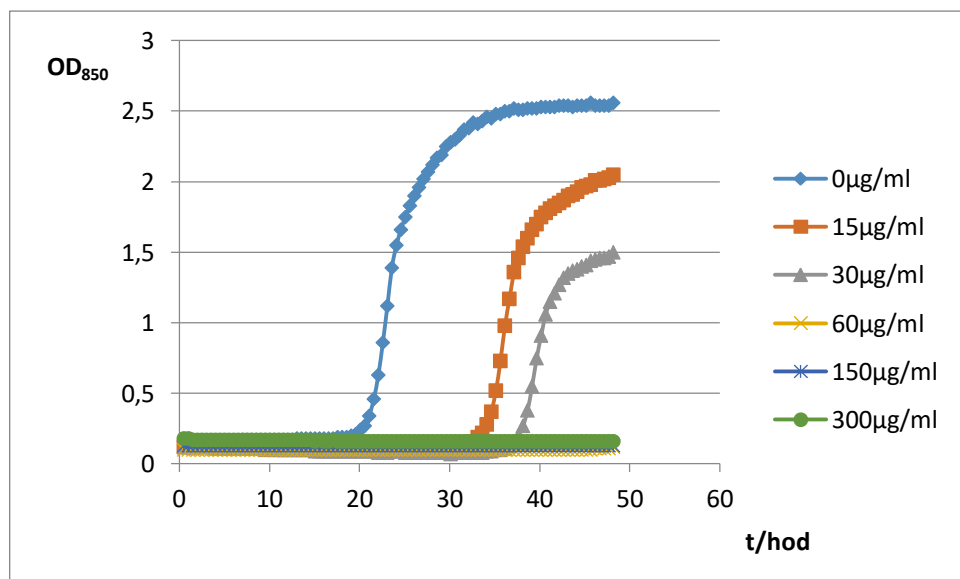
7.1.2 Vliv thymolu na bakterii *Enterococcus faecalis* CCDM 53

U bakterie *Enterococcus faecalis* CCDM 53 byla pro thymol zjištěna minimální inhibiční koncentrace 60 $\mu\text{g/ml}$ (obr. 2). Při nižší koncentraci (15 $\mu\text{g/ml}$) bakterie rostla podobně, jako bez inhibiční látky, v případě koncentrace 30 $\mu\text{g/ml}$ došlo k prodloužení lag fáze o cca 7 hodin. Po přidání vyššího množství inhibiční látky bakterie zastavila svůj růst. Měření probíhalo za teploty 37 °C po dobu 24 hodin.

Obrázek 2: Vliv thymolu na bakterii *Enterococcus faecalis* CCDM 53

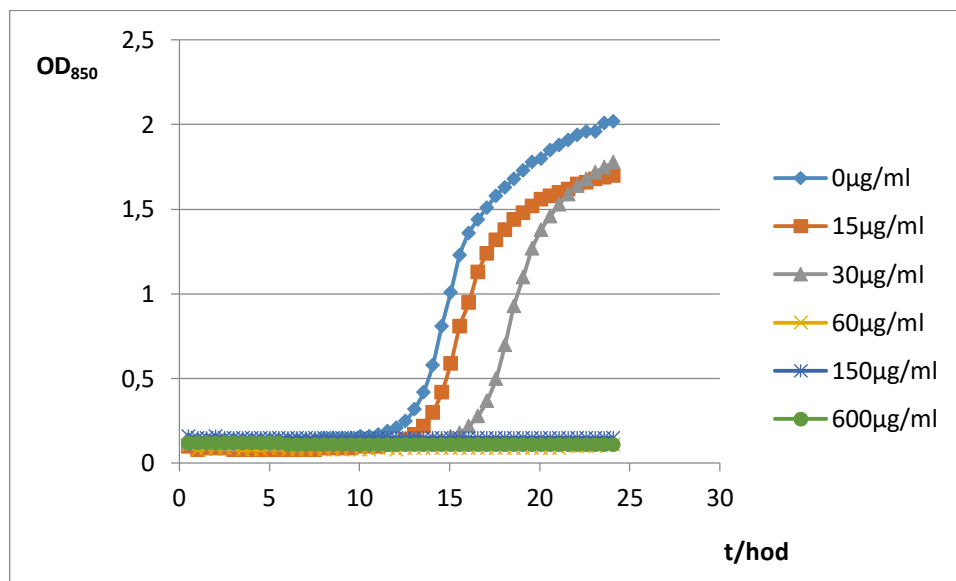
7.1.3 Vliv thymolu na bakterii *Enterococcus faecalis* CCDM 4224

U bakterie *Enterococcus faecalis* CCDM 4224 byla po použití thymolu zjištěna minimální inhibiční koncentrace 60 µg/ml (obr. 3). Při použití nižší koncentrace inhibiční látky došlo k prodloužení lag fáze a zpomalení růstu. Měření probíhalo za teploty 37 °C po dobu 48 hodin (testovaný kmen vykazoval v kontrolním médiu bez inhibiční látky delší generační dobu).

Obrázek 3: Vliv thymolu na bakterii *Enterococcus faecalis* CCDM 4224

7.1.4 Vliv thymolu na bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

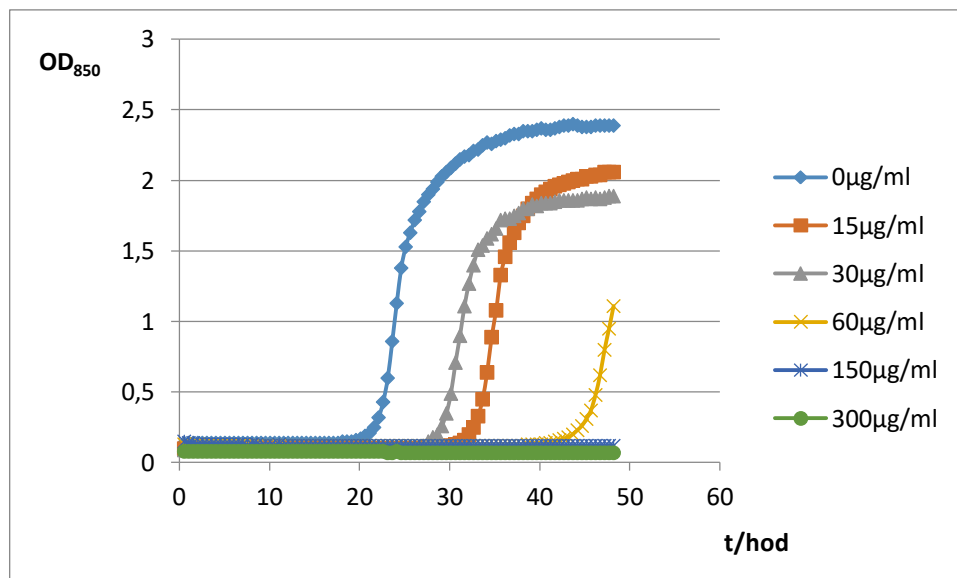
U bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 byla zjištěna po použití inhibiční látky thymolu minimální inhibiční koncentrace 60 μ g/ml (obr. 4). Při použití nižších koncentrací inhibiční látky (15 a 30 μ g/ml) došlo k mírnému prodloužení lag fáze a zpomalení růstu. Po přidání vyššího množství inhibiční látky bakterie zastavila svůj růst. Měření probíhalo za teploty 37 °C po dobu 24 hodin.



Obrázek 4: Vliv thymolu na bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

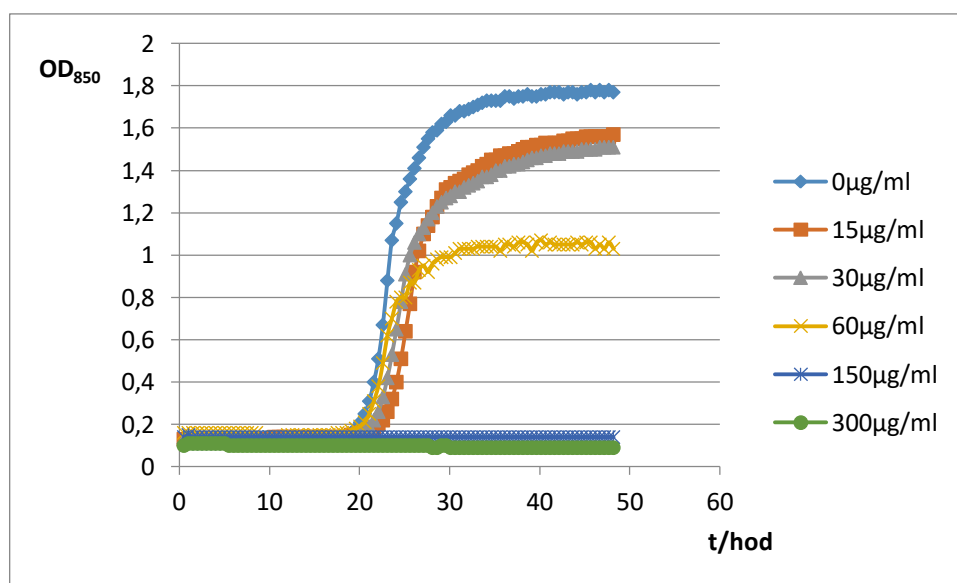
7.1.5 Vliv thymolu na bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

U bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 byla pro thymol zjištěna minimální inhibiční koncentrace 150 μ g/ml. Při aplikaci thymolu v koncentracích 15 a 30 μ g/ml došlo k prodloužení lag fáze o asi 8 – 10 hodin a k mírnému zpomalení růstu. Pokud byl použit thymol v koncentraci 60 μ g/ml, byla lag fáze prodloužena zhruba dvakrát (oproti kontrolnímu bujónu bez inhibiční látky) a nebylo ani dosaženo stacionární fáze růstu (obr. 5). Po přidání vyššího množství inhibiční látky bakterie zastavila svůj růst. Měření probíhalo za teploty 37 °C po dobu 48 hodin.

Obrázek 5: Vliv thymolu na bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

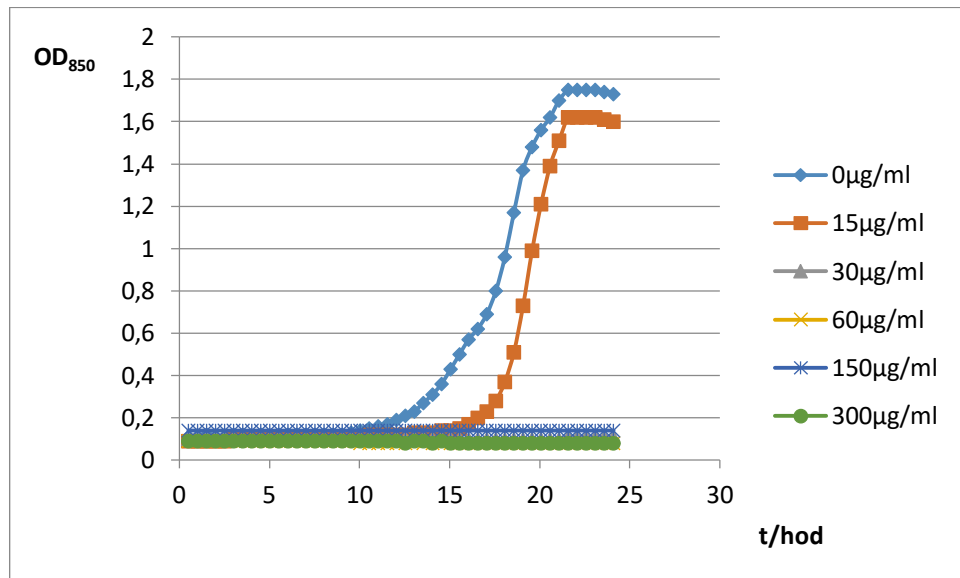
7.1.6 Vliv thymolu na bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

U bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 byla po použití thymolu zjištěna podobně, jako u *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004, minimální inhibiční koncentrace 150 µg/ml. Při použití dvou nejnižších koncentrací inhibiční látky (15 a 30 µg/ml) bakterie rostla podobně, jako v kontrolním médiu bez inhibiční látky (obr. 6), v přítomnosti thymolu o koncentraci 60 µg/ml došlo ke zpomalení růstu. Měření probíhalo za teploty 30 °C po dobu 48 hodin.

Obrázek 6: Vliv thymolu na bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

7.1.7 Vliv thymolu na bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

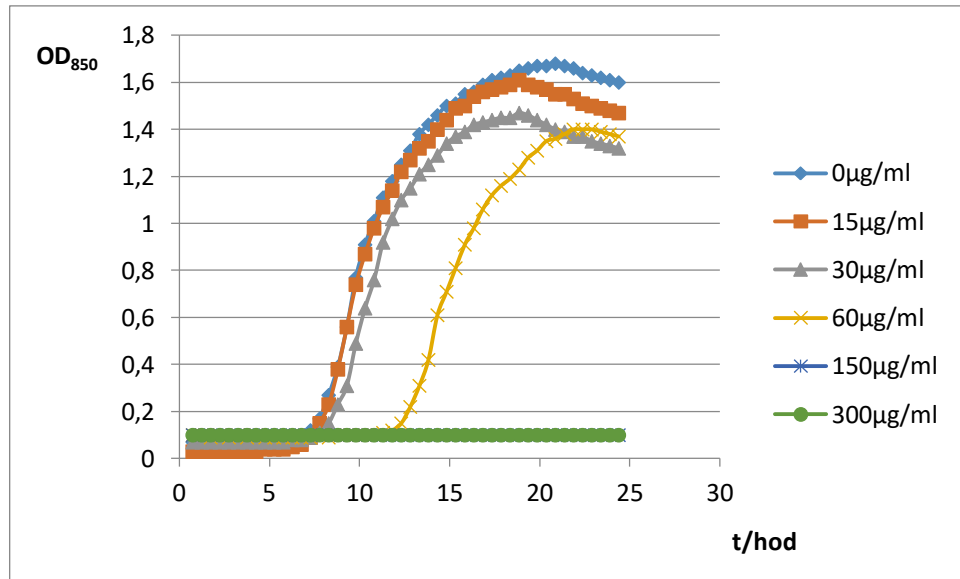
U bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 byla zjištěna po použití inhibiční látky thymol minimální inhibiční koncentrace 30 $\mu\text{g/ml}$ (obr. 7). Při použití thymolu o koncentraci 15 $\mu\text{g/ml}$ bakterie rostla podobně, jako bez inhibiční látky. Po přidání vyššího množství inhibiční látky bakterie zastavila svůj růst. Měření probíhalo za teploty 30 °C po dobu 24 hodin.



Obrázek 7: Vliv thymolu na bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

7.1.8 Vliv thymolu na bakterii *Proteus mirabilis* CCM 7188

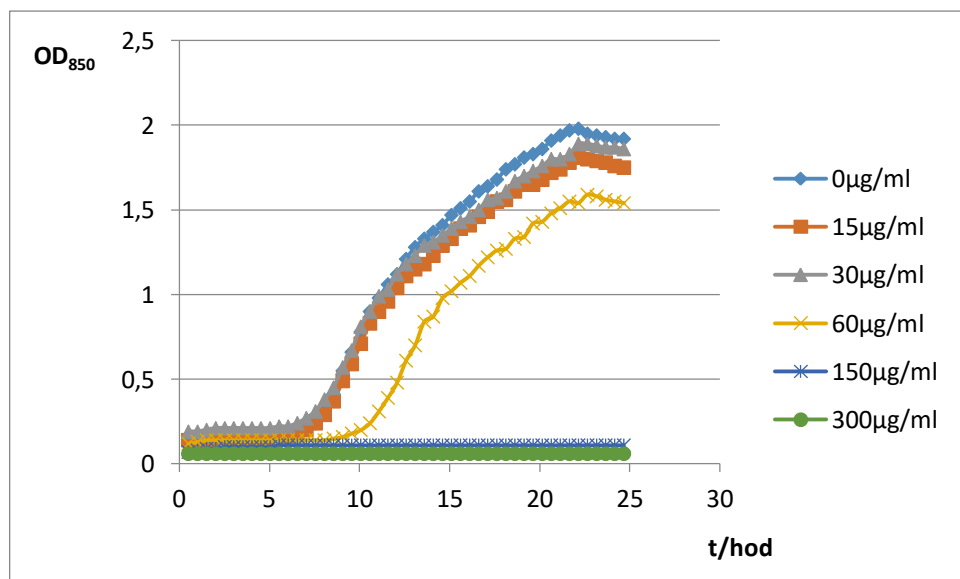
U bakterie *Proteus mirabilis* CCM 7188 byla pro thymol zjištěna minimální inhibiční koncentrace 150 $\mu\text{g/ml}$ (obr. 8). Při aplikaci thymolu v koncentracích 15 a 30 $\mu\text{g/ml}$ bakterie rostla podobně, jako bez inhibiční látky. Jestliže byl thymol přidán v koncentraci 60 $\mu\text{g/ml}$, došlo k výraznějšímu prodloužení lag fáze na 12 hodin (oproti 5 hodinám u kontrolního bujónu bez thymolu). Po přidání vyššího množství inhibiční látky bakterie zcela zastavila svůj růst. Měření probíhalo za teploty 37 °C po dobu 24 hodin.



Obrázek 8: Vliv thymolu na bakterii *Proteus mirabilis* CCM 7118

7.1.9 Vliv thymolu na bakterii *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

U bakterie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 byla zjištěna po použití inhibiční látky thymol minimální inhibiční koncentrace 150 μg/ml. Při použití nižší koncentrace inhibiční látky vykazovala bakterie obdobný růst, jako bez inhibiční látky. Měření probíhalo za teploty 37 °C po dobu 24 hodin



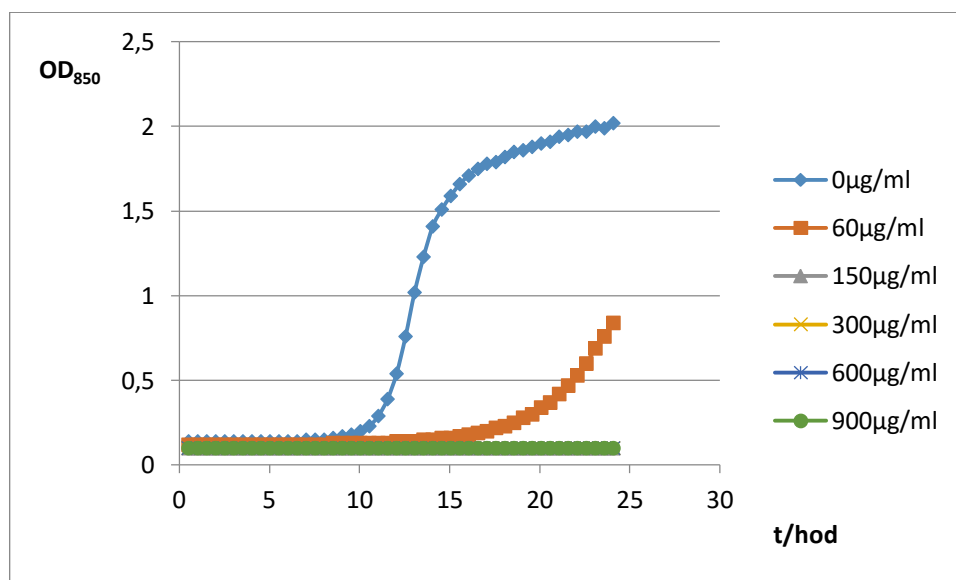
Obrázek 9: Vliv thymolu na bakterii *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

7.2 Vliv eugenolu na testované bakterie

Testované bakterie byly podrobeny působení eugenolu v koncentracích 0, 60, 150, 300, 600 a 900 $\mu\text{g/ml}$.

7.2.1 Vliv eugenolu na bakterii *Enterococcus durans* CCDM 2665

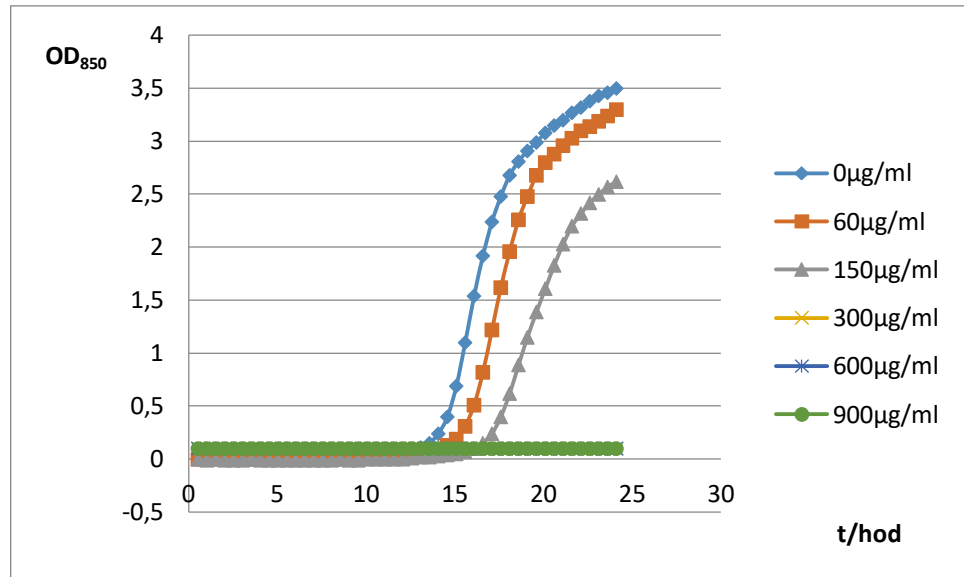
U bakterie *Enterococcus durans* CCDM 2665 byla zjištěna po použití eugenolu minimální inhibiční koncentrace 150 $\mu\text{g/ml}$. V přítomnosti eugenolu o koncentraci 60 $\mu\text{g/ml}$ došlo k výraznému prodloužení lag fáze a také ke zpomalení růstu (obr. 10). Měření probíhalo za teploty 37 °C po dobu 24 hodin.



Obrázek 10: Vliv eugenolu na bakterii *Enterococcus durans* CCDM 2665

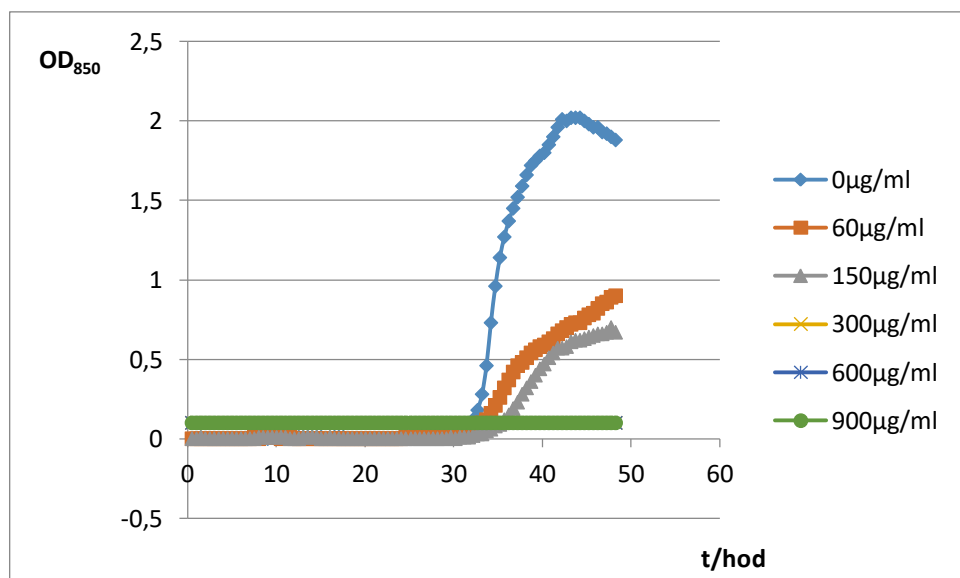
7.2.2 Vliv eugenolu na bakterii *Enterococcus faecalis* CCDM 53

U bakterie *Enterococcus durans* CCDM 2665 byla pro eugenol zjištěna minimální inhibiční koncentrace 300 $\mu\text{g/ml}$. Při použití nižší koncentrace inhibiční látky došlo k mírnému zpomalení růstu a také k prodloužení lag fáze (obr. 11). Po přidání vyššího množství inhibiční látky bakterie zcela zastavila svůj růst. Měření probíhalo za teploty 37 °C po dobu 24 hodin.

Obrázek 11: Vliv eugenolu na bakterii *Enterococcus faecalis* CCDM 53

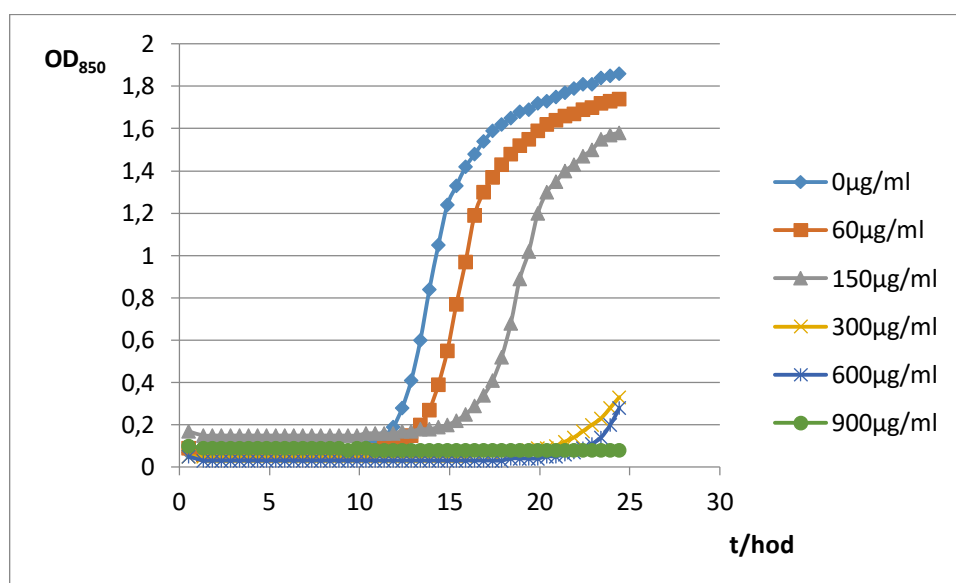
7.2.3 Vliv eugenolu na bakterii *Enterococcus faecalis* CCDM 4224

U bakterie *E. faecalis* CCDM 4224 byla minimální inhibiční koncentrace pro eugenol stanovena na 300 µg/ml (obr. 12). Při použití nižší koncentrace eugenolu bylo pozorováno velmi mírné prodloužení lag fáze, na rozdíl od výrazného zpomalení růstu. Měření probíhalo za teploty 37 °C po dobu 48 hodin.

Obrázek 12: Vliv eugenolu na bakterii *Enterococcus faecalis* CCDM 4224

7.2.4 Vliv eugenolu na bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

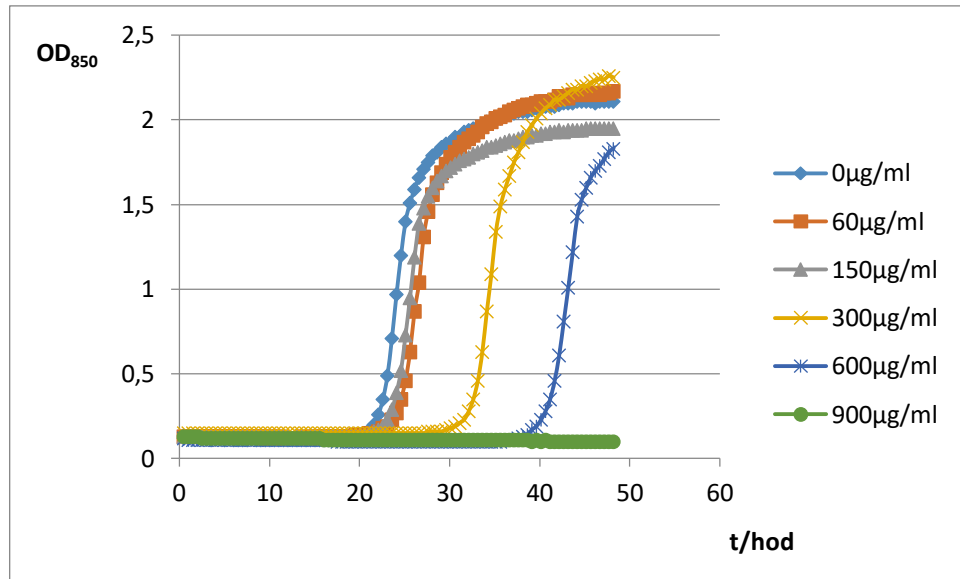
U bakterie *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 byla pro eugenol zjištěna minimální inhibiční koncentrace 900 $\mu\text{g/ml}$ (obr. 13), což byla nejvyšší testovaná koncentrace této látky. Při použití koncentrací 60 a 150 $\mu\text{g/ml}$ bakterie rostla podobně, jako bez inhibiční látky, akorát došlo k mírnějšímu prodloužení lag fáze. Pokud byl eugenol do kultivačního média přidán v koncentracích 300 a 600 $\mu\text{g/ml}$, došlo k výraznému prodloužení lag fáze a zpomalení růstu, přičemž nebylo ani dosaženo stacionární fáze růstu (obr. 13). Měření probíhalo za teploty 37 °C po dobu 24 hodin.



Obrázek 13: Vliv eugenolu na bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141

7.2.5 Vliv eugenolu na bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

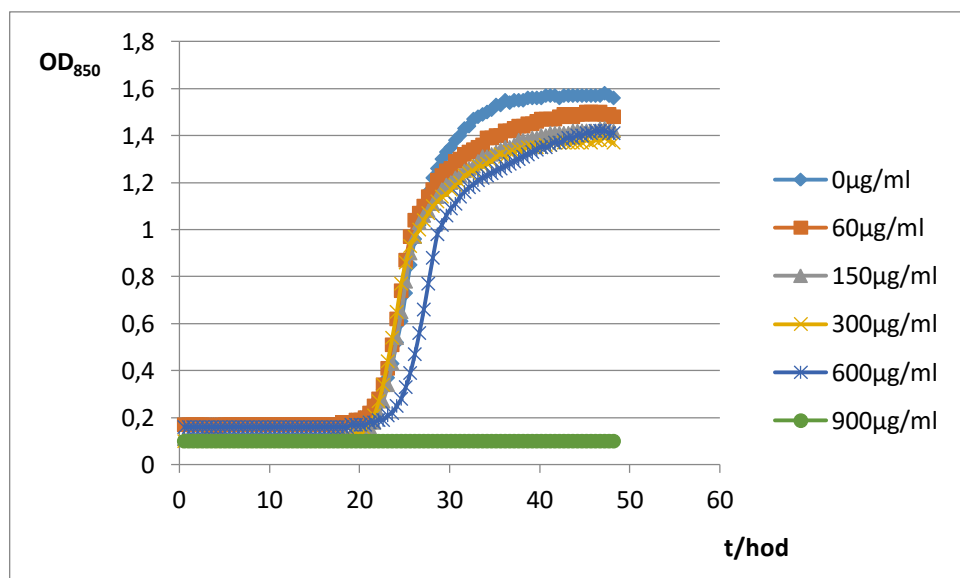
U bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 byla, obdobně, jako u kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, zjištěna pro eugenol minimální inhibiční koncentrace 900 $\mu\text{g/ml}$. Při aplikaci eugenolu v koncentracích 60 a 150 $\mu\text{g/ml}$ byl růst tohoto kmene téměř totožný jako v případě, kdy do média tato látka přidána nebyla (obr. 14). Po přidavku eugenolu v koncentracích 300 a 600 $\mu\text{g/ml}$ došlo k výraznějšímu prodloužení lag fáze, avšak po určité době dosáhla kultura srovnatelné denzity s kontrolním vzorkem. Měření probíhalo za teploty 37 °C po dobu 48 hodin.



Obrázek 14: Vliv eugenolu na bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

7.2.6 Vliv eugenolu na bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

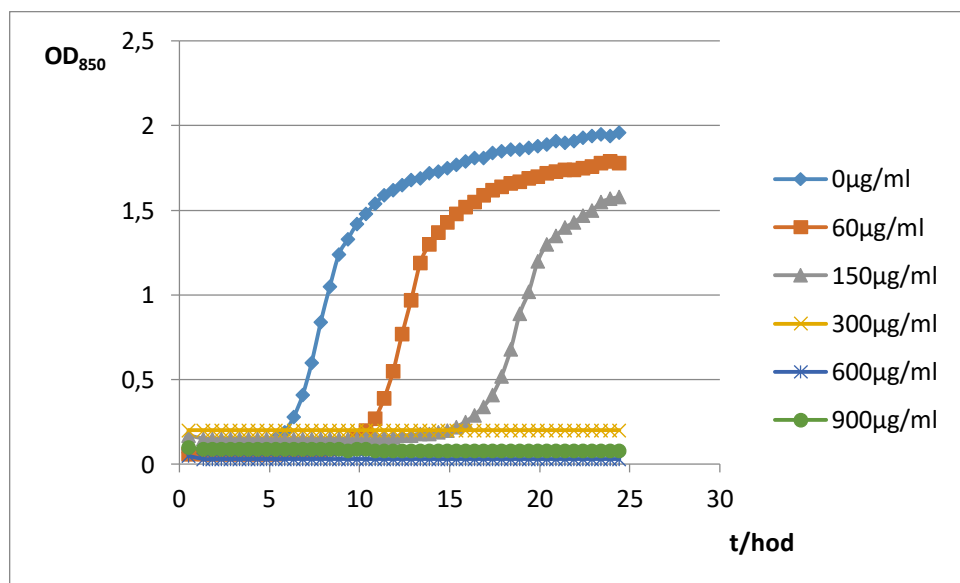
Inhibiční efekt eugenolu se u bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 projevil podobně jako u předchozích dvou laktokoků až při nejvyšší testované koncentraci (900 µg/ml; obr. 15). Při použití nižší koncentrace bakterie rostla prakticky shodně, jako v prostředí bez inhibiční látky. Měření probíhalo za teploty 30 °C po dobu 48 hodin.



Obrázek 15: Vliv eugenolu na bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

7.2.7 Vliv eugenolu na bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

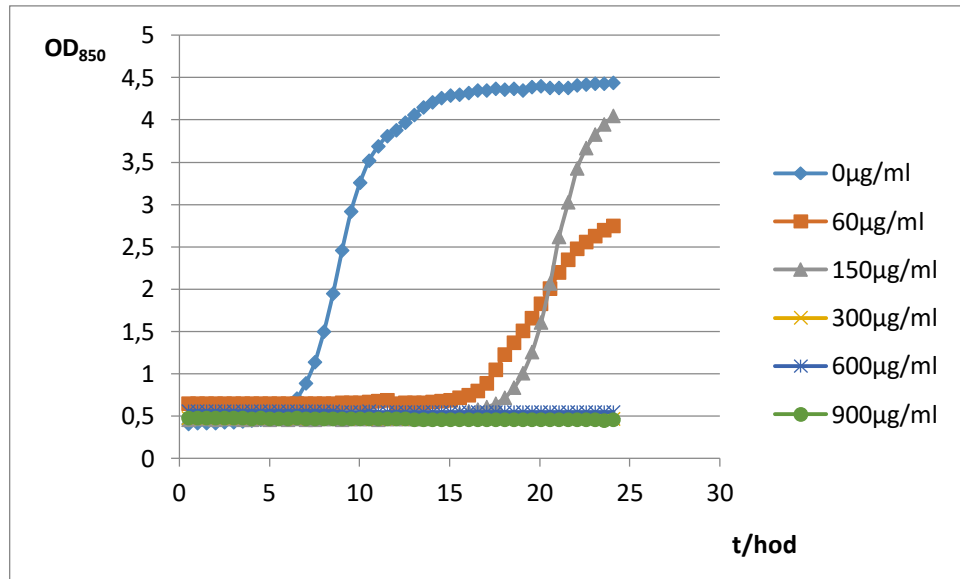
Bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 se v prostředí s eugenolem chovala odlišněji, než předchozí testované bakterie druhu *L. lactis*. U tohoto kmene byla zjištěna minimální inhibiční koncentrace eugenolu 300 μ g/ml (obr. 16). Jestliže byl eugenol aplikován v nižších koncentracích, bylo pozorováno prodloužení lag fáze (v případě koncentrace 150 μ g/ml poměrně výrazné) a zároveň mírné zpomalení růstu. Měření probíhalo za teploty 30 °C po dobu 24 hodin.



Obrázek 16: Vliv eugenolu na bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

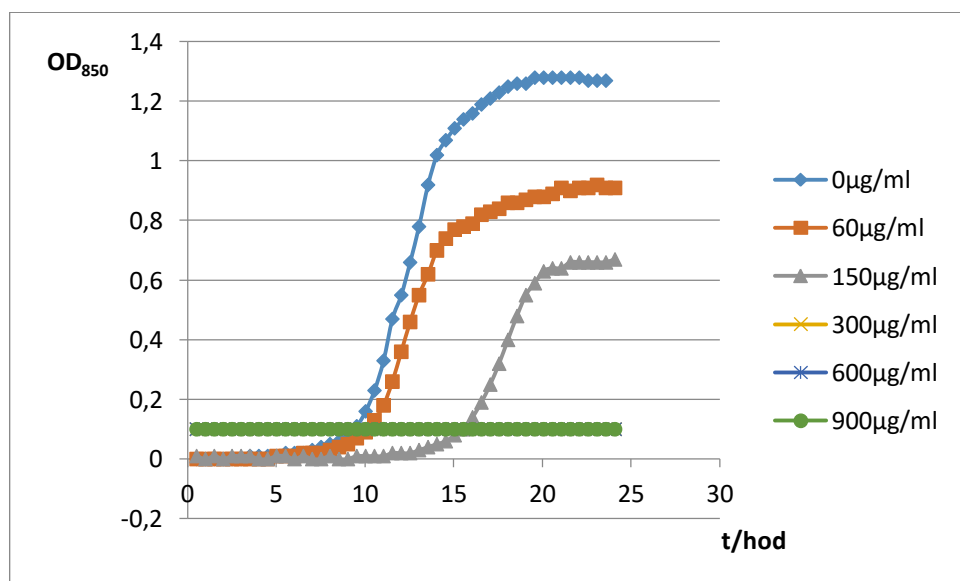
7.2.8 Vliv eugenolu na bakterii *Proteus mirabilis* CCM 7188

U bakterie *Proteus mirabilis* CCM 7188 byla pro eugenol zjištěna minimální inhibiční koncentrace 300 μ g/ml. Při použití nižších koncentrací inhibiční látky (60 a 150 μ g/ml) je možné pozorovat výrazné prodloužení lag fáze (obr. 17). I přes toto výrazné prodloužení přípravné fáze však bylo dosaženo stacionární růstové fáze. Měření probíhalo za teploty 37 °C po dobu 24 hodin.

Obrázek 17: Vliv eugenolu na bakterii *Proteus mirabilis* CCM 7188

7.2.9 Vliv eugenolu na bakterii *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

Minimální inhibiční koncentrace eugenolu pro *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 byla, podobně jako u *P. mirabilis* CCM 7188, stanovena na 300 µg/ml (obr. 18). Při aplikaci koncentrací 60 a 150 µg/ml došlo k mírnému prodloužení lag fáze a výraznějšímu zpomalení růstu. Měření probíhalo za teploty 37 °C po dobu 24 hodin.

Obrázek 18: Vliv eugenolu na bakterii *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

8 DISKUZE

Zamezení růstu patogenních mikroorganismů, které kazí potraviny je předmětem velkého počtu studií. K inhibici se používají přírodní látky, jako např. esenciální oleje. Testováno bylo velké množství mikroorganismů a velké množství esenciálních olejů. [20] Esenciální oleje jsou více inhibiční vůči grampozitivním bakteriím než bakteriím gramnegativním. [2] Účinnost inhibice závisí na aplikaci antimikrobní látky. V lépe zpracovatelných potravinách jako jsou džemy, džusy, polévky nebo omáčky lze antimikrobiální systém přidat přímo do produktu. U hůře zpracovatelných potravin, zejména takových, které nejsou zcela homogenní, jako jsou např. kousky ovoce, saláty a další, lze konzervovat mimo jiné přidáním inhibiční látky na povrch, a to buď ponořením produktu do konzervační látky, nastříkáním nebo aplikováním na její povrch, případně na jiné nosiče. Velmi často se látky přidávají během balení do ochranné atmosféry nebo začleněním látek do fólie či jiného obalu. [20]

Thymol je esenciální olej získaný z tymiánu a eugenol z hřebíčku. [6], [19] Kombinace thymolu a eugenolu přidaná do obalu patří mezi nejúčinnější inhibiční látky se širokým potenciálem využití v potravinářství. Jejich inhibice byla prokázána např. u bakterií *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. [5],[9]

Bylo prokázáno, že éterické oleje, jako jsou karvakrol, thymol a eugenol vykazují antimikrobní aktivitu také proti patogenním bakteriím. Významné antibakteriální účinky se v potravinách dosahují při koncentracích mezi 0,5 a 20 $\mu\text{l/g}$. Dosud však nebylo provedeno dostatečné množství studií, kde by tyto látky byly testovány v komerčně dostupných potravinách nebo přímo v potravinářských závodech. Studie se prozatím zaměřují na modelové potraviny vyrobené v laboratorních podmínkách. [21] Bylo zjištěno, že pokud byly karvakrol nebo thymol aplikovány v koncentracích více než 100 $\mu\text{l/g}$, vedlo to k úplné inhibici růstu plísní *in vitro*. [15]

Směs thymolu a eugenolu byla napuštěna do obalového systému, do kterého bylo baleno hotové drůbeží maso. Díky tomuto obalu došlo ke snížení mikrobiální kontaminace bakteriemi *Salmonella enterica* ser. Typhimurium a *Escherichia coli* o několik řádů při chladírenském skladování během 10 dnů. Obaly obsahující antimikrobní látky byly používány v absorpčních polštářcích jako součást systémů balení potravin. Absorpční podložky pomáhají udržovat potraviny čerstvé a zdravotně nezávadné tím, že absorbují

vlhkost z čerstvých potravin, jako jsou maso, drůbež a ryby. Nicméně tyto polštářky mohou způsobit nežádoucí organoleptické změny potravin, čemuž by do jisté míry mohla zabránit aplikace esenciálních olejů. [22]

Černý pepř, kurkuma, paprika a majoránka patří mezi nejvíce kontaminované koření bakteriemi. Aerobní bakterie v koření mohou dosáhnout úrovně až 80–100 milionů mikroorganismů na 1 g. Anaerobní bakterie jsou méně početné než aerobní bakterie. Některé bakterie obsahují spóry, které se neinaktivují při sušení koření, mohou být potenciálním rizikem. Kontaminace plísněmi může být také důležitým ukazatelem. Bílý pepř, černý pepř, chilli a koriandr jsou nejvíce kontaminovány plísněmi. Skupina *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus niger* a *Penicillium* spp. obvykle převládá. Plísně mohou růst na částech koření a bylinách před sušením nebo během sušení, skladování a přepravy.[2] Proto je třeba při získávání antimikrobních látek z koření a bylin dbát na to, aby tyto nebyly kontaminovány mikroorganismy nebo jejich metabolity, např. mykotoxiny.

Každá bakterie má rozdílný tvar, pohyblivost, strukturu, vzhled buňky. [23] Strukturu buněčné stěny rozlišuje Gramovo barvení, které rozlišuje bakterie na dva typy. Grampozitivní bakterie, které se díky tomuto barvení zabarvují do tmavě fialové, jelikož si ponechávají krystalovou violet, a gramnegativní, u kterých se fialové zbarvení vyplaví alkoholem a safraninem se zabarví do červena. [24] Tyto dva druhy buněk mají rozdílnou strukturu buněčné stěny. Grampozitivní bakterie mají ve své stěně silnou vrstvu tvořenou peptidoglykenem. Bakterie s gramnegativní stěnou mají vnější membránu a pod ní tenkou vrstvu peptidoglykenu, která se snáz odbarví. Mezi gramnegativní bakterie patří bakterie rodu *Proteus* a *Salmonella*. Do skupiny grampozitivních bakterií patří ze zkoumaných bakterií bakterie rodu *Enterococcus* a *Lactococcus*. Právě odlišná stavba buněčné stěny může být jednou z příčin odlišné citlivosti grampozitivních a gramnegativních bakterií k esenciálním olejům a nepolárním látkám. [23]

Eugenol a thymol vykazovaly v jiných studiích inhibiční účinek na růst několika kmenů bakterií *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, včetně *E. coli* O1587:H7, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* nebo *Penicillium digitatum*. Eugenol vykazoval nejširší spektrum aktivity proti 24 z 25 bakterií, s výjimkou *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Thymol vykazoval inhibici u 9 z 9 bakterií. [24], [25] Grampozitivní bakterie jsou vůči působení těchto esenciálních olejů citlivější než gramnegativní, zejména pak *Bacillus cereus*, jehož růst byl v uvedené studii potlačen nejvíce. [25]

Práce byla zaměřena na inhibiční působení dvou látek (eugenolu a thymolu) na vybrané, potravinářsky významné bakterie. Pro sledování koncentrace potřebné pro inhibici (minimální inhibiční koncentrace) byly zvoleny nežádoucí grampozitivní a gramnegativní bakterie, které produkují biogenní aminy. Thymol vykazoval nejlepší inhibiční účinek na bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, kde byla zjištěna minimální inhibiční koncentrace 30 μ g/ml. Nejméně účinné působení thymolu bylo pozorováno u bakterií *Enterococcus durans* CCDM 2665, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, *Proteus mirabilis* CCM 7188, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420, kde bylo zapotřebí zvýšit koncentraci až na 150 μ g/ml. U eugenolu byl nejlepší inhibiční účinek zjištěn u bakterie *Enterococcus durans* CCDM 2665, kde byla minimální inhibiční koncentrace určena na 150 μ g/ml. Slabší inhibiční účinky eugenolu byly zjištěny u bakterií *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, kde bylo zapotřebí aplikovat nejvyšší testovanou koncentraci eugenolu (900 μ g/ml). Výsledky této práce vykazují, že účinnějším esenciálním olejem byl thymol.

V porovnání s jinými studiemi vykazoval eugenol minimální inhibiční koncentraci u bakterií *Streptococcus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* 0,7-40mg/ml. [25] Při použití thymolu jako inhibiční látky byla zjištěna minimální inhibiční koncentrace u bakterie *Enterococcus faecalis* ≤ 2 mg/ml, *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* 1,25 mg/ml, *Pseudomonas fluorescens* <100 μ g/ml.[5], [25] V naší studii byly u většiny testovaných bakterií zjištěny pro tyto dvě inhibiční látky nižší minimální inhibiční koncentrace. Je třeba však brát v úvahu, že z dostupných literárních zdrojů nebylo možno tyto účinky zcela srovnat, protože efekt esenciálních olejů na mléčné koky (laktokoky) dosud testován nebyl.

Tato bakalářská práce by mohla být využita pro další výzkum za účelem snížení přídavných látek v potravinách např. konzervantů. Nicméně působení těchto látek na nežádoucí mikroorganismy v potravinách se může vzhledem ke složitější potravinové matici projevit jinak, než v podmínkách *in vitro*, proto bude nutné pokračovat ve výzkumu dále a účinky těchto látek otestovat v reálných potravinách zaočkovaných dekarboxyláza-pozitivními bakteriemi.

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá sledováním inhibičních účinků thymolu a eugenolu na vybrané bakterie produkující biogenní aminy. Obě tyto látky vykazovaly na testované dekarboxyláza-pozitivní bakterie inhibiční efekt. Ze získaných výsledků lze vyvodit:

- na testované bakterie lépe inhibičně působil thymol než eugenol;
- thymol vykazoval nejlepší inhibiční účinek u bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, kde byla zjištěna minimální inhibiční koncentrace 30 μ g/ml;
- nejméně účinné působení thymolu bylo pozorováno u bakterií *Enterococcus durans* CCDM 2665, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, *Proteus mirabilis* CCM 7188, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420, kde bylo zapotřebí zvýšit koncentraci na 150 μ g/ml;
- nejlepší inhibiční účinek eugenolu byl zjištěn u bakterie *Enterococcus durans* CCDM 2665, kde byla minimální inhibiční koncentrace určena na 150 μ g/ml;
- slabší inhibiční účinky eugenolu byly zjištěny u bakterií *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, kde bylo zapotřebí aplikovat nejvyšší testovanou koncentraci eugenolu (900 μ g/ml).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Dikeman, Michael Devine, Carrick. (2014). *Encyclopedia of Meat Sciences (2nd Edition) - Biogenic Amines*. Elsevier. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00U6GZZ5/encyclopedia-meat-sciences/biogenic-amines>
- [2] Motarjemi, Yasmine Moy, Gerald Todd, Ewen. (2014). *Encyclopedia of Food Safety - 27.6.4.4 Hazards of Microbiological Nature and Control Measures*. Elsevier. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00C6DJX2/encyclopedia-food-safety/hazards-microbiological>
- [3] Purslow, Peter P.. (2017). *New Aspects of Meat Quality - From Genes to Ethics - 9.6 Interventions at the Processing Level to Enhance Microbiological Safety of Meat*. Elsevier. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt011G0OU1/new-aspects-meat-quality/interventions-at-processing>
- [4] Hashemi, Seyed Mohammad Bagher Khaneghah, Amin Mousavi Sant'Ana, Anderson de Souza. (2018). *Essential Oils in Food Processing - Chemistry, Safety and Applications*. John Wiley & Sons. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpEOFPCSA3/essential-oils-in-food/essential-oils-in-food>
- [5] Barros-Velázquez, Jorge. (2016). *Antimicrobial Food Packaging - 11.2.5 Bacteriocins*. Elsevier. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt010WNKD3/antimicrobial-food-packaging/bacteriocins>
- [6] International Food Information Service. (2009). *Dictionary of Food Science and Technology (2nd Edition) - Eugenol*. International Food Information Service (IFIS Publishing). Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt006QC4TN/dictionary-food-science/eugenol>
- [7] Meriluoto, Jussi Spoof, Lisa Codd, Geoffrey A.. (2017). *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis - 19.5 Depsipeptides*. John Wiley & Sons. Retrieved from

- <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt011HM995/handbook-cyanobacterial/depisepptides>
- [8] Lu, Xiaonan. (2017). *Sensing Techniques for Food Safety and Quality Control - 3.4.9 Food Allergens*. Royal Society of Chemistry. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0122ZJV3/sensing-techniques-food/food-allergens>
- [9] Doyle, Michael P. Buchanan, Robert L.. (2013). *Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers (4th Edition) - 6.11.2.2 Biogenic Amines*. American Society for Microbiology (ASM). Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00C3KEM1/food-microbiology-fundamentals/biogenic-amines>
- [10] Toldrá, Fidel. (2017). *Lawrie's Meat Science (8th Edition) - 6.5.4 Biogenic Amine Production*. Elsevier. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00CX3IH3/lawries-meat-science/biogenic-amine-production>
- [11] Inamuddin Asiri, Abdullah M. Isloor, Arun M.. (2020). *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science - Supercritical Carbon Dioxide as Green Solvent*. Elsevier. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpGSPCEES4/green-sustainable-process/green-sustainable-process>
- [12] Shahidi, Fereidoon. (2005). *Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Volumes 1-6 (6th Edition) - 5.1.4 Mechanical Extraction*. John Wiley & Sons. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt003Y1GI4/baileys-industrial-oil/mechanical-extraction>
- [13] Attokaran, Mathew. (2017). *Natural Food Flavors and Colorants (2nd Edition) - References*. John Wiley & Sons. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt011BW5H1/natural-food-flavors/japanese-m-references>
- [14] Surburg, Horst Panten, Johannes. (2016). *Common Fragrance and Flavor Materials - Preparation, Properties and Uses (6th Edition) - 3.2.1 Essential Oils*. John Wiley & Sons. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt011B6OH2/common-fragrance-flavor/essential-oils>

- [15] Peter, K.V.. (2004). *Handbook of Herbs and Spices, Volume 2 - 3.3 Measuring Antimicrobial Activity*. Woodhead Publishing. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt003I5M03/handbook-herbs-spices-2/measuring-antimicrobial>
- [16] Montville, Thomas J. Matthews, Karl R.. (2008). *Food Microbiology - An Introduction (2nd Edition) - 23.9.4 Spices and Their Essential Oils*. American Society for Microbiology (ASM). Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt008XKL39/food-microbiology-an/spices-their-essentia>
- [17] Pokorny, J. Yanishlieva, N. Gordon, M.. (2001). *Antioxidants in Food - Practical Applications - 10.7 References*. Woodhead Publishing. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt002QI501/antioxidants-in-food/sources-natural-references-2>
- [18] Taylor, T. M.. (2015). *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality - References*. Elsevier. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00U8RLY3/handbook-natural-antimicrobials/handbook-n-references-8>
- [19] Griffiths, Mansel. (2005). *Understanding Pathogen Behaviour - Virulence, Stress Response and Resistance - 18.4.2.2 Natural Antimicrobials from Plant Sources*. Elsevier. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt010XP9LA/understanding-pathogen/understand-natural-antimicrobials>
- [20] Ohlsson, T. Bengtsson, N.. (2002). *Minimal Processing Technologies in the Food Industry - 6.5 Activity of Natural Antimicrobials*. Woodhead Publishing. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt002TTUO1/minimal-processing-technologies/activity-natural-antimicrobials>
- [21] Blackburn, Clive de, W.. (2006). *Food Spoilage Microorganisms - 20.4 Implications for Control in Foods Affected*. Woodhead Publishing. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt006MSKC5/food-spoilage-microorganisms/implications-control>

- [22] Grumezescu, Alexandru Mihai. (2017). *Food Preservation - Nanotechnology in the Agri-Food Industry, Volume 6 - 4.3.2.3 Antimicrobial Nanocarrier Systems: Use in Edible Films and Coatings*. Elsevier. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0114HKX2/food-preservation-nanotechnology/antimicrobial-nanocarrier>
- [23] Hill, Annie E.. (2015). *Brewing Microbiology - Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste - 9.4.1 Pectinatus*. Elsevier. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00ULXIJ3/brewing-microbiology/appearance-pectinatus>
- [24] Moran, Anthony P. Holst, Otto Brennan, Patrick J. Itzstein, Mark von. (2009). *Microbial Glycobiology - Structures, Relevance and Applications - 25.1 Introduction*. Elsevier. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt007B50M1/microbial-glycobiology/chemical-synthesis-introduction>
- [25] Ho, C-T. Mussinan, C.J. Shahidi, F. Tratras Contis, E. EDITOR. (2010). *Recent Advances in Food and Flavor Chemistry - Food Flavor and Encapsulation, Health Benefits, Analytical Methods, and Molecular Biology of Functional Foods - 40.3 Results and Discussion*. Royal Society of Chemistry. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00C82ZF2/recent-advances-in-food/native-vs--results-discussion>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BA biogenní aminy

CCDM Sběrka mlékařských mikroorganismů

CCM Česká sbírka mikroorganismů

EO esenciální olej

MIC minimální inhibiční koncentrace

OD optická denzita

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vliv thymolu na bakterii <i>Enterococcus durans</i> CCDM 2665	24
Obrázek 2: Vliv thymolu na bakterii <i>Enterococcus faecalis</i> CCDM 53	25
Obrázek 3: Vliv thymolu na bakterii <i>Enterococcus faecalis</i> CCDM 4224	25
Obrázek 4: Vliv thymolu na bakterii <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141	26
Obrázek 5: Vliv thymolu na bakterii <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004	27
Obrázek 6: Vliv thymolu na bakterii <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824	27
Obrázek 7: Vliv thymolu na bakterii <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946	28
Obrázek 8: Vliv thymolu na bakterii <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7118	29
Obrázek 9: Vliv thymolu na bakterii <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis CCM 4420	29
Obrázek 10: Vliv eugenolu na bakterii <i>Enterococcus durans</i> CCDM 2665	30
Obrázek 11: Vliv eugenolu na bakterii <i>Enterococcus faecalis</i> CCDM 53	31
Obrázek 12: Vliv eugenolu na bakterii <i>Enterococcus faecalis</i> CCDM 4224	31
Obrázek 13: Vliv eugenolu na bakterii <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141	32
Obrázek 14: Vliv eugenolu na bakterii <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004	33
Obrázek 15: Vliv eugenolu na bakterii <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 ...	33
Obrázek 16: Vliv eugenolu na bakterii <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946 ...	34
Obrázek 17: Vliv eugenolu na bakterii <i>Proteus mirabilis</i> CCM 7188	35
Obrázek 18: Vliv eugenolu na bakterii <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis CCM 4420	35

