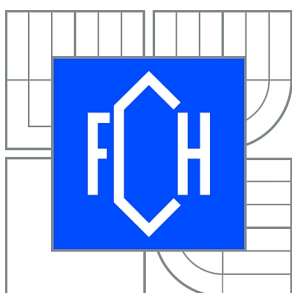




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM ANTIMIKROBIÁLNÍHO ÚČINKU VYBRANÝCH DRUHŮ KOŘENÍ

STUDY OF THE ANTIMICROBIAL EFFECTS OF SELECTED SPICES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JANA KALÁBOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. STANISLAVA VOBĚRKOVÁ,
Ph.D.

BRNO 2013



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0742/2012	Akademický rok: 2012/2013
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Jana Kalábová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Mgr. Stanislava Voběrková, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Studium antimikrobiálního účinku vybraných druhů koření

Zadání diplomové práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité metody hodnocení
3. Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
4. Zhodnoťte získané výsledky formou diskuze

Termín odevzdání diplomové práce: 3.5.2013

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Jana Kalábová
Student(ka)

Mgr. Stanislava Voběrková, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na studium antimikrobiálních účinků extraktů ze skořice, hřebíčku, zázvoru mletého a čerstvého proti *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* a *Pichia fermentans*. Extrakty koření byly připraveny ve třech rozpouštědlech (ethanol, voda, octan ethylnatý) a pro testování inhibičních účinků na dané mikroorganismy byly použity dvě metody disková difuzní a bujónová diluční metoda. Dále byla stanovena antioxidační aktivita a celkový obsah polyfenolických látek v koření.

Výsledky naznačují, že skořice i hřebíček extrahované v octanu ethylnatém a ethanolu jsou velice slibná antimikrobiální činidla proti všem testovaným mikroorganismům. Kombinace skořice a hřebíčku vykazuje aditivní účinek zejména po extrakci octanem ethylnatým. Nicméně, v případě bujónové diluční metody vykazoval nejvyšší inhibiční buněčného růstu zázvor čerstvý a to při optimálních růstových podmínkách *Bacillus subtilis* (35 °C, pH 7, 250 rpm). Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla pro všechny mikroorganismy stanovena 8,3 mg/ml.

Největší množství polyfenolických látek bylo v případě extraktů v ethanolu a to u skořice a hřebíčku, což koreluje s výsledky antioxidační aktivity.

ABSTRACT

The antimicrobial effects of cinnamon, clove and ginger (grand and fresh) extracts against *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* and *Pichia fermentans* were studied in this thesis. Selected spices were extracted in three solvents (ethanol, water and ethyl acetate) and inhibition effect on tested microorganisms was studied using two methods disc diffusion and broth dilution methods. The antioxidant activity and total polyphenolic compounds from spices were also determined.

The results showed that cinnamon and clove extracts in ethyl acetate and ethanol were a promising antimicrobial substances for all tested microorganisms. Combination of cinnamon and clove especially ethyl acetate extracts showed an additive effect. However, in the case of broth dilution method, fresh ginger inhibited bacterial growth under optimal growth conditions of *Bacillus subtilis* (35 °C, pH 7, 250 rpm). Minimum inhibitory concentration (MIC) values for all susceptible microorganisms was determined 8,3 mg/ml.

The highest amounts of polyphenolic substances were found in cinnamon and clove ethanol extract and this result was in correlation with antioxidant activity.

KLÍČOVÁ SLOVA

Antimikrobiální účinek, koření, esenciální olej, antioxidační aktivita, polyfenoly

KEYWORDS

Antimicrobial effects, spices, essentials oil, antioxidant activity, polyphenolics

KALÁBOVÁ, J. *Studium antimikrobiálního účinku vybraných druhů koření*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 66 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Stanislava Voběrková, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem citovala správně a úplně. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce Mgr. Stanislavě Voběrkové, Ph.D. za ochotu, laskavost, odborné a cenné rady, které mi usnadnily vypracování této diplomové práce.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. ESENCIÁLNÍ OLEJE	8
2.1. Historie esenciálních olejů	8
2.2. Výskyt EOS.....	8
2.3. Složení EOS	9
2.4. Biologické účinky EOS	10
2.5. Mechanismus účinku EOS.....	11
2.6. Využití esenciálních olejů	12
2.7. Metody získávání EOS	12
2.7.1. Destilace vodní parou	13
2.7.2. Lisování za studena	13
2.7.3. Extrakce oxidem uhličitým.....	13
2.7.4. Loužení.....	13
2.7.5. Extrakce ultrazvukem	13
2.7.6. Superkritická fluidní extrakce.....	14
2.7.7. Extrakce chemickými rozpouštědly.....	14
3. Mikrobiologické metody	15
3.1. Metody pro stanovení antimikrobiální aktivity	15
3.1.1. Kvalitativní metody	15
3.1.2. Kvantitativní metody	16
3.2. Stanovení růstové křivky	17
3.3. Denzitometrie.....	19
4. Fenolické sloučeniny	20
4.1. Antioxidační aktivita.....	20
4.2. Stanovení antioxidační aktivity.....	21
Metoda TEAC - (Trolox equivalent antioxidant capacity).....	21
Metoda FRAP - (Ferric reduction ability of plasma)	21
Metoda ORAC - (Oxygen radical absorbance capacity)	21
Metoda ABTS (2,29-azinobis-(3-etylbenzotiazoline- 6-sulfonová kyselina)).....	21
Metoda DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazylu)	22
HPLC (vysokoučinná kapalinová chromatografie)	22
4.3. Metody pro stanovení celkového obsahu fenolů.....	22
Metoda PBM (Price and Buthler method)	22
Stanovení za účasti Folin-Ciocalteho činidla	22
5. Charakteristika vybraných druhů koření.....	24
5.1. SKOŘICE MLETÁ – <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	24
5.1.1. Historie, původ, rozšíření	24
5.1.2. Botanický popis	24
5.1.3. Využití	24
5.1.4. Přehled účinných látek.....	24
5.1.5. Antimikrobiální působení extraktů ze skořice	25
5.2. HŘEBÍČEK VONNÝ – <i>Syzygium aromaticum</i>	26
5.2.1. Historie, původ, rozšíření	26
5.2.2. Botanický popis	26
5.2.3. Využití	26
5.2.4. Přehled účinných látek.....	26
5.2.5. Antimikrobiální působení extraktů z hřebíčku	27
5.3. ZÁZVOR OBECNÝ – <i>Zingiber officinalis</i>	28
5.3.1. Historie, původ rozšíření	28

5.3.2. Botanický popis	28
5.3.3. Využití	28
5.3.4. Přehled účinných látek.....	28
5.3.5. Antimikrobiální působení extraktů ze zázvoru	29
6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
6.1. Použité přístroje	30
6.2. Použité chemikálie	30
6.3. Použitý materiál	31
6.4. Použité mikroorganismy	31
6.5. Kultivační média a jejich příprava	32
Médium pro kultivaci a uchovávání kvasinek a plísní.....	32
6.6. Použité metody a postupy práce.....	33
6.6.1. Stanovení antimikrobiálního účinku.....	33
6.6.2. Příprava extraktů.....	33
6.6.3. Příprava inokula.....	33
6.6.4. Stanovení růstové křivky	33
6.6.5. Testování antimikrobiálních účinků extraktů z koření	34
6.6.6. Stanovení celkové obsahu fenolických sloučenin.....	34
6.6.7. Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS	35
7. VÝSLEDKY A DISKUZE	37
7.1. Stanovení celkové obsahu polyfenolů.....	37
7.1.1. Metoda FCM	37
7.2. Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS.....	38
7.3. Antimikrobiální účinky extraktů z koření diskovou difuzní metodou	39
7.4. Antimikrobiální aktivita synergického účinku skořice a hřebíčku.....	43
7.4.1. Octan ethylnatý.....	43
7.4.2. Extrakty v ethanolu.....	44
7.5. Antimikrobiální účinky extraktů koření stanovené bujónovou diluční metodou.....	46
7.5.1. Stanovení optimálních podmínek růstu <i>Bacillus subtilis</i>	46
7.5.1.1. Stanovení pH optima buněčného růstu	46
7.5.1.2. Stanovení teplotního optima pro buněčný růst	47
7.5.1.3. Stanovení optimální rychlosti třepání	49
7.5.2. Stanovení antimikrobiální aktivity bujónovou diluční metodou.....	50
8. ZÁVĚR.....	57
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	58
10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	65
11. SEZNAM PŘÍLOH	66

1. ÚVOD

Rostliny, koření a esenciální látky jsou látky přírodního původu, obsahující antimikrobiální složky - silice. Antimikrobiální látky se hojně využívají v potravinářském průmyslu, protože potlačují růst a rozmnožování nežádoucích patogenních mikroorganismů, prodlužují trvanlivost potravin a zajišťují jejich bezpečnost.

EOs a jiné rostlinné výtažky mají antibakteriální, antimykotickou a nativní aktivitu a jsou považovány za potenciální nové látky účinné k léčbě infekčních chorob a konzervaci potravin.

V dnešní době roste zájem o přípravky, které zajistí bezpečné, zdravotně nezávadné a vysoce kvalitní potraviny a to z důvodu výskytu nových patogenních mikroorganismů. Existují různé techniky, které zajistí ochranu potravin např. vakuové balení potravin, uchovávání pod inertní atmosférou, mírné tepelné zpracování nebo naopak chlazení potravin. Tyto techniky jsou však nedostatečné proti patogenním mikroorganismům a proti mikrobiálnímu kažení. V současné době existuje řada studií, které se zabývají antimikrobiální aktivitou koření a hledáním nových alternativních a účinných složek pro konzervaci a prodloužení trvanlivosti potravin. Na základě dosud publikovaných výsledků bylo zjištěno, že při použití esenciálních olejů jako bio konzervačních látek došlo ke zvýšení trvanlivosti i celkové kvality výrobku a snížil se výskyt patogenních mikroorganismů.

Tato diplomová práce se zaměřuje na studium a ověření antimikrobiálních účinků extraktů z různých druhů koření (skořice, hřebíček, zázvor) na vybraných zástupcích bakterií, kvasinek a plísní za použití agarové difuzní a bujónové diluční metody. Dále byla stanovena antioxidační aktivita a celkový obsah polyfenolů obsažených v esenciálních olejích s ohledem na druh koření a způsob extrakce respektive použití extrakčního rozpouštědla.

2. ESENCIÁLNÍ OLEJE

Silice neboli éterické (esenciální oleje) jsou těkavé, aromatické, olejové směsi přírodních látek, které jsou těžko rozpustné ve vodě. Obsahují komplexní směs vonných a těkavých látek. Silice mají hydrofobní charakter a vykazují poměrně velkou viskozitu. Vyznačují se optickou aktivitou a vysokým indexem lomu, které jsou dány přítomností nenasycených látek s dvojnými a trojnými vazbami. Získávají se pomocí vhodné metody z aromatických a těkavých částí rostlin (destilace vodní parou, extrakce oxidem uhličitým).^{[1],[2]}

Už od středověku jsou esenciální oleje známé především pro své antimikrobiální^[4] a léčivé účinky. Jejich komponenty vykazují také antivirovou^[5] antimykotickou^[6] a antitoxickou^[7] aktivitu a insekticidní vlastnosti^[8], které pravděpodobně souvisí s funkcí látek v daných rostlinách. Esenciální oleje (EOs) hrají důležitou roli v ochraně rostlin. Různé druhy rostlin obsahují odlišné množství procentuálního zastoupení EOs.^{[1],[3]}

Esenciální oleje jsou vysoce koncentrované, proto by se měly používat dostatečně zředěné. Jsou nestálé a musí být uchovávány v hermeticky uzavřených obalech v temnotě, aby se zabránilo kompozičním změnám.^{[1],[10]}

2.1. Historie esenciálních olejů

Koření bylo již od starověku využíváno pro svoji vůni na výrobu parfémů a pro své konzervační účinky. Koření a EOs byly používány již před 2000 lety v Egyptě, Číně a Indii. V 9. století byla extrakce koření zdokonalena Araby. Až do 16. století nebyly v Evropě EOs příliš rozšířeny, avšak v průběhu 19. a 20. století narůstal jejich význam v medicíně zejména pro jejich výraznou chuť a aroma. V 16. století došlo k rozšíření literatury s rostlinným léčitelstvím, kde podle předepsaných metod bylo možné připravit oleje a vonné vody. V období 18. a 19. století začali chemici identifikovat aktivní látky léčivých rostlin jako např. kofein, chinin, morfium atd.^{[1],[11]}

Rostlinné extrakty přispívaly kromě vůně a chuti také k potlačení růstu gram-pozitivních bakterií. Také mohou zvyšovat jeho skladovací stabilitu prostřednictvím aktivních prvků, včetně fenolů, alkoholů nebo aldehydů. První vědecké studie byly publikovány už v roce 1880, kdy olej ze skořice byl účinný v boji proti sporám antraxu. Hřebíček byl úspěšně používán pro konzervaci masných výrobků, sirupů, omáček a bonbónů. V roce 1910 byl zjištěn antimikrobiální účinek skořice a hřebíčku u výroby jablečné šťávy.^[12]

V oblasti Číny a Indie je využití rostlin jako účinné léčebné metody známé už tisíce let, ale v Evropě se léčení vracíme až v poslední době.^[2]

2.2. Výskyt EOS

Silice se vyskytují v rostlinách. Je známo asi 3000 druhů, ale nejvýznamnějších je kolem 300, ty jsou komerčně využívány ve farmaceutickém, potravinářském, zemědělském a kosmetickém průmyslu. Silice se tvoří v protoplasmě sekrečních buněk, rozpadem buněčných blan nebo hydrolýzou určitých glykosidů. Mohou prostupovat všemi pletivy nebo se koncentrovat v určitých orgánech např. v kůře a listech skořicovníku, v žláznatých trichomech listů máty apod. Syntetizují se v různých rostlinných orgánech (květy, listy, pupeny, kůra, stonky). Rostliny, které obsahují alkaloidy, silice vůbec neobsahují nebo jen

v malé míře a naopak. Obsah silic se v rostlině mění během její ontogeneze, ale i během 24 hodin, což je důkazem jejich zapojení do látkové výměny. ^{[9],[13],[24]}

2.3. Složení EOS

Esenciální oleje se skládají z velkého počtu chemických sloučenin. Jsou zastoupeny látkami především s nízkou molekulovou hmotností, s menším počtem kyslíkatých skupin, bez glykosidové vazby na cukry. Obsahují tedy značný podíl terpenových (monoterpenových, diterpenových a seskviterpenových) uhlovodíků. Vonné a chuťové vlastnosti látek esenciálních olejů nemají velký význam, protože nositeli vůně a chutě jsou kyslíkaté látky (alkoholy, aldehydy, ketony, estery...). ^{[9],[10]}

Podrobnou analýzu o složení EOs můžeme zajistit pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Jsou to přírodní komplexy, které mohou obsahovat 20 – 60 jednotlivých komponent v různém koncentračním zastoupení. Většinou se vyznačují přítomností dvou nebo třech hlavních složek ve vysoké koncentraci (20 – 70 %), ostatní sloučeniny se nachází ve stopovém množství. Antimikrobiální účinek látky však závisí na několika faktorech, např. způsobu extrakce, objemu inokula, růstové fázi mikroorganismu, vnitřních a vnějších podmínkách potravin (pH, obsah vody, konzervační látky, antioxidanty). ^{[12],[13]}

Za antibakteriální aktivitu jsou odpovědné fenolové sloučeniny. Hlavní komponenty řady EOs vykazující antimikrobiální aktivitu jsou uvedeny v *Tabulce 1*.

EOs vyrobené z rostliny sklizené ihned nebo v průběhu odkvětu vykazují nejsilnější antimikrobiální aktivitu. Také složení EOs ze stejné rostliny, ale z různých částí se výrazně liší. Například esenciální olej získaný ze semen koriandru má zcela odlišné složení než z lístků koriandru. ^[14]

Tabulka 1: Hlavní komponenty EOs vykazující antimikrobiální aktivitu

Název rostliny	Latinský název rostliny	Hlavní složky	Složení v %
Koriandr	<i>Coriandrum sativum</i> (semena)	Linalool ^[14] E-2-decnal ^[14]	70 % –
Koriandr	<i>Coriandrum sativum</i> (listy)	Linalool ^[14] E-2-decantal ^[14]	26 % 20 %
Skořice	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Trans-cinnamaldehyde ^[15]	65 %
Oregano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol ^[16] Thymol ^[17] p-Cymen ^[19] γ -terpinen ^[18]	80 % 64 % 52 % 2 – 52 %
Šalvěj	<i>Salvia officinalis</i> L.	Kafr ^[20] α -pinen ^[20] β -pinen ^[20] 1,8-cineole ^[20] α -tujon ^[20]	6 – 15 % 4 – 5 % 2 – 10 % 6 – 14 % 20 – 42 %
Rozmarýn	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -pinen ^[19] 1,8-cineole ^[19] Kafr ^[19] Bornyl acetát ^[19]	2 – 25 % 3 – 89 % 2 – 14 % 0 – 17 %
Hřebíček	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol ^[21] Eugenol acetát ^[21]	75 – 85 % 8 – 15 %
Tymián	<i>Thymus vulgaris</i>	Thymol ^[15] Carvacrol ^[22] p-Cymen ^[19] γ -terpinen ^[23]	10 – 64 % 2 – 11 % 10 – 56 % 2 – 31 %

2.4. Biologické účinky EOs

Éterické oleje jsou přírodní komplexní směsi. Obecně platí, že hlavní komponenty esenciálního oleje odrážejí biofyzikální a biologické vlastnosti ze základních olejů, z nichž byly izolovány. ^[24]

Mnoho nových studií se zabývá u esenciálních olejů biologickými účinky na lidské zdraví ^{[13],[24],[27]} a ochranu životního prostředí ^{[24],[34]}. Některé z EOs představují určité alternativy nebo doplňky syntetických sloučenin v chemickém průmyslu, které však nevykazují sekundární účinek. Silice a jejich složky jsou velmi účinné proti širokému spektru organismů, včetně bakterií, virů, plísní, parazitů, roztočů, larev a hmyzu. V rostlině plní funkci látek s protipatogenními účinky. ^{[9],[24]}

U silic bylo prokázáno, že vykazují cytotoxickou aktivitu. Esenciální oleje dokážou proniknout přes buněčnou stěnu, plazmatickou membránu, narušit několik vrstev polysacharidů, mastných kyselin a fosfolipidů, které permeabilizují. U bakterií je permeabilizace spojená se ztrátou iontů, snížením membránového potenciálu a vyčerpání zásob ATP. Poškození a narušení buněčné stěny vede k lyzi buňky. ^{[24],[25]}

Cytotoxicita EOs je spojená s přítomností fenolů, alkoholů a aldehydů. Tato vlastnost má velký význam v aplikaci EOs proti lidským a zvířecím patogenům a parazitům. Cytotoxické

vlastnosti různých éterických olejů a jejich složek jsou spojeny s antikarcinogenními účinky. ^{[24],[25]}

Některé esenciální oleje vykazují fytotoxicitu, z důvodu přítomnosti fotoaktivních molekul, jako jsou např. furokumariny. V případě cytotoxicity esenciálního oleje poškozují buněčnou membránu a membrány organel, kdy mohou působit jako prooxidanty na bílkoviny a DNA a dochází k produkci reaktivních forem kyslíku. Oproti tomu fytotoxické složky esenciálních olejů pronikají až do buněk, aniž by došlo k poškození membrány, proteinu nebo DNA. ^[24]

2.5. Mechanismus účinku EOs

Mechanismus účinku silic na mikroorganismy je komplexní a nebyl ještě zcela objasněn. Antimikrobiální účinky souvisí s hydrofilní a lipofilní povahou jednotlivých komponent esenciálních olejů. Celkový účinek EOs závisí na citlivosti mikroorganismu a na druhu silice. Chemické složení a účinek silice ovlivňují také klimatické změny, růstové podmínky, použitá část rostliny, způsob extrakce a její způsob uchovávání. Např. terpenoidy jsou látky lipofilního charakteru, které s největší pravděpodobností působí na membránové enzymy a blokují respirační cyklus. Jiné silice mohou mít vliv na biochemické změny v mikroorganismu např. inhibice syntézy DNA, RNA, proteinů a polysacharidů. Terpeny s aldehydickou funkční skupinou nebo hydroxylovou funkční skupinou vázanou na benzenové jádro (fenoly) rozrušují membránu. Také potlačují enzymatickou aktivitu nebo úplně zastaví produkci enzymů, čímž mohou způsobit i smrt bakteriální buňky. ^{[9],[26]}

Lambert a kol (2001) provedli studii, kde byly zjišťovány mechanismy účinku thymolu, karvakrolu a eugenolu na *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*. Mechanismus jejich baktericidních účinků spočíval ve zvýšení permeability buněčné membrány, kdy sloučeniny pronikají do cytoplazmy bakterií přes proteiny vnější membrány, čímž dochází k poškození transportu iontů. ^[32]

Ultee a kol. (2001) prokázali, že při současném působení karvakrolu a cymenu na *Bacillus cereus* zvyšuje cymen baktericidní aktivitu karvakrolu. Tento synergický účinek je způsoben narušením cytoplazmatické membrány gram-pozitivních bakterií cymenem. Karvakrol pak může snadněji vstoupit do buňky a zesílit porušení transportu iontů a živin do buňky. ^[33]

Obecně platí, že antimikrobiální aktivita přírodních látek se odvíjí od složení buněčné stěny cytoplazmatické membrány. Gram-pozitivní bakterie jsou citlivější k antimikrobiálním látkám, protože vnější membrána obsahuje vyšší vrstvu peptidoglykanu, obsahující řetězce kyseliny teichové. Gram-negativní bakterie obsahují menší vrstvu peptidoglykanu, ale silnou vrstvu lipoproteinů a liposacharidů, které zabraňují průniku cizorodých látek dovnitř buňky. Jsou tedy obvykle více rezistentní k antimikrobiálním látkám z rostlin. ^{[24],[26]}

Esenciální oleje jsou vzhledem k jejich baktericidním a fungicidním vlastnostem, farmaceutickému a potravinářskému účelu stále více rozšířeny jako alternativní ekologická ochrana krajiny. ^[24]

Kuorwel a kol. (2011) studovali antimikrobiální aktivitu thymolu, karvakrolu a linalolu proti růstu *S. aureus* po jejich aplikaci do biodegradovatelných fólií na bázi škrobu. Vybrané látky vykazovaly antimikrobiální aktivitu proti řadě mikroorganismů a inhibovaly růst hub. Všechny antimikrobiální fólie inhibovaly růst *Staphylococcus aureus*. Nejvyšší účinek byl

zaznamenán u thymolu, nicméně účinek fólií závisel na koncentraci antimikrobiální látky. Fólie se zabudovaným esenciálním olejem jsou využitelné jako potravinářské obalové materiály a také mohou snížit riziko vzniku onemocnění z potravin. ^[62]

2.6. Využití esenciálních olejů

EOs a jiné rostlinné přírodní látky nacházejí uplatnění zejména v kosmetickém průmyslu pro výrobu šampónů, vody do koupele nebo jako součást parfémů. V potravinářském průmyslu mají uplatnění jako přírodní přípravky při konzervaci a prodloužení trvanlivosti potravin, potlačení růstu patogenních mikroorganismů a k celkovému zvýšení kvality výrobku. Také mají široké uplatnění ve farmacii, kde se kromě silic používají přímo siličné drogy a též jednotlivé izolované složky silic např. z natě máty peprné (*Herba menthae piperine*) se izoluje mátová silice (*Oleum menthae piperine*) a z ní dále mentol. ^{[2],[3],[13]}

Jednotlivé složky esenciálních olejů jsou používány jako aromatické přísady a vonné esence. Základní oleje mají využití při masážích ve směsi s rostlinnými oleji, ale především v aromaterapii. ^{[1],[24]}

Existuje mnoho způsobů jak využít drogy obsahující silice. Uplatňují se především jako desinfekční a antiseptické prostředky, stomachika, diuretika, karminativa (látky působící proti nadměrné plynatosti střev), antiflogistika a k léčbě infekčních chorob. ^[13]

Navíc některé z nich vykazují antimutagenní vlastnosti, které mohou být propojeny s antikarcinogenními účinky. Také bylo prokázáno, že prooxidační činnost silic, jejich komponent nebo některých polyfenolů je efektivní v medicíně při snižování objemu tumoru nebo proliferace nádorových buněk. ^[24]

Esenciální oleje mají terapeutické využití také v humánní medicíně, díky svým protizánětlivým, protinádorovým, antivirotickým, antibakteriálním a antioxidačním vlastnostem. Syntetické konzervanty - jako antioxidanty nebo antimikrobiální látky jsou považovány za bezpečné a bez nežádoucích účinků. ^[27]

2.7. Metody získávání EOs

Nejčastěji se silice izolují z rostlinného materiálu pomocí několika metod jako je destilace vodní parou (SD)^[28], hydrodestilace (HD)^[28], organická extrakce^[28], superkritická extrakce oxidem uhličitým (SCE)^[28], ultrazvuková extrakce (UE)^[28], mikrovlnná extrakce bez rozpouštědel (SFME), vysokotlaká extrakce (HPSE), mikrovlnná destilace (MAD)^[31]. K získávání EOs se využívá i jiných postupů jako např. extrakce pomocí těkavých látek (hexan, oxid uhličitý) nebo tuků, které rostlina absorbuje a poté vylučuje. ^[11]

Metoda pro získání cenných a účinných látek závisí především na druhu rostliny. ^[11]

Metody pro získání esenciálních olejů:

- Destilace vodní parou
- Lisování za studena
- Extrakce oxidem uhličitým
- Mikrovlnná extrakce bez rozpouštědel
- Loužení (leaching)

- Extrakce ultrazvukem (sonikace)
- Superkritická fluidní extrakce
- Extrakce chemickými rozpouštědly

2.7.1. Destilace vodní parou

Tato metoda je používána především pro farmaceutické účely, slouží pro destilaci málo těkavých látek, které se s vodou nemísí, nebo jsou v ní nepatrně rozpustné a není nutné je zahřívat na jejich bod varu. Využívá vodní páry, která vstřebává vonné silice a vynáší je směrem vzhůru. ^{[11],[13]}

U destilace se musí klást důraz na teplotu procesu, kdy právě správná kvalita získaných olejů je závislá na hodnotě teploty. Vyšší teplota umožňuje vyšší výtěžnost, avšak na úkor kvality, kdy olej není tak čistý. Parní destilace zaručuje nejlepší výtěžek, čistotu produktu a navíc je relativně jednoduchá a levná. ^[11]

Metoda SD byla porovnáována s metodou HD při výrobě esenciálního oleje z hřebíčku. Podle výsledků studie, metoda SD poskytuje nejvyšší obsah eugenolu v hřebíčkovém oleji (58,2 %) a nejnižší byl získán metodou hydrodestilace (48,8 %). ^[28]

2.7.2. Lisování za studena

Daný proces se uplatňuje především u citrusových plodů, kde jsou éterické oleje obsaženy ve slupce. Metoda lisování je velmi jednoduchý proces, kdy na konci je výsledná směs oleje a vody oddělena centrifugací. ^[11]

2.7.3. Extrakce oxidem uhličitým

Extrakce pomocí kapalného oxidu uhličitého je metoda prováděná za nízké teploty a vysokého tlaku, která vytváří přirozenější organoleptický profil, čímž zaručuje plnohodnotné zachování vonných esencí a kvality oleje. Nevýhodou je finanční a technická náročnost. ^{[11],[29]}

2.7.4. Loužení

Loužení neboli leaching je separace pevného materiálu za působení kapaliny, v níž je daná matrice rozpustná.

2.7.5. Extrakce ultrazvukem

Tradiční extrakční metoda pro pevné vzorky, která je časově náročná a pracná. Vzorek se v ultrazvukové lázni intenzivně pohybuje, a případné shluky částic se rozpadají. ^[30]

2.7.6. Superkritická fluidní extrakce

Metoda využívá superkritické fluidní kapaliny při kritické teplotě a tlaku, které kombinují solvatační sílu kapalin a difuzivitu plynů. Umožňuje rychlejší extrakci, z důvodu nižší viskozity a vyšší difuzivity, rychlejší transport hmoty a efektivnější extrakční účinnost kapaliny přes vzorek matrice vlivem kontinuálního toku.^[30]

SFE byla testována u výroby esenciálního oleje z hřebíčku pod vlivem různých parametrů, jako je teplota, tlak a velikost částic. Výsledky ukazují, že teplota má největší vliv na obsah eugenolu v extraktu a velikost částic na maximální výtěžnost esenciálního oleje. Bylo dokázáno, že SFE bylo získáno největší množství látky eugenol acetátu z hřebíčku, která je účinnou antioxidační látkou.^[28]

2.7.7. Extrakce chemickými rozpouštědly

Metoda se začala využívat až kolem 20. století, rostliny jsou smíchány s rozpouštědlem jako je např. aceton, ethanol, petroléter nebo chloroform. Extrakce je založena na rozpustnosti silic v nízkovroucích rozpouštědlech. Extrahovadlo musí dobře pronikat materiálem a nesmí se mísit s vodou. Po extrakci se rozpouštědlo odpaří za nízké teploty a vakua. Organická rozpouštědla extrahují kromě silic také vosky a barviva, což komplikuje samotnou výrobu.^[12]

Mohamed Hussain a kol (2013) testovali antioxidační aktivitu u šalvěže, tymiánu a majoránky extrahované v methanolu, ethanolu, diethyetheru a hexanu. Nejlepší výtěžnost extraktu byla získána extrakcí v methanolu, následoval ethanol, diethylether a hexan. Více polární rozpouštědla jsou účinnější při získávání fenolických látek z rostlinných materiálů než méně polární.^[34]

3. Mikrobiologické metody

3.1. Metody pro stanovení antimikrobiální aktivity

Antibakteriální látky jsou schopné potlačit růst určitého patogenního mikroorganismu. Pro jejich detekci slouží několik metod, které jsou založeny na stejném principu. Z toho důvodu se výsledky liší podle typu použitého mikroorganismu, sloučenin vykazující antimikrobiální aktivitu, způsobu jejich extrakce nebo rozpustnosti.^[35] Metody pro stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám dělíme na kvantitativní a kvalitativní.

3.1.1. Kvalitativní metody

Mezi kvalitativní metody patří především difuzní testy, které stanovují semikvantitativní citlivost bakterií k antimikrobiálním látkám.^[26]

Disková difuzní metoda

Disková metoda slouží pro stanovení citlivosti vybraného mikrobiálního kmene k antibakteriálním látkám. Agarová plotna je naočkována vhodnou koncentrací testovaného mikroorganismu. Jde o velmi jednoduchou metodu, založenou na difuzi antimikrobiální látky napuštěné v papírovém disku do agarové půdy. Dochází k množení a růstu bakterií, který se postupně v přítomnosti antimikrobiální látky inhibuje. Absorpcí vody z půdy se látka rozpouští a následně difunduje do média, čímž kolem disku vzniká koncentrační gradient účinné látky tzv. inhibiční zóna. Na její velikost má vliv druh testovaného mikroorganismu, jeho citlivost k antimikrobiálním látkám, fyzikální vlastnosti půdy a rychlost růstu mikroorganismu.^{[26],[36]}

Perianayagam a kol. (2012) testovali metodou diskového difuzního testu antimikrobiální aktivitu ethanového extraktu *Trichodesmy indicum* a jejich izolovaných sloučenin. Mezi testovanými mikroorganismy, jejichž růst byl úspěšně inhibován, byly bakterie *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, plísně *Aspergillus niger* a *Aspergillus flavus*.^[37]

Lu a kol. (2011) porovnávali antibakteriální účinek různých druhů koření proti *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus auerus* a *Saccharomyces cerevisiae*. Esenciální olej z oregana vykazoval nejvyšší účinek vůči všem mikroorganismům, bazalka projevovala antimikrobiální aktivitu u gram-pozitivních bakterií *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*. EOs bazalky a oregana byl podrobeny také analýze pomocí GC/MS, která prokázala, že za antimikrobiální aktivitu odpovídají fenoly a terpeny.^[38]

Celiktas a kol. (2007) testovali difuzní diskovou metodou silice a methanolové extrakty rozmarýnu lékařského proti *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonie*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* a *Candida albicans*. Methanolové extrakty vykazovaly velmi nízkou aktivitu u *S. aureus*, u ostatních MO byly neaktivní. Samotné silice byly nejvíce citlivé pro *E. faecalis* a *P. vulgaris*.^[39]

Agarová difuzní metoda

Podstata metody je podobná jako u diskové difuzní metody, s tím rozdílem, že antimikrobiální látka se aplikuje do připravených vyhloubených jamek v agarové plotně. [36]

Dorman a Deans (2000) zjistili, že thymol, karvakrol a eugenol vykazují baktericidní a bakteriostatické účinky. Agarovým difuzním testem potvrdili aktivitu eugenolu proti devíti gram-pozitivním bakteriím a šestnácti gram-negativním. [40]

3.1.2. Kvantitativní metody

Mezi kvantitativní metody patří diluční metody, které stanovují množství antimikrobiální látky účinné pro inhibici růstu mikroorganismu tzv. minimální inhibiční koncentrace (MIC) nebo pro jejich usmrcení tzv. minimální baktericidní koncentrace (MBC).

Agarová diluční metoda

Vybrané testované kmeny se aplikují na Mueller-Hintonovův agar, kdy každá plotna má přesně definovanou koncentraci antimikrobiálních látek. Na jednotlivé plotně se může současně testovat 36 různých kmenů. Obvykle se testuje 12 – 15 účinných látek, které se dvojnásobně ředí geometrickou řadou. Na agarové plotny se aplikuje připravené testované inokulum a po ukončení doby inkubace se odečítá nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která inhibovala růst testovaného kmene. [26]

Klančnik a kol. (2010) použili diskovou difuzní a diluční metodu pro stanovení antimikrobiálního účinku ethanolového extraktu rozmarýnu u gram-pozitivních bakterií (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*) a gram-negativních bakterií (*Salmonella infantis*, *Escherichia coli* O157: H7, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*). [35]

Lu a kol. (2011) testovali antibakteriální aktivitu synergického účinku skořice a hřebíčku proti třem gram-pozitivním bakteriím (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* a *Staphylococcus aureus*) a dvěma gram-negativním bakteriím (*Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium*). Aditivní účinek byl nejvyšší u *Bacillus subtilis* a *Bacillus cereus*. [41]

Bujónová diluční metoda

Metoda se testuje ve zkumavkách s objemem větším než 1 ml, které obsahují sestupnou koncentraci antimikrobiální látky při použití růstového média Mueller-Hintonova bujónu s upravenou koncentrací hořčíku a vápníku. Testované inokulum se připravuje o optické hustotě 0,5 dle McFarlanda. Danou metodou můžeme hodnotit citlivost jednoho druhu mikroorganismu k více antimikrobiálním látkám. Po ukončení inkubace se hodnotí nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, kde nevznikl žádný zákal, tedy nedošlo k růstu mikroorganismu. [26]

Becerill a kol. (2007) použili diluční metodu při testování antimikrobiálních účinků obalových materiálů obsahujících skořici nebo oregano proti *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Antimikrobiální obal měl vysokou účinnost, což podporuje jejich potenciální využití jako materiálu pro balení potravinových výrobků. [42]

Mikrodiluční metoda

Mikrodiluční metoda se provádí v mikrotitračních destičkách o objemu 0,5 ml. Pro každou jamku destičky se připraví zásobní roztoky o různé koncentraci antimikrobiální látky. Tuto metodu lze provádět manuálně nebo automaticky pomocí jehlového inokulátoru. Naočkované destičky se inkubují 16 – 24 hodin při teplotě 37 °C. Růst bakterií se projeví zákalem jamky nebo sedimentem. Opět se stanoví MIC, tedy taková koncentrace, která zabrání růstu mikroorganismu a nedochází k vytvoření zákalu v jamce. ^{[26],[36]}

Skocibusiš a kol. (2004) testovali aktivitu thymolu a karvakrolu, tedy účinných látek tymiánu na bakteriích *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*. Inhibiční účinek byl prokázán u všech testovaných mikroorganismů, kromě *Pseudomonas aeruginosa*. ^[43]

Perianayagam a kol. (2012) využili tuto metodu pro stanovení antimikrobiální aktivity rostliny *Trichodesma indicum*. Výrazná inhibice růstu byla prokázána u bakterie *Staphylococcus epidermis* a *Escherichia coli* a plísní *Aspergillus niger* a *Aspergillus flavus*, kde se MIC pohybovala kolem 38 µg/ml. Nejvyšší však byla u *Pseudomonas aeruginosa* - 76 µg/ml. Nejnižší antimikrobiální účinek byl zaznamenán u *Bacillus subtilis* a *Candida albicans*. ^[37]

Al-Bayati a kol. (2008) mikrodiluční metodou testovali synergický účinek methanoloových extraktů *Thymus vulgaris* a *Pimpinella anisum* proti devíti patogenním bakteriím. Samotný tymián vykazoval inhibici u všech mikroorganismů, nejvíce u *Bacillus cereus* s MIC 15,6 µg/ml a *Staphylococcus aureus*. Synergický účinek byl nejvyšší u *Proteus vulgaris* a *Proteus mirabilis*. Celkově vykazoval vyšší antibakteriální aktivitu tymián, ačkoliv obě rostliny jsou velice bohaté na obsah fenolických sloučenin. ^[44]

3.2. Stanovení růstové křivky

Optimální růst mikroorganismů charakterizuje růstová křivka, která má sigmoidní tvar. Na Obr. 1 je znázorněna růstová křivka, kde na osu x se vynáší doba kultivace a na osu y logaritmus počtu živých buněk. Na počátku dochází k nárůstu buněk mikroorganismů, který po dosažení vrcholu opět klesá. Přírůstek ani úbytek není rovnoměrný. V některých úsecích může být vyšší, jinde nižší, tyto úseky vymezují na křivce růstové fáze. ^{[45],[46]}

Průměrná generační doba bakterií je přibližně 30 minut, u kvasinek se pohybuje od 3 – 3,5 hodiny. Pro růst buněk je nezbytný přísun dostatečného množství živin a to v podobě biogenních (P, S, C, H, N) a stopových prvků. ^{[45],[46]}

Lag-fáze růstu

První fáze růstu začíná při zahájení kultivace a její doba se odvíjí od druhu mikroorganismu a jeho fyziologického stavu. V dané fázi mikroorganismus neroste, pouze se adaptuje na nové podmínky, proto je tato fáze nevýznamná pro průmyslovou výrobu. ^{[45],[46]}

Pokud tedy buňka lag-fázi překoná, nezáleží již na tom, jak dlouho tato fáze trvala, ale v exponenciální fázi se populace chová stejně jako u populace, u které lag-fáze téměř nenastala. ^[46]

Fáze zrychleného růstu

V této fázi se mikroorganismy plně adaptují na podmínky, ve kterých se kultivují. Obvykle se fáze zrychleného růstu spojuje s exponenciální fází růstu. ^[46]

Exponenciální fáze růstu

V dané fázi dochází k intenzivnímu růstu buněk za přítomnosti dostatečného množství živin v médiu. V této fázi jsou produkovány primární metabolity např. ethanol produkovaný kvasinkami nebo kyselina mléčná produkovaná bakteriemi. Jelikož je rychlost růstu větší než rychlost množení, buňky jsou velké a mají protáhlý tvar. Měrná růstová rychlost závisí na druhu mikroorganismu, složení média, zdroji uhlíku, energie, zdroji dusíku, přítomnosti či absenci kyslíku, teplotě a pH živného média. Nezávisí však na koncentraci limitující živiny. Na konci této fáze pak dosahuje rychlost růstu buněk své maximální hodnoty. ^{[45],[46]}

Fáze zpomaleného růstu

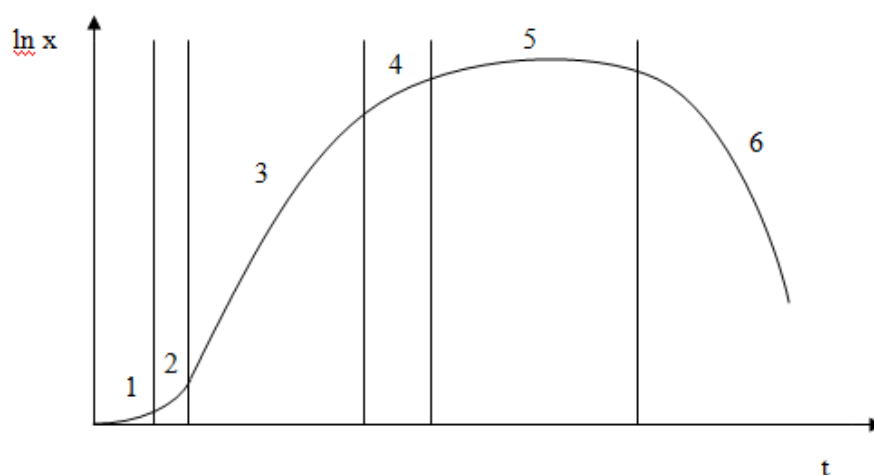
Během fáze dochází k postupnému vyčerpávání živin a v systému se objevuje vliv limitujícího substrátu. Také dochází k hromadění inhibičních metabolických produktů a mikroorganismy ztrácejí postupně schopnost udržovat vysokou měrnou růstovou rychlost. ^{[45],[46]}

Stacionární fáze růstu

V této fázi dochází k vyčerpání živin a nastává zastavení růstu buněčné populace. Z průmyslového hlediska je fáze velmi významná, jelikož dochází k produkci sekundárních metabolitů, kterými jsou např. antibiotika, enzymy nebo vitamíny. Právě vliv limitace některého ze substrátů zde hraje důležitou roli a úmyslné dodání menšího množství může produkci sekundárního produktu urychlit. ^{[30],[31]}

Fáze odumírání buněk

Po stacionární fázi růstu nastává fáze odumírání buněk. Dochází k lyzi buněk a poklesu jejich počtu. ^[45]



Obrázek 1: Růstová křivka buněk mikroorganismu (1-lag-fáze; 2-fáze zrychleného růstu; 3-exponenciální fáze; 4-stacionární fáze; 5-fáze zpomaleného růstu; 6-fáze odumírání)

3.3. Denzitometrie

Denzitometrie je optická metoda, která je určena k měření turbidity roztoků v rozmezí McFarlandovy stupnice. Principem je měření absorpce procházejícího světla, které je zeslabené rozptylem částic. Využívá se pro stanovení citlivosti mikroorganismů vůči antibiotikům, pro určení koncentrace buněk bakterií nebo kvasinek během fermentace, pro měření optické denzitometrie při zvolené vlnové délce.



Obrázek 2: Denzitometr

4. Fenolické sloučeniny

Fenoly jsou organické těkavé sloučeniny obsahující OH skupinu, která je vázaná na aromatickém jádru. Tvoří oxoniové soli, fenoláty a estery. Jsou to aromatické hydroxylované sloučeniny, které vykazují antioxidační a biologickou aktivitu. Polyfenolické sloučeniny se vyskytují běžně v přirozené formě, kdy jsou produkovány rostlinami a živočichy nebo jsou vyráběny synteticky. Surové výtažky z rostlin a koření jsou velice bohaté na rostlinné fenoly. Fenolické látky jsou sekundární metabolity, které jsou deriváty pentafosfátu a fenylpropanoidů u rostlin. Tyto sloučeniny se řadí mezi fytochemikálie a mají značný fyziologický a fytochemický význam v rostlinách. Jsou velmi důležité v reprodukci a růstu rostlin a ochraně před predátory a patogeny. ^{[47], [48],[49]}

Jsou také důležitou součástí lidské stravy, nejvíce se vyskytují v ovoci, zelenině a nápojích. Fenolické sloučeniny koření jsou primárně zodpovědné za baktericidní a bakteriostatické účinky. Také vykazují celou řadu fyziologických účinků jako např. antialergické, antimikrobiální, antioxidační a antitrombotické. Mají velké využití v potravinářském průmyslu, protože dokážou zpomalit oxidační degradaci lipidů a tím zajistit zlepšení kvality nutriční hodnoty potravin. ^{[12],[48],[49]}

4.1. Antioxidační aktivita

Antioxidant je látka, jejíž molekuly omezují aktivitu kyslíkových radikálů. Nejvýznamnější antioxidanty jsou vitamin C, tokoferoly, fenolové látky (flavonoidy, fenolové kyseliny, stilbeny). Antioxidační aktivita je schopnost sloučeniny nebo směsi látek inhibovat oxidační degradaci různých sloučenin. Důležitá je také přítomnost jiných látek ve směsi, které mohou působit synergicky nebo antagonisticky. Antioxidační efekt látky vyplývá z její specifické struktury. U fenolických sloučenin závisí antioxidační účinek na počtu a poloze hydroxylových skupin. Fenoly s jednou hydroxylovou skupinou jsou stabilnější vůči oxidaci. Fenoly obsahující dvě hydroxylové skupiny v poloze ortho a para se oxidují, dochází k porušení aromatického kruhu a vznikají chinony. Antioxidační aktivitu ovlivňuje také přítomnost dalších substituentů, pH systému a stabilita sloučeniny. Funkční skupiny v molekule antioxidantu mají vliv na lipofilně-hydrofilní vlastnost a polaritu molekuly. Z toho důvodu se může lišit účinek antioxidantů v různých dispergovaných potravinových systémech. Obecně jsou lipofilní antioxidanty účinnější v emulzích olej ve vodě a v samotném oleji než antioxidanty hydrofilní povahy. ^{[47], [50],[51],[52]}

Antioxidanty by měly být zdravotně nezávadné, bez chuti a zápachu, účinné v nízkých koncentracích. Významné uplatnění nachází v potravinářství i lékařství pro jejich pozitivní účinky na lidské zdraví, především při prodloužení trvanlivosti potravin, zabránění vzniku nežádoucích vůní a chutí, čímž se dosahuje vyšší nutriční hodnoty potraviny. Antioxidační vlastnosti fenolických sloučenin hrají důležitou roli i ve stabilitě potravinářských výrobků. Dalším významem je prevence proti koronárním onemocněním - snižují riziko nádorových onemocnění. ^{[48],[50],[51]}

Pro hodnocení antioxidační aktivity biologického materiálu byly vypracovány některé metody a postupem času i jejich modifikace. Principem je charakterizace jejich antioxidační účinnosti, jako souhrnné vlastnosti potraviny, v podmínkách blízkých fyziologickému prostředí. Mezi nejznámější a nejpoužívanější metody patří ABTS a DPPH, které se vyznačují

vynikající reprodukovatelností za určitých podmínek, citlivostí a rychlostí. Volný radikál DPPH nevyžaduje žádnou přípravu, ale radikálový kationt ABTS⁺ musí být generován za účasti enzymů nebo chemických reakcí. ^{[51],[53],[54]}

Pro identifikaci fenolických látek v rostlinách slouží metody chromatografie na tenké vrstvě (TLC) a kolonová chromatografie (CC). Pro kvantitativní či kvalitativní stanovení volíme elektromigrační a chromatografické metody jako vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC-MS) a kapilární elektroforéza, která identifikuje fenolické látky a dalších 20 aromatických látek. ^[55]

4.2. Stanovení antioxidační aktivity

Metody, které umožňují stanovení celkové antioxidační aktivity TAC (total antioxidant capacity):

Metoda TEAC - (Trolox equivalent antioxidant capacity)

Jde o metodu využívající činidla, která za účasti iniciace jiné látky přechází ve svou radikálovou formu, která je barevná a relativně stabilní. V přítomnosti antioxidačně aktivních složek extrahovaných ze vzorku potravin se činidlo redukuje, a tím odbarvuje. Rychlost a míra odbarvení jsou úměrné antioxidační aktivitě vzorku. Jako standart se používá askorbát, trolox, galát nebo epikatechin. ^[53]

Metoda FRAP - (Ferric reduction ability of plasma)

Metoda je založena na redukci železitých komplexů ze vzorku antioxidanty TPTZ 2,4,6-tri-(2-pyridyl-1,3,5-triazin) s hexokyanatanem draselným nebo chloridem draselným, které jsou téměř bezbarvé. Po redukci a reakci s dalším činidlem vyváří barevné produkty modrého zbarvení, např. berlínská modř. ^[52]

Metoda ORAC - (Oxygen radical absorbance capacity)

Další metoda spočívá ve vytvoření peroxylového radikálu fykoeritrinu, pomocí jeho oxidace za účasti činidla ABAP (2,2'- azobis-2-methyl- propionamidin). Radikál se určuje kvantitativně fluorimetricky. Vyhodnocení je na základě rychlosti úbytku signálu po přidání testovaného vzorku. ^[53]

Metoda ABTS (2,29-azinobis-(3-etylbenzotiazoline- 6-sulfonová kyselina))

Je to nejpoužívanější metoda pro stanovení celkové antioxidační aktivity. Využívá činidla, které za účasti iniciace jiné látky přechází ve svou radikálovou formu, která je barevná a relativně stabilní. V přítomnosti antioxidačně aktivních složek extrahovaných ze vzorku potravin se redukuje, a tím odbarvuje. Vzorek je testován na schopnosti zhaset kation radikál ABTS⁺ (2,2'-azinobis (3-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). Zhasení radikálu ABTS⁺ antioxidanty, které se chovají jako donory vodíku, měříme spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm na základě změny absorpčního spektra ABTS⁺. Metoda je velmi rychlá, jednoduchá a umožňuje široké hodnocení antioxidační aktivity různých látek i směsných vzorků. ^{[53],[56]}

Lu and kol. (2011) studovali metodou ABTS antioxidační účinnost 19 druhů koření. Nejlepší antioxidační kapacitu měl galangal (u nás známý jako zázvor), který také obsahoval

nejvíce fenolických sloučenin. Dále následovala skořice a bobkový list. Nejnižší antioxidační účinnost naopak vykazoval bílý pepř. ^[48]

Metoda DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazylu)

Slouží pro stanovení antiradikálové aktivity čistých látek, izolovaných přírodních látek, rostlinných látek a potravin. Přítomnost antioxidantů reaguje s barevným stabilním radikálem 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylu, který se redukuje na bezbarvou neutrální formu. Rychlost a pokles absorbance jsou úměrné antioxidační účinnosti testované látky. Pro stanovení lze využívat spektrofotometrii, spinovou elektronovou rezonanci nebo HPLC, která se používá hlavně u barevných vzorků. ^[56]

Mohamed Hussain a kol (2013) testovali antioxidační aktivitu metodou DPPH u šalvěže, tymiánu a majoránky extrahované v methanolu, ethanolu, diethyetheru a hexanu. Na základě výsledků antioxidační aktivity mají všechny methanолоvé extrakty potenciální využití jako přírodní antioxidanty. Methanолоvý extrakt tymiánu však vykazoval nejvyšší antioxidační účinek. ^[34]

Antioxidační kapacitu kůry skořice pomocí DPPH testovali Mathew a kol. (2006). Výsledky ukázaly vysokou účinnost likvidace volných radikálů ve všech zvolených koncentracích u methanолоvých extraktů. ^[54]

HPLC (vysokoučinná kapalinová chromatografie)

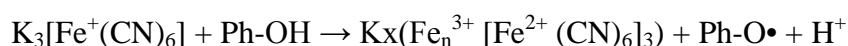
Při použití analýzy HPLC s elektrochemickou detekcí lze přesně a citlivě detekovat elektroaktivní látky. Principem je vložení potenciálu na pracovní elektrodu detektoru a oxidace látky při daném potenciálu. Objeví se pík, podle kterého můžeme v retenčním čase charakterizovat látku. Metoda může identifikovat komplexní směsi a jejich jednotlivé účinné antioxidační komponenty na základě hodnoty potenciálu vložené na elektrodu. HPLC-ECD může korelovat při stanovení celkové antioxidační aktivity i s jinými metodami např. DPPH. ^[56]

4.3. Metody pro stanovení celkového obsahu fenolů

Metoda PBM (Price and Buthler method)

Principem metody je oxidace anion fenolátu na radikál fenolátu, čímž dochází současně k redukci hexakynoželezitanu na hexakynoželeznan. Vzniká modrý komplex např. berlínská modř. ^[57]

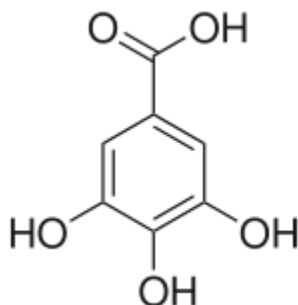
Rovnice:



Stanovení za účasti Folin-Ciocalteho činidla

Tato spektrofotometrická metoda se využívá pro celkové stanovení antioxidační aktivity. Je založena na oxidaci fenolických látek v alkalickém prostředí, kdy ze žluté fosfowolframové heteropolykyseliny vzniká modrý komplex, jehož maximální absorpce je závislá na kvantitativním a kvalitativním složení fenolických směsí. Folin-Ciocalteho činidlo neobsahuje fenol, ale obsahuje sloučeniny, které jsou schopny reagovat s fenolickými sloučeninami. Při reakci dochází k redukci látky na chromogeny, které jsou měřeny při absorbanci v rozmezí vlnových délek 700 – 760 nm. Velmi důležitá je však koncentrace alkoholu přítomná

v reakční směsi. Použití jiného rozpouštědla než je voda, může mít vliv na výsledné modré zabarvení směsi. Jako standart slouží kyselina gallová. Výsledná hodnota se přepočítává na ekvivalentní množství kyseliny gallové. ^{[57],[58]}



Obrázek 3: kyselina gallová

Stratil a kol (2008) studovali metodou FCM obsah fenolických sloučenin v několika odrůdách bílého a červeného vína. Průměrné hodnoty fenolů u bílých vín se pohybovaly kolem 103 – 125 mg/l GAE. Hodnoty u červených vín obsahovaly 10 – 15 krát vyšší obsah fenolů. Tento rozdíl naznačuje, že antokyany tvoří nejdůležitější část fenolických sloučenin u červených vín. ^[57]

Mohamed Hussain a kol (2013) testovali extrakty šalvěže, tymiánu a majoránky na obsah fenolických sloučenin. Výsledky ukázaly, že methanolové extrakty všech koření vykazují dostatečnou antioxidační aktivitu a mají potenciální využití jako přírodní antioxidanty. Nejvyšší obsah fenolických sloučenin byl zjištěn u methanolového extraktu tymiánu 8,1 mg GAE/g suché rostliny. ^[34]

V další studii Lu a kol. (2011) zjišťovali obsah fenolických látek u 19 druhů koření, které se pohybovaly v rozmezí 3,5 – 58,3 mg GAE/g sušené rostliny. Nejvyšší úroveň fenolů byla nalezena v zázvoru a nejnižší u bílého pepře a fenyklu. Vysoký obsah fenolů byl zaznamenán i u skořice a bobkového listu. ^[59]

5. Charakteristika vybraných druhů koření

5.1. SKOŘICE MLETÁ – *Cinnamomum zeylanicum*

5.1.1. Historie, původ, rozšíření

Cinnamomum zeylanicum pochází z ostrova Srí Lanka (dříve nazývaný Ceylon). Kultura se také rozšířila na indický poloostrov a do jihozápadní Asie, Číny, Vietnamu a později do Ameriky, zejména Brazílie. ^[60]

5.1.2. Botanický popis

Skořicovník cejlonský je stálezelený tropický strom s aromatickou kůrou, který dorůstá výšky až 15 metrů. V kultuře dorůstá vzhledem k seřezávání listů, pouze do výšky 2,5 – 3 metrů. Vyznačuje se oválnými řapíkatými listy, svrchu lesklé, zespu do šedozelené, celokrajné s délkou až 15 cm. Viditelné jsou výrazné žilky, které vycházejí ze spodiny a sbíhají se na vrcholu. Skořicovník se vyznačuje drobnými, vonnými, bílými květy, které jsou sestavené do vrcholíků. Plodem je vejčitá bobule. V době zralosti jsou modročerné a obsahují hnědé semeno. ^[60]

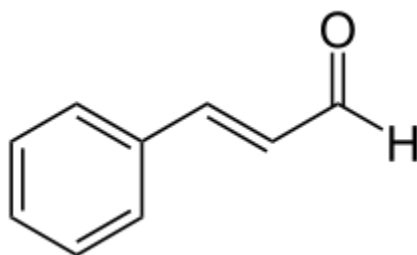
Skořicovník vyžaduje lehké a výživné půdy. Musí mít dostatek dešťových srážek a průměrné roční teploty kolem 27 – 30°C. ^[60]

5.1.3. Využití

Cejlonská skořice se používá hlavně v potravinářství, výhradně do sladkých pokrmů, moučníků nebo jako ingredience do svařeného vína. Užití našla též v likérnictví, vinařství a v medicíně zejména jako žaludeční lék. Podporuje trávení, léčí průjem a zvyšuje apetit. Olej z kůry skořicovníku má silné antiseptické účinky. Skořicový olej má jemnou vůni, která se využívá k aromatizaci zubních a farmaceutických výrobků. Kůra skořice také snižuje hladinu cholesterolu v krvi. Hlavní použití tohoto oleje jsou aromatické látky v koření, vůně v mýdlech a insekticidech. ^{[60],[61]}

5.1.4. Přehled účinných látek

Chemické složení olejů se liší v závislosti na části rostliny, která je použita pro destilaci. Většinou jde o monoterpeny, seskviterpeny a jejich kyslíkaté deriváty. Hlavní součástí skořicového oleje jsou z 63 % cinnamaldehyd, 8 % limonen, 7 % eugenol, 5,5 % cinnamaldehyd propylen a 1 – 2 % terpenoidní sloučeniny (α -Pinen, kamfen). Trans-cinnamaldehyd tzv. (2E)-3-fenylprop-2-enal je organická sloučenina, která dodává skořici vůni a chuť. Přirozeně se vyskytuje v kůře skořicovníku cejlonského a dalších druzích skořicovníku (*Cinnamomum*). Esenciální olej skořicové kůry obsahuje okolo 90 % cinnamaldehydu. ^{[2],[61]}



Obrázek 4: vzorec *trans*-cinnamaldehydu ^[1]

5.1.5. Antimikrobiální působení extraktů ze skořice

Skořice je koření velmi bohaté na esenciální oleje a má silnou antimikrobiální aktivitu.

Chao a kol. (2000) testovali antimikrobiální aktivitu 45 esenciálních olejů, z nichž skořicová kůra vykazovala velmi široké spektrum antimikrobiálních vlastností proti bakteriím, kvasinkám a plísním. Esenciální oleje včetně skořice byly testovány proti čtyřem gram-pozitivním bakteriím (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* a *Listeria monocytogenes*), čtyřem gram-negativním bakteriím (*Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella choleraesuis* a *Pseudomonas aeruginosa*), dvěma plísním (*Penicillium islandicum* a *Aspergillus flavus*) a kvasince (*Candida albicans*). ^[41]

Kombinace různých extraktů EOs má potenciál pro zvýšení celkové antimikrobiální aktivity. ^[41] Je však málo studií, které se týkají synergického účinku skořice a jiných EOs.

Vliv skořice a hřebíčku byl zkoumán pomocí agarové metody proti třem gram-pozitivním bakteriím (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*) a dvěma gram-negativním bakteriím (*Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium*). Skořice v kombinaci s hřebíčkem ukázala aditivní účinek proti *B. subtilis*, *B. cereus* a *S. aureus* a nevýrazný vliv proti *E. coli* a *S. typhimurium*. Samotný skořicový olej ukázal nejsilnější antibakteriální účinek proti *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus* a *E. coli*. Tymióvaný olej měl větší antibakteriální aktivitu než olej z hřebíčku proti *B. subtilis*, *B. cereus*, a *S. aureus*. Kombinace skořice a tymiánu ukazuje aditivní účinky proti bakteriím *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus* a *E. coli*. ^[41]

Skořice byla testována difuzním testem proti 21 bakteriím a čtyřem kvasinkám rodu *Candida*. Velmi slibné účinky vykazovala proti *Staphylococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp. a *Pseudomonas aeruginosa*. Dále bylo prokázáno, že cinnamaldehyd vykazuje nejsilnější antimykotickou aktivitu oproti ostatním složkám skořicového oleje. A jako hlavní složka je cinnamaldehyd také velice účinný proti bakteriím *Clostridium* sp., *Pseudomonas* sp. a kvasinkám rodu *Candida*. ^[63]

Burt a kol. (2005) potvrdili antimikrobiální aktivitu synergického působení eugenolu s aldehydem kyseliny skořicové. Jako testované mikroorganismy byly použity *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella hyicus*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus cereus*. ^[1]

Dosavadní studie naznačují, že skořice patří mezi silné antibakteriální látky a v kombinaci s jinou EOs vykazuje aditivní nebo indiferentní účinek proti různým bakteriálním kmenům.

To má za následek zvýšení konzervačního účinku, tedy zvýšení kvality a bezpečnosti potravin. ^[41]

5.2. HŘEBÍČEK VONNÝ – *Syzygium aromaticum*

5.2.1. Historie, původ, rozšíření

Hřebíček pochází původně ze Severních Moluk v Indonésii. Dnes je hojně pěstován na ostrově Pemba, který se Zanzibarem tvoří část státu Tanzanie. ^[60]

5.2.2. Botanický popis

Hřebíčkovce vonný je tropický, stálezelený strom, jehož kmen je pokryt šedavou kůrou. Listy jsou celokrajné, po vyrašení světle žlutozelené barvy, postupem času však zkožovají a získávají tmavozelenou barvu. Květy jsou čtyřčetné, uspořádány ve vrcholičnatých květenstvích. Mají nachově červené zbarvení. Kalich je srostlý a skládá se ze čtyř okvětních plátků. Plodem jsou jedno až dvě semenné bobule eliptického tvaru. Má intenzivní sladkou vůni a silně pálivou chuť. Z květů se lisuje hřebíčková silice - éterický olej. ^[60]

Hřebíčkovce vyžaduje pro svůj optimální růst slunce, vlhkost, humózní půdy a vysokou vzdušnou vlhkost. ^[60]

5.2.3. Využití

Hlavní využití najdeme v gastronomickém průmyslu. Koření má uplatnění též ve farmaceutickém průmyslu, zvláště pak ve stomatologii, kde se používá jako přísada do zubních past a ústních vod. Napomáhá lepšímu trávení a podporuje funkci dýchacích cest. Slouží k léčbě revmatismu a plísňových onemocnění. Má výrazné antiseptické a antibakteriální účinky. Kromě antimikrobiální, antioxidační, protiplísňové a protivirové aktivity, má hřebíček i protizánětlivé, cytotoxické, insekticidní a anestetické vlastnosti. ^{[2],[13]}

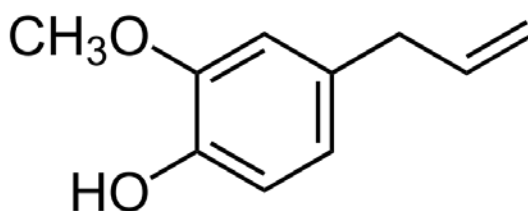
5.2.4. Přehled účinných látek

Aromatické chemikálie přítomné v listech, květech a pupenech hřebíčku mají velmi prospěšné účinky na zdraví člověka. Léčivé vlastnosti těchto aromátů, jako je antioxidační aktivita, byly zjištěny v poslední době. ^[3]

Hlavními sloučeninami hřebíčkového oleje jsou fenylypropanoidy jako eugenol (76,8 %), β -karyofylen (17,4 %), ahumulén (2,1 %), a eugenyl acetát (1,2 %). ^[2]

Eugenol je odpovědný za vůni pupenů hřebíčku, byla u něj zjištěna antimykotická aktivita, antiseptické a mírně omamující účinky. Eugenol jako hlavní složka hřebíčku z *Eugenia aromatica* je dlouho známý pro své analgetické, protizánětlivé účinky a jako lokální anestetikum. Je známým antibakteriálním prostředkem proti patogenům, včetně *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus sakei* a *Helicobacter pylori*. Tato fenolová sloučenina může denaturovat

bílkoviny a reaguje s fosfolipidy buněčných membrán, což má za následek změnu jejich propustnosti. ^{[2],[3],[28],[60]}



Obrázek 5: eugenol ^[1]

5.2.5. Antimikrobiální působení extraktů z hřebíčku

Hřebíček je zdrojem antimikrobiálních látek, které úspěšně bojují proti bakteriím ústní dutiny, které jsou spojeny se vznikem zubního kazu nebo paradontózy. V této studii, byla diluční metodou stanovena antioxidační aktivita hřebíčku a jeho hlavních sloučenin, eugenolu a β -karyofylenu. Nejsilnější aktivitu proti bakteriím zubního kazu a paradontózy vykazoval hřebíčkový olej a eugenol. ^[2]

Goni a kol. (2008) zjišťovali citlivost různých mikroorganismů proti EOs skořice, hřebíčku a jejich směsi. Byly testovány bakteriální kmeny nacházející se v potravinářském průmyslu. Z gram-negativních bakterií byly vybrány *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella choleraesuis* a *Pseudomonas aeruginosa*, z gram-pozitivních to byly bakterie *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus aureus*. ^[64]

K testování antimikrobiální aktivity byly použity agarové difuzní testy a testy difuze par. Esenciální olej byl zředěn v ethylétheru k získání sériového ředění a aplikován na sterilní disky. Petriho misky se pak utěsnily sterilní lepicí páskou, protože experimenty byly navrženy tak, aby simulovaly nejhorší situaci, kdy únik aktivních složek může pravděpodobně způsobit zvyšující kontaminaci mikroorganismů. Kontrola byla připravena aplikací 10 μ l ethylétheru na papírový disk v Petriho misce, kde bylo ověřeno, že přítomnost ethylétheru nijak neovlivňuje životaschopnost některé bakteriální kultury. ^[64]

Agarovou difuzní metodou byl testován synergický účinek skořice a hřebíčku. Největší inhibiční účinek byl viditelný u *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica* a *Enterococcus faecalis*. Naopak nejmenší účinek se projevil proti *Pseudomonas aeruginosa*. U testu difuzních par měl největší antimikrobiální působení hřebíček u *Escherichia coli* a *Listeria monocytogenes*. ^[64]

V další studii Ali a kol. (2005) posuzovali *in vitro* účinky eugenolu a cinnamaldehydu, proti *Helicobacter pylori* při různých hodnotách pH. Agar diluční metodou byla stanovena citlivost jednotlivých izolátů. Eugenol a cinnamaldehyd inhibovaly všech 30 kmenů *H. pylori*. Izoláty *H. pylori* v dané studii přežili při pH 4, v jiném experimentu i při pH 3. To je způsobeno jejich adaptací na různý stupeň kyselého prostředí žaludku pomocí syntézy ureázy, která kolem nich vytváří neutrální pH. Baktericidní účinky testovaných látek měly tedy vyšší aktivitu v kyselém prostředí. ^[65]

Sanla-Ead a kol. (2011) studovali potenciální využití eugenolu a cinnamaldehydu pro přípravu potravinových obalových materiálů. MIC obou sloučenin byla testována agarovou diluční metodou. Cinnamaldehyd a eugenol byly začleněny do obalového filmu na bázi celulózy a byla testována jejich antimikrobiální aktivita proti 10 patogenním MO a kvasinkám. Obě látky v koncentraci 0,78 – 50 µl/ml inhibovaly všechny testované MO. Nejvíce citlivé na testované sloučeniny byly *Aeromonas hydrophila* a *Enterococcus faecalis*. Celkově cinnamaldehyd ukázal nižší MIC než eugenol. ^[66]

5.3. ZÁZVOR OBECNÝ – *Zingiber officinalis*

5.3.1. Historie, původ rozšíření

Zázvor pochází pravděpodobně z Indie a od 16. století se rozšířil i do karibské oblasti a západní Afriky, kde se pěstuje. Ve volné přírodě se nenachází. ^[64]

5.3.2. Botanický popis

Zázvor se řadí mezi čeleď *Zingiberaceae*. Je to vysoká vytrvalá rostlina, dorůstající do výšky 3 – 4 metrů. Má dužnatý, hlízovitý, členovitý oddenek, ze kterého každoročně vyrůstají přímé, štíhlé a přisedlé listy. Krátká, hustá květenství ve formě klasu vyrůstají na koncích asi třicetcentimetrových stvolů, které jsou bezlisté, objaté blanitými pochvami. Okvětí je srostlé a světle fialové barvy. Plodem je trojpodzdrá mnohosemenná tobolka, která nikdy nedozrává. ^{[64],[67]}

Pro optimální růst vyžaduje teplé podnebí a vlhkou půdu. ^[67]

5.3.3. Využití

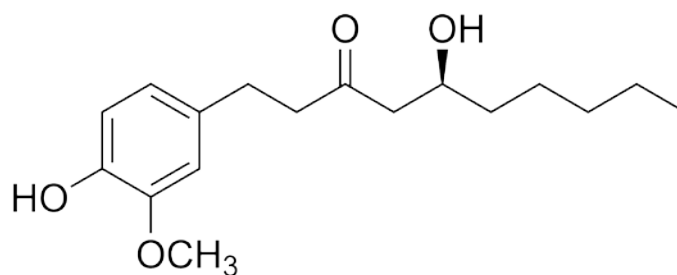
Od starověku je hojně využíván proti širokému spektru onemocnění, jako je revmatismus, onemocnění kloubů, poruchy trávení, zvracení, horečka, hypertenze a infekční nemoci. ^[67]

Zázvor má protizánětlivé a antibakteriální účinky. Podporuje prevenci proti nachlazení, žaludečním nevolnostem a bolesti hlavy. Gingerol pozitivně ovlivňuje nádorové onemocnění (rakovina střev, vaječníku a slinivky břišní). Zázvor je hojně využíván v kosmetickém průmyslu, pro výrobu parfému, šamponů a koupelových olejů, které mají dezinfekční účinky a efektivně prokrvují pokožku. Je velice bohatý na draslík, hořčík, měď, mangan a vitamin B₆. Příznivě působí proti potlačení rakoviny, při žaludečních a těhotenských nevolnostech. Z oddenků zázvoru se varí pivo, čaj i limonáda. ^[68]

5.3.4. Přehled účinných látek

Obsahuje především terpeny (aromatické a organické látky). Za vůni je zodpovědná silice zingiberen. Aktivní složkou zázvoru je gingerol, organická sloučenina, která dodává ostrou a výraznou chuť a je zodpovědná za terapeutické a antikarcinogenní vlastnosti. Při vysoké teplotě se gingerol mění na zingeron, což je aromatická látka, která nachází uplatnění v potravinářském průmyslu. ^[68]

6-gingerol je izolován z oddenků nebo kořenů zázvoru pomocí ethanolu a jiných organických rozpouštědlech. ^[67]



Obrázek 6: gingerol ^[69]

5.3.5. Antimikrobiální působení extraktů ze zázvoru

Podle řady studií vykazuje gingerol antimikrobiální, farmaceutické a fungicidní vlastnosti. Bylo dále prokázáno, že extrakty zázvoru v ethanolu a n-hexanu úspěšně inhibují 3 gram-negativní bakterie *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* a *Prevotella intermedia*, které způsobují onemocnění parodontu. ^[69]

V další studii bylo zjištěno, že některé složky zázvoru (6-, 8- a 10- gingerol) inhibují funkci anti-serotoninu, což má za následek změny působení v gastrointestinální a centrální nervové soustavě. ^[72]

Pozitivní účinek zázvoru potvrdili i Mahady a kol. (2003) testováním *in vitro* proti *Helicobacter pylori*. Methanolvý extrakt zázvoru a z něj izolované složky (6-, 8-, 10-gingerol) inhibovaly všech 19 kmenů *H. pylori*. ^[70]

Auta a kol. (2011) studovali antimikrobiální účinek zázvoru agarovou difuzní metodou proti *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*. *P. aureginosa* byla mnohem citlivější k ethanolovému extraktu zázvoru, proto zde byly zaznamenány větší inhibiční účinky. ^[71]

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1. Použité přístroje

Autokláv PS 50V BMT - Vaposperi
Biologický termostat IP 100-U
Automatická pipeta 100-1000 μ l - HTL, Labmate
Automatická pipeta 20-200 μ l - HTL, Labmate
Laboratorní váhy - SPO 61 SCALTEC, USA
Analytické váhy AND GR-202-EC, Japonsko
Laboratorní třepačka UNIMAX, Heidolph, Německo
Digitální fotoaparát - Olympus C-5060 widezoom
Vakuová odparka
Vortex - Reax Top, Heidolph, Německo
Centrifuga- Ependorf 5417-R
McFarland denzitometr DEN-1B - BIOSAN
Očkovací box AURA mini - BIOAIR
Laboratorní pH metr Inolab pH 720, Merck s.r.o., Brno
Spektrofotometr - UV/VIS HELIOS DELTA - Thermospectronic, Anglie
Sušárna - Binder

6.2. Použité chemikálie

Destilovaná voda
Octan ethylnatý (Lachema, Neratovice)
Ethanol 99,8 % (Riedel-de Haen)
Sladina (STAROBRNO, Brno)
Kyselina gallová (Loba-chemie, Rakousko)
Peroxidisiřan draselný (Spolek pro chemickou a hutní výrobu, Československo)
ABTS diamonná sůl (Sigma Aldrich, Německo)
Kyselina octová (Lachema, Neratovice)
Octan sodný (Lachema, Neratovice)
Chlorid sodný (Lachema, Neratovice)
Hydrogen uhličitán sodný (Lachema, Neratovice)
Pepton (Himedia Lab. Limited, Indie)
Kvasničný extrakt (Himedia Lab. Limited, Indie)
D-glukóza (Lachema, Brno)
Folin-Ciocalteho činidlo (Výrobní divize, Chrudim)

6.3. Použitý materiál

Koření

- Skořice mletá (Thymos, spol. s.r.o., Slovenská republika)
- Hřebíček mletý (Thymos, spol. s.r.o., Slovenská republika)
- Zázvor čerstvý (země původu Čína)
- Zázvor mletý (Vitana, Česká republika)

6.4. Použité mikroorganismy

- *Bacillus subtilis* CCM 1999 použitá bakteriální kultura je ze sbírky Česká sbírka mikroorganismů (CCM), Masarykova Univerzita Brno, Přírodovědecká fakulta, Česká republika.
- *Pichia fermentans* CCY 39-4-2 Sběrka kvasinkových kultur, SAV, Slovensko
- *Aspergillus niger* CCM-F-8189 použitá kultura je ze sbírky Česká sbírka mikroorganismů (CCM), Masarykova Univerzita Brno, Přírodovědecká fakulta, Česká republika

6.5. Kultivační média a jejich příprava

Médium pro kultivaci a uchovávání kvasinek a plísní

M-5: Sladinový agar:

Složení a příprava:

pivovarská sladina ředěná na 7 ° dle Ballinga.....1000 ml
agar20,0 g

Po krátkém rozvaření agaru se sterilizuje autoklávováním při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Hodnota pH připravovaného média má být $4,0 \pm 0,2$. Úprava pH se provádí 0,1 M NaOH nebo 0,1 M HCl.

M-21: Sladinové médium:

Sladina získaná z pivovaru obsahuje asi 16 hmot. % extraktu. Zředí se na 7 až 8 hmot. % extraktu vodou. Obsah extraktu se měří sacharometrem.

Médium pro kultivaci a uchování bakterií

M-2 Masopeptonový agar (MPA)

Složení a příprava:

masový extrakt.....10,0 g
pepton (vyrobený z masa).....10,0 g
chlorid sodný (NaCl).....5,0 g
agar (dle viskozity).....15,0 – 20,0 g
destilovaná voda.....1000 ml
pH.....7,2 – 7,3

Předepsané ingredience se postupně rozpustí v destilované vodě za současného zahřívání buď ve vodní lázni, nebo v Kochově parním hrnci. Potom se upraví pH na hodnotu 7,2 – 7,3 pomocí 0,1 M NaOH nebo 0,1 M HCl. Sterilizuje se v autoklávu po dobu 30 minut za přetlaku 0,1 MPa a při teplotě 121 °C.

Živné médium s přídavkem glukózy (NBG)

Složení a příprava:

pepton.....30g/l
kvasničný extrakt.....10 g/l
chlorid sodný (NaCl).....5 g/l
D-glukóza.....20 g/l

Předepsané ingredience se rozpustí v daném množství destilované vody a výsledná směs se sterilizuje v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 30 minut.

6.6. Použité metody a postupy práce

6.6.1. Stanovení antimikrobiálního účinku

V daném experimentu byly k testování vybraných mikroorganismů (*Bacillus subtilis*, *Pichia fermentans* a *Aspergillus niger*) použity připravené extrakty z koření. Na mikroorganismech (MO) byl testován antimikrobiální účinek extraktů a jejich antioxidační aktivita. Koření bylo extrahováno ve třech různých rozpouštědlech (destilovaná voda, ethanol, octan ethylnatý).

Extrakty byly připraveny z:

- Skořice mletá (S)
- Hřebíček mletý (H)
- Zázvor mletý (ZM)
- Zázvor čerstvý (ZČ)

6.6.2. Příprava extraktů

10 g koření bylo zalito 100 ml destilované vody a extrahováno na třepačce při laboratorní teplotě po dobu 24 hod. Extrakt koření byl poté centrifugován při 8 000 rpm. Supernatant byl slit, přefiltrován přes Büchnerovu nálevku a odpařen na vakuové odparce při teplotě 45°C. Zahuštěný extrakt byl opět rozpuštěn v takovém množství rozpouštědla, aby výsledný zásobní roztok měl koncentraci 0,5 g/ml a ten byl uchován v lednici pro další aplikaci. Stejným způsobem byly připraveny i extrakty v ethanolu a octanu ethylnatém.

6.6.3. Příprava inokula

Byla vytvořena suspenze, kdy 0,5 ml fyziologického roztoku bylo sterilně převedeno do zkumavky s kulturou MO, která byla inkubována v termostatu po dobu 48 hodin. Buňky byly přeneseny do roztoku otíráním kličky o půdu pod hladinou kapaliny. Obsah zkumavek byl zhomogenizován na vortexu a sterilně převeden do Erlenmayerovy baňky, která obsahovala 100 ml média NBG v případě *Bacillus subtilis*. Připravené inokulum se nechalo třepat 3 dny při 160 rpm při laboratorní teplotě. Poté bylo použito pro další experimenty.

6.6.4. Stanovení růstové křivky

Pro stanovení růstové křivky *Bacillus subtilis* bylo použito 6 ml sterilního NBG média a 0,6 ml připraveného inokula *B. subtilis*. L-zkumavky byly dány na třepačku při testovaných otáčkách (100, 150, 200 a 250 rpm), optimální teplotě růstu (30, 35 a 40 °C) a pH (6,5; 7; 7,5 a 8). V různých časových intervalech byly odečítány hodnoty optické hustoty na denzitometru a byla vyhodnocena růstová křivka.

6.6.5. Testování antimikrobiálních účinků extraktů z koření

Pro stanovení antimikrobiální aktivity jednotlivých extraktů z koření při testování na vybraných mikroorganismech byly použity dvě metody - diskový difuzní test a bujónový diluční test. Účinnost esenciálního oleje byla vypočítána na základě měření průměru (v mm) zóny inhibice růstu mikroorganismů na disku i kolem vzniklé inhibiční zóny. U diluční metody byla hodnocena minimální inhibiční koncentrace (MIC), která je definována jako nejnižší koncentrace éterických olejů, při které dochází k potlačení viditelného růstu mikroorganismu.

6.6.5.1. Diskový difuzní test

Mikroorganismy byly oživeny za zásobních kultur na šikmém agaru. Narostlé buňky byly rozsuspendovány v 5 ml sterilního fyziologického roztoku a výsledná suspenze byla promíchána na vortexu. Suspenze byla aplikována na připravené Petriho misky v objemu 0,5 ml a rozetřena hokejkou. Na naočkované agarové plotny byly postupně nanášeny vždy 4 vysterilizované papírové disky o průměru 0,5 cm, které byly postupně namáčeny v připravených extraktech koření. Experiment byl proveden dvakrát a byla stanovena průměrná hodnota inhibiční zóny a směrodatná odchylka. Kultury *Bacillus subtilis* a *Aspergillus niger* byly inkubovány v termostatu při teplotě 30 °C a kultura *Pichia fermentans* při teplotě 28 °C po dobu 24 hod. Po prvním dnu inkubace byly viditelné inhibiční zóny růstu změřeny a fotograficky zdokumentovány.

6.6.5.2. Bujónový diluční test

Do L-zkumavek bylo nepipetováno vždy 6 ml sterilního NBG média. Poté byl aplikován extrakt z koření o výsledné koncentraci 8,3; 12,5 a 17 mg/ml. Nakonec bylo přidáno připravené inokulum *B. subtilis* o objemu 0,6 ml. L-zkumavky byly dány na třepačku při 250 rpm a teplotě 35 °C. Při zvolených časových intervalech po dobu 5 dní byla měřena optická hustota pomocí denzitometru v kapalném médiu. Byla vyhodnocena růstová křivka a MIC, jako nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která inhibuje viditelný růst.

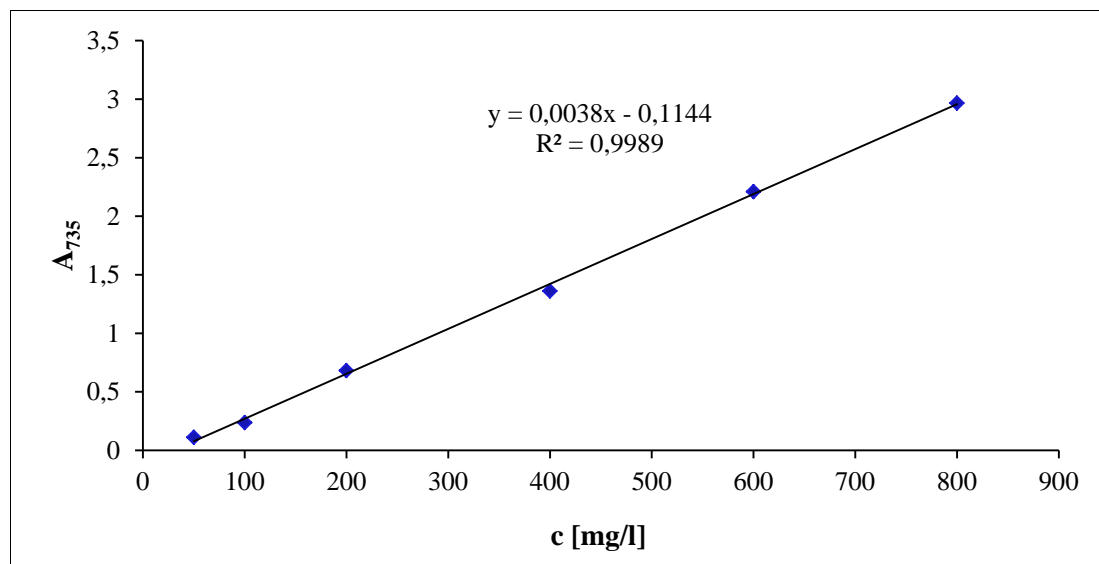
6.6.6. Stanovení celkové obsahu fenolických sloučenin

Příprava standardu

Byla připravena kalibrační křivka kyseliny gallové o koncentracích 50, 100, 200, 400, 600 a 800 mg·l⁻¹. Pro její stanovení byl použit stejný postup jako u extraktu, kdy byly k reakční směsi přidávány připravené koncentrace kyseliny gallové. Absorbance jednotlivých koncentrací byla měřena při vlnové délce $\lambda=735$ nm. Byla sestrojena kalibrační křivka v závislosti absorbance na koncentraci kyseliny gallové (mg·l⁻¹).

Tabulka 2: Jednotlivé objemy použitých činidel pro metodu FCM

Činidlo	V [ml]
Folin-Ciocalteho	0,5
Extrakt koření	0,5
Uhličitan sodný (20%)	1,5
Destilovaná voda	7,5



Graf 1: Vyjádření závislosti změny absorbance na množství kyseliny gallové

Celkový obsah fenolů u extraktů koření byl stanoven pomocí Folin-Ciocalteho činidla. Do 10 ml odměrné baňky bylo nepipetováno 0,5 ml extraktu, dále 0,5 ml Folin-Ciocalteho činidla a po třech minutách bylo přidáno 1,5 ml 20 % uhličitanu sodného (Tab. 2). Celkový objem baňky byl doplněn destilovanou vodou po rysku. Reakcí fenolických sloučenin s činidlem vzniklo modré zbarvení, jehož intenzita byla po dvou hodinách změřena na spektrofotometru při vlnové délce 735 nm proti slepému vzorku (místo extraktu bylo použito 0,5 ml destilované vody).

Celkové množství fenolických látek bylo vypočteno pomocí kalibrační křivky, která byla sestavena pro standardní roztok kyseliny gallové. Výsledná absorbance analyzovaného vzorku byla vyjádřena jako $\text{GAE} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Gallic Acid Equivalents), ekvivalentní množství kyseliny gallové na 1 kg vzorku.

6.6.7. Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Radikál kationtu ABTS byl připraven reakcí ABTS diamonné soli s peroxodisíranem draselným. Byl připraven roztok ABTS o $c = 3,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ navážením 0,096 g ABTS, které bylo rozpuštěno v 50 ml destilované vody. Roztok $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ o $c = 0,06 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl připraven navážením 0,405 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ a rozpuštěn v 25 ml destilované vody. Výsledné roztoky byly smíchány v poměru 50:1 (ABTS: $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). Vzniklý roztok byl ponechán 16 hodin reagovat bez přítomnosti světla při laboratorní teplotě. Po uplynulé době byl roztok smíchán s čerstvě připraveným octanovým pufrům o pH 4,3 v poměru 39:1 (pufr:ABTS).

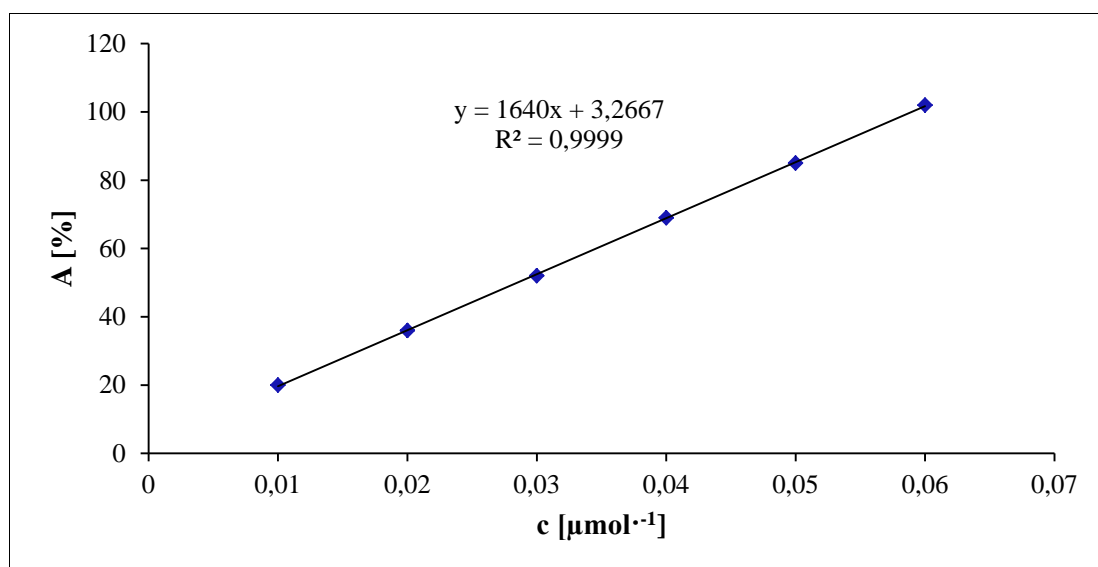
Do zkumavky byly pipetovány 2 ml reakční směsi a 25 μl extraktu. Roztok byl ponechán reagovat po dobu 30 minut a poté byl změřen úbytek absorbance při vlnové délce $\lambda = 734 \text{ nm}$. Absorbance reakční směsi byla měřena spektrofotometricky, jako blank byl použit octanový pufr. Úbytek absorbance byl vyjádřen v % a stanovením kalibrační křivky přepočten na ekvivalentní množství kyseliny gallové.

Příprava pufru o pH 4,3

Octanový pufr o pH 4,2 byl připraven smícháním 36,8 ml kyseliny octové (11,55 ml/1000 ml) a 13,2 ml octanu sodného (16,4 g $C_2H_3O_2Na$ /1000 ml). Potřebná hodnota pH 4,3 se získala úpravou pomocí octanu sodného.

Příprava standardu

Postup pro sestavení kalibrační křivky byl stejný jako při přípravě reakčního roztoku s analyzovaným vzorkem. Ředěním kyseliny gallové byly připraveny koncentrace 0,01 – 0,06 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, které byly přidávány k reakční směsi místo analyzovaného vzorku a následně byla měřena jejich absorbance.



Graf 2: Vyjádření závislosti úbytku absorbance na množství kyseliny gallové

7. VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem práce bylo zkoumání vlivu extraktů z vybraných druhů koření na růst a rozmnožování testovaných mikroorganismů pomocí dvou metod - kvalitativního diskového difuzního testu a kvantitativní bujónové diluční metody. Dalším krokem bylo stanovení celkového obsahu polyfenolických látek a určení antioxidační aktivity připravených extraktů skořice, hřebíčku a zázvoru.

7.1. Stanovení celkové obsahu polyfenolů

7.1.1. Metoda FCM

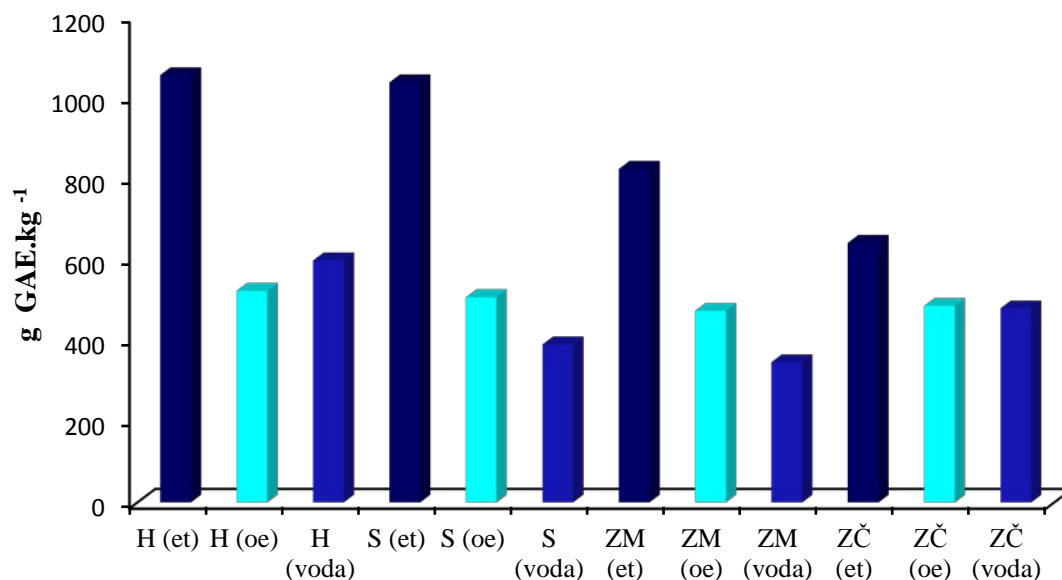
Celkový obsah polyfenolů byl stanoven za použití Folin-Ciocalteho činidla. Principem metody je redukce fenolických sloučenin obsažených v extraktech skořice, hřebíčku, zázvoru mletého i čerstvého v destilované vodě, ethanolu a octanu ethylnatém. Každý vzorek byl změřen třikrát a výsledná hodnota obsahu polyfenolických látek byla zprůměrována a byla stanovena směrodatná odchylka. Naměřené výsledky jsou zobrazeny v *Tabulce 3*. Z rovnice lineární regrese kalibrační křivky kyseliny gallové (*Graf 1*) byl vypočítán obsah polyfenolů. Výsledky jsou vyjádřeny v g kyseliny gallové/1 kg vzorků (g GAE·kg⁻¹).

Nejvyšší množství polyfenolů bylo stanoveno v extraktu hřebíčku a skořice v ethanolu (*Graf 3*). Celkově koření extrahované v ethanolu vykazovalo nejvyšší obsah polyfenolů, na rozdíl od octanu ethylnatého, kde vzorky skořice, hřebíčku i zázvoru mletého obsahovaly téměř stejné množství polyfenolů. To je dáno pravděpodobně tím, že více polární rozpouštědla jsou účinnější při získávání fenolických sloučenin z rostlinného materiálu než méně polární. Tento závěr je v korelaci se studií Hossain a kol. (2011), kde methanolové extrakty vykazovaly vyšší koncentraci polyfenolických látek než extrakty v octanu ethylnatém.^[74] Nejnižší obsah polyfenolických látek se projevil u extraktu zázvoru mletého ve vodě. Obecně však koření extrahované ve vodě vykazovalo nejnižší obsah fenolických látek. Tyto výsledky mohou být ovlivněny tím, že extrakty z různých koření mohou obsahovat různé typy a množství fenolických látek.

Tabulka 3: Průměrné hodnoty celkového obsahu polyfenolů proměřených extraktů

Extrakt	Absorbance	FCM (g GAE.kg ⁻¹) ± S.D
Hřebíček (et)	3,951	1058,6 ± 0,5
Hřebíček (oe)	1,898	524,0 ± 0,1
Hřebíček (voda)	2,180	597,5 ± 0,3
Skořice (et)	3,870	1037,5 ± 0,1
Skořice (oe)	1,837	508,2 ± 0,3
Skořice (voda)	1,387	391,0 ± 0,2
Zázvor mletý (et)	3,048	823,5 ± 0,1
Zázvor mletý (oe)	1,708	474,6 ± 0,8
Zázvor mletý (voda)	1,221	347,7 ± 0,3
Zázvor čerstvý (et)	2,348	641,2 ± 0,1
Zázvor čerstvý (oe)	1,755	486,8 ± 0,5
Zázvor čerstvý (voda)	1,732	480,8 ± 0,2

S.D. - směrodatná odchylka, et (ethanol), oe (octan ethylnatý)



Graf 3: Stanovení polyfenolů v jednotlivých extraktech metodou FCM

7.2. Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Radikál kation ABTS byl získán smícháním peroxidisíranu draselného s diamonovou solí. Úbytek absorbance A byl vypočten podle vzorce:

$$A (\%) = A_0 - (A_1/A_0) \cdot 100$$

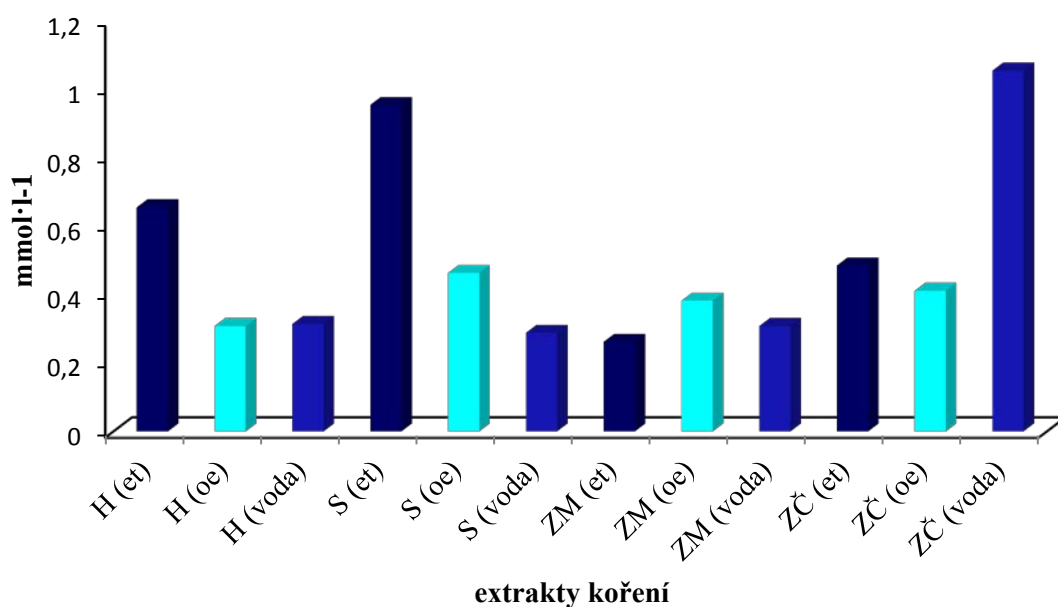
kde A_0 je absorbance reakční směsi a A_1 je absorbance extraktu změřená po 30 minutách. Výsledná závislost úbytku absorbance A_0 na koncentraci kyseliny gallové je znázorněna pomocí kalibrační křivky kyseliny gallové (Graf 2).

Celkem bylo proměřeno metodou ABTS 12 vzorků extraktů skořice, hřebíčku, zázvoru mletého i čerstvého. Každý vzorek byl změřen třikrát a byl vypočítán průměr antioxidační aktivity a směrodatná odchylka. Výsledné hodnoty absorbance a antioxidační aktivity jsou uvedeny v *Tabulce 4*. Na základě regresní rovnice získané z kalibrační křivky byl zjištěn úbytek absorbance extraktu, který byl přepočítán na ekvivalentní množství kyseliny gallové. Podle grafického znázornění (Graf 4) můžeme posoudit, že nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval extrakt zázvoru čerstvého ve vodě a skořice v ethanolu. Zhruba stejnou antioxidační aktivitu vykazovaly extrakty hřebíček (oe), hřebíček (voda), skořice (voda), zázvor mletý (et) a zázvor mletý (voda).

V porovnání s metodou FCM, kde obsah fenolických látek u zázvoru čerstvého (voda) nebyl nijak výrazný je antioxidační aktivita stanovená metodou ABTS nejvyšší. Podle některých studií byla zjištěna pozitivní korelace mezi antioxidační aktivitou a obsahem polyfenolů např. u antokyanů brambor s tím, že především tyto látky mají podstatný význam v antioxidační kapacitě [73]. V našem případě došlo ke korelaci těchto parametrů u extraktů skořice a hřebíčku. Odlišnost výsledků u zázvoru může být způsobena odlišným charakterem polyfenolických látek v tomto koření. Srovnání výsledků s dosud publikovanými studiemi je poměrně obtížné z důvodu použití různých rozpouštědel, metod extrakce i metod pro stanovení antioxidační aktivity.

Tabulka 4: průměrné hodnoty antioxidační aktivity naměřené u jednotlivých extraktů metodou ABTS

Extrakt	Absorbance	ABTS (mmol.kg ⁻¹) ± S.D.
Hřebíček (et)	0,657	0,655 ± 0,005
Hřebíček (oe)	0,310	0,308 ± 0,008
Hřebíček (voda)	0,316	0,314 ± 0,002
Skořice (et)	0,956	0,954 ± 0,003
Skořice (oe)	0,465	0,463 ± 0,001
Skořice (voda)	0,290	0,288 ± 0,002
Zázvor mletý (et)	0,267	0,262 ± 0,001
Zázvor mletý (oe)	0,387	0,382 ± 0,001
Zázvor mletý (voda)	0,311	0,308 ± 0,001
Zázvor čerstvý (et)	0,490	0,485 ± 0,002
Zázvor čerstvý (oe)	0,412	0,411 ± 0,003
Zázvor čerstvý (voda)	1,059	1,054 ± 0,001



Graf 4: Antioxidační aktivita jednotlivých extraktů koření metodou ABTS

7.3. Antimikrobiální účinky extraktů z koření diskovou difuzní metodou

Pro stanovení inhibičních účinků a antimikrobiální aktivity byly testovány tyto extrakty:

- skořice, hřebíček, zázvor čerstvý a zázvor mletý v ethanolu
- skořice, hřebíček, zázvor čerstvý a zázvor mletý v octanu ethylnatém
- skořice, hřebíček, zázvor čerstvý a zázvor mletý ve vodě

Pomocí diskového difuzního testu byl testován jejich inhibiční účinek proti *Bacillus subtilis*, *Pichia fermentans* a *Aspergillus niger* v závislosti na druhu koření a rozpouštědla, ve kterém bylo extrahováno. Uvedené mikroorganismy byly zvoleny pro jejich negativní dopad v potravinářském průmyslu, kdy napadají potraviny a způsobují jejich kazivost, čímž snižují

jejich kvalitu. Kvasinky se uplatňují především ve fermentačních procesech (výroba vína, piva, lihu), kde *Pichia fermentans* způsobuje tzv. křísovatění vína, což výrazně mění chuť a vůni odrudového vína a může docházet k poklesu extraktu vína. Plísně rodu *Aspergillus* se využívají pro průmyslovou výrobu enzymů (pektinázy, lipázy, amylázy) pro potravinářské účely (aplikace při zpracování ovoce a zeleniny), výrobu kyseliny citronové a itakonové. Způsobují onemocnění dýchacích cest, ušní infekce (Otomykóza) plesnivění džemů a chleba, některé druhy produkují mykotoxiny. Bakterie rodu *Bacillus* obsahuje řadu patogenních zástupců, kteří patří mezi původce enterotoxikóz. Antimikrobiální účinky jednotlivých extraktů byly zhodnoceny s ohledem na velikost vzniklých inhibičních zón, které byly jednak změřeny (Tabulka 5, 6, 7) a jednak fotograficky zdokumentovány (Obr. 7 – 9).

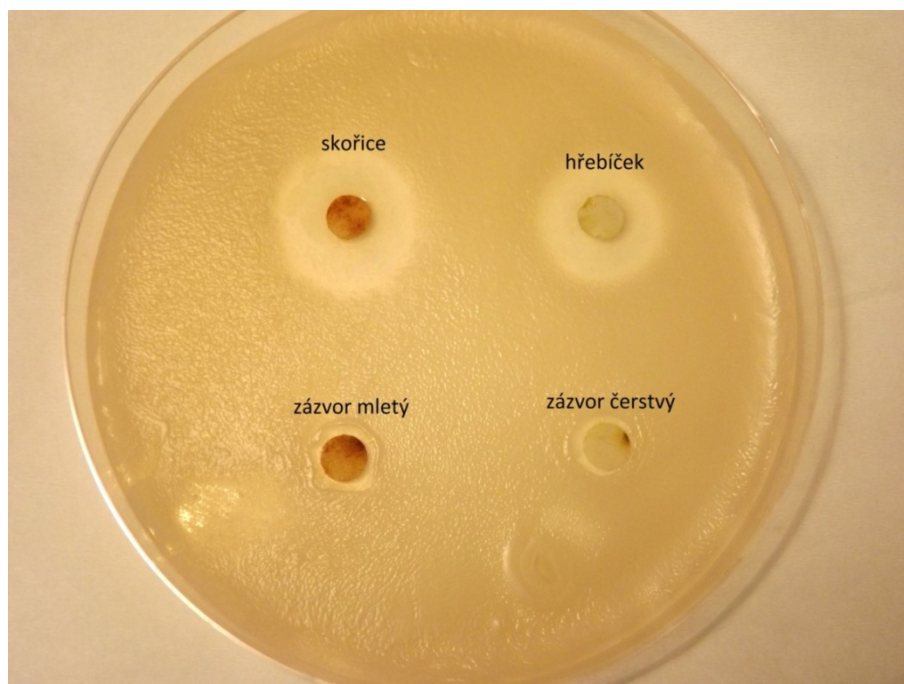
Pichia fermentans

Vyhodnocení inhibičních účinků kvasinky *Pichia fermentans* bylo provedeno na základě vizuálního posouzení agarového dilučního testu (Obr. 7). Potlačení růstu daného mikroorganismu je vidět po aplikaci extraktu skořice a hřebíčku v octanu ethylnatém. U zázvoru mletého (oe) i zázvoru čerstvého (oe) jsou sice inhibiční zóny malé, ale i zde byla prokázána antimikrobiální aktivita daných extraktů. U ethanolových extraktů vykazoval nejvyšší inhibici hřebíček a zázvor mletý. Co se týká vodných extraktů, tak ty prokázaly antimikrobiální účinek pouze u zázvoru čerstvého. Celkově koření extrahované v octanu ethylnatém vykazovalo nejvyšší antimikrobiální aktivitu (Tabulka 5).

Tabulka 5: Velikost naměřených inhibičních zón po aplikaci jednotlivých extraktů u P. fermentans

Koření	Ethanol	Octan ethylnatý	Voda
	Inhibiční zóny [mm]		
Skořice	8,4 ± 0,1	15 ± 0,1	n.d.
Hřebíček	14 ± 0,1	12,5 ± 0,1	n.d.
Zázvor mletý	11,1 ± 0,1	7,5 ± 0,1	n.d.
Zázvor čerstvý	6,5 ± 0,1	7 ± 0,1	7 ± 0,1

n.d. - inhibiční zóna nebyla detekována



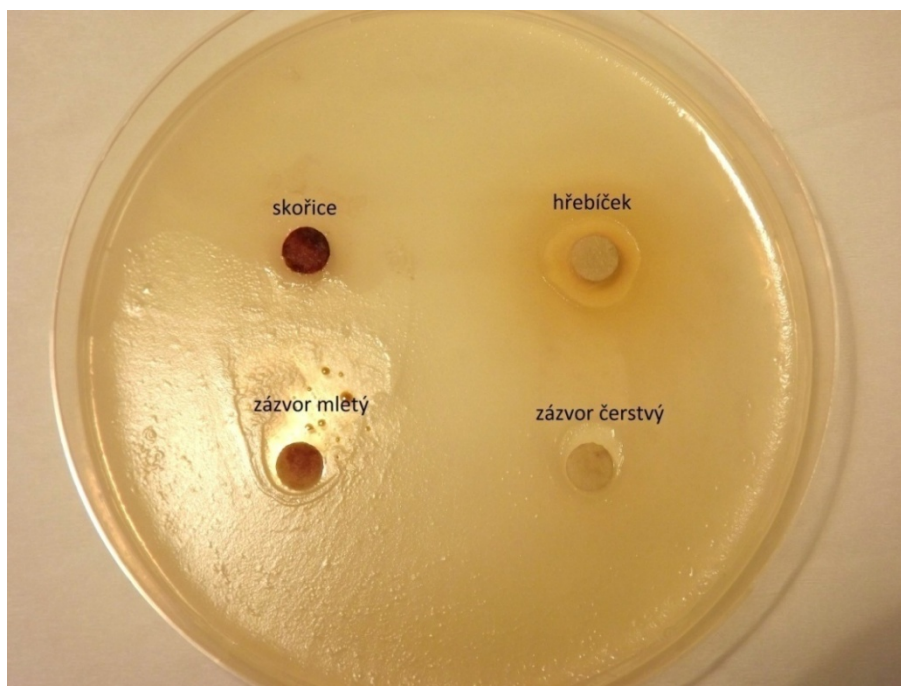
Obrázek 2: Viditelné inhibiční zóny u růstu *Pichia fermentans* po aplikaci extraktů v octanu ethylnatém

Bacillus subtilis

Z výsledků při testování antimikrobiálních účinků koření proti bakterii *Bacillus subtilis* vyplývá, že všechny extrakty připravené v octanu ethylnatém inhibovaly růst sledovaného MO (Tab. 6), z toho nejvyšší stupeň inhibice se projevil u extraktu skořice. Na (Obr. 8) je prokázán vznik inhibiční zóny kolem sterilního disku s obsahem extraktu hřebíčku, kde došlo k účinnému potlačení růstu testovaného mikroorganismu. V případě zkoumání ethanolových extraktů měl nejvyšší antimikrobiální účinnost extrakt hřebíčku oproti extraktům zázvoru mletého i zázvoru čerstvého. Po aplikaci extraktu skořice v ethanolu nedošlo k inhibici *B. subtilis*. Z výsledků dále vyplývá, že antimikrobiální aktivita nebyla prokázána v případě extraktů skořice, hřebíčku a zázvoru mletého ve vodě. Zázvor čerstvý extrahovaný ve vodě vykazoval jen slabou antimikrobiální aktivitu. Celkově lze říci, že extrakty připravené v ethanolu a octanu ethylnatém úspěšně potlačily růst bakterie *B. subtilis*.

Tabulka 6: Velikost naměřených inhibičních zón po aplikaci jednotlivých extraktů u *B. subtilis*

Koření	Ethanol	Octan ethylnatý	Voda
	Inhibiční zóny [mm]		
Skořice	n.d.	11 ± 0,1	n.d.
Hřebíček	11,5 ± 0,1	9 ± 0,1	n.d.
Zázvor mletý	9 ± 0,1	6,5 ± 0,1	n.d.
Zázvor čerstvý	8 ± 0,1	6,5 ± 0,1	2 ± 0,1



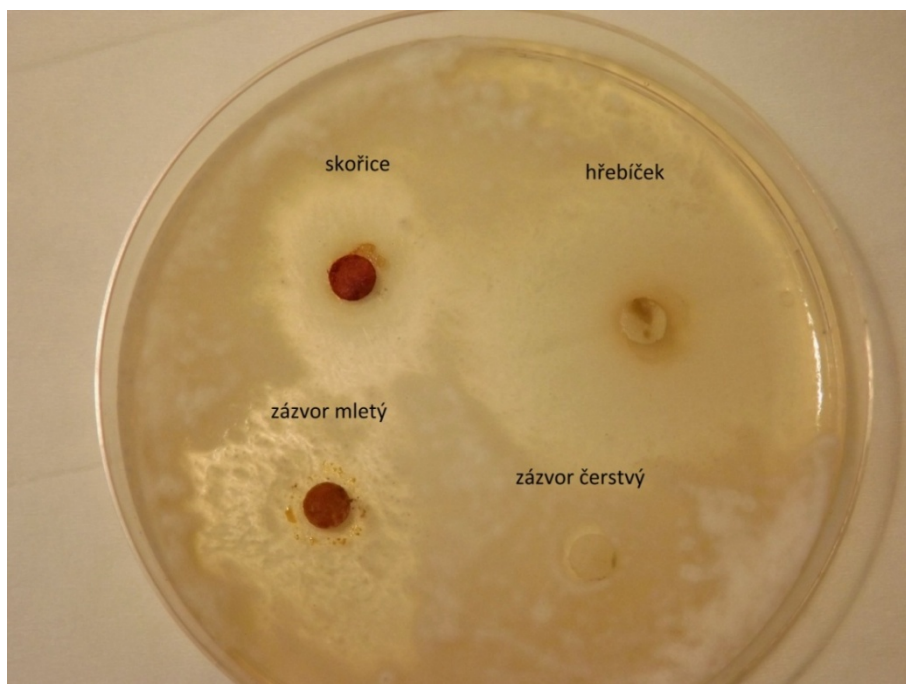
Obrázek 3: Viditelné inhibiční zóny u *Bacillus subtilis* po aplikaci extraktů v octanu ethylnatém

Aspergillus niger

V případě plísně *Aspergillus niger* došlo ke vzniku nejvýraznějších inhibičních zón a byla zde prokázána nejvyšší antimikrobiální aktivita u extraktů skořice a hřebíčku. Velice dobré výsledky vykazovaly extrakty koření jak v ethanolu, tak v octanu ethylnatém, zatímco vodné extrakty neprokázaly žádný inhibiční účinek (Tab. 7). Nejvyšší antimikrobiální aktivita byla viditelná u ethanolového extraktu hřebíčku, který je zobrazen na Obr. 9. Téměř stejnou aktivitu vykazoval i extrakt skořice v octanu ethylnatém. Celkově byl hřebíček nejúčinnější v potlačení růstu *A. niger*, pravděpodobně kvůli obsahu eugenolu, který má velmi vysoké antimikrobiální účinky.

Tabulka 7: Velikost naměřených inhibičních zón po aplikaci extraktů u *A. niger*

Koření	Ethanol	Octan ethylnatý	Voda
	Inhibiční zóny [mm]		
Skořice	15 ± 0,1	30 ± 0,1	n.d.
Hřebíček	32 ± 0,1	25 ± 0,1	n.d.
Zázvor mletý	18 ± 0,1	6,7 ± 0,1	n.d.
Zázvor čerstvý	7 ± 0,1	9,8 ± 0,1	n.d.



Obrázek 4: Viditelné inhibiční zóny u růstu *Aspergillus niger* po aplikaci ethanolového extraktu

7.4. Antimikrobiální aktivita synergického účinku skořice a hřebíčku

Pro stanovení antimikrobiální aktivity synergického účinku byly vybrány extrakty, které vykazovaly velkou úspěšnost u všech testovaných MO. Jednalo se o:

- skořice + hřebíček v ethanolu
- skořice + hřebíček v octanu ethylnatém

Pro studium inhibičního účinku koření byl použit diskový difuzní test. Extrakty skořice a extrakt hřebíčku byly smíchány v různém objemovém poměru (Tabulka 8).

Tabulka 8: Přehled připravených extraktů skořice a hřebíčku v ethanolu a octanu ethylnatém

Extrakt	V [ml]
Skořice + hřebíček (1)	0,75 ml + 0,25 ml
Skořice + hřebíček (2)	0,25 ml + 0,75 ml
Skořice + hřebíček (3)	0,5 ml + 0,5 ml

7.4.1. Octan ethylnatý

Ze získaných výsledků (Tab. 9) můžeme říci, že připravené extrakty octanu ethylnatého ze skořice a hřebíčku vykazovaly antimikrobiální aktivitu u všech testovaných MO.

Porovnáním hodnot bylo zjištěno, že největší inhibiční účinky vykazovala plíseň *Aspergillus niger*, kde největší inhibiční zóny byly viditelné po aplikaci samostatného

hřebíčku nebo skořice v octanu ethylnatém. Jejich synergické působení zaznamenalo také výrazný inhibiční účinek.

Tabulka 9: Naměřené velikosti inhibičních zón po aplikaci extraktu octanu ethylnatého

Extrakt OE	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pichia fermentans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
	Inhibiční zóny [mm]		
Skořice	6,5 ± 0,1	12 ± 0,1	30 ± 0,1
Hřebíček	15 ± 0,1	9 ± 0,1	31 ± 0,1
S + H (1)	13,5 ± 0,1	15 ± 0,1	24 ± 0,1
S + H (2)	13 ± 0,1	13 ± 0,1	23,5 ± 0,1
S + H (3)	12 ± 0,1	12 ± 0,1	22 ± 0,1

Odlišné výsledky byly zaznamenány u bakterie *Bacillus subtilis*, kde extrakt skořice vykazoval velmi nízkou inhibici. Největší inhibiční účinek byl zaznamenán u extraktu z hřebíčku, přičemž nepatrně nižší hodnoty inhibičních zón byly pozorovány v případě studie synergického účinků skořice a hřebíčku.

U kvasinky *Pichia fermentans* mělo synergické působení skořice a hřebíčku (1) nejvyšší inhibiční účinek. Naopak nejmenší vliv byl viditelný u extraktu z hřebíčku.

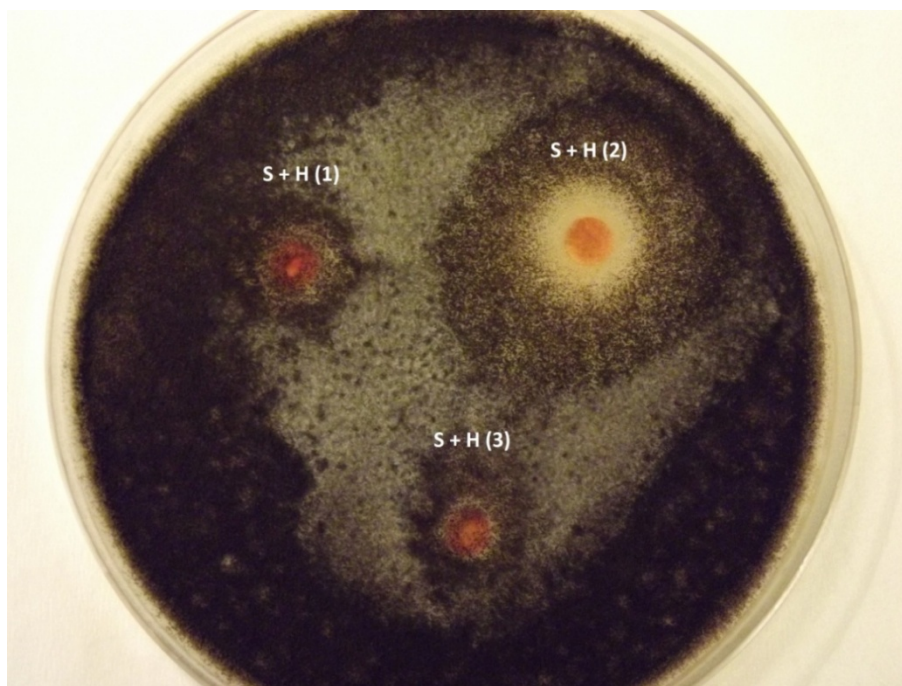
Celkově lze říci, že synergické působení hřebíčku a skořice bylo prokázáno u všech testovaných mikroorganismů. Z (Tab. 9) vyplývá, že vyšší obsah hřebíčku ve směsi prokázal nepatrně vyšší inhibiční účinek, ale celkově se objemově různé zastoupení hřebíčku a skořice ve směsi ve výsledcích výrazněji neprojevovalo.

7.4.2. Extrakty v ethanolu

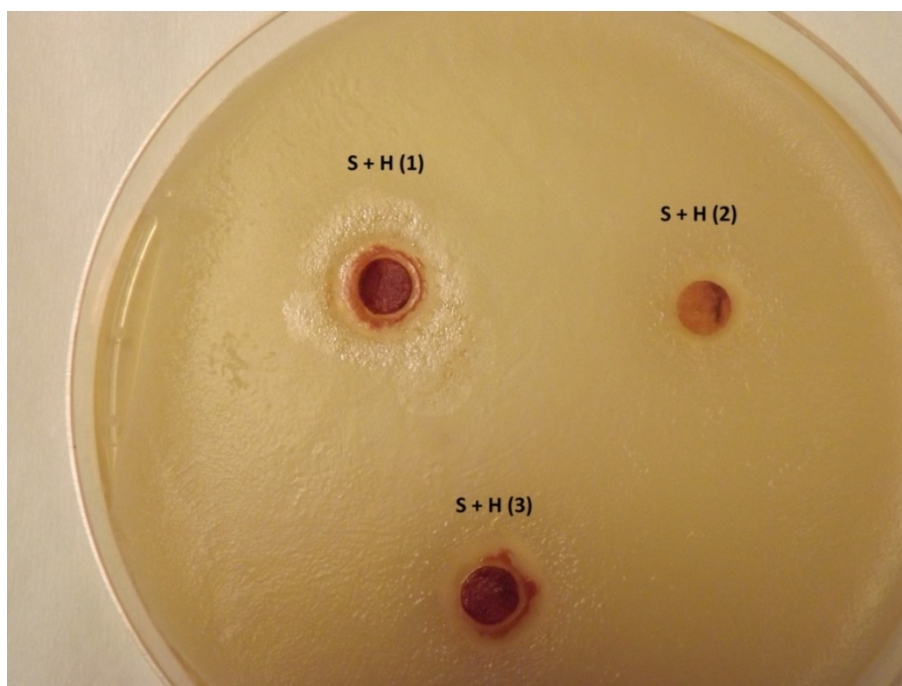
U ethanolových extraktů byl synergický účinek skořice a hřebíčku pozitivní pouze u *P. fermentans* (Tab. 10).

Tabulka 10: Naměřené velikosti inhibičních zón po aplikaci ethanolového extraktu

Extrakt (et)	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pichia fermentans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
	Inhibiční zóny [mm]		
S + H (1)	5,5 ± 0,1	12,5 ± 0,1	n.d.
S + H (2)	n.d.	9,5 ± 0,1	12 ± 0,1
S + H (3)	n.d.	11 ± 0,1	n.d.



Obrázek 5: Viditelná inhibiční zóna u *Aspergillus niger* po aplikaci ethanolového extraktu



Obrázek 6: Inhibiční zóna po aplikaci ethanolového extraktu u *Pichia fermentans*

Nejvyšší inhibici prokázala směs s vyšším obsahem hřebíčku (Obr. 11).

U bakterie *B. subtilis* se projevil nepatrný inhibiční účinek pouze u směsi s vyšším podílem hřebíčku, který vykazoval výraznější antimikrobiální aktivitu i proti *A. niger* (Obr. 10).

U směsi S+H (1) a S+H (2) nedošlo k potlačení růstu u *A. niger* ani u *B. subtilis*. Podle studie Lu a kol. (2011) mělo synergické působení hřebíčku a skořice aditivní účinek proti *B. subtilis*, zde však byly extrakty získány pomocí destilace vodní parou. ^[41]

Ze získaných výsledků testované antimikrobiální aktivity extraktů koření lze celkově shrnout, že kvasinky jsou velmi citlivé na působení esenciálních olejů a bakterie jsou odolnější než plísně. Jedním z důvodů může být odlišné složení a struktura buněčné stěny u jednotlivých mikroorganismů. Přítomnost lipidů v buněčné stěně snižuje účinnost esenciálních olejů, jelikož působí jako přirozená bariéra a zabraňuje EOs narušit buněčnou stěnu a proniknout dovnitř buňky. Hlavní složky buněčné stěny kvasinek jsou polysacharidy (glukan, manan, chitin a protein), které tvoří 90 % buněčné stěny, naopak zastoupení lipidů je minimální. Plísně mají podobné složení jako kvasinky, kdy buněčná stěna obsahuje především polysacharidy. *B. subtilis* patří mezi gram-pozitivní bakterie, které obsahují peptidoglykanovou vrstvu, která je vyztužená kyselinou teichovou. Na povrchu peptidoglykanové vrstvy jsou navázané polysacharidy. Obsahují tedy méně lipidů než gram-negativní bakterie, které jsou tedy více rezistentní k působení EOs.

7.5. Antimikrobiální účinky extraktů koření stanovené bujónovou diluční metodou

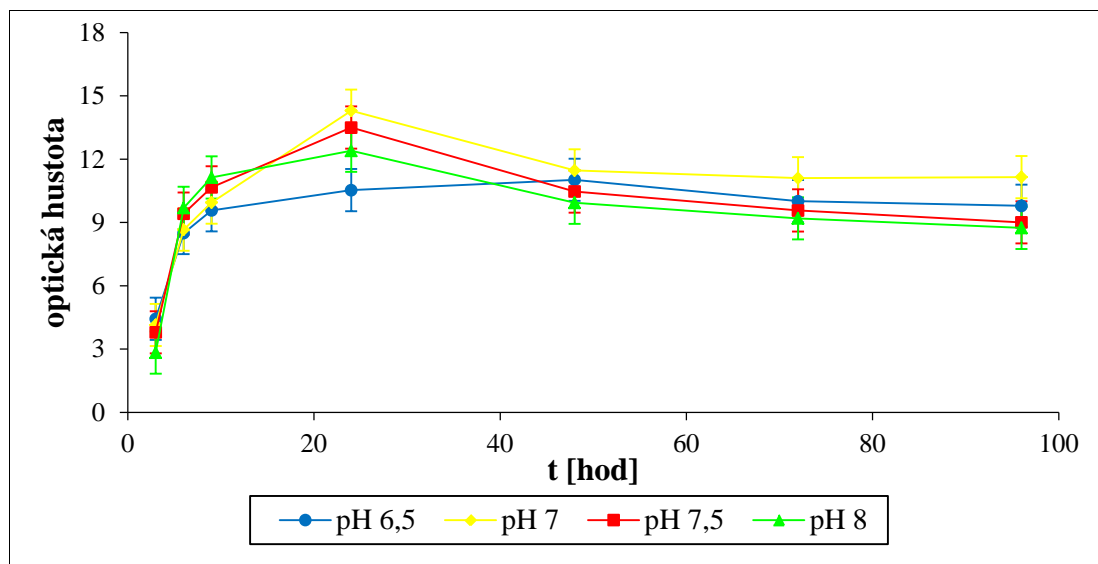
Pro stanovení antimikrobiálních účinků připravených extraktů koření bujónovou diluční metodou byl použit mikroorganismus *B. subtilis*. Nejdříve byly stanoveny optimální podmínky pro růst *B. subtilis*. Testování jednotlivých extraktů koření bylo provedeno při neoptimálnějších podmínkách růstu *B. subtilis* při třech různých koncentracích extraktů - 8,3; 12,5; 17 mg/ml. U jednotlivých druhů koření a mikroorganismů byla stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC).

7.5.1. Stanovení optimálních podmínek růstu *Bacillus subtilis*

Optimální podmínky jsou nutné pro růst a rozmnožování mikroorganismů (pH, teplota, rychlost třepání, množství živin), kdy dochází k exponenciálnímu růstu buněk. V průběhu experimentů byl sledován vliv pH, teploty a rychlosti třepání na optimální růst *B. subtilis*.

7.5.1.1. Stanovení pH optima buněčného růstu

Hodnota pH má výrazný vliv na metabolismus, ale ovlivňuje i teplotní odolnost mikroorganismů. *B. subtilis* roste v rozmezí pH 5,5 – 8,5. Pro testování optimálních podmínek růstu byly tedy zvoleny čtyři hodnoty pH 6,5; 7; 7,5 a 8. Při teplotě 30 °C a daných hodnotách pH byla změřena růstová křivka, na základě níž bylo stanoveno pH optimum bakteriálního růstu.

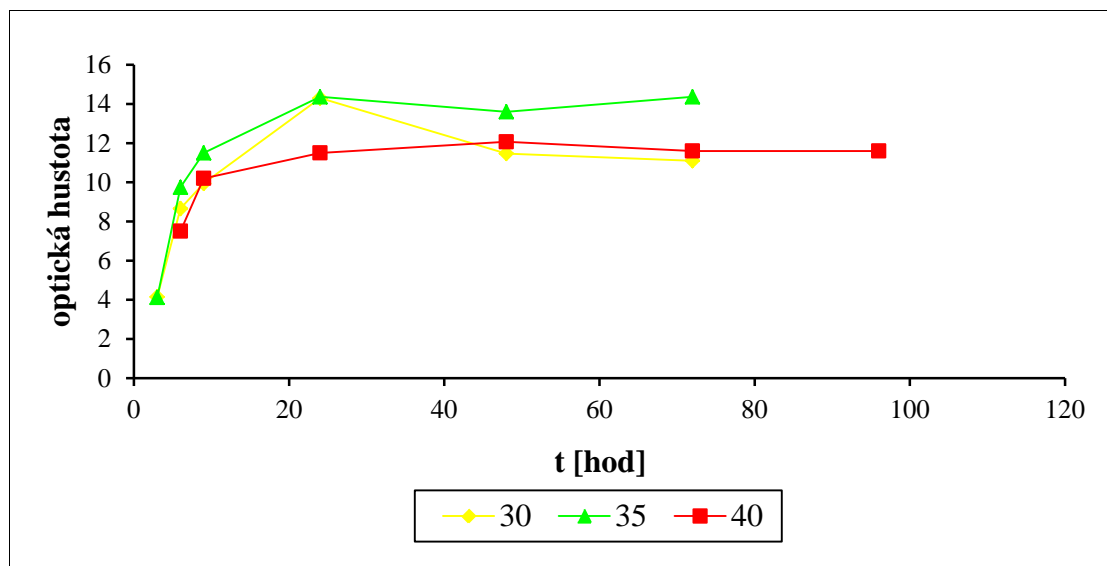


Graf 5: Růstová křivka *B. subtilis* při zvolených hodnotách pH

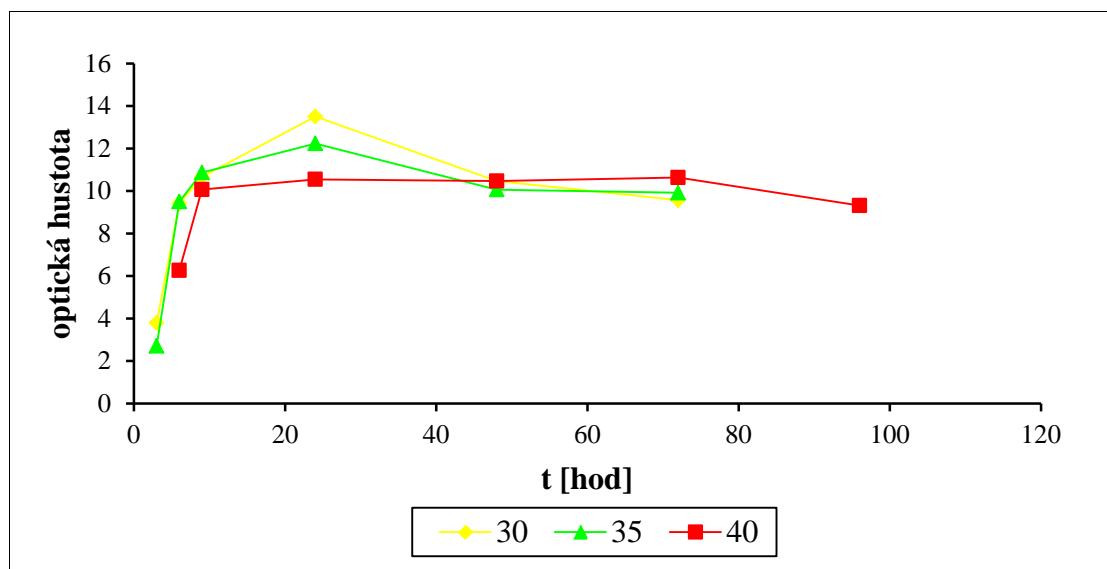
Z grafického znázornění (Graf 5) je patrné, že nejvyšší růst *B. subtilis* nastal při pH 7, velice podobné hodnoty byly zaznamenány i při pH 7,5. Naopak nejnižší hodnoty buněčného růstu vykazovalo mírně kyselé pH 6,5. Pro stanovení optimální teploty bylo pH 6,5 dále vyloučeno a to, z důvodu nejnižšího růstu testovaného mikroorganismu. Tyto výsledky korelují s již publikovanými studiemi, které uvádí za nejvhodnější pH pro optimální růst *B. subtilis* 7 – 7,5. ^[75]

7.5.1.2. Stanovení teplotního optima pro buněčný růst

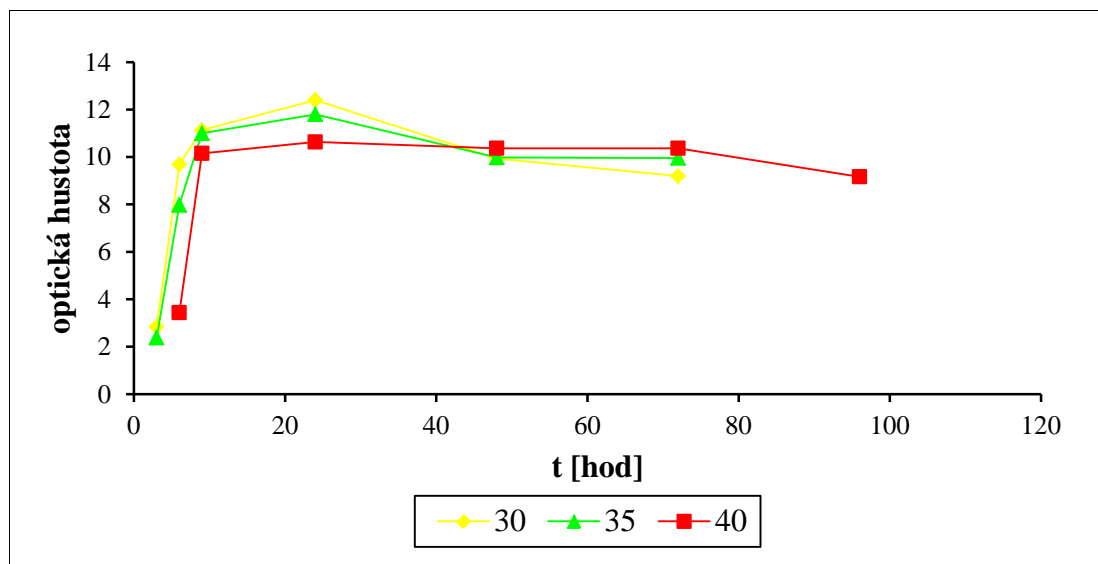
Teplota, je důležitým faktorem pro růst mikroorganismu, ovlivňuje jeho schopnost přežití. Závislost růstové rychlosti na teplotě je obvykle nesymetrická. Nižší teploty dělení pouze zpomalují, ale nebrání mu. Naopak vyšší teploty působí na mikroorganismy destruktivně. *B. subtilis* patří mezi mezofilní mikroorganismy dokáže přežít od 18 °C až po 43 °C, při teplotě 55 °C dochází k zastavení růstu. ^[75] Pro stanovení teplotního optima buněčného růstu *B. subtilis* byly zvoleny hodnoty 30, 35 a 40 °C. Růst mikroorganismu byl sledován při třech hodnotách pH (7; 7,5 a 8).



Graf 6: Růstová křivka *B. subtilis* při pH 7 a jednotlivých teplotách



Graf 7: Růstová křivka *B. subtilis* při pH 7,5 a jednotlivých teplotách

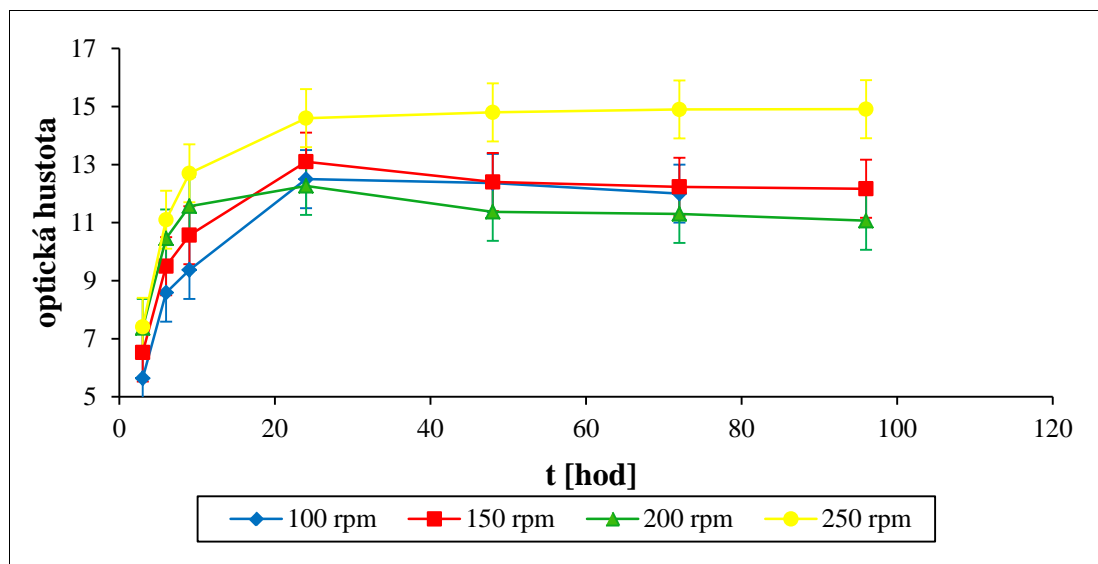


Graf 8: Růstová křivka *B. subtilis* při pH 8 a jednotlivých teplotách

V grafickém znázornění (Graf 6, 7, 8) jsou porovnávány hodnoty pH (7; 7,5 a 8) při jednotlivých teplotách (30, 35 a 40 °C). Z hodnot viditelných na Grafu 6 je patrné, že nejlepších výsledků je dosaženo při pH 7 a teplotě 35 °C. Podobný růst byl zaznamenán při teplotě 30 °C při pH 7 a 7,5. Optimální teplota růstu *B. subtilis* se podle literatury pohybuje od 30 – 37 °C. ^[75] Nejvíce studií je prováděno při teplotě 37 °C. ^[76]

7.5.1.3. Stanovení optimální rychlosti třepání

Co se týká vztahu *B. subtilis* ke kyslíku, lze tento MO označit jako anaerobní, i když se objevily i studie, které naznačují, že tato bakterie může v přítomnosti nitrátu růst i anaerobně. ^[77] Při optimální teplotě růstu 35 °C a pH 7 byla testována nejvhodnější rychlost třepání. Testované rychlosti třepání byly 100, 150, 200 a 250 rpm.



Graf 9: Růstová křivka *B. subtilis* při teplotě 35 °C, pH 7 a různé rychlosti třepání

Nejvyšší intenzita růstu *B. subtilis* byla zaznamenána při rychlosti 250 rpm (Graf 9). Naopak nejnižší růst byl prokázán při rychlosti otáček 100 rpm. Zejména v exponenciální fázi růstu je patrné, že se zvyšující se rychlostí třepání roste i intenzita buněčného růstu, což souvisí s množstvím kyslíku v médiu a také s lepší dostupností živin.

7.5.2. Stanovení antimikrobiální aktivity bujónovou diluční metodou

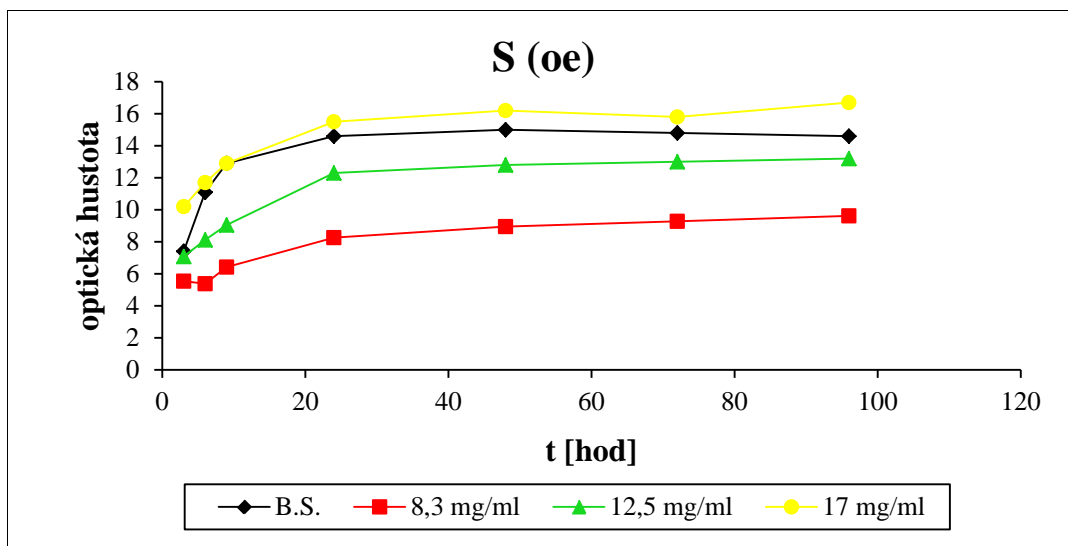
Při optimálních podmínkách buněčného růstu *B. subtilis* (35 °C, pH 7, 250 rpm) byla stanovena antimikrobiální aktivita extraktů koření bujónovou diluční metodou. Byly použity extrakty:

- skořice, hřebíček, zázvor čerstvý a zázvor mletý v ethanolu
- skořice, hřebíček, zázvor čerstvý a zázvor mletý v octanu ethylnatém
- skořice, hřebíček, zázvor čerstvý a zázvor mletý ve vodě

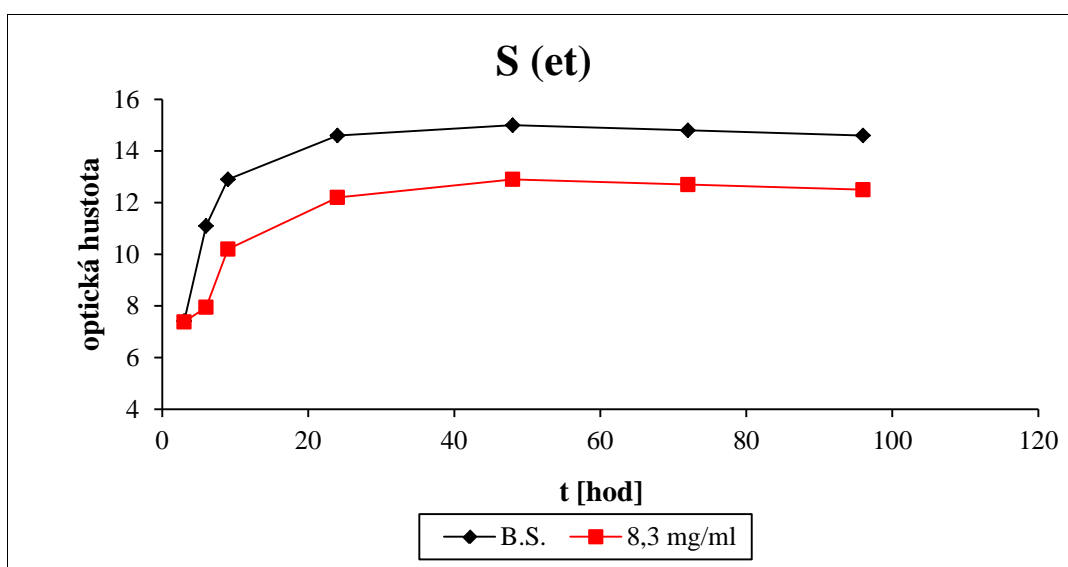
V průběhu experimentu byl sledován vliv různé koncentrace extraktů (8,3; 12,5; 17 mg/ml) na buněčný růst *B. subtilis* po dobu 5 dnů (Graf 10 – 21).

Vliv skořice

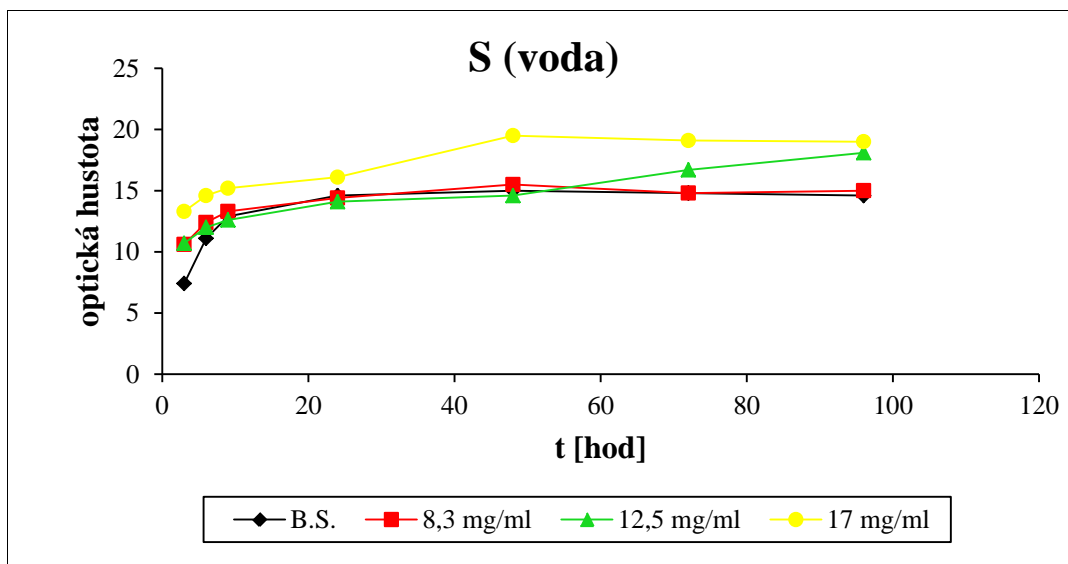
V přítomnosti extraktu skořice v octanu ethylnatém (Graf 10) došlo k úspěšnému potlačení růstu *B. subtilis* u všech použitých koncentrací extraktů, výjimkou byla koncentrace extraktu 17 mg/ml. V případě použití ethanolového extraktu skořice (Graf 11) byl zaznamenán antimikrobiální účinek pouze po aplikaci nejnižší koncentrace tedy 8,3 mg/ml a došlo k poklesu nárůstu o 120 % po 5 dnech kultivace. Další dvě koncentrace (12,5 a 17 mg/ml) extraktu nedokázaly potlačit růst bakterie. Z důvodu vyšších hodnot, které překročily rozsah denzitometru, nejsou hodnoty graficky zpracovány. Vodný extrakt skořice o koncentraci 8,3 a 12,5 mg/ml vykazoval mírné inhibiční účinky (Graf 12). Na základě uvedených výsledků můžeme shrnout, že u extraktů skořice je MIC 8,3 mg/ml.



Graf 10: Růstová křivka *B. subtilis* v přítomnosti extraktů skořice v octanu ethylnatém



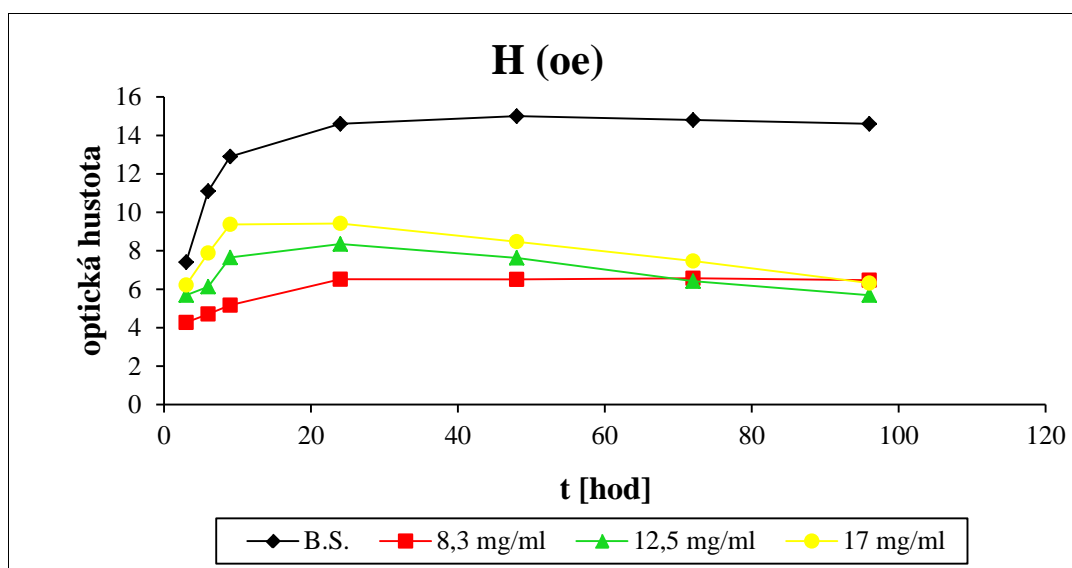
Graf 11: Růstová křivka *B. subtilis* v přítomnosti etanolových extraktů skořice



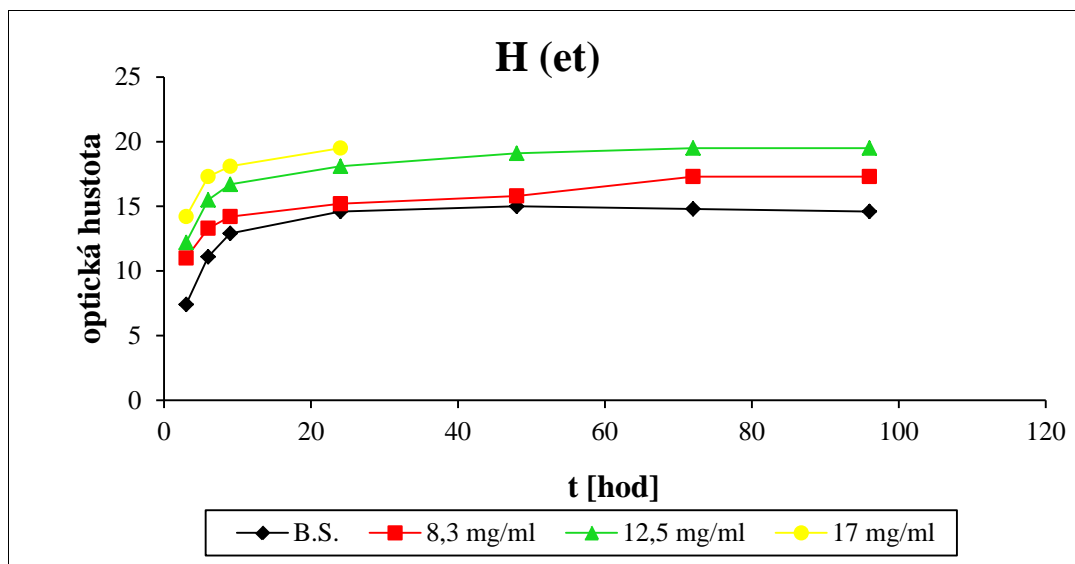
Graf 12: Růstová křivka *B. subtilis* v přítomnosti vodných extraktů ze skořice

Vliv hřebíčku

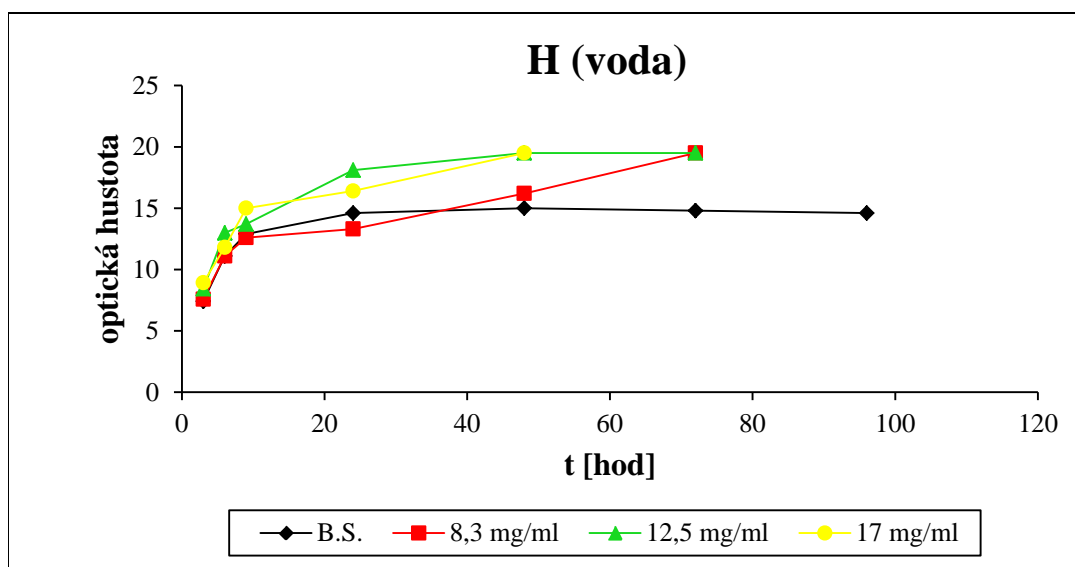
Při porovnání extraktů z hřebíčku bylo zjištěno, že nejvyšší antimikrobiální účinek zaznamenal extrakt hřebíčku v octanu ethylnatém (Graf 13), kde došlo k inhibici po aplikaci všech třech zvolených koncentrací. U ethanolového extraktu (Graf 14) nedošlo sice k potlačení růstu *B. subtilis*, ale extrakt o koncentraci 8,3 mg/ml vykazoval nejúčinnější aktivitu. Mírné potlačení růstu *B. subtilis* však bylo zaznamenáno u vodného extraktu hřebíčku u koncentrace 8,3 mg/ml (Graf 15). Lze tedy říci, že v případě použití extraktů hřebíčku nebyl tak patrný vliv koncentrace extraktů, ale spíše použitého rozpouštědla a to nejvýrazněji v případě octanu ethylnatého. I zde však můžeme stanovit MIC a to opět 8,3 mg/ml.



Graf 13: Růstová křivka *B. subtilis* v přítomnosti extraktů hřebíčku v octanu ethylnatém



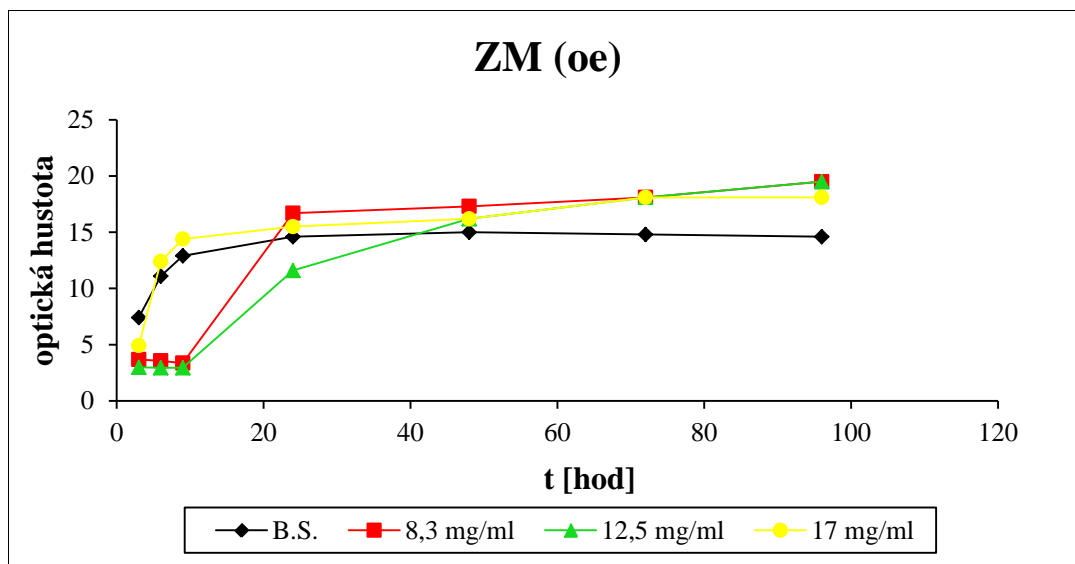
Graf 14: Růstová křivka *B. subtilis* v přítomnosti etanolových extraktů hřebíčku



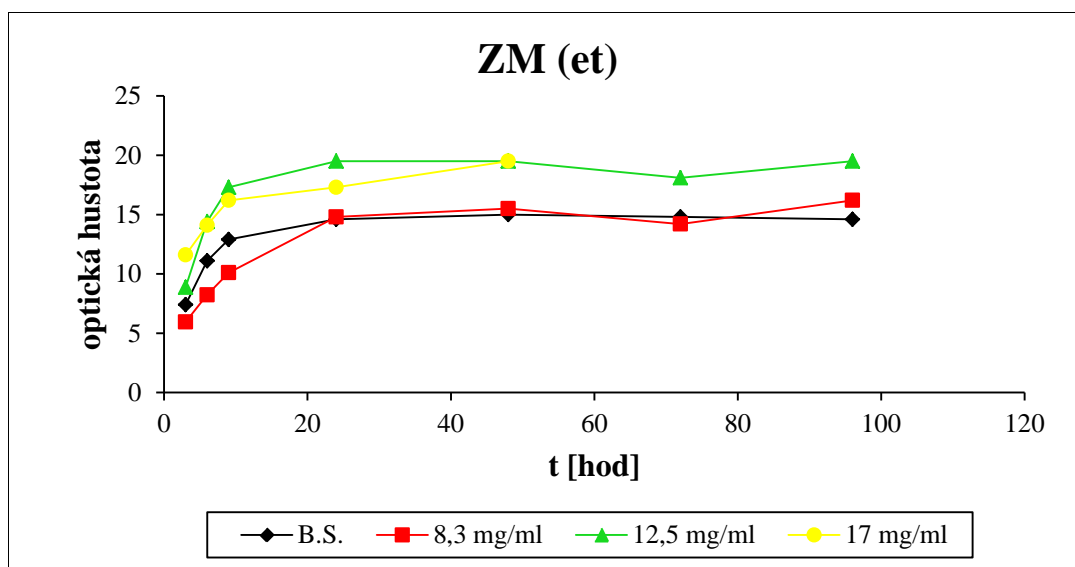
Graf 15: Růstová křivka *B. subtilis* v přítomnosti vodných extraktů hřebíčku

Vliv zázvoru mletého

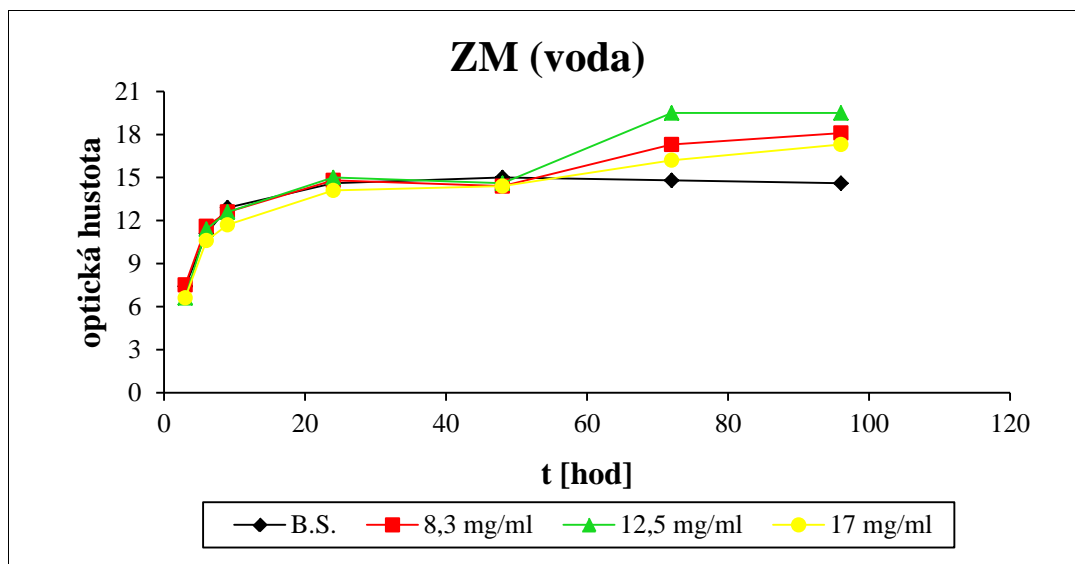
Zázvor mletý extrahovaný v octanu ethylnatém dokázal v koncentraci 8,3 a 12,5 mg/ml inhibovat růst *B. subtilis* v exponenciální fázi růstu (Graf 16). V případě testování ethanolového extraktu (Graf 17) je patrné, že inhibiční účinek proti testovanému MO vykazovala pouze koncentrace 8,3 mg/ml. Co se týká vodného extraktu, tak ten prokázal antimikrobiální aktivitu ve všech zvolených koncentracích a dokázal potlačit růst *B. subtilis* během exponenciální fáze růstu (Graf 18). Na základě těchto výsledků můžeme říci, že stejně jako u předchozích testovaných koření i zde prokázaly vyšší antimikrobiální aktivitu nižší koncentrace a to u všech použitých extraktů zázvoru mletého. Minimální inhibiční koncentrace, která inhibovala růst *B. subtilis* byla stanovena na hodnotu 8,3 mg/ml.



Graf 16: Růstová křivka *B. subtilis* v přítomnosti extraktů ZM octanu ethylnatého



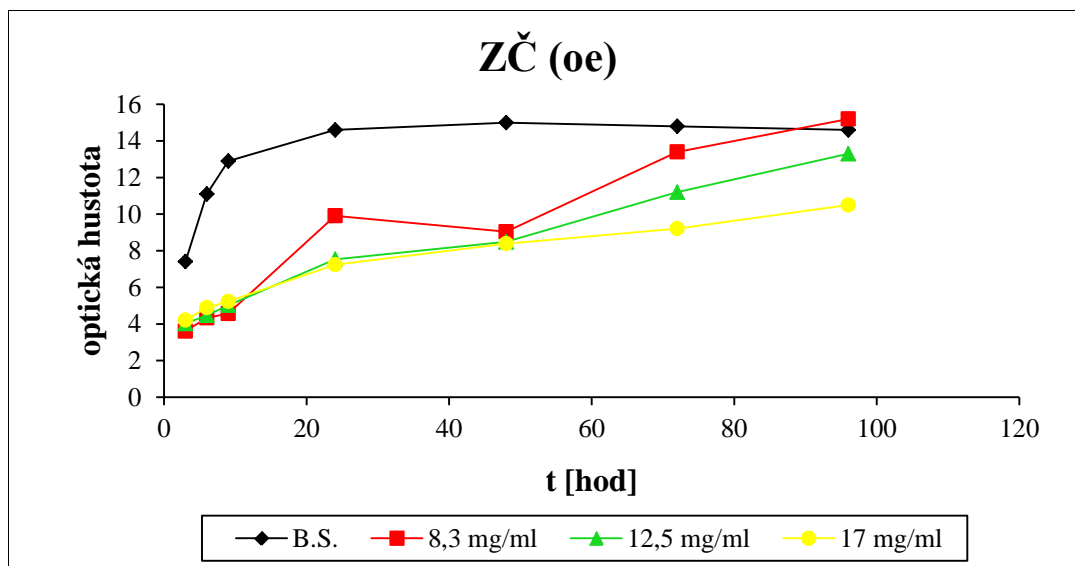
Graf 17: Růstová křivka *B. subtilis* v přítomnosti etanolových extraktů ZM



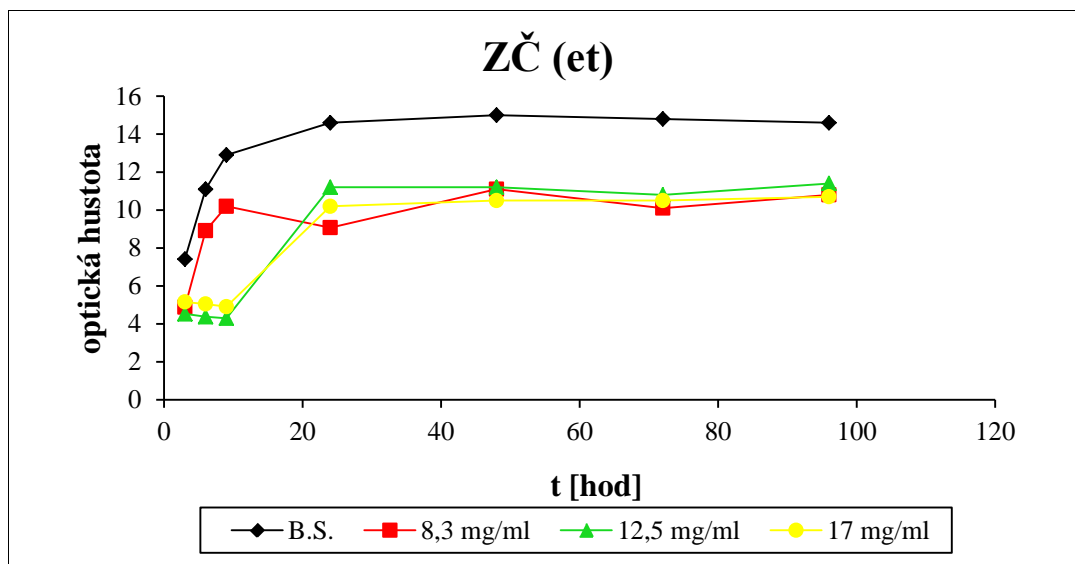
Graf 18: Růstová křivka *B. subtilis* v přítomnosti vodných extraktů ZM

Vliv zázvoru čerstvého

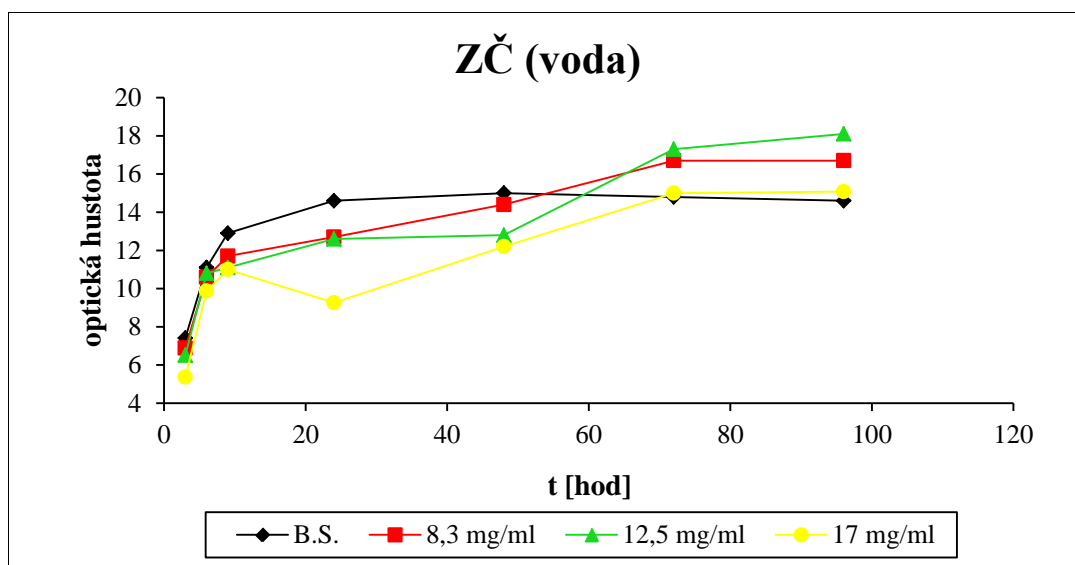
Naopak zázvor čerstvý extrahovaný v ethanolu a octanu ethylnatém vykazoval velice účinný antimikrobiální vliv (Graf 19, 20) a to u všech zvolených koncentrací extraktu. Dobré výsledky byly také zaznamenány v případě vodného extraktu zázvoru čerstvého (Graf 21), kde nejlepší inhibiční účinky vykazovaly koncentrace extraktů (8,3 a 12,5 mg/ml). Extrakty zázvoru čerstvého dokázaly účinně potlačit růst *B. subtilis* ve všech zvolených rozpouštědlech.



Graf 19: Růstová křivka *B. subtilis* v přítomnosti extraktů ZČ octanu ethylnatého



Graf 20: Růstová křivka *B. subtilis* v přítomnosti etanolových extraktů ZČ



Graf 21: Růstová křivka *B. subtilis* v přítomnosti vodných extraktů ZČ

Na základě výše uvedených výsledků můžeme zhodnotit, že při použití extraktu o nižší koncentraci dochází k účinnější inhibici bakterie *B. subtilis* než při vyšších koncentracích. Antimikrobiální účinek jednotlivých extraktů koření byl testován pomocí bujónové diluční metody. Jako nejúčinnější antimikrobiální činidlo se projevil zázvor čerstvý a to po extrakci ve všech zvolených rozpouštědlech. Minimální inhibiční koncentrace, tedy nejnižší účinná koncentrace EOs, kdy dochází k potlačení růstu mikroorganismu, byla stanovena na 8,3 mg/ml.

8. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo prostudovat antimikrobiální účinky vybraných druhů koření na zástupce mikroorganismů z řad bakterií, kvasinek a plísní a současně stanovit celkový obsah fenolických látek a antioxidační aktivitu těchto koření. Byl sledován vliv extraktů skořice, hřebíčku a zázvoru mletého i čerstvého proti *Bacillus subtilis*, *Pichia fermentans* a *Aspergillus niger*. Extrakty koření byly připraveny ve třech rozpouštědlech - voda, ethanol a octan ethylnatý a jejich antimikrobiální aktivita byla otestována diskovým difuzním testem a bujónovou diluční metodou. U těchto extraktů bylo také stanoveno celkové množství polyfenolických látek a antioxidační aktivita. Nejvyšší obsah polyfenolů obsahovalo koření extrahované v ethanolu a to zejména hřebíček a skořice. U těchto dvou koření se navíc projevila korelace s antioxidační aktivitou, která ale dosahovala nejvyšších hodnot u vodného extraktu zázvoru čerstvého.

Diskovým difuzním testem byl prokázán nejvyšší antimikrobiální účinek u koření extrahovaných v octanu ethylnatém a ethanolu proti *B. subtilis*, *P. fermentans* a *A. niger*. Naopak vodné extrakty neměly na testované MO téměř žádný vliv. Nejúčinnější ze všech extraktů byl hřebíček, který vykazoval největší inhibiční zóny a to zejména v případě extrakce ethanolem. To je pravděpodobně způsobeno vysokým obsahem eugenolu v hřebíčku, který má vysoce antimikrobiální aktivitu. V případě extraktů skořice byl jako nejúčinnější rozpouštědlo stanoven octan ethylnatý. Při testování synergického působení skořice a hřebíčku v octanu ethylnatém byl úspěšně potlačen růst u všech testovaných MO. Oproti tomu směs hřebíčku a skořice v ethanolu inhibovala jen růst *P. fermentans*. Také se ukázalo, že účinnější proti růstu *A. niger* je použití hřebíčku a skořice samostatně než ve směsi.

Pro stanovení antimikrobiální aktivity bujónovou diluční metodou, která doposud není optimalizovaná byl vybrán mikroorganismus *B. subtilis*, u kterého byly stanoveny optimální podmínky buněčného růstu (35 °C, pH 7, 250 rpm). Jako nejúčinnější rozpouštědlo se jevil octan ethylnatý, nicméně nejvýraznější inhibiční účinek byl pozorován u zázvoru čerstvého a to ve všech třech rozpouštědlech. U extraktů hřebíčku nebylo prokázáno tak výrazné potlačení růstu jako u diskové difuzní metody. Na základě výsledků také můžeme zhodnotit, že minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla ve většině případů 8,3 mg/ml. Rozdíly ve výsledcích diskové difuzní a bujónové diluční metody pro inhibici růstu *B. subtilis* mohou být způsobeny rozdílným způsobem růstu testovaného MO (kultivace na pevném povrchu vs. v tekutém médiu) a odlišným mechanismem působení fenolických látek.

Srovnání s jinými studiemi je poměrně komplikované, protože účinnost jednotlivých extraktů se může lišit v závislosti na použité koncentraci, rozpouštědle, původu koření, období sklizně nebo zvolené metodě testování.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of food Microbiology*. 2004, č. 94, s. 223–253.
- [2] MOON, Sang-Eun, Hye-Young, KYM, Jeong-Dan, CHA. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Archives of oral biology*. 2011, č. 56, s. 907–916
- [3] SOLÓRZANO-SANTOS, Fortino, Maria, GUADALUPE MIRANDA-NOVALES. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Food Biotechnology-Plant Biotechnology*. 2012, č. 23, s. 136–141
- [4] SHELEF, L. A. Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety*. 1983, č. 6, s. 29–44.
- [5] BISHOP, C. D. Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. *Journal of Essential Oil Research*. 1995, č. 7, s. 641–644.
- [6] AZZOUZ, M. A., L. B. BULLERMAN. Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. *Journal of Food Protection*. 1982, č. 45 (14), s. 1298–1301.
- [7] AKGÜL, A., M. KIVANC, S. SERT. Effect of carvacrol on growth and toxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Sciences des Aliments*. 1991, č. 11, s. 361–370.
- [8] KONSTANTOPOULOU, I., L. VASSILOPOULOU, P. MAVRAGANI-TSIPIDOU, Z. G. SCOURAS. Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oils extracted from eleven Greek aromatic plants on *Drosophila auraria*. *Experientia*. 1992 č. 48 (6), s. 616–619.
- [9] BACÍLKOVÁ, Bronislava a Hana PAULUSOVÁ. Vliv silic a jejich hlavních účinných látek na mikroorganismy a na archivní materiál. *Národní archiv, Praha* [online]. 2012, s. 28 [cit. 2013-03-17]. Dostupné z: <<http://www.nacr.cz/Z-files/silice/silice.pdf>>.
- [10] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. OSSIS 2002. 368 s. ISBN 80-86659-012-1.
- [11] MATOVIC, M. *Lebenwet-leben*. [online]. [cit. 2012-04-30]. Dostupné z WWW: <<http://www.lebenswert-leben.com>>.
- [12] TAJKARIMI, M. M., S. A. IBRAHIM, D. A. CLIVER. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*. 2010, č. 21, s. 1199–1218.
- [13] SENATORE, F. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996, č. 44, s. 1327–1332.

- [14] DELAQUIS, P. J., K. STANICH, B. GIRARD, G. MAZZA. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 2002, č. 74, s. 101–109.
- [15] LENS-LISBONNE, C., A. CREMIEUX, C. MAILLARD, G. BALANSARD. Methodes d'évaluation de l'activité antibacterienne des huiles essentielles: application aux essences de thym et de cannelle. *Journal de Pharmacie de Belgique*. 1987, č. 42 (5), s. 297–302.
- [16] LAWRENCE, B. M. The botanical and chemical aspects of oregano. *Perfumer & Flavorist*. 1984, č. 9, s. 41–51.
- [17] CHARAI, M., M. MOSADDAK, M. FAID. Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *O. compactum* Benth. *Journal of Essential Oil Research*. 1996, č. 8, s. 657–664.
- [18] KOKKINI, S., R. KAROUSOU, A. DARDIOTI, N. KRIGAS, T. LANARAS. Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry*. 1997, č. 44 (5), s. 883–886.
- [19] DAFERERA, D. J., B. N. ZIOGAS, M. G. POLISSIOU. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, č. 48, s. 2576–2581.
- [20] MARINO, M., C. BERSANI, G. COMI. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiacea and Compositae. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, č. 67, s. 187–195.
- [21] BAUER, K., D. GARBE, H. SURBURG. Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses. *Wiley-VCH, Weinheim*. 2001, s. 293.
- [22] MCGIMPSEY, J. A., M. H. DOUGLAS, J. L. VAN KLINK, D. A. BEAUREGARD, N. B. PERRY. Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* L. in New Zealand. *Flavour and Fragrance Journal*. 1994, č. 9, s. 347–352.
- [23] MARINO, M., C. BERSANI, G. COMI. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *Journal of Food Protection*. 1999, č. 62 (9), s. 1017–1023.
- [24] BAKKALI F., S. AVERBECK, D. AVERBECK a M. IDAOMAR. Biological effects of essential oils – A review. *Food and chemical toxicology*. 2008, č. 46, s. 446–475.
- [25] UNLU, Mehmet, Emel ERGENE, Gulhan Vardar UNLU, Hulya Sivas ZEYTINOGLU a Nilufer VURAL. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food and Chemical Toxicology*. 2010, roč. 48, č. 11, s. 3274–3280. ISSN 02786915. DOI: 10.1016/j.fct.2010.09.001.
- [26] SOBKOVÁ, Kristýna. Antibakteriální účinky přírodních látek. [online]. 2009 [cit. 2013-02-28]. Dostupné z:

<https://dspace.upce.cz/bitstream/10195/33854/1/SobkovaK_Antibakterialni%20ucinky_JM_2009.pdf>.

- [27] TEIXEIRA, Bárbara, António MARQUES, Chrtistina RAMOS, Nuno R. NENG, Joé M. F. NOGUEIRA, Jorge Alexandre SARAIVA a Maria Leonor NUNES. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial crops and products*. 2013, č. 43, s. 587–595.
- [28] WENQIANG, Guan, Li SHUFEN, Yan RUIXIANG, Tang SHAOKUN a Quan CAN. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chemistry*. 2007, č. 101, s. 1558–1564.
- [29] MOYLER, D. CO₂ extraction and other new technologies: an update on commercial adoption. International Federation of Essential Oils and Aroma Trades-21st *International Conference on Essential Oils and Aroma's. IFEAT*. 1998, s. 33–39.
- [30] BIELSKÁ, Lucie. Metody analytické extrakce perzistentních organických polutantů z pevných matric. [online]. [cit. 2013-03-17]. Dostupné z WWW: <http://is.muni.cz/th/106556/prif_b/Metody_analyticke_extrakce_persistentnich_organickyh_polutantu_z_pevnych_matric.txt>.
- [31] OKOH, O. O., A. P. SADIMENKO a A. J. AFOLAYAN. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food chemistry*. 2010, č. 120, s. 308–312.
- [32] LAMBERT, R. J., P. N. SKANDAMIS, P. J. COOTE a G. J. NYCHAS. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 2001, č. 91, s. 453–462.
- [33] ULTEE, A. a E. J. SMID. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food. Microbiol.* 2001, č. 64, s. 373–378.
- [34] HAMDY ROBY, Muhamed Hussein, Muhamed Atef SARHAN, Khaled ABDELHAMED SELIM a Khalel Ibrahim KHALEL. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrila Crops and Products*. 2013, č. 43, s. 827–831.
- [35] KLANČNIK, Anja, Saša PISKERNIK, Barbara JERŠEK a Sonja Smole JEŽINA. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*. 2010, č. 81, s. 121– 126.
- [36] Ústav laboratorní diagnostiky. [online]. [cit. 2013-03-17]. Dostupné z: <<http://www.old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie>>.
- [37] PERIANAYAGAM, James B., S. K. SHARMA, K. K. PILLAI, A. PANDURANGAN a D. KASAVAN. Evaluation of antimicrobial activity of ethanol extract and compounds isolated from *Trichodesma indicum* (Linn.). *Journal of Ethnopharmacology*. 2012, č. 142, s. 283–286.

- [38] LU, Fei, Liang HAO, Yuan QIPENG a Chunfang LI. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*. 2011, č. 44, s. 3057–3064.
- [39] CELIKTAS O., E. E. YESIL, H. KOCABAS, E. BEDIR, F. Vardar SUKAN, T. OZEK a K. H. C. BASER. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. 2007, č. 2, s. 433–872.
- [40] DORMAN, H. J., S. G. DEANS. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 2000, č. 88, s. 308–316.
- [41] LU, Fei, Yi-cheng DING, Xing-qian YE a Yu-ting DING. Antibacterial Effect of Cinnamon Oil Combined with Thyme or Clove Oil. 2011, s. 1–6.
- [42] BECERRIL R., R. GÓMEZ-LUS, P. GOÑI, P. LÓPEZ a C. NERÍN. Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, č. 388, s. 1003–1011.
- [43] SKOCIBUSIŠ, M., a N. BEZIŠ. Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils. *Phytother Res.* 2004, č. 18, s. 967–970.
- [44] AL-BAYATI a A. FIRAS. Synergistic antimicrobial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella visum* Essentials oils and metanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008, č. 116, s. 403–406.
- [45] VESELÝ, Martin. (z přednášek prof. Jana Pácy). *Bioinženýrství I, II*. Praha: VŠCHT. 1999, s. 53.
- [46] KAŠTÁNEK, František. *Bioinženýrství*. Praha: Academia. 2001, s. 334. ISBN 80-200-0768-7.
- [47] RACLAVSKÁ, H., J. KUCHAROVÁ a D. PLACHÁ. Přehled metod a identifikace látek sledovaných podle Protokolu o registrech úniků a přenosů znečišťujících látek v únicích do půd. [online]. 2008 [cit. 2013-02-26]. Dostupné z: <http://www.irz.cz/dokumenty/irz/metody_mereni/puda/Fenoly.pdf>.
- [48] WOJDYLO, Aneta, Jan OSZMIANSKI a Renata CZEMERYYS. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*. 2007, č. 105, s. 940–949.
- [49] BALASUNDRAM, SUNDRAM a Samir SAMMAN. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 2006, č. 99, s. 191–203.
- [50] SLANINA J. a E. TÁBORSKÁ. *Chem. Listy*. 2004, č. 98, s. 239 – 245. 2. ČEPIČKA J. a M. KARABON. *Chem. Listy*. 2002, č. 96, s. 90–95.
- [51] PARKÁNYIOVÁ, Jana, Lucie PARKÁNYIOVÁ a Jan POKORNÝ. Rostliny jako zdroje přírodních antioxidantů. VŠCHT Praha [online]. [cit. 2013-02-26]. Dostupné z: <http://www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/p/P_30C.doc>.

- [52] ŠULC, M., J. LACHAMN, K. HAMOUZ, M. ORSÁK, P. DVOŘÁK a V. HORÁČKOVÁ. *Chemické listy*. 2007, č. 101, s. 584–591.
- [53] ZLOCH, Z., J. ČELAKOVSKÝ a A. AUJEZDSKÁ. Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného materiálu. [online]. 2004 [cit. 2013-02-26]. Dostupné z: <<http://www.institut-danone.cz/data/studie/pridelene-granty/2004-03.pdf>>.
- [54] MATHEW, Sindhu a T. Emilia ABRAHAM. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. *Food chemistry*. 2006, č. 94, s. 520–528.
- [55] KLEJDUS, B. a V. KUBÁŇ. Rostlinné fenoly v allelopatii. *Chemické listy*. 1999, č. 104, s. 243–248.
- [56] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. *Chemické listy*. 2004, č. 98, s. 174–179. [online]. [cit. 2013-02-26]. Dostupné z: <http://www.chemickelisty.cz/docs/full/2004_04_03.pdf>.
- [57] STRATIL P., V. KUBÁŇ a J. FOJTOVÁ. Comparison of the Phenolic Content and Total Antioxidant Activity in Wines as Determined by Spectrophotometric Methods. *Czech J. Food Sci*, 2008, č. 26, s. 242–253.
- [58] GRYGARČÍKOVÁ JANA. Fenolické látky obilovin a jejich stanovení Folinovým činidlem. [online]. 2011. [cit. 2013-02-26]. Dostupné z: <http://dspace.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/18318/grygar%C4%8D%C3%ADkov%C3%A1_2011_bp.pdf?sequence=1>.
- [59] LU, Mei, Bo YUAN, Maomao ZENG a Jie CHEN. Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. *Food Research International*. 2011, č. 44, s. 530–536. ISSN 09639969. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.10.055.
- [60] Atlas rostlin.cz. [online]. 2010 [cit. 2013-03-24]. Dostupné z: <<http://listnate-stromy.atlasrostlin.cz/skoricovnik-cejlonsky>>.
- [61] Cinnamon (*Cinnamomum* species). *Medical Toxicology of Natural Substances*. 2009, č. 55, s. 327–335.
- [62] KUORWEL, K., J. Marlene, CRAN, Kees SONNEVELD, Joseph MILTZ, Stephen W. BIGGER. Antimicrobial Activity of Natural Agents Coated on Starch-based Films against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science*. 2011, č. 8, s. M531–M537.
- [63] UNLU, Mehmet, Emel ERGENE, Gulhan Vardar UNLU, Hulya Sivas ZEYTIÑOGLU a Nilufer VURAL. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food and Chemical Toxicology*. 2010, roč. 48, č. 11, s. 3274–3280. ISSN 02786915. DOI: 10.1016/j.fct.2010.09.001.

- [64] GONI, P., P. LÓPEZ, C. SÁNCHEZ, R. GÓMEZ-LUS, R. BECERRIL a C. NERÍN. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*. 2009, č. 116, s. 982–989.
- [65] SHAIK, M. Ali, Alee A. KHAN, Irshad AHMED, M. MUSADDIQ, Kahaja S. AHMED, H. POLASA, L. Venkateswar RAO, Chittoor M. HABIBULLAH, Leonardo A. SECHI a Niyaz AHMED. Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* [online]. 2005 [cit. 2013-03-24]. Dostupné z: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/4/1/20>
- [66] SANLA-EAD, Nutcha, Anuvat JANGCHUD, Vanee CHONHENCHOB a Panuwat SUPPAKUL. Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde and Eugenol and Their Activity after Incorporation into Cellulose-based Packaging Films. *Packaging Technology and Science*. 2011, č. 25, s. 7–17.
- [67] Aphios. [online]. [cit. 2013-03-24]. Dostupné z: <http://www.aphios.com/products/research-chemicals/6-gingerol.html>.
- [68] Nazeleno.cz. [online]. [cit. 2013-03-24]. Dostupné z: <http://www.nazeleno.cz/zazvor-vselek-ktery-muze-i-skodit.aspx>.
- [69] PARK, M., J. BAE a DS LEE. Antibacterial activity of [10]-gingerol and [12]-gingerol isolated from ginger rhizome against periodontal bacteria. *Systems Microbiology Research Center*. 2008, č. 22, s. 1446–1449.
- [70] MAHADY, G. B., S. L. PENDLAND, G. S. YUN, Z. Z. LU a A. STOIA. Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and the gingerols inhibit the growth of Cag A⁺ strains of *Helicobacter pylori*. *Pubmed*. 2003, č. 23, s. 3699–3702.
- [71] AUTA, K. I., A. A. GALADIMA, J. U. BASSEY, O. D. OLOWONIYI, O. O. MOSES a A. B. YAKO. Antimicrobial Properties of the Ethanolic Extracts of *Zingiber officinale* (Ginger) on *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Research Journal of Biological Sciences*. 2011, č. 6, č. 1, s. 37–39. ISSN 18158846.
- [72] HUANG Q., M. IWAMOTO, S. AOKI, N. TANAKA, K. TAJIMA, J. YAMAHARA, Y. TAKAISHI, M. YOSHIDA, T. TOMIMATSU a Y. TAMAI. Anti-5-hydroxytryptamine 3 effect of galanolactone, diterpenoid isolated from ginger. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 1991, č. 39, s. 397–399.
- [73] REYES L. F., J. C. MILLER, L. CISNEROS-ZEVALLOS. *Am. J. Pot. Res.* 2005, č. 82, s. 271.
- [74] HOSSAIN M. A., M. D. SHAH, CH. GNANARAJ, M. IQBAL. *In vitro* total phenolic, flavonoids content and antioxidant activity of essential oil, various organic extract from the leaves of tropical medicinal plant *Tetrastigma* from Sabah. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2011, s. 717-721.
- [75] KORSTEN, L. a N. COOK. Optimizing Culturing Conditions for *Bacillus Subtilis*. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*. 1996, č. 19, s. 54-58.

- [76] PIGGOT, P. J. *Bacillus subtilis*. *Encyclopedia of microbiology*. 2009, s. 45-56.
- [77] NAKANO, Michiko M., Yves P. DAILLY, Peter ZUBER a David P. CLARK. Characterization of Anaerobic Fermentative Growth of *Bacillus subtilis*: Identification of Fermentation End Products and Genes Required for Growth. *Journal of Bacteriology*. 1997, č. 179, no. 21, s. 6749–6755.

10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

MO	Mikroorganismus
EOs	Esenciální, éterické oleje
SD	Destilace vodní parou
HD	Hydrodestilace
SCE	Superkritická fluidní extrakce oxidem uhličitým
UE	Ultrazvuková extrakce
SFME	Mikrovlnná extrakce bez rozpouštědel
HPSE	Vysokotlaká extrakce
MAD	Mikrovlnná extrakce
SFE	Superkritická fluidní extrakce
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
Et	Ethanol
Oe	Octan ethylnatý
ZČ	Zázvor čerstvý
ZM	Zázvor mletý
S	Skořice
H	Hřebíček
S.D.	Směrodatná odchylka
n.d.	Nebyla detekována

11. SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha č. 1: Průměrné hodnoty růstové křivky *B. subtilis* a směrodatná odchylka při zvolených hodnotách pH
- Příloha č. 2: Průměrné hodnoty růstové křivky *B. subtilis* a směrodatná odchylka při teplotě 30 °C a zvolených hodnotách pH
- Příloha č. 3: Průměrné hodnoty růstové křivky *B. subtilis* a směrodatná odchylka při teplotě 35 °C a zvolených hodnotách pH
- Příloha č. 4: Průměrné hodnoty růstové křivky *B. subtilis* a směrodatná odchylka při teplotě 40 °C a zvolených hodnotách pH
- Příloha č. 5: Průměrné hodnoty růstové křivky *B. subtilis* a směrodatná odchylka při zvolených rychlostech třepání

Příloha č. 1: Průměrné hodnoty růstové křivky B. subtilis a směrodatná odchylka při zvolených hodnotách pH

pH				
t [hod]	6,5	7	7,5	8
3	4,4 ± 0,3	4,1 ± 0,1	3,8 ± 0,1	2,83 ± 0,08
6	8,50 ± 0,03	8,66 ± 0,08	9,41 ± 0,05	9,7 ± 0,1
9	9,6 ± 0,3	9,9 ± 0,4	10,7 ± 0,2	11,1 ± 0,3
24	10,5 ± 0,2	14,3 ± 0,2	13,50 ± 0,08	12,4 ± 0,4
48	11,0 ± 0,2	11,5 ± 0,4	10,47 ± 0,05	9,9 ± 0,3
72	10,0 ± 0,5	11,1 ± 0,4	9,57 ± 0,05	9,20 ± 0,03
96	9,8 ± 0,4	11,2 ± 0,8	9,0 ± 0,1	8,74 ± 0,02

Příloha č. 2: Průměrné hodnoty růstové křivky B. subtilis a směrodatná odchylka při teplotě 30 °C a zvolených hodnotách pH

30 °C			
t [hod]	7	7,5	8
3	4,1 ± 0,1	3,8 ± 0,1	2,83 ± 0,08
6	8,66 ± 0,08	9,42 ± 0,05	9,7 ± 0,1
9	9,9 ± 0,4	10,7 ± 0,2	11,1 ± 0,3
24	14,3 ± 0,2	13,50 ± 0,08	12,4 ± 0,4
48	11,5 ± 0,4	10,47 ± 0,05	9,9 ± 0,3
72	11,1 ± 0,4	9,57 ± 0,05	9,20 ± 0,03
96	11,2 ± 0,8	9,0 ± 0,1	8,74 ± 0,02

Příloha č. 3: Průměrné hodnoty růstové křivky B. subtilis a směrodatná odchylka při teplotě 35 °C a zvolených hodnotách pH

35 °C			
t [hod]	7	7,5	8
3	4,1 ± 0,5	2,7 ± 0,1	2,48 ± 0,07
6	9,75 ± 0,06	9,5 ± 0,2	8,0 ± 1,0
9	11,5 ± 0,3	10,9 ± 0,4	11,0 ± 0,3
24	14,4 ± 0,8	12,23 ± 0,09	11,8 ± 0,3
48	13,6 ± 0,9	10,1 ± 0,2	9,98 ± 0,09
72	14,4 ± 0,1	9,92 ± 0,07	9,9 ± 0,3
96	14,1 ± 0,2	9,6 ± 0,3	9,9 ± 0,2

Příloha č. 4: Průměrné hodnoty růstové křivky B. subtilis a směrodatná odchylka při teplotě 40 °C a zvolených hodnotách pH

40 °C			
t [hod]	7	7,5	8
3	7,50 ± 0,03	6,3 ± 0,5	3,4 ± 0,5
6	10,2 ± 0,1	10,1 ± 0,5	10,2 ± 0,2
9	11,5 ± 0,1	10,6 ± 0,4	10,63 ± 0,09
24	12,1 ± 0,3	10,47 ± 0,05	10,4 ± 0,2
48	11,6 ± 0,3	10,6 ± 0,2	10,4 ± 0,2
72	11,6 ± 0,5	9,3 ± 0,9	9,2 ± 0,4
96	11,4 ± 0,1	9,6 ± 0,9	9,5 ± 0,2

Příloha č. 5: Průměrné hodnoty růstové křivky B. subtilis a směrodatná odchylka při zvolených rychlostech třepání

Rychlost třepání [rpm]				
t [hod]	100	150	200	250
3	5,6 ± 0,3	6,5 ± 0,1	7,4 ± 0,2	7,41 ± 0,05
6	8,9 ± 0,2	9,50 ± 0,09	10,5 ± 0,5	11,10 ± 0,08
9	9,4 ± 0,4	10,6 ± 0,1	11,6 ± 0,8	12,7 ± 0,2
24	12,5 ± 0,3	13,10 ± 0,08	12,3 ± 0,7	14,60 ± 0,09
48	12,4 ± 0,1	12,4 ± 0,2	10,5 ± 0,4	14,80 ± 0,09
72	12,0 ± 0,2	12,2 ± 0,3	11,3 ± 0,9	14,9 ± 0,5
96	11,7 ± 0,2	12,2 ± 0,2	11,1 ± 0,9	14,9 ± 0,4