



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

ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY ROSTLINNÝCH EXTRAKTŮ

ANTIMICROBIAL EFFECT OF PLANT EXTRACTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

PATRIK KONDERLA

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

RNDr. MÁRIA VESELÁ, Ph.D.

BRNO 2015

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce bylo zkoumání možné antimikrobiální aktivity různých extraktů šípkových čajů a také stanovení antioxidační aktivity a koncentrace biologicky aktivních látek (polyfenolů a flavonoidů) těchto čajů.

V teoretické části byly shrnuty základní informace o rostlině růži šípkové a chemickém složení jejích plodů, přehled přírodních biologicky účinných látek a obecné rozdělení čajů. Praktická část je zaměřena na stanovení antimikrobiální aktivity čajových extraktů proti bakteriálním kmenům *Serratia marcescens* a *Bacillus subtilis* a také spektrofotometrické stanovení koncentrace polyfenolů, flavonoidů a celková antioxidační aktivity těchto extraktů.

Z výsledků vyplývá, že vodné extrakty šípkových čajů mají jistou mikrobiální aktivitu. Rovněž bylo zjištěno, že tyto extrakty mají vysoký obsah polyfenolických a flavonoidových látek.

ABSTRACT

The purpose of this bachelor thesis was to research the possible antimicrobial activity of various extracts of rosehip tea and also determine the antioxidant activity and the concentration of biologically active compounds (polyphenols and flavonoids) in these tea.

Theoretical part describes basic information about plant *Rosa canina* and chemical composition of rosehips, summary of the natural biologically active compounds and general classification of tea. The practical part is focused on detection of antimicrobial activity of tea extracts against bacterial strains *Serratia marcescens* and *Bacillus subtilis* as well as spectrophotometrical determination of concentration polyphenols, flavonoids and overall antioxidant activity of these extracts.

From the results flow the testing aqueous extracts rosehips tea analysed antimicrobial effects. Also was found, that these extracts has high content of polyphenols and flavonoids.

KLÍČOVÁ SLOVA

Růže šípková, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, rostlinné extrakty, čaj, antimikrobiální aktivita, antioxidační aktivita

KEYWORDS

Rosa canina, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, plant extracts, tea, antimicrobial activity, antioxidant activity

KONDERLA, P. *Antimikrobiální účinky rostlinných extraktů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 45 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Mária Veselá, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská 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:

Rád bych poděkoval mé vedoucí práce paní RNDr. Márii Veselé, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a čas, který mi věnovala při řešení této bakalářské práce.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	8
2.1	Popis přírodních účinných látek.....	8
2.2	Charakteristika přírodních látek s antimikrobiálními účinky	8
2.2.1	Fenoly, polyfenoly a fenolové kyseliny	8
2.2.2	Flavonoidy.....	9
2.2.3	Chinony	9
2.2.4	Třísloviny	9
2.2.5	Silice.....	10
2.2.6	Terpeny, terpenoidy.....	10
2.2.7	Alkaloidy	10
2.3	Čaje – zdroj přírodních antimikrobiálních látek	11
2.3.1	Chemické složení čaje	11
2.4	Rozdělení čajů.....	12
2.4.1	Nefermentované čaje	12
2.4.2	Částečně fermentované čaje	12
2.4.3	Fermentované čaje.....	13
2.5	Šípek	13
2.5.1	Botanický popis	13
2.5.2	Chemické složení plodu Růže šípkové.....	14
2.5.3	Šípkový čaj.....	14
2.6	Čajová směs	14
2.6.1	Aronie.....	14
2.6.2	Černý rybíz.....	15
2.7	Metody získávání rostlinných extraktů.....	15
2.7.1	Konvenční extrakční techniky	15
2.7.2	Nekonvenční extrakční techniky	16
2.8	Mikrobiologické metody.....	18
2.8.1	Difuzní stanovení antimikrobiální aktivity.....	18

2.9	Antioxidační systémy	19
2.9.1	Stanovení celkového obsahu polyfenolů	19
2.9.2	Stanovení celkového obsahu flavonoidů	20
2.9.3	Stanovení celkové antioxidační aktivity rostlinného materiálu	20
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1	Seznam použitých přístrojů.....	21
3.2	Seznam použitých chemikálií	21
3.3	Použitý software	21
3.4	Charakteristika použitých mikroorganismů	21
3.4.1	<i>Serratia marcescens</i>	22
3.4.2	<i>Bacillus subtilis</i>	22
3.5	Vzorky čajů podrobené analýze	22
3.6	Kultivační media a jejich příprava	23
3.7	Příprava macerátů	24
3.8	Příprava výluhů	24
3.9	Ověření antimikrobiálních účinků šípkových čajů	24
3.10	Stanovení celkových polyfenolů	25
3.11	Stanovení celkových flavonoidů	26
3.12	Stanovení celkové antioxidační aktivity	27
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	29
4.1	Stanovení celkového obsahu polyfenolů	29
4.2	Stanovení celkového obsahu flavonoidů	30
4.3	Stanovení celkové antioxidační aktivity	31
4.4	Antimikrobiální účinky extraktů	33
4.4.1	Inhibiční účinek extraktů macerátů	33
4.4.2	Inhibiční účinek extraktů výluhů	36
5	ZÁVĚR.....	39
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	40
7	ZDROJE	41

1 ÚVOD

Díky stále větší dostupnosti dat o zdravé výživě, silně stoupá spotřebitelská poptávka po bezpečných a kvalitních potravinách. Také se zvyšují obavy ohledně bezpečnosti potravin, zapříčiněné nárůstem výskytu nemocí způsobených patogenními mikroorganismy v potravinách, u kterých v poslední době stoupá odolnost vůči syntetickým konzervantům. To vyvolává nedůvěru v používání těchto konzervantů a umělých antimikrobiálních látek k inaktivaci a inhibici růstu patogenních mikroorganismů.[2]

V důsledku toho se pozornost obrací k přírodním antimikrobiálním látkám. Přírodní antimikrobiální látky jsou extrahovány především z rostlinných, ale také z živočišných a mikrobiálních zdrojů. Mají značný potenciál pro využití v technologii uchovávání potravin. Léčivé účinky rostlin jsou známy velmi dlouho. Již v dávné minulosti se rostliny používaly jako léčivé přípravky nebo konzervační látky. Přestože antimikrobiální mechanismy těchto látek nejsou zcela známy, roste snaha vyvinout nové účinné metody, které využívají těchto látek ke zvýšení bezpečnosti potravin.[1]

Zájem o výzkum antimikrobiálních vlastností přírodních látek v posledních letech také stoupá z důvodu narůstající rezistence mikroorganismů k používaným antibiotikům. Přírodní látky jsou preferovány pro jejich minimální toxicitu, minimální vedlejší účinky, dobrou dostupnost a lepší odbouratelnost ve srovnání s antibiotiky. Také přidáním některých přírodních látek do antibiotik se dá jejich účinnost mnohonásobně zesílit.[2][4]

Využívají se jak extrakty z rostlin, tak i jednotlivé složky, které tyto extrakty obsahují. Rostlinné extrakty se získávají pomocí maceračních, destilačních nebo odpařovacích technik.[4]

Cílem předložené práce je testování možné antimikrobiální aktivity, rostlinných extraktů výluhů a macerátů, čajových přípravků z plodů růže šípkové na mikroorganismy *Serratia marcescens* a *Bacillus subtilis*. Dále také stanovení hlavních složek s antioxidační aktivitou obsažených v použitých čajích a diskuze vlivu těchto látek na antimikrobiální aktivitu.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Popis přírodních účinných látek

Hledání léčivých a konzervačních prostředků z rostlin má velmi dlouhou tradici. Většina rostlin má schopnost vytvářet různé chemické látky, které určitými mechanismy ovlivňují živé organismy. Tyto látky rostliny využívají při obraně proti mikroorganismům, hmyzím škůdcům i býložravcům. Mezi nejvýznamnější skupinu těchto látek patří fenolické a polyfenolické sloučeniny. Tyto chemické sloučeniny mají často také vliv na rostlinnou vůni či zbarvení jako například kapsaicin což je terpenoid obsažený v chilli papričkách. Tato látka je zodpovědná za charakteristickou pálivou chuť chilli papriček. Některé z těchto rostlinných látek mohou mít také léčivé nebo konzervační účinky.[6]

Účinné složky mohou být obsaženy v celé rostlině, nebo jen v některé z jejích částí. Nacházejí se v nadzemní části, jako jsou nať, květy, listy, lodyha, pupen, semeno a také podzemní části: kořen, oddenek, hlíza.[5]

Účinnost přírodních látek je ovlivněna složením a strukturou daných sloučenin, dále funkčními skupinami a také možnými synergickými nebo antagonistickými interakcemi těchto komponent.[7]

Mechanismus účinku přírodních látek není zcela znám, nicméně studie dokazují, že terpenoidy a fenoly narušují membrány mikroorganismů a například alkaloidy mají vliv na změny genetického materiálu mikroorganismů. Terpeny také zasahují do enzymatických pochodů buňky tím, že potlačují enzymatickou aktivitu nebo úplně zastavují produkci enzymů a tím může dojít k smrti bakteriální buňky. Některé sekundární metabolity rostlin působí jako „vypínače“, interferují totiž s translokací protonů přes membránové váčky a tak blokují fosforylaci adenosin-difosfátu jakožto primárního energetického metabolismu. Účinnost antimikrobiálních sloučenin je závislá na hodnotě pH, typu potraviny a počtu kontaminujících mikroorganismů.[4][16]

2.2 Charakteristika přírodních látek s antimikrobiálními účinky

2.2.1 Fenoly, polyfenoly a fenolové kyseliny

Fenoly jsou alkoholy, které lze charakterizovat jako látky obsahující jedno nebo více aromatických jader substituovaných hydroxylovými skupinami. Jejich nejjednodušším zástupcem je fenol.

K nejvýznamnějším fenolům patří eugenol ze silice hřebíčkové (*Oleum caryophylli*), thymol ze silice tymiánové (*Oleum thymi*) a karvakrol ze silice kmínové (*Oleum carvi*). Fenolické étery jsou například anetol z plodů anýzu a fenyklu a safrol ze silice badyánové (*Oleum anisi stellati*).[6][17]

Polyfenolové sloučeniny jsou významnou skupinou přírodních látek a jsou obsaženy téměř ve všech vyšších rostlinách. Jedná se o velice obsáhlou skupinu látek, do které patří několik tisíc strukturně velmi různorodých fenolových sloučenin. Polyfenolové látky jsou známé svou vysokou antioxidační a antimikrobiální aktivitou, což dokazuje mnoho studií.[9][17]

Poloha a počet hydroxylových skupin ve fenolické struktuře úzce souvisí s antimikrobiální aktivitou. Studie ovšem dokazují, že s přibývajícím počtem hydroxylových skupin se zvyšuje také toxicita těchto sloučenin.[6]

2.2.2 Flavonoidy

Flavonoidy tvoří majoritní podíl všech v přírodě se vyskytujících se polyfenolických látek a jsou jednou z nejlépe studovaných skupin přírodních látek s antimikrobiální aktivitou. Z chemického hlediska jsou flavonoidy hydroxylované, aromatické, fenolické sloučeniny, jejichž základem je heterocyklická sloučenina flavan, která je tvořena dvěma benzenovými kruhy spojenými heterocyklickým pyranem. Flavonoidy jsou sloučeniny s vysokou antioxidační aktivitou. Na antioxidační účinnost flavonoidů má největší vliv poloha a počet hydroxylových skupin v molekule.[20][21]

Předpokládá se, že antimikrobiální aktivitu flavonoidů způsobuje schopnost interakce těchto látek s extracelulárními proteiny v buněčné stěně mikroorganismu, což vede k degradaci buněčné stěny. Lipofilní flavonoidy také mohou rozrušovat cytoplazmatickou membránu mikroorganismů.[6]

Nejznámějším flavonoidem je netoxický rutin, který má určitý antimikrobiální význam v zaživacím traktu. Významnými flavonoidy jsou glykosidy morin, quercetin a kemferol. Především quercetin vykazuje silné inhibiční účinky proti *Salmonella enteritidis* a *Bacillus cereus*. [18][19]

Do skupiny flavonoidů patří také katechiny, které jsou hlavní složkou čajových lístků. Katechiny inhibují růst mikroorganismů a vykazují také dobré výsledky při prevenci některých generačních chorob.[6]

2.2.3 Chinony

Chinony jsou nejrozšířenější skupinou přírodních barviv. Chemicky se jedná o deriváty benzochinonů, naftochinonů a antrachinonů.[5]

Jsou to aromatické sloučeniny se dvěma oxo skupinami v poloze para, formálně odvozeny od difenolů oxidací příslušných hydroxylových skupin. Chinony jsou vysoce reaktivní sloučeniny. V mikrobiální buňce tvoří ireverzibilní komplexy s nukleofilními aminokyselinami, což má za následek inaktivaci proteinů a ztrátu jejich funkce. Pravděpodobně reagují také s povrchovými adhezidy, polypeptidy buněčné stěny a enzymy vázanými na membránách.[6]

2.2.4 Třísloviny

Třísloviny neboli taniny jsou látky známe svou trpkou svíravou chutí. Vyskytují se především v kůře a ovoci celé řady rostlin, především v kůře různých dubů. Chemicky jsou taniny heterogenní a komplexní směs. Třísloviny se obvykle dělí na dvě skupiny: (a) deriváty flavanolů, tzv. kondenzované třísloviny a (b) hydrolyzovatelné třísloviny (významnější skupina), které jsou estery sacharidů, obvykle glukosy, s jednou nebo více molekul kyseliny trihydroxybenzenkarboxylové

(gallové), či jejím dimerem kyseliny ellagové. Bohaté na třísloviny jsou především dvouděložné rostliny, jednoděložné naopak velmi chudé. **Error! Reference source not found.**[23]

Mezi třísloviny patří například korilagin nebo kaki tanin. Kaki tanin je komplexní sloučenina skládající se z epikatechinu, katechin-gallátu, gallokatechinu a gallokatechin-gallátu. **Error! Reference source not found.**

2.2.5 Silice

Silice jsou těkavé lipofilní směsi přírodních látek s intenzivní vůní. Tvoří je bohaté směsi organických sloučenin (terpeny, seskviterpeny a fenylypropanové deriváty). Silice mohou prostupovat celou rostlinu, jako v případě jehličnatých stromů nebo se koncentrují v určitých rostlinných orgánech (květy, plody, listy, kůra a kořeny).[23]

Antibakteriální, antifugicidní a antioxidační aktivita silic a jejich složek ještě není zcela prostudována. Antioxidační aktivita je studována především u silic získaných z kořenových částí rostlin. Nejlepších výsledků v inhibici bakteriálních kmenů dosahovaly silice obsahující především carvacrol, cineol, eugenol a thymol.[18]

2.2.6 Terpeny, terpenoidy

Jsou významnou složkou rostlinných silic a pryskyřic. Struktura terpenů je založena na pěti uhlíkatém isoprenu, lineárním spojováním této základní jednotky vznikají: monoterpeny, diterpeny, triterpeny a seskviterpeny. Terpeny mohou být i karotenoidy (tetraterpeny). Terpeny, které obsahují heterogenní molekulu kyslíku se nazývají terpenoidy. Nejznámějšími terpenoidy jsou kafr, menthol (monoterpeny), farnesol a artemisin (seskviterpenoidy). Cyklizací triterpenů vzniká další významná skupina látek steroidy (fytosteroly).[25][26]

Terpeny a terpenoidy potlačují růst bakterií, virů a prvoků. Například triterpenoid betulín, který je obsažen v pigmentu břízy bělokoré, je již dlouhá léta testován na anti-HIV aktivitu. Mechanismus inhibičního působení terpenoidů zatím není zcela objasněn, nicméně je vědecky prokázáno, že terpenoidy narušují cytoplazmatickou membránu mikroorganismů. Toxicita terpenů pro mikroorganismy je založena na lipofilních vlastnostech těchto látek. Jedná se o vazbu na lipidy bakteriálních membrán, narušování iontové rovnováhy a s tím i související poruchy funkce membránových proteinů, což může vést k buněčné smrti.[6][24]

2.2.7 Alkaloidy

Alkaloidy jsou látky, které se vyznačují přítomností aminového dusíku heterocyklicky vázaného v molekule s různými farmakologickými účinky, hojně využívané v medicíně. Nejznámějším alkaloidem je morfin, který byl izolovaný již v 19. století z máku. Mezi další alkaloidy patří například diterpenoidní alkaloidy, extrahované z pryskyřníku, které vykazují antibakteriální aktivitu nebo

glykoalkaloid solamargin, který je používán při léčbě HIV infekce. Důležitým představitelem skupiny je berberin, který inhibuje růst mikroorganismů vmezeřováním do bakteriální DNA.[6][23]

V rostlinách jsou vázány jako soli organických kyselin (kyselina šťavelová, octová, mléčná, jablečná, vinná apod.). Většina alkaloidů jsou bezbarvé pevné látky, bez zápachu, špatně rozpustné ve vodě a naopak dobře rozpustné v alkoholu, chloroformu, éteru a ve směsi chloroformu s éterem.[6]

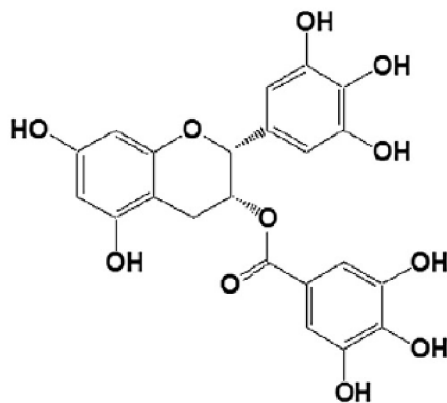
2.3 Čaje – zdroj přírodních antimikrobiálních látek

Dlouhá historie čaje jako nápoje je pozoruhodná. Čaj je pěstován na mnoha různých místech po celém světě. Nicméně, všechny skutečné čaje jsou vyrobeny z listů *Camellia sinensis*, která je původem z Číny. Čaj je na světě po vodě druhým nejoblíbenějším nápojem, který konzumují dvě třetiny světové populace. V roce 2010 dosáhla světová výroba čaje přes 4,52 miliónů tun. Největšími producenty čaje jsou Čína, Indie, Keňa, Srí Lanka a Turecko. Globálně je Indie na druhém místě (991 180 tun) v čajové produkci za Čínou (1 467 467 tun).[15][11][15]

2.3.1 Chemické složení čaje

Složení čaje se liší podle odrůdy, sezóny, stáří listu, klimatu a pěstitelských postupech. Na chemické složení má také značný vliv použití fermentačních procesů při dalším zpracování čajových listů. Po chemické stránce je čajový list komplexem jež obsahuje sacharidy, aminokyseliny, bílkoviny, alkaloidy (kofein, theofylin a theobromin), těkavé sloučeniny, polyfenoly, minerály a stopové prvky. V posledních letech se vědecký zájem soustřeďuje pro jejich biologickou aktivitu na polyfenoly a z nich především na flavanoly.[3]

Čerstvé zelené čajové lístky jsou bohaté na monomerní flavanoly, známé jako katechiny, ze kterých je nejhojněji a zároveň nejvíce bioaktivní epigalokatechin-3-galát (EGCG) (Obr 1). EGCG představují 50–80 % z celkového obsahu katechinů v zeleném čaji. Katechiny jsou v rostlině zastoupeny v množství 30–40 % suché hmotnosti čerstvých čajových lístků a dělí se podle stupně polymerizace na monomery, dimery a oligomery. Monomery se označují jako katechiny a patří mezi ně již zmiňovaný EGCG dále epigalokatechin (EGC), epikatechin, galokatechin a katechin. Dimery se obecně nazývají theaflaviny a patří zde theaflavin, theaflavin-3-galát, theaflavin-3'-galát a theaflavin-3,3'-dikalát (TF3). Oligomery jsou polymery vzniklé oxidací EGC a EGCG, tyto látky jsou odvozeny od trislovin a jejich struktura není přesně známá. Biologická aktivita flavanolů zahrnuje prevenci vzniku volných radikálů, antimutagenní aktivitu, ochranu před kardiovaskulárními chorobami, snižování hladiny cholesterolu v plasmě, zlepšení u diabetu 2. typu, ochranu před neurodegenerativními chorobami a zesilování kapilár („vitamin P efekt“).[3][15]



Obr 1: *Struktura epigalokatechin-3-galátu (EGCG)* [12]

2.4 Rozdělení čajů

Jak již bylo zmíněno výše čaj je jedním z nejoblíbenějších nápojů na světě díky svému aroma, chuti a blahodárným účinkům. Čaj je připravován mnoha různými způsoby, ale v závislosti na výrobním procesu je čaj klasifikován do tří hlavních typů: nefermentované (zelené a bílé čaje), částečně fermentované (oolongy neboli polozelené čaje) a fermentované (černé a tmavé čaje). Přestože jde ve skutečnosti o oxidaci (čajové listy nejsou vystaveny vlivu mikroorganismů, ale kyslíku). Děj je označován jako fermentace z historických důvodů.[3]

2.4.1 Nefermentované čaje

Zelený čaj je typickým nefermentovaným čajem. Vyrábí se sušením na pánvích nebo napařováním čerstvých čajových lístků. Tím dochází k inaktivaci enzymu polyfenolické oxidázy a tudíž zastavení oxidace. Už ve starověké Číně byl zelený čaj považován za profylaktický nápoj. Díky tomu, že u zeleného čaje nedochází k oxidaci, je v něm obsaženo nejvíce monomerních katechinů, především EGCG ze všech čajů. To má za následek jeho zdravotní přínos, jako je snížení výskytu kardiovaskulárních onemocnění, inhibice matrix metaloproteináz, stimulační účinky, regulace tělesné teploty, antimikrobiální aktivita, regulace krevního cukru a podpora trávení.

U bílého čaje dochází jen k jemné oxidaci, která probíhá během vadnutí listů. Poté je čaj sušen. Během výroby se dbá na co největší minimalizaci oxidace, což činí tento čaj bílý. Ačkoliv extrakty z bílého čaje jsou méně prostudované, je známo, že účinně inhibují adipogenezi a tudíž má potenciál ve využití léčby obezity. Některé odrůdy bílého čaje také vykazují silnou antimutagenní aktivitu a působí jako foto-protektční činidla chránící před stimulovaným slunečním zářením, vyvolávajícím oxidační poškození DNA.[11][11]

2.4.2 Částečně fermentované čaje

Polozelené čaje jinak nazývané také oolongy tvoří přechod mezi nefermentovaným zeleným čajem

a fermentovaným černým čajem. Vyrábí se unikátním procesem, který zahrnuje vadnutí na silném slunci a během, kterého je oxidace v různých fázích přerušena. Poté jsou čajové lístky rolovány a zkrucovány. Polozelené čaje vykazují anti-obezitní efekt a svou úlohu má také v prevenci diabetu.[11]

2.4.3 Fermentované čaje

Mezi fermentované čaje patří černé a tmavé čaje. Černý čaj se vyrábí tak, že po sběru se lístky mechanicky naruší, oxidační proces poté probíhá při teplotě okolo 30 °C a velice vysoké vlhkosti. Zpracování trvá týden i déle. Během těchto procesů dochází k oxidaci a kondenzaci monomerních katechinů, ze kterých vznikají větší polyfenolické molekuly (oligomery a polymery). Tyto polymery jsou zodpovědné za silnou hořkou chuť černého čaje a jeho černou barvu. Podle některých výzkumů má černý čaj pozitivní vliv na pokles krevního tlaku, prevenci vzniku ischemické cévní mozkové příhody a snížení rizika vzniku kardiovaskulárních chorob.[3]

Tmavý čaj neboli Pu-erh se vyrábí z vybraných listů vysokých a starých čajovníků. Tmavé čaje se také označují jako dvakrát fermentované, protože u druhé fermentace se používají mikroorganismy. První fermentační proces je stejný jako u čaje černého, ale fermentace probíhá mnohem delší dobu. Doba fermentace tmavých čajů je přímo úměrná jejich kvalitě. V porovnání se všemi ostatními druhy čajů, má tmavý čaj nejvyšší obsah kofeinu. Tmavý čaj má příznivý vliv na snižování cholesterolu v krvi. Vodné výluhy tmavých čajů také vykazují antimikrobiální aktivitu proti gram-pozitivním kmenům *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*. [11]

2.5 Šípek

2.5.1 Botanický popis

Rosa canina patří do čeledi růžovité (*Rosaceae*). Růže šípková je rozložitý a někdy šplhavý keř, který dorůstá výšky 1–3 m, má převislé větve se silnými, hákovitě dolů zahnutými ostny. Lísty jsou lichozpeřené. Tato rostlina kvete od června do srpna bílými, lehce narůžovělými květy. Tyto květy jsou složeny z 5 korunních plátků a baňkovité čísky s velkým množstvím pylových tyčinek. Z oplozených květů se vyvíjí nepravý plod šípek. Plody jsou červené elipsoidního až kulatého tvaru a zrají na konci léta. Uvnitř šípku se nacházejí pravé plody, tvrdé nažky.[27][28][29]

Růže šípková se vyskytuje v Evropě, na Madeiře, Kanárských ostrovech, severozápadní Africe i Blízkém východě. Roste jak v nížinách, tak v horských oblastech, kde se vyskytuje mezi hranicí lesa a kosodřevinou. Preferuje humózní půdy bohaté na živiny, nepříliš suché na slunných či polostinných místech.[29][30]

2.5.2 Chemické složení plodu Růže šípkové

Plody šípku obsahují vysoké množství vitamínu C, a to 417 mg ve 100 g plodů. To je 6krát více než v pomeranči, kde je ve 100 g 76 mg vitamínu C. Tento vitamín se vyskytuje ve formě kyseliny askorbové, která je bez zápachu. Šípkové plody obsahují největší množství kyseliny askorbové po dosažení zralosti, kdy jsou plně vybarvené a tvrdé. Poté se obsah této kyseliny v plodech pomalu snižuje. Při skladování natrhaných plodů se obsah kyseliny askorbové sníží za rok o 50 %.[32][34]

Dalšími aktivními látkami obsaženými v šípkových plodech jsou flavonoidy, které mají synergický účinek s kyselinou askorbovou takže zesilují celkový antioxidační efekt šípkových extraktů. Také je známo, že šípkové plody obsahují vitamín B₁, B₂, provitamin A, kyselinu nikotinovou a karotenoidy (lykopen, karoten, rubixanthin, xantofyl, taraxanthin), sacharidy, třísloviny a slizy.[23][31]

V plodech šípkové růže pěstované v Turecku bylo zjištěno 2,365–2,712 g vitamínu C ve 100 g plodů, 3,97–4,67 mg · kg⁻¹ sodíku, 890,5–1 023,9 mg · kg⁻¹ draslíku a 1 850–2 200 mg · kg⁻¹ fosforu. Dále byly ve stopovém množství stanoveny prvky: železo, zinek, mangan, hořčík a vápník a také byla zjištěna přítomnost organických kyselin jako například kyselina citronová, jablečná, betulinová, olejová, linolová a α -linolenová.[33]

2.5.3 Šípkový čaj

Růže šípková byla již v dávné minulosti častým prostředkem používaným v lidovém léčitelství. Pro své léčivé vlastnosti byly a jsou používány především nepravé plody a okvětní lístky.[28]

Například odvar z květů se používá k obkladům na zmírnění zánětu spojivek. Nálev z korunních plátků také napomáhá trávení po požití těžkých jídel.[29]

Plodové kyseliny a pektiny obsažené v šípcích povzbuzují činnost střev tak, že čaj nemá projímavé, ale spíše regulační účinky na střeva a zároveň také působí močopudně. V čajových směsích se šípek často vyskytuje v čajích proti chřipce a urologických čajích. V lidovém léčitelství je také známý čaj z šípkových jader, jenž má pomáhat při problémech ledvin, močového měchýře, revmatizmu a dně. Kyselina askorbová obsažená v šípcích posiluje celkovou obranyschopnost organismu a napomáhá při léčbě hojení ran.[30]

2.6 Čajová směs

2.6.1 Aronie

Aronie je 2 až 3 metry vysoký ovocný keř, jinak též nazývaný temnoplodec nebo černý jeřáb. Původně pochází z východní části severní Ameriky a Kanady. Kolem roku 1900 byla tato rostlina dovezena do Německa, odkud se poté rozšířila do zemí východní Evropy, Skandinávie a Ruska. Rozlišují se dva hlavní druhy Aronie, Aronii černou (*Aronia melanocarpa*) a Aronii Červenou (*Aronia arbutifolia*). V potravinářském průmyslu využívají pouze plody Aronie černé. Aronie se běžně používá k výrobě ovocných šťáv, sirupů, marmelád, želé a čajů. V čajích se obvykle vyskytuje ve směsích s dalšími více

aromatickými složkami, často s černým rybízem. Nicméně vzhledem k silně kyselé až svíravé chuti plodů, dochází pouze k omezenému použití v průmyslové výrobě šťáv a nektarů. Mnohem častěji se používá v ovocných šťávách v kombinaci s dalšími druhy ovoce.

Plody aronie mají vysoký obsah anthokyanových pigmentů, díky čemuž se používaly jako přírodní barvivo. Dále je také Aronie známá vysokým obsahem sorbitolu a polyfenolických látek.[35]

2.6.2 Černý rybíz

Černý rybíz je odrůdou rybízu obecného, který patří do rodu *Ribes*. Je to planě rostoucí keř, vyskytující se v celé oblasti severní a střední Evropy. Jedná se o ovocný keř dorůstající výšky až 2 m, s hrozny střední velikosti, které mají černé nebo tmavě fialové bobule. Mezi další odrůdy rybízu patří rybíz červený a rybíz bílý. Plody černého rybízu mají vysoký obsah vitamínů, především vitamínu C. Také obsahuje velké množství minerálních látek především draslíku. Z antimikrobiálního hlediska patří mezi důležité látky zastoupené v plodech rybízu anthokyanová barviva a organických kyselin.[36][37]

2.7 Metody získávání rostlinných extraktů

S ohledem na velké rozdíly ve struktuře bioaktivních látek a ohromnou rozmanitost rostlinných druhů, existuje také velké množství separačních technik získávání těchto látek. V minulosti byly vypracovány postupy pro zpracování rostlin s účinnými látkami, od pojmenování rostliny až po komercializaci produktu, jež zahrnují: hodnocení toxicity, přípravu vzorků a elementární analýzu, biologické testy, izolaci účinné látky a *in vivo* analýzu. U většiny z těchto postupů je nejprve nutné identifikovat a charakterizovat bioaktivní látky a následně ze zjištěných informací zvolit vhodný typ extrakce. Nastavením přesných extrakčních podmínek, se dají selektivně extrahovat bioaktivní látky z rozmanitých přírodních zdrojů. U některých extrakčních technik se jejich postup nezměnil stovky let.[49]

Všechny extrakční techniky mají některé společné cíle, (a) extrakci cílené bioaktivní sloučeniny z komplexního vzorku rostliny, (b) zvýšení selektivity analytických metod, (c) zvýšení koncentrace cílené látky (d) převedení bioaktivní sloučeniny do formy vhodnější pro detekci a separaci, (e) vytvoření silné reprodukovatelné metody, která je nezávislá na změně matrice vzorku.[49]

2.7.1 Konvenční extrakční techniky

Existuje několik klasických extrakčních technik používaných pro získávání bioaktivních látek z rostlinného materiálu. Většina z těchto metod je založena na využití extrakční síly různých rozpouštědel v kombinaci s aplikací tepla a nebo míchání. Mezi klasické extrakční techniky získávání biologicky aktivních látek patří: soxhletova extrakce, macerace a hydrodestilace.[49]

Soxhletova extrakce byla navržena především pro extrakci lipidů, ale dá se použít také pro extrahování bioaktivních látek z přírodních zdrojů. Používá se jako model pro srovnání nových alternativních extrakčních technik.[49]

Macerace je jednoduchý a levný způsob získávání rostlinných extraktů, který se běžně používá také pro domácí výrobu. Základní macerace se skládá ze tří kroků. Za prvé se rostlinný materiál nadrtí na malé části pro zvýšení povrchové plochy a usnadnění míchání s rozpouštědlem. Za druhé přidání vhodného rozpouštědla pro macerační proces, které se nazývá menstruum a vložení macerační směsi do uzavřené nádoby. Za třetí lisování získaného macerátu z vyextrahovaného rostlinného vzorku. Příležitostné třepání v maceraci usnadňuje extrakci zvýšenou difuzí.[4]

Hydrodestilace je tradiční metodou extrakce bioaktivních látek a esenciálních olejů z rostlin. Existují dva typy hydrodestilace: destilace vodou a přímá parní destilace. V prvním případě je vzorek zalit vodou, která se poté přivede k varu a v druhém případě se pára přímo vstříkává do vzorku rostlin. Hydrodestilace zahrnuje tři hlavní fyzikálně chemické procesy: difuzi, hydrolýzu a tepelný rozklad.

Při vysoké extrakční teplotě mohou být ztraceny některé těkavé složky. Tento nedostatek omezuje použití hydrodestilace pro tepelně labilní sloučeniny.[4]

2.7.2 Nekonvenční extrakční techniky

Hlavními nedostatky konvenčních extrakčních technik jsou dlouhá doba extrakce, nákladné požadavky na vysokou čistotu rozpouštědel, nízká extrakční selektivita a ztráta tepelně labilních sloučenin během extrakce. K překonání těchto omezení konvenčních extrakčních metod, jsou zaváděny nové extrakční techniky. Tyto nové metody jsou označovány jako nekonvenční extrakční techniky. Nejslibnějšími z těchto technik jsou ultrazvuková extrakce, enzymově asistovaná extrakce, mikrovlnná extrakce, extrakce pulzním elektrickým polem a tlaková extrakce. U těchto nových metod je kladen také velký důraz na používání bezpečnějších chemikálií a rozpouštědel, energetickou účinnost a využívání obnovitelných surovin. To je také důvodem proč se některé z těchto metod označují jako „zelené techniky“.[49]

2.7.2.1 Ultrazvuková extrakce

Ultrazvuk je speciální typ zvukového vlnění nad hranici slyšitelnosti lidského ucha. V chemii se obvykle využívá zvukové vlnění o frekvenci od 20 kHz do 100 MHz. Při použití tohoto vlnění v extrakci dochází k opakovanému stlačování a expanzi média, což vede k jevu zvanému kavitace. Kavitace je děj při, kterém vznikají uvnitř kapaliny bubliny způsobené lokálním poklesem tlaku. Po vymizení podtlaku tyto bubliny implodují za vzniku rázových vln. Studie uvádějí, že uvnitř kavitačních bublin je dosahováno teplot asi 5000 K a tlaku 1000 MPa. Princip ultrazvukové extrakce je založen na využití energie těchto kavitačních bublin.

Ultrazvuková extrakce zintenzivňuje přestup hmoty a urychluje přístup rozpouštědla k buněčnému materiálu rostlinných částí, to vede k usnadnění loužení organických a anorganických sloučenin z rostlinné matrice. Extrakce ultrazvukem zahrnuje především dva fyzikální jevy, (a) difuzi látek přes buněčnou stěnu a (b) vyplachování buněčného obsahu po rozrušení buněčné stěny. Hlavními faktory ovlivňujícími výsledek ultrazvukové extrakce jsou teplota, tlak, frekvence, velikost rostlinných částí a doba působení ultrazvuku. Ultrazvuková extrakce se také používá ve spojení s některými klasickými technikami, protože je známo, že zvyšuje jejich účinnost.[49]

2.7.2.2 Extrakce pulzním elektrickým polem

Principem využití pulzního elektrického pole (PEP) je destrukce struktur buněčných membrán za účelem zvýšení extrakce. Pro PEP jsou citlivé ty části buněčných membrán, které fungují na dipólovém charakteru. Při překročení kritické hodnoty přibližně 1 V transmembránového potenciálu, vzniká mezi látkami s dipólem odpor, což vede ke tvorbě pórů v membráně a to zapříčiní uvolňování intracelulárních sloučenin z rostlinné tkáně zvýšením propustnosti membrány.

Pro PEP se používá jednoduché zařízení sestávající z komory obsahující elektrody, do které se vkládá rostlinný materiál. Účinnost PEP extrakce závisí na síle vstupního pulsu, teplotě a také vlastnostech rostlinné matrice. Použitím PEP dochází k rozrušení buněčných membrán aniž by docházelo k razantnímu zvýšení teploty. Z tohoto důvodu se dá PEP použít při extrakci tepelně labilních sloučenin.[49]

2.7.2.3 Enzymově asistovaná extrakce

Určité fytochemikálie jsou v rostlinných maticích vázány do polysacharidů pomocí hydrofóbních vazeb, které jsou při použití běžných extrakčních technik a rozpouštědel neextrahovatelné. Použití enzymů během extrakčního procesu se ukázalo jako efektivní způsob jak uvolňovat výše zmíněné sloučeniny a zvýšit tím celkový výtěžek extrakce. Pro hydrolýzu strukturálních polysacharidů se používají specifické enzymy jako je celulóza, α -amyláza a pektináza.

Enzymy se používají především pro extrakci olejů, například při extrakci olejů ze semen lisovaných za studena. Bylo zjištěno, že oleje získané metodami s enzymovou asistencí obsahují vyšší množství volných mastných kyselin a fosforu než běžně hexanem extrahované oleje. Enzymově asistovaná extrakce je uznávána jako ekologicky šetrná technologie pro extrakci bioaktivních látek a olejů, protože používá vodu jako rozpouštědlo namísto organických chemikálií.[49]

2.7.2.4 Mikrovlnná extrakce

Mikrovlnná extrakce je jednou z dalších nových extrakčních technik používaných pro extrakci rozpustných materiálů. Mikrovlny jsou elektromagnetické vlny s kmitočtovým pásmem od 300 MHz

do 300 GHz. Působením mikrovln na rostlinnou matici dochází k přeměně elektromagnetické energie v tepelnou energii. To je způsobeno neustálým otáčením polárních molekul, což vede ke kolizím těchto molekul, které generují teplo.

Mikrovlenná extrakce má tři fáze: za prvé oddělení rozpustných látek z aktivních míst matrice za zvýšené teploty a tlaku, za druhé difuzi rozpouštědla přes matici vzorku a za třetí uvolňování rozpuštěných látek z matrice vzorku do rozpouštědla. Mikrovlenná extrakce se používá především pro extrakci organických a organokovových sloučenin.[49]

2.7.2.5 Tlaková extrakce rozpouštědlem

Tato moderní extrakční technika je založena na využití vysokého tlaku během extrakce, který udržuje rozpouštědlo při vysoké teplotě, ale v kapalném stavu. Díky současné automatizaci technik dochází k velkému rozvoji tlakové extrakce (PSE). Výhodou PSE je malá spotřeba rozpouštědla a vyšší rychlost extrakce než u běžných technik. PSE je také považována za alternativní techniku pro extrakci kapalinou v nadkritickém stavu. PSE se používá pro extrakci organických znečišťujících látek, které jsou stabilní při vysokých teplotách. Pro svou nízkou spotřebu rozpouštědla je PSE také řazena mezi ekologicky šetrné technologie pro extrakci.[49]

2.8 Mikrobiologické metody

Antimikrobiální 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 vykazujících antimikrobiální aktivitu, způsobu jejich extrakce nebo rozpustnosti.[38]

2.8.1 Difuzní stanovení antimikrobiální aktivity

Difuzní metoda patří mezi kvalitativní a semikvantitativní metody stanovení citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám. Tato metoda využívá tuhé agarové medium, ve kterém je naočkovaný citlivý mikroorganismus a testovaná látka difunduje mediem, čímž způsobuje vznik inhibičních zón; velikost zóny je závislá na koncentraci testované látky, na složení kultivační půdy, vlhkosti půdy, tloušťce kultivační půdy, pH půdy, doby inkubace a stability látky.[39]

Podle způsobu nanášení testované látky se difuzní metoda dělí na jamkovou difuzní metodu a diskovou difuzní metodu.

Při všech uvedených metodách je důležité, aby vrstva kultivačního media byla rovnoměrně vysoká, aby mikroorganismus byl rovnoměrně naočkovaný po celém povrchu (v celém objemu) a aby jednotlivé vzorky byly dostatečně vzdálené od okrajů plotny a navzájem se nedotýkaly. [39]

Disková difuzní metoda

Disková metoda je založena na difuzi antimikrobiální látky do agarové plotny, naočkované testovaným mikroorganismem skrz papírové disky ve, kterých je napuštěna.[14]

Jamková difuzní metoda

U jamkové metody se testovací látky pipetují do jamek vyhloubených sterilním korkovrtem přímo do naočkované ztuhlé agarové vrstvy.[14]

2.9 Antioxidační systémy

Aerobní organismy jsou existenčně závislé na kyslíku, současně však jsou vystaveny negativním účinkům reaktivních forem kyslíku tzv. volným radikálům a dalším sloučeninám vznikajícím jako vedlejší produkty oxidačního metabolismu. Živé organismy disponují komplexním systémem antioxidační ochrany. Rostlinná tkáň je velmi bohatá na většinu typů antioxidantů, které posilují náš antioxidační systém.[13]

S antioxidační aktivitou v bylinách jsou nejčastěji spojovány skupiny látek známe jako vitamíny především vitamin E a C, polyfenoly, flavonoidy a také pigmenty mezi, které patří karotenoidy a anthokyany. Antioxidanty i v nízkých koncentracích výrazně zpomalují nebo zabraňují oxidačním reakcím citlivých složek jako jsou například lipidy. Kromě toho je antioxidační aktivita spojena se snížením poškození DNA a peroxidace lipidů, což zvyšuje úroveň imunity při ochraně a redukcí zhoubných proměn v buňkách. Některé studie uvádějí fenolické sloučeniny jako hlavní bioaktivní fytochemikálie s antioxidační aktivitou. S přihlédnutím k výsledkům získaných různými výzkumy se dá dojít k závěru, že polyfenoly jsou pravděpodobně nejhodnotnější zastoupenými a nejdominantnějšími antioxidanty bylinných výtažků.[1][10][12]

2.9.1 Stanovení celkového obsahu polyfenolů

Díky své jednoduchosti a nízkým ekonomickým nákladům se ke stanovení celkových polyfenolů používají především spektrofotometrické metody. Poskytují užitečné informace a charakterizaci jak jednotlivých strukturálních tříd polyfenolů, tak i celkové stanovení těchto komponent v rostlinném materiálu.[40]

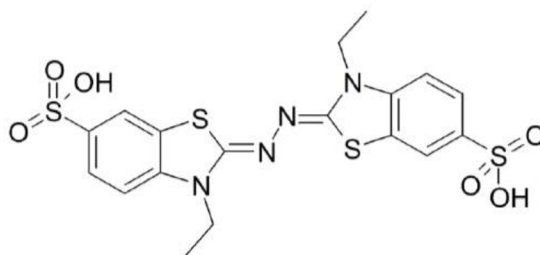
Jednou z nejvyužívanějších metod je Folin–Ciocalteuho spektrofotometrická metoda. Metoda je založena na reakci látek směsi Folinova činidla a fosfomolybdenanu a fosfowolframanu s fenoly obsažených v rostlinném vzorku. Principem je redukce fenolů za současného vzniku chromogenů, modrých produktů. Rozsah zabarvení, spektrofotometricky měřený při vlnové délce 750 nm, představuje celkový obsah fenolů. Výsledná hodnota koncentrace fenolových sloučenin ve vzorku je pak získána přepočítáním na ekvivalentní množství kyseliny gallové. Ve světě se Folin–Ciocalteuho spektrofotometrická metoda označuje názvem GAE (Gallic Acid Equivalent method).[41]

2.9.2 Stanovení celkového obsahu flavonoidů

Jednou z nejpoužívanějších analytických metod pro běžné stanovení celkového obsahu flavonoidů v rostlinných extraktech je Christ–Müllerova metoda. Principem metody je spektrofotometrická detekce barevných komplexů Al^{3+} s hydroxylovou a karbonylovou skupinou v alkalickém prostředí. Praktické provedení zahrnuje reakci s hlinitou solí a dusitanem a následným zalkalizováním vzorku. Výsledný roztok je v přítomnosti flavonoidů žlutě zbarvený a měří se u něj absorbance při 510 nm. Hodnota koncentrace flavonoidů ve vzorku je poté získána pomocí přepočtu vycházejícího z kalibrační křivky katechinu.[13][42]

2.9.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity rostlinného materiálu

Pro hodnocení antioxidační aktivity biologického materiálu byly vypracovány některé metody a postupem času i jejich modifikace. Nejpoužívanější metodou pro stanovení celkové antioxidační aktivity je metoda ABTS. Tato metoda využívá činidla, které za účasti iniciace jiné látky přechází ve svou radikálovou formu, která je barevná a relativně stabilní. V přítomnosti látek s antioxidační aktivitou se redukuje a tím i odbarvuje. Principem metody je sledování schopnosti vzorku zhaset kation radikál $ABTS^{•+}$ (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazol-6-sulfonát)). Zhášení radikálu $ABTS^{•+}$ antioxidanty, které se chovají jako donory vodíku, měříme spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm. Výpočet koncentrace antioxidačních látek ve vzorku vychází z rozdílů absorbance vzorku v čase 0 a 10 minut a také z kalibrační křivky vytvořené ze standardního roztoku troloxu (kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2 karboxylová), což je derivát vitamínu E. Díky tomu je tato metoda také označována jako metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Metoda je velmi rychlá, jednoduchá a umožňuje široké hodnocení antioxidační aktivity různých látek i směsných vzorků.[13][43]



Obr. 2: *Struktura ABTS* [43]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Seznam použitých přístrojů

Spektrofotometr – UV/VIS HELIOS DELTA – Thermospectronic, Anglie

Vortex – Reax Top, Heidolph, Německo

Laboratorní váhy – KERN, EMB, spol. s. r. o., Kyjov

Analytické váhy – AND GR–202–EC, Japonsko

Fotoaparát Nikon D50

Mikropipety Biohit Proline

Centrifuga – Ependorf 5417–R

Biologický inkubátor – P100–U, BioTech a. s., Praha

Autokláv – Vaposteri BMT, Brno

3.2 Seznam použitých chemikálií

Destilovaná voda

Ethanol 96 % (VWR)

Folin-Ciocalteho činidlo (Sigma–Aldrich Chemie GmbH)

Uhličitán sodný (LACHEMA)

Kyselina gallová (PENTA)

Dusitan sodný (PENTA)

Katechin (LACHEMA)

Chlorid hlinitý (PENTA)

Hydroxid sodný (LACHEMA)

3.3 Použitý software

osobní počítač

operační systém windows

MS Word

MS Excel

program Lucia NET – Lucia je program obrázkové analýzy navržený pro zachycování, archivaci obrazů, pro měření různých znaků obrazu a automatické zachycování rozsáhlých sekvencí obrazů.[44]

3.4 Charakteristika použitých mikroorganismů

Kmeny mikroorganismů použitých v tomto měření pocházejí ze sbírky Masarykovy univerzity přírodovědecké fakulty v Brně. *Serratia marcescens* CCM 303, *Bacillus subtilis* CCM 1999.

3.4.1 *Serratia marcescens*

Serratia marcescens je gramnegativní bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*. Buňky této bakterie mají tvar velmi krátkých tyčinek o průměru do 1 μm . Vyskytuje se jednotlivě nebo v krátkých řetízích. *Serratia marcescens* je fakultativně aerobní bakterie a jejím charakteristickým znakem je tvorba červeně pigmentovaných kolonií. Toto zbarvení je způsobeno červeným pigmentem prodigiosinem. Optimální teplota růstu bakterie *Serratia marcescens* je mezi 20 a 25 °C. Při teplotách nad 37 °C přestává růst. *Serratia marcescens* dobře roste na všech základních půdách.[47]

Všechny bakterie rodu *Serratia* jsou v přírodě velmi rozšířené. Vyskytují se především ve vodě a v zemědělských produktech. Tato bakterie je hlavním původcem červených skvrn na potravinách obsahujících škrob.[47]

3.4.2 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis, jinak též nazývaný senný bacil, je grampozitivní bakterie, jejíž buňky mají tvar tyčinek se zaoblenými konci. Velikost těchto buněk je 0,3 až 1,5 \times 2 až 3 μm . Vyskytují se jednotlivě i v řetízích a jsou peritrichně obrvené. *Bacillus subtilis* je aerobní bakterie, ale za určitých podmínek může růst i anaerobně (dýchání pomocí dusičnanů, jako donorů elektronů nebo fermentací v nepřítomnosti elektronových donorů) patří tedy mezi fakultativní anaeroby. Za nepříznivých podmínek tvoří teplotně rezistentní, dormantní spory. *Bacillus subtilis* zkapalňuje želatinu, hydrolyzuje škrob a z dextrinů tvoří kyseliny.[48]

Teplotní rozmezí růstu bakterie *Bacillus subtilis* je 10 až 55 °C a ideální teplota růstu je 37 až 40 °C. Sporulace začíná při teplotách nad 44 °C, v závislosti na bakteriálním kmenu a zvoleném kultivačním médiu. Spóry vydrží teploty až 150 °C po dobu 6 hodin.

Tato bakterie je v přírodě velmi rozšířená, vyskytuje se především v půdě, v seně a v asociaci s rostlinami. S touto bakterií se můžeme často setkat při mikrobiologické kontrole v celém potravinářském průmyslu. *Bacillus subtilis* patří s *Escherichia coli* k nejlépe prozkoumaným prokaryotním mikroorganismům. **Error! Reference source not found.**

3.5 Vzorčky čajů podrobené analýze

K testování inhibičního účinku u vybraných mikroorganismů byly použity připravené výluhy a maceráty ze dvou druhů čajů firmy Valdemar Grešík – Natura s. r. o.

- Šípek oplodí – plod zbavený semen a chloupků



Obr. 3: Použitý Šípkový čaj firmy Valdemar Grešík – Natura s. r. o.[45]

- Směs – šípek oplodí 50 %, aronie plod 40 %, černý rybíz plod 10 %



Obr. 4: Použitá čajová směs firmy Valdemar Grešík – Natura s. r. o.[46]

3.6 Kultivační media a jejich příprava

Jako kultivační médium pro uchování a pomnožení testovaných mikroorganismů jsme použili živné médium firmy Himedia: Nutrient agar No. 2.

Složení a příprava:

Živočišná tkáň.....	10 g
Hovězí extrakt.....	10 g
Chlorid sodný (NaCl).....	5 g
Agar.....	15 g
Destilovaná voda.....	1000 ml
pH.....	7,2

40 g živného média se rozpustilo v 1000 ml destilované vody. Živné médium bylo poté vysterilizováno v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

3.7 Příprava macerátů

Příprava vodného macerátu

10 g zvoleného vzorku čaje bylo zalito 100 ml destilované vody o teplotě 25 °C a macerováno 7 dní bez přístupu světla při laboratorní teplotě (25 °C). Čajový macerát byl poté zfiltrován a filtrát byl uchováván v lednici při teplotě 4 °C.

Příprava ethanolového macerátu

10 g zvoleného vzorku čaje bylo zalito 100 ml 99,8% ethanolu o teplotě 25 °C a macerováno 7 dní bez přístupu světla při laboratorní teplotě (25 °C). Čajový macerát byl poté zfiltrován a filtrát byl uchováván v lednici při teplotě 4 °C.

3.8 Příprava výluhů

Příprava vodného výluhu

10 g zvoleného vzorku čaje bylo zalito 100 ml destilované vody o teplotě 100 °C a poté byl extrakt vložen do vodní lázně, kde byl extrahován 30 min při teplotě 100 °C. Čajový výluh byl poté zfiltrován a filtrát byl uchováván v lednici při teplotě 4 °C.

Příprava ethanolového výluhu

10 g zvoleného vzorku čaje bylo zalito 100 ml 99,8% ethanolu o teplotě 50 °C a poté byl extrakt vložen do vodní lázně, kde byl extrahován 30 min při teplotě 50 °C. Čajový výluh byl poté zfiltrován a filtrát byl uchováván v lednici při teplotě 4 °C.

3.9 Ověření antimikrobiálních účinků šípkových čajů

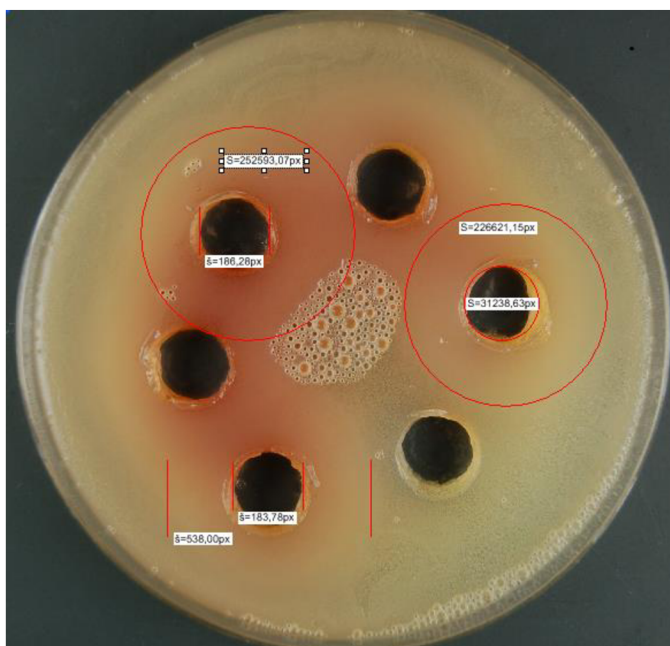
Na ověření inhibičních účinků čajových extraktů a macerátů byla použita difúzní jamková metoda na agarových plotnách. Pro ověření byly použity Petriho misky o průměru 9 cm a korkovrt o průměru 1 cm.

Do zkumavky se 4,5 ml sterilního živného bujónu č. 2 byla naočkována kultura mikroorganismů, která byla inkubována v termostatu 24 hodin při 30 °C. Za 24 hodin bylo odpipetováno 1,5 ml do 150 ml vysterilizovaného agarů, který byl ochlazen na 42–45 °C. Takto připravené zaočkované medium bylo rozléváno na plastové Petriho misky (37 ml). Do tuhého agarů bylo sterilním korkovrtem vyhloubeno šest jamek. Do pěti jamek bylo pipetováno po 100 µl testovaného výluhu nebo macerátu (dest. voda a etOH), který byl uchováván při 4 °C, do šesté jamky bylo napipetováno 100 µl čistého rozpouštědla bez aktivní látky tzv. blank. Petriho misky byly poté inkubovány při 30 °C po dobu 48 hodin v termostatu. Nakonec byla zhotovena fotografická dokumentace jednotlivých Petriho misek a změřena velikost inhibičních zón v programu Lucia NET.

3.10 Metody měření inhibičních zón

- metoda měření délky
- metoda měření plochy
- metoda měření jamky délkou a zóny plochou

Ze známé velikosti jamky (10 mm) byly všechny naměřené velikosti délky v pixelech (px) či plochy px², přepočteny na milimetry.



Obr: 5: Zobrazení jednotlivých metod měření inhibičních zón v programu Lucia NET

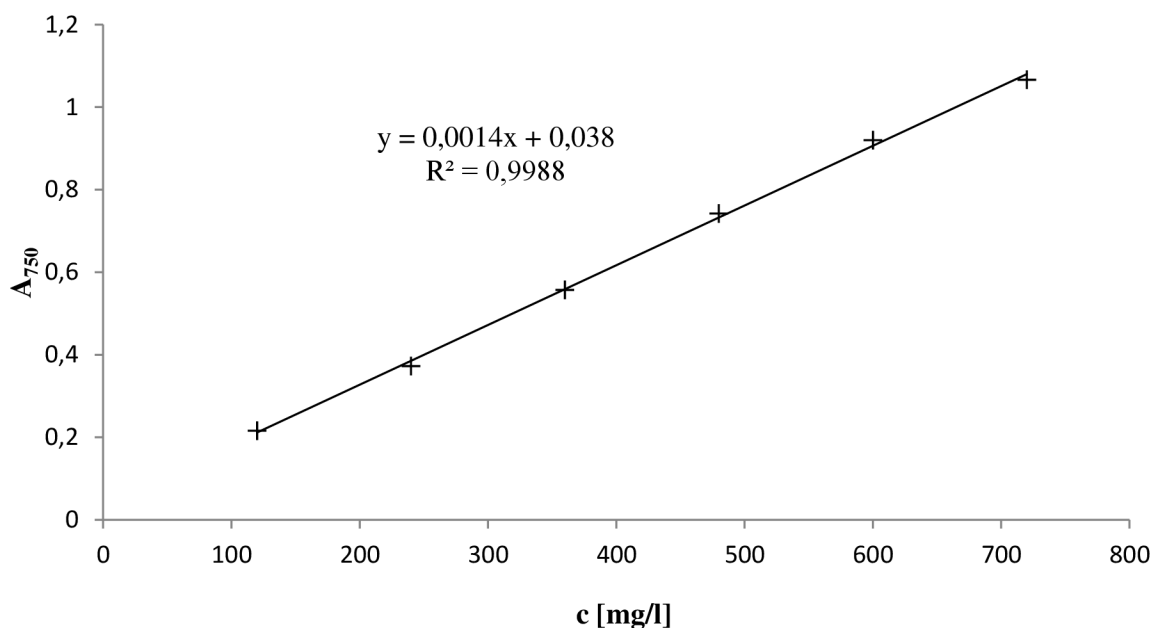
3.11 Stanovení celkových polyfenolů

Příprava standardu

Byla připravena kalibrační křivka kyseliny gallové o koncentracích 100, 200, 300, 400, 500 a 600 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 $\lambda = 750$ nm. Byla sestrojena kalibrační křivka v závislosti absorbance na koncentraci kyseliny gallové (mg·l⁻¹).

Tabulka 1: Jednotlivé objemy použitých činidel pro metodu FCM

Činidlo	V [ml]
Folin-Ciocaltauovo	1
Extrakt čaje	0,1
Uhličitan sodný	1
Destilovaná voda	1



Obr. 6: Kalibrační křivka kyseliny gallové

Celkový obsah fenolů u extraktů čajů byl stanoven pomocí Folin–Ciocalteuova činidla. Do zkumavky bylo napipetováno 1 ml zředěného Folin–Ciocalteuova činidla, 1 ml destilované vody a 100 μ l extraktu vzorku. Každý vzorek byl analyzován ve třech paralelních stanoveních. Roztok ve zkumavkách byl promíchán a ponechán stát. Po pěti minutách bylo do zkumavky přidáno 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného a roztok byl opět promíchán. Reakcí fenolických sloučenin s činidlem vzniklo modré zbarvení, jehož intenzita byla po dvou hodinách změřena na spektrofotometru, při vlnové délce 750 nm proti slepému vzorku (kde namísto 100 μ l extraktu bylo použito 100 μ l destilované vody). Celkové množství polyfenolů bylo vypočteno pomocí kalibrační křivky.

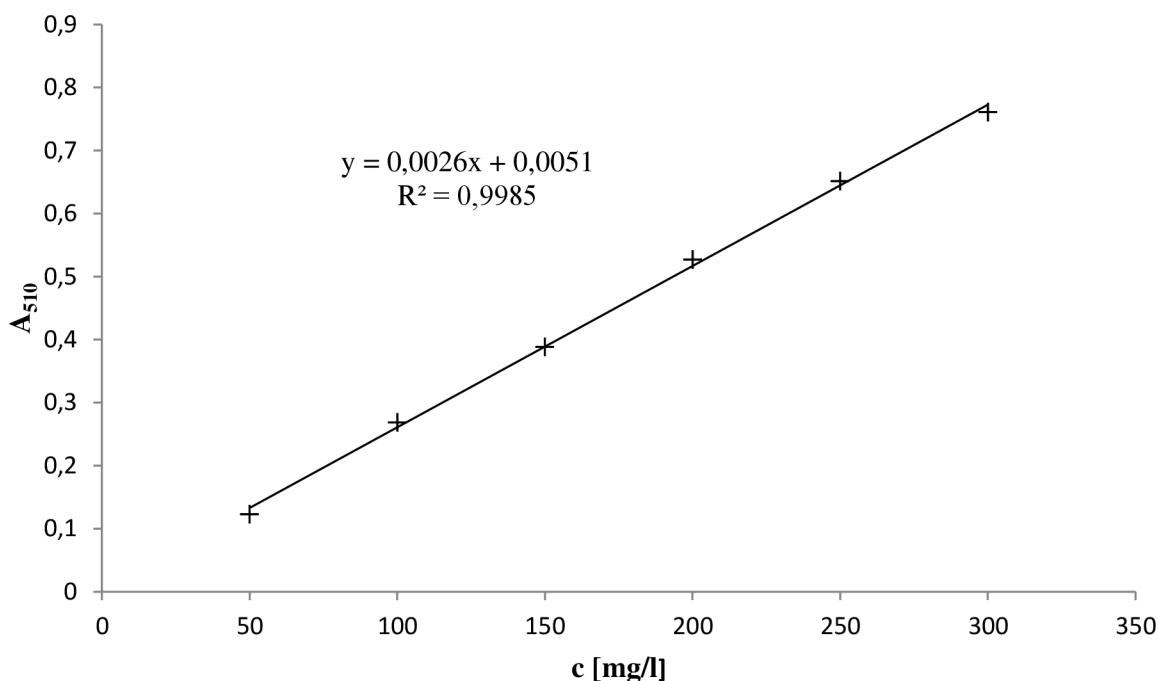
3.12 Stanovení celkových flavonoidů

Příprava standardu

Byla připravena kalibrační křivka katechinu o koncentracích 50, 100, 150, 200, 250 a 300 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro její stanovení byl použit stejný postup jako u extraktu, kdy byly k reakční směsi přidávány připravené koncentrace katechinu. Absorbance jednotlivých koncentrací byla měřena při vlnové délce $\lambda = 510 \text{ nm}$. Byla sestrojena kalibrační křivka v závislosti absorbance na koncentraci standardu katechinu ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

Tabulka 2: Jednotlivé objemy použitých činidel pro stanovení flavonoidů

Činidlo	V [ml]
extrakt čaje	0,5
destilovaná voda	2,5
dusičnan sodný 5%	0,2
chlorid hlinitý 10%	0,2
hydroxid sodný	1,5



Obr. 7: Kalibrační křivka katechinu

Celkový obsah flavonoidů u extraktů čajů byl stanoven pomocí hlinité soli a dusitanu. Do zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml extraktu, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% roztoku dusičnanu sodného. Roztok ve zkumavce byl důkladně promíchán a ponechán stát 5 minut. Poté bylo do zkumavky přidáno 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého, roztok byl opět promíchán a ponechán stát 5 minut. Nakonec bylo do zkumavky přidáno 1,5 ml roztoku hydroxidu sodného a 1 ml destilované vody. Po 15 minutách byly vzorky analyzovány pomocí spektrofotometru při vlnové délce 510 nm proti slepému vzorku (200 µl destilované vody). Celkové množství flavonoidů bylo vypočteno pomocí kalibrační křivky.

3.13 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Radikál kationtu ABTS byl připraven reakcí ABTS diamonné soli s peroxidisíranem draselným. Byl připraven roztok ABTS o koncentraci 7 mM, rozpuštěním ABTS v destilované vodě. Radikálový

kationt z ABTS byl poté získán reakcí s 2,45 mM peroxodisíranem draselným. Vzniklý roztok byl ponechán stát ve tmě při laboratorní teplotě 16 hodin.

Před použitím byl ABTS^{++} zředěn ethanolem na absorbanci 0,70 při 734 nm proti ethanolu. Do zúžené kyvety bylo napipetováno 1 ml ABTS^{++} a 10 μl použitého extrakčního rozpouštědla (dest. voda nebo ethanol) a byla změřena absorbance A_0 v čase $t = 0$. Poté bylo do další kyvety napipetováno 1 ml ABTS^{++} a 10 μl extraktu vzorku. Kyveta byla na 10 minut uložena do tmy a poté byl změřen pokles absorbance A_{10} .

Pro výpočet celkové antioxidační aktivity byla použita kalibrační rovnice troloxu :

$$A = 1,389 \cdot c .$$

Kalibrační rovnice troloxu byla připravena v rozmezí koncentrací 50–400 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Hlavním předmětem této studie byly čajové směsi ve, kterých obsahově převládaly plody Růže šípkové. Obchodní řetězce nabízejí velké množství čajových směsí s různým obsahem léčivých bylin. Pro naše měření byly zvoleny čaje firmy Valdemar Grešík – Natura s. r. o.. Prvním z nich byl čaj Šípek oplodí. Jedná se o sypaný čaj s hrubě nadrcenými sušenými plody Růže šípkové a druhým byla čajová směs Aronie & Šípek & Černý rybíz. Tato čajová směs byla jemně nadrcená a zabalena ve formě čajových sáčků. Při analýze těchto směsí jsme měli dva hlavní cíle. V první řadě posouzení antimikrobiálního vlivu na zvolené mikroorganismy *Serratia marcescens* a *Bacillus subtilis*. Za druhé stanovení koncentrace biologicky aktivních sloučenin (polyfenolů, flavonoidů) a také celkové antioxidační aktivity vybraných směsí.

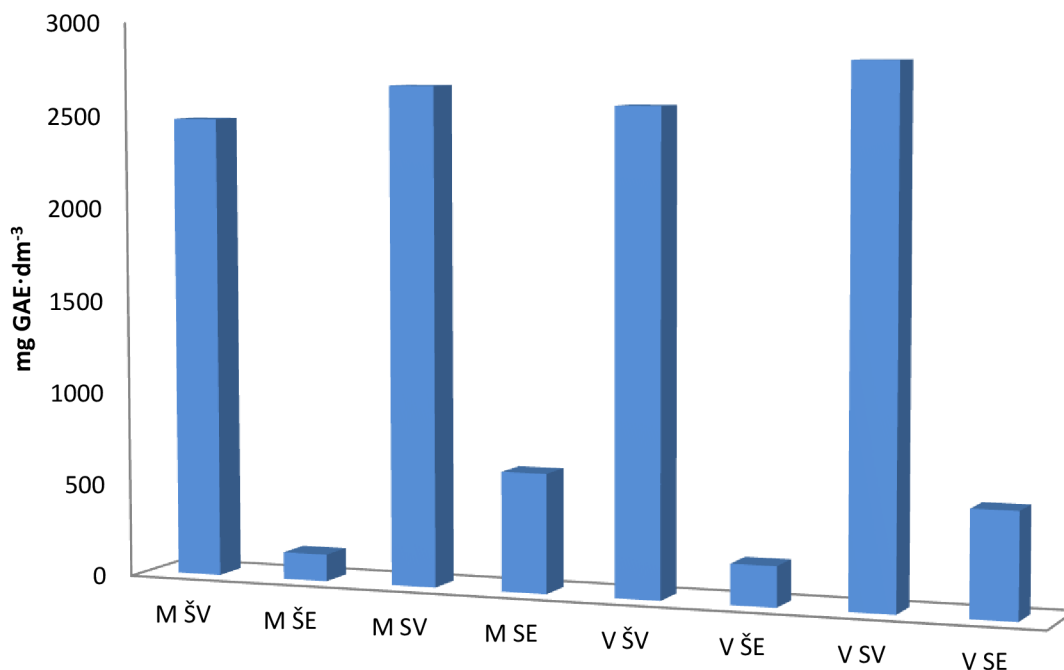
4.1 Stanovení celkového obsahu polyfenolů

Celkový obsah polyfenolů byl stanoven za použití Folin–Ciocalteho činidla. Principem metody je redukce fenolických sloučenin obsažených ve vyluzích a macerátech šípkového čaje a směsi v destilované vodě a ethanolu. Každý vzorek byl třikrát změřen a získané hodnoty obsahu polyfenolických látek byly zprůměrovány. Tabulka 3 zobrazuje naměřené výsledky. Z rovnice lineární regrese kalibrační křivky kyseliny gallové (Obr. 6) byl vypočítán obsah polyfenolů. Výsledky jsou vyjádřeny v mg kyseliny gallové/ 1 l vzorku ($\text{mg GA} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Z (Obr. 8) lze vyčíst, že vodné extrakty obsahují mnohem vyšší obsah polyfenolů než ethanolové extrakty. Úplně nejvyšší obsah polyfenolů byl stanoven ve vodném výluhu směsi. Také si můžeme povšimnout, že vyšší hodnoty polyfenolů byly více zaznamenány v čajové směsi než v šípkovém čaji a to v případě obou extrakčních technik i obou rozpouštědel.

Tabulka 3: Průměrné hodnoty celkového obsahu polyfenolů proměřených extraktů (* u hodnoty absorbance znamená, že roztok byl 10krát zředěn)

Extrakt		Absorbance \pm SD	FCM [$\text{mg GA} \cdot \text{dm}^{-3}$] \pm SD
macerát	šípek voda	*0,386 \pm 0,028	2483,3 \pm 202
	šípek ethanol	0,247 \pm 0,005	149,3 \pm 3,5
	směs voda	*0,412 \pm 0,003	2671,4 \pm 23
	směs ethanol	0,962 \pm 0,067	660,0 \pm 48
výluh	šípek voda	*0,399 \pm 0,020	2576,2 \pm 141
	šípek ethanol	0,351 \pm 0,011	223,6 \pm 7,6
	směs voda	*0,433 \pm 0,007	2819,0 \pm 50
	směs ethanol	*0,117 \pm 0,003	564,3 \pm 20



Obr. 8: Stanovení celkových polyfenolů v jednotlivých extraktech metodou FCM

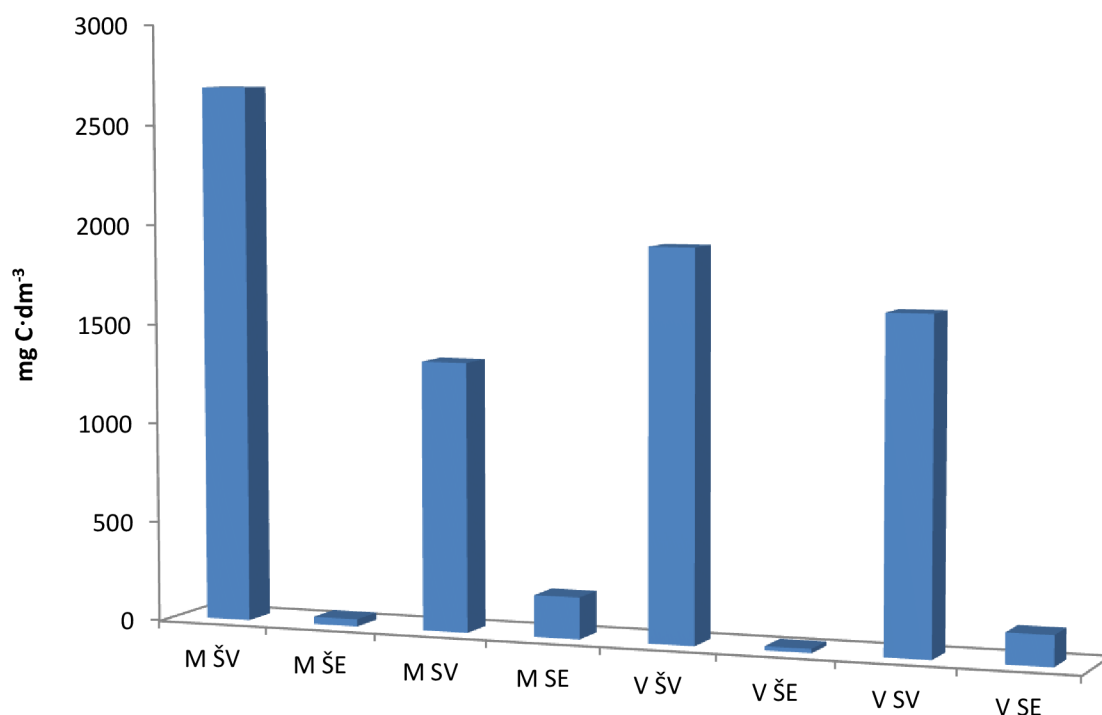
4.2 Stanovení celkového obsahu flavonoidů

Stanovení celkového množství flavonoidů v rostlinných extraktech bylo provedeno pomocí spektrofotometrické metody reakcí s hlinitou solí a dusitanem. Za přítomnosti flavonoidů ve vzorku vznikalo oranžovočervené zbarvení, u kterého byla změřena absorbance při 510 nm. U každého vzorku bylo měření třikrát zopakováno a pro výpočet obsahu flavonoidů byla použita průměrná hodnota těchto měření. Celkový obsah flavonoidů byl získán dosazením naměřené absorbance do rovnice kalibrační křivky (Obr. 7) získané ze standardu katechinu. Výsledky jsou vyjádřeny v mg katechinu/ 1 l vzorku ($\text{mg C} \cdot \text{dm}^{-3}$). Tabulka 4 uvádí přehled těchto výsledků.

Stejně jako u stanovení celkových polyfenolů je i u stanovení flavonoidů koncentrace aktivních látek mnohem vyšší ve vodných extraktech, než v extraktech ethanolových (Obr. 9). Nejvyšší koncentrace flavonoidů byla stanovena v macerátu šípkového čaje, na rozdíl od stanovení polyfenolů je koncentrace flavonoidů ve vodných výluzích a macerátech vyšší u šípkového čaje než směsi. Rozdíl je navíc mnohem markantnější.

Tabulka 4: Průměrné hodnoty celkového obsahu flavonoidů proměřených extraktů

Extrakt		Absorbance ± SD	ChMM [mg C·dm ⁻³] ± SD
macerát	šípek voda	*0,705 ± 0,011	2691,9 ± 44
	šípek ethanol	0,099 ± 0,001	36,2 ± 0,5
	směs voda	*0,356 ± 0,018	1348,3 ± 70
	směs ethanol	0,543 ± 0,003	206,8 ± 1,0
výluh	šípek voda	*0,510 ± 0,018	1940,6 ± 71
	šípek ethanol	0,058 ± 0,006	20,3 ± 2,2
	směs voda	*0,435 ± 0,010	1653,5 ± 37
	směs ethanol	0,401 ± 0,009	152,3 ± 3,6



Obr. 9: Stanovení celkových flavonoidů v jednotlivých extraktech spektrofotometricky

4.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Pro vyhodnocení celkové antioxidační aktivity vzorku byla použita metoda ABTS, jenž spočívá v měření schopnosti vzorku zhášet kation–radikál ABTS^{•+}. Tento radikál byl připraven smícháním peroxidisíranu draselného s diamonnou solí ABTS. Zhášení radikálu bylo sledováno spektrofotometricky na základě změn absorpčního spektra ABTS^{•+}. Výsledná absorbance A vzorku byla vypočtena pomocí vzorce:

$$A_{vz} = \frac{A_0 - A_{10}}{A_0}$$

kde A_0 je absorbance ABTS⁺⁺ v čase $t = 0$ a A_{10} je absorbance extraktu vzorku s ABTS⁺⁺ změřená po 10 minutách. Měření bylo pro každý vzorek třikrát zopakováno a pro výpočet byla použita průměrná hodnota. Takto získaná hodnota absorbance byla použita pro výpočet celkové antioxidační aktivity vzorku dosazením do kalibrační rovnice troloxu:

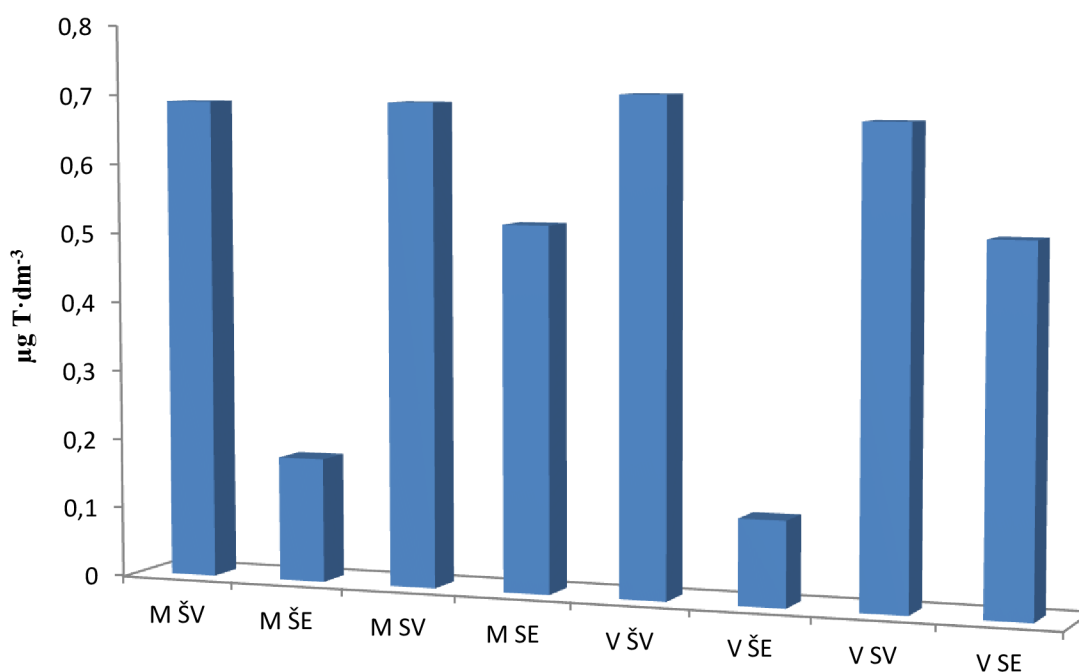
$$A = 1,389 \cdot c$$

Výsledky jsou vztaženy na ekvivalentní množství troloxu a jsou vyjádřeny v μg troloxu/ 1 l vzorku ($\mu\text{g T} \cdot \text{dm}^{-3}$). Výsledky jsou uvedeny v (Tabulka 5).

Nejvyšší koncentrace antioxidačně aktivních látek byla stanovena ve vodném výluhu šípkového čaje, ale všechny vodné extrakty dosáhly velice podobných výsledků (Obr. 10). Na rozdíl od stanovení polyfenolů a flavonoidů byla zjištěna poměrně vysoká koncentrace antioxidačně aktivních látek také v ethanolovém macerátu a výluhu čajové směsi.

Tabulka 5: Průměrné hodnoty celkové antioxidační aktivity proměřených extraktů

Extrakt		Absorbance \pm SD	ABTS [$\mu\text{g T} \cdot \text{dm}^{-3}$] \pm SD
macerát	šípek voda	0,961 \pm 0,015	0,692 \pm 0,011
	šípek ethanol	0,250 \pm 0,013	0,180 \pm 0,009
	směs voda	0,963 \pm 0,014	0,693 \pm 0,010
	směs ethanol	0,727 \pm 0,040	0,523 \pm 0,028
výluh	šípek voda	0,982 \pm 0,004	0,707 \pm 0,003
	šípek ethanol	0,173 \pm 0,013	0,124 \pm 0,009
	směs voda	0,934 \pm 0,044	0,673 \pm 0,032
	směs ethanol	0,719 \pm 0,039	0,517 \pm 0,028



Obr. 10: Stanovení celkové antioxidační aktivity v jednotlivých extraktech metodou ABTS

4.4 Antimikrobiální účinky extraktů

Za účelem ověření antimikrobiální aktivity vybraných čajových extraktů proti *Bacillus subtilis* a *Serratia marcescens*, byla použita jamková difuzní metoda. Předmětem sledování byl jak vliv přípravy extraktu (macerát, výluh), tak použité rozpouštědlo (dest. voda, ethanol) na výslednou antimikrobiální aktivitu.

Při prvním měření jsme připravili kromě koncentrovaných extraktů (10 g čaje na 100 ml) rozpouštědla, také zředěné extrakty (5 g čaje na 100 ml a 2 g čaje na 100 ml), jelikož, ale u zředěných extraktů nebyla pozorována žádná antimikrobiální aktivita (Tabulka 6) používali jsme u dalších měření pouze koncentrované extrakty.

U vyhodnocování velikosti inhibičních zón v programu Lucia NET byly použity tři různé metody: metoda měření délky, metoda měření plochy a metoda měření jamky délkou a zóny plochou. V prvním případě byl pomocí programu zjištěn pouze průměr plochy zóny a jamky v px. U druhé metody byla programem zjištěna plocha zóny a jamky v px². Třetí metoda je kombinace dvou předchozích u inhibiční zóny byla měřena plocha a u jamky průměr. Výsledky všech tří metod byly z pixelů přepočítány na milimetry pomocí programu MS Excel.

Tabulka 6: Velikost naměřených inhibičních zón po aplikaci jednotlivých macerátů (pokus č.1) na oba studované bakteriální kmény (Š V – šípek voda, Š E – šípek ethanol, S V – směs voda, S E – směs ethanol)

mikroorganismus	extrakt + použité rozpouštědlo	množství aktivní látky ve 100 ml rozpouštědla [g]		
		10	5	2
		inhibiční zóny [mm]		
<i>Bacillus subtilis</i>	Š V	29,5 ± 0,3	-	-
	Š E	-	-	-
	S V	-	-	-
	S E	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	Š V	15,9 ± 0,3	-	-
	Š E	-	-	-
	S V	-	-	-
	S E	-	-	-

4.4.1 Inhibiční účinek extraktů macerátů

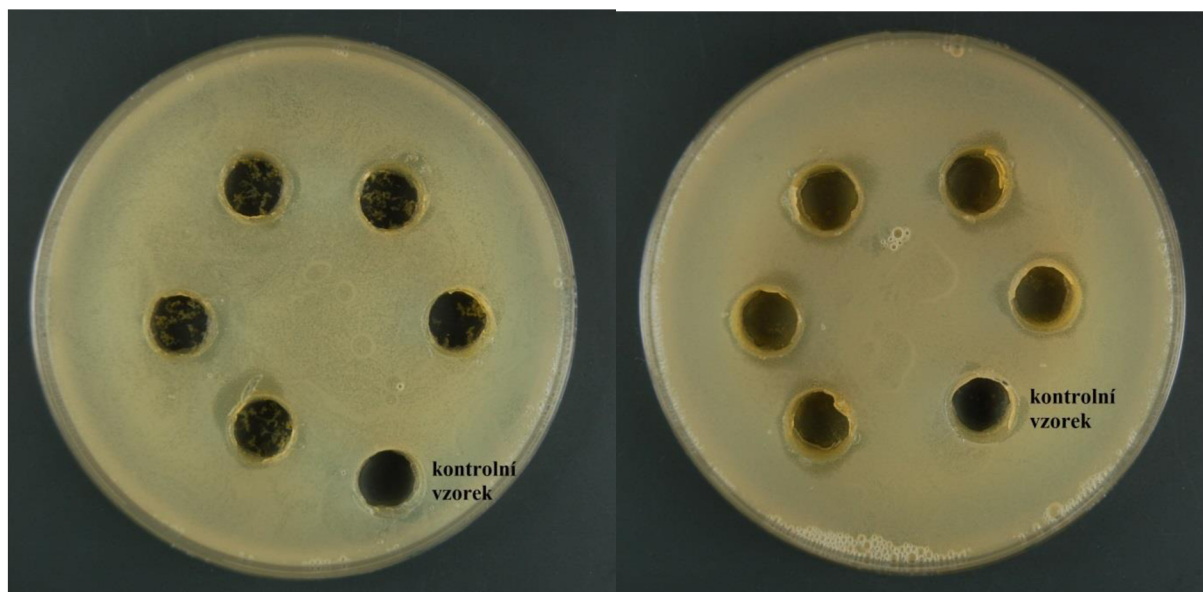
V druhém pokusu byl použit pouze koncentrovaný extrakt (10 g čaje/ 100 ml rozpouštědla). U každého měření bylo provedeno paralelní stanovení a oba výsledky byly poté zprůměrovány. Výsledky velikosti inhibičních zón jsou uvedeny v (Tabulka 7).

Z výsledků jasně vidíme, že extrakty u kterých bylo jako rozpouštědlo použit ethanol nemají žádnou antimikrobiální aktivitu. Také si můžeme povšimnout, že mnohem lepších výsledků bylo dosaženo bakterie *Bacillus subtilis*. Vodné maceráty z šípkových čajů jsou tedy účinnější proti grampozitivním

bakteriím než gramnegativním bakteriím. To odpovídá výsledkům studie Stojanovice [50][24] podle, které jsou G⁻ bakterie odolnější k působení přírodních sloučenin než G⁺ bakterie. Ke stejným výsledkům došly také mnohé další studie. Výsledky také ukazují, že u macerátů připravených z šípkového čaje dosahují inhibiční zóny většího průměru než u macerátů čajové směsi.

Tabulka 7: Velikost naměřených inhibičních zón po aplikaci jednotlivých macerátů (pokus č. 2) na oba studované bakteriální kmeny

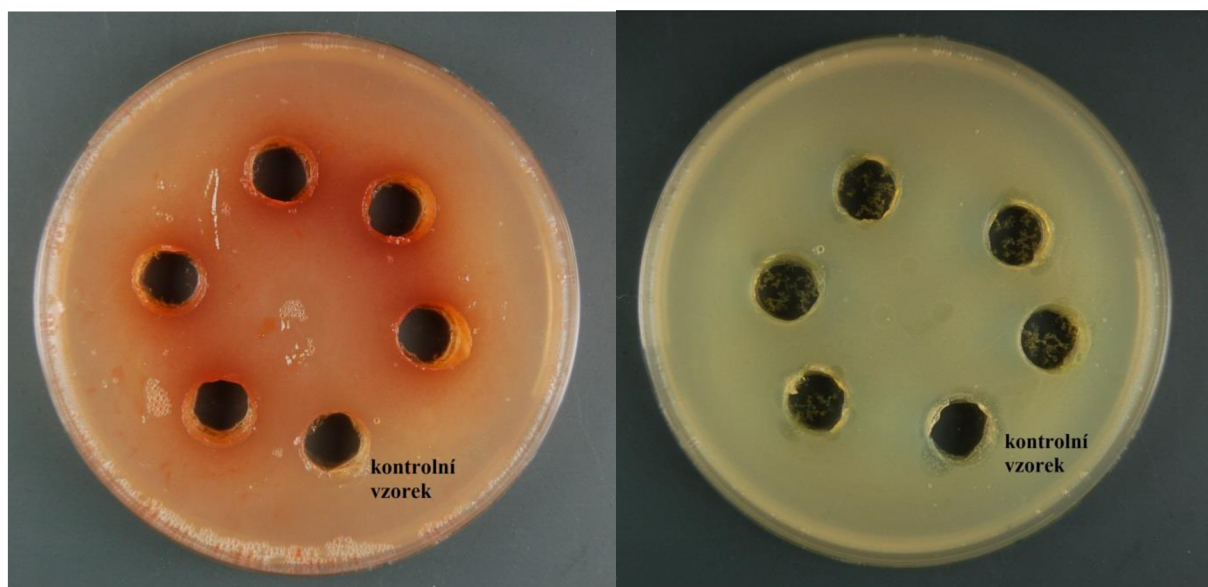
mikroorganismus	extrakt + použité rozpouštědlo	metoda vyhodnocení inhibiční zóny		
		měření délky	měření plochy	kombinovaná metoda
		inhibiční zóny [mm]		
<i>Bacillus subtilis</i>	Š V	32,0 ± 1,8	33,4 ± 2,6	32,9 ± 2,3
	Š E	-	-	-
	S V	27,4 ± 0,9	27,0 ± 0,9	26,6 ± 1,1
	S E	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	Š V	17,2 ± 0,3	17,2 ± 0,6	17,5 ± 0,5
	Š E	-	-	-
	S V	15,3 ± 0,6	14,3 ± 0,4	15,0 ± 0,5
	S E	-	-	-



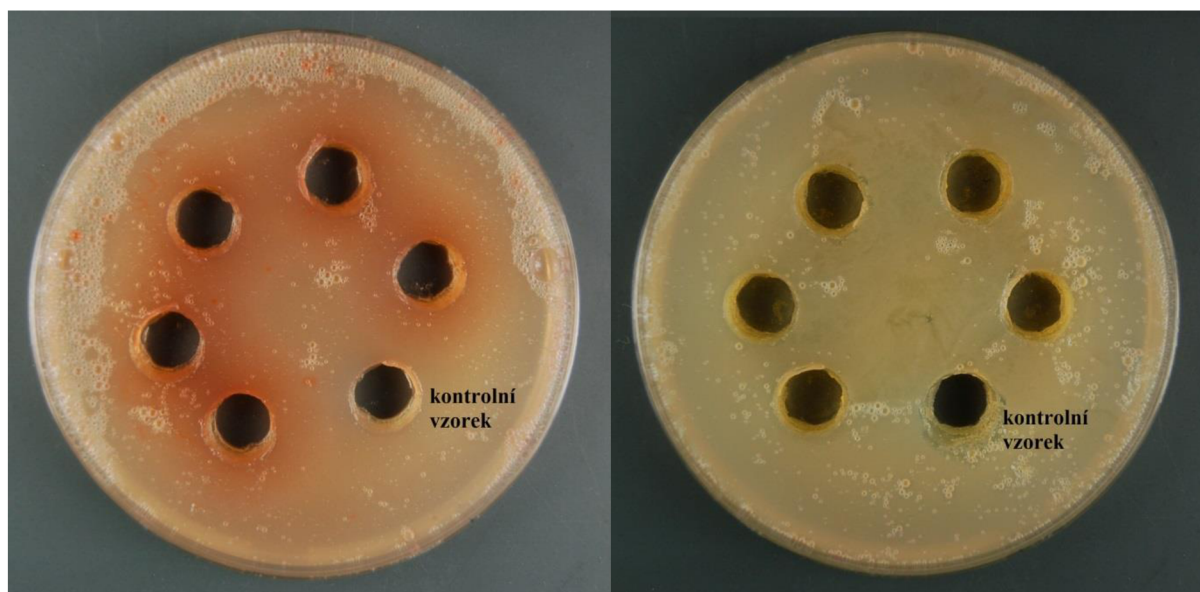
Obr. 11: vlevo ethanolový macerát šípku na agaru naočkovaném BS, vpravo ethanolový macerát směsi na agaru naočkovaném BS



Obr. 12: vlevo vodný macerát šípku na agaru naočkovaném BS, vpravo vodný macerát směsi na agaru naočkovaném BS



Obr. 13: vlevo vodný macerát šípku na agaru naočkovaném SM, vpravo ethanolový macerát šípku na agaru naočkovaném SM



Obr. 14: vlevo vodný macerát směsi na agaru naočkovaném SM, vpravo ethanolový macerát směsi na agaru naočkovaném SM

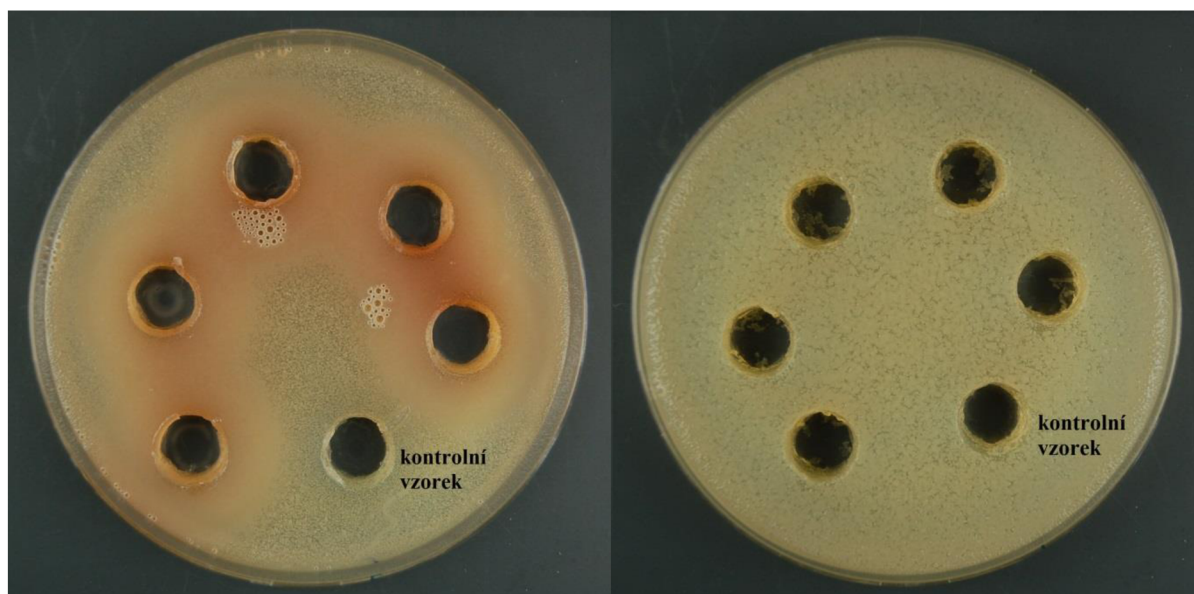
4.4.2 Inhibiční účinek extraktů výluhů

Měření inhibičního účinku výluhů bylo provedeno stejným způsobem jako měření inhibičního účinku macerátů. Tabulka 8 uvádí přehled výsledků.

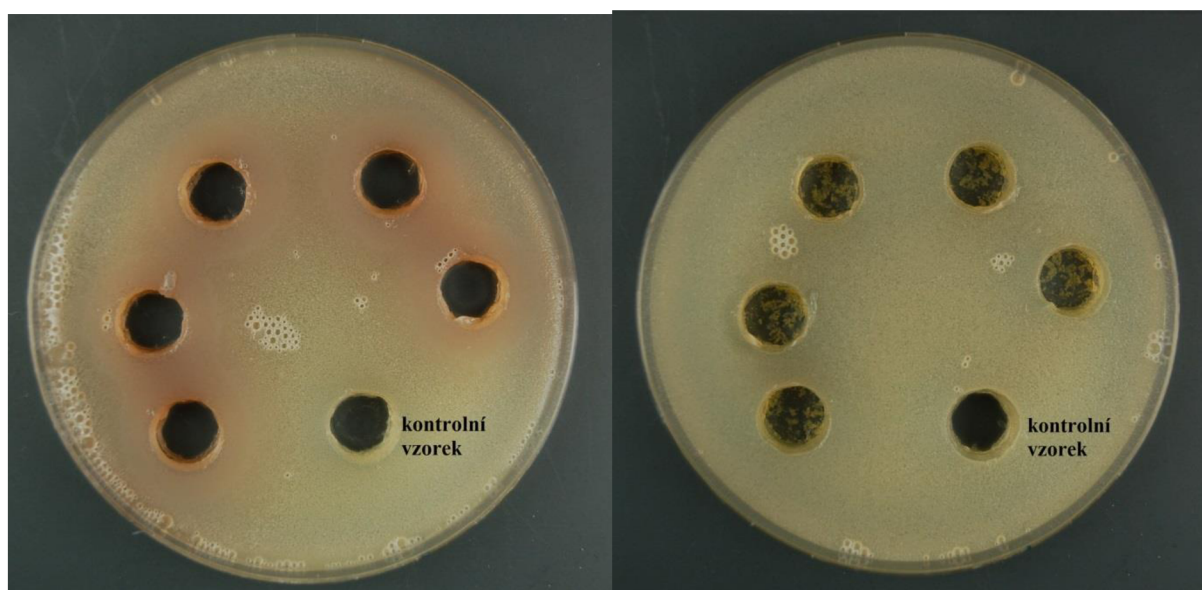
Získaná data jsou velice podobná výsledkům získaných při stanovování inhibičního účinku macerátů. U ethanolových výluhů opět nedošlo vůbec k žádné inhibiční aktivitě ani u jednoho druhu čajů. Vodné výluhy dosáhly větších zón při použití proti *Bacillus subtilis* a u obou mikroorganismů byla zaznamenána vyšší inhibiční aktivita při použití šípkového čaje než čajové směsi.

Tabulka 8: Velikost naměřených inhibičních zón po aplikaci jednotlivých výluhů na oba studované bakteriální kmeny

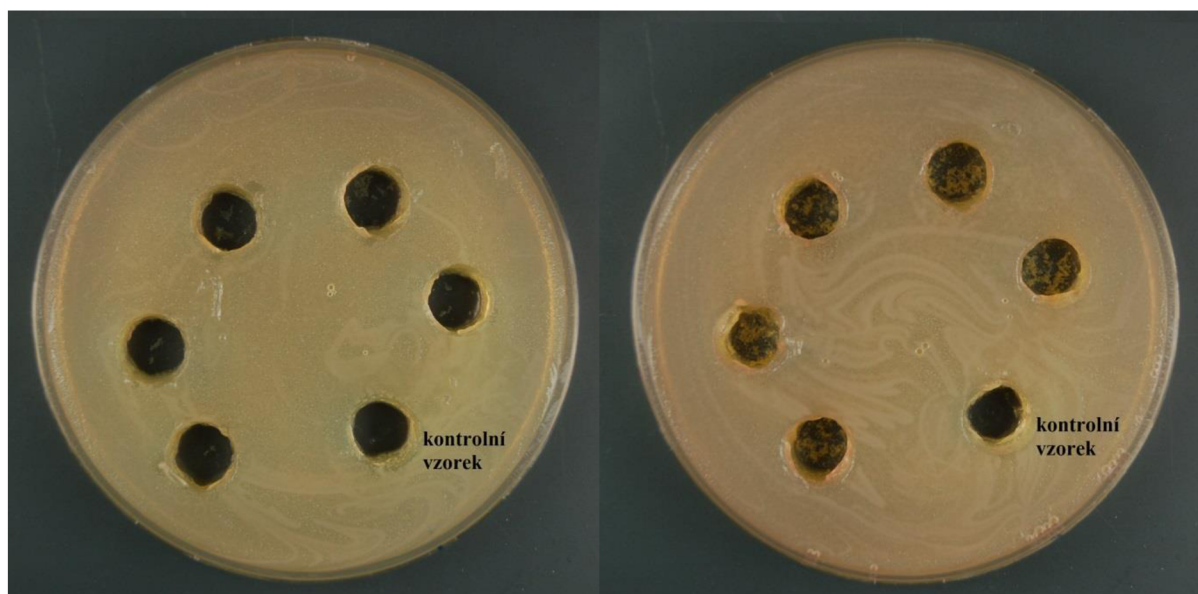
mikroorganismus	extrakt + použité rozpouštědlo	metoda vyhodnocení inhibiční zóny		
		měření délky	měření plochy	kombinovaná metoda
		inhibiční zóny [mm]		
<i>Bacillus subtilis</i>	Š V	31,8 ± 0,8	31,9 ± 1,0	32,5 ± 1,0
	Š E	-	-	-
	S V	23,8 ± 0,8	22,4 ± 0,5	23,0 ± 0,4
	S E	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	Š V	17,5 ± 1,5	16,9 ± 1,0	17,3 ± 1,1
	Š E	-	-	-
	S V	16,1 ± 0,6	15,8 ± 0,5	16,2 ± 0,8
	S E	-	-	-



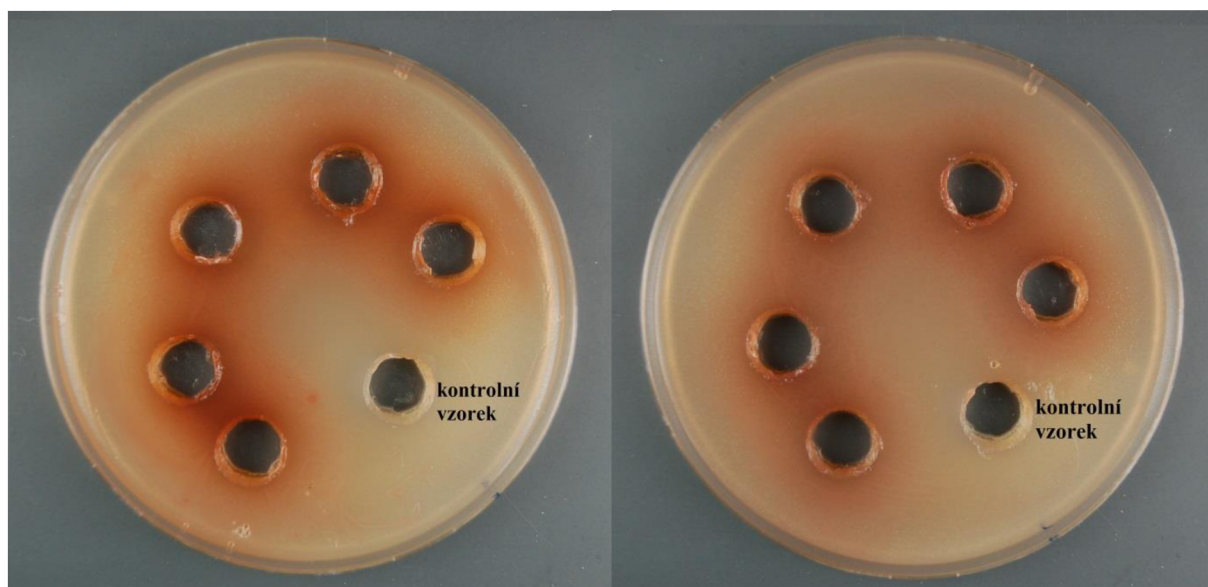
Obr. 15: vlevo vodný výluh šípku na agaru naočkovaném BS, vpravo ethanolový výluh šípku na agaru naočkovaném BS



Obr. 16: vlevo vodný výluh směsi na agaru naočkovaném BS, vpravo ethanolový výluh směsi na agaru naočkovaném BS



Obr. 17: vlevo ethanolový výluh šípku na agaru naočkovaném SM, vpravo ethanolový výluh směsi na agaru naočkovaném SM



Obr. 18: vlevo vodný výluh šípku na agaru naočkovaném SM, vpravo vodný výluh směsi na agaru naočkovaném SM

5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo prostudovat antimikrobiální účinky vybraných druhů šípkových čajů na zástupce mikroorganismů *Bacillus subtilis* a *Serratia marcescens* a současně stanovit celkovou antioxidační aktivitu těchto extraktů a celkovou koncentraci chemických látek majících na antioxidační aktivitu největší vliv. Testovány byly dva druhy čajů, jeden obsahoval pouze sušené plody Růže šípkové, v druhém čaji byly sušené šípky majoritní částí čajové směsi spolu s plody černého rybíze a aronie. Extrakty z těchto čajů byly připraveny dvěma způsoby jako maceráty a výluhy a každý typ extraktu byl připraven s dvěma různými rozpouštědly (ethanol a dest. voda). Antimikrobiální aktivita připravených extraktů byla měřena jamkovým difuzním testem.

Porovnáním naměřených hodnot a vyhodnocených výsledků vyplývá že:

Největších inhibičních účinků jak proti *Bacillus subtilis* tak proti *Serratia marcescens* vykazoval vodný macerát šípkového čaje. Podobné účinky měl i výluh šípkového čaje. Naopak u extraktů připravených za pomoci ethanolu byla zjištěna nulová antimikrobiální aktivita.

Ve srovnání měření inhibičních účinků z Růže šípkové a čajové směsi mezi *Bacillus subtilis* a *Serratia marcescens* bylo zjištěno, že při všech měřeních vznikaly větší inhibiční zóny u mikroorganismu *Bacillus subtilis* než *Serratia marcescens*.

Výsledky antimikrobiální aktivity jsou v korelaci s výsledky stanovení celkových flavonoidů ve vybraných extraktech, kde u vodného macerátu šípkového čaje byla stanovena nejvyšší koncentrace těchto látek oproti ostatním extraktům. U stanovení celkových polyfenolů byly nejvyšší koncentrace zjištěny ve vodném výluhu čajové směsi a vodném macerátu čajové směsi. Z toho můžeme usuzovat, že na celkovou antimikrobiální aktivitu přírodních extraktů mají větší vliv flavonoidy než polyfenolické sloučeniny. Také koreluje celková antimikrobiální neúčinnost ethanolových extraktů s celkovým stanovením antioxidačně aktivních látek. U všech ethanolových extraktů byla totiž celková stanovená koncentrace polyfenolů a flavonoidů o řád až dva řády nižší, než v případě vodných extraktů.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

EGCG – epigalokatechin-3-galát

EGC – epigalokatechin

TF3 – theaflavin-3,3'-digalát

PEP – pulzní elektrické pole

PSE – tlaková extrakce rozpouštědlem

GAE – gallic acid equivalent method

ABTS – 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonová kyselina)

TEAC – trolox equivalent antioxidant capacity

FCM – Folin-Ciocalteuova metoda

ChMM – Christ-Müllerova metoda

SD – směrodatná odchylka

C – katechin

T – trolox

PX – pixel

Š V – vodný extrakt šípkového čaje

Š E – ethanolový extrakt šípkového čaje

S V – vodný extrakt čajové směsi

S E – ethanolový extrakt čajové směsi

BS – *Bacillus subtilis*

SM – *Serratia marcescens*

7 ZDROJE

- [1] FARZANEH, Vahid a Isabel S. CARVALHO. A review of the health benefit potentials of herbal plant infusions and their mechanism of actions. *Industrial Crops and Products* [online]. 2015, vol. 65, s. 247-258 [cit. 2015-04-17]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.10.057. Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092666901400675X>
- [2] TAJKARIMI, M.M., S.A. IBRAHIM a D.O. CLIVER. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* [online]. 2010, vol. 21, issue 9, s. 1199-1218 [cit. 2015-04-17]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.02.003. Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713510000459>
- [3] ALMAJANO, M. Pilar, Rosa CARBÓ, J. Angel López JIMÉNEZ a Michael H. GORDON. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry* [online]. 2008, vol. 108, issue 1, s. 55-63 [cit. 2015-04-17]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.10.040. Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607010631>
- [4] NEGI, Pradeep Singh. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2012, vol. 156, issue 1, s. 7-17 [cit. 2015-04-17]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006.
- [5] MORAVCOVA, J.: *Biologicky aktivní přírodní látky*, VŠCHT Praha 2003, s. 11-91.
- [6] COWAN, M. M.: *Plant products as microbial agents*, Clin. Microbiol. Reviews, 1999, vol. 12, no. 4, s. 564 – 582
- [7] DORMAN, H. J., DEANS, S. G.: Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils., J. Appl. Microbiol., 2000 vol. 88, no. 2, s. 308-316.
- [8] CZYZOWSKA, A., E. KLEWICKA, E. POGORZELSKI a A. NOWAK. Polyphenols, vitamin C and antioxidant activity in wines from *Rosa canina* L. and *Rosa rugosa* Thunb. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2015, vol. 39, s. 62-68 [cit. 2015-04-17]. DOI: 10.1016/j.jfca.2014.11.009. Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157514002099>
- [9] SANDOVAL-ACUÑA, Cristian, Jorge FERREIRA a Hernán SPEISKY. Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2014, vol. 559, s. 75-90 [cit. 2015-04-17]. DOI: 10.1016/j.abb.2014.05.017. Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000398611400174X>
- [10] CUSHNIE, T.P. Tim a Andrew J. LAMB. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 2011, vol. 38, issue 2, s. 99-107 [cit. 2015-04-17]. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014. Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857911001300>

- [11] JAIN, Aditi, Chanchal MANGHANI, Shrey KOHLI, Darshika NIGAM a Vibha RANI. Tea and human health: The dark shadows. *Toxicology Letters* [online]. 2013, vol. 220, issue 1, s. 82-87 [cit. 2015-04-17]. DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.04.010. Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427413001653>
- [12] BOURASSA, Philippe, Roland CÔTÉ, Surat HUTCHANDANI, Guy SAMSON a Heidar-Ali TAJMIR-RIahi. The effect of milk alpha-casein on the antioxidant activity of tea polyphenols. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2013, vol. 128, s. 43-49 [cit. 2015-04-17]. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2013.07.021. Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S101113441300167X>
- [13] MÁROVÁ Ivana, Stanislav Obruča: *Vybrané instrumentální úlohy z aplikované biochemie*, Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. ISBN 978-802-1447-882.
- [14] VESELÁ, Mária: *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 3. vyd., 2004, VUT FCH. ISBN 80-214-2567-9.
- [15] BANSAL, Sumit, Shivani CHOUDHARY, Manu SHARMA, Suthar Sharad KUMAR, Sandeep LOHAN, Varun BHARDWAJ, Navneet SYAN a Saras JYOTI. Tea: A native source of antimicrobial agents. *Food Research International* [online]. 2013, vol. 53, issue 2, s. 568-584 [cit. 2015-04-17]. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.01.032. Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996913000598>
- [16] KALEMBA, D., KUNICKA, A.: Antibacterial and antifungal properties of essential oils, *Current Medicinal Chemistry*, 2003, vol. 10, no. 10, s. 813-829
- [17] ZENDULKA, Ondřej. Polyfenoly ve výživě jako možná prevence nádorových onemocnění. Brno, 2008. Disertační práce. Masarykova univerzita v Brně, Lékařská fakulta. Vedoucí práce Jiří Totušek.
- [18] OPLETAL, L., ŠIMERDA, B.: *Antiinvazivní látky přírodního původu jako aditiva do krmiv*, Ministerstvo zemědělství ČR – Vědecký výbor pro výživu zvířat, Výzkumný ústav pro výživu zvířat, 2005, s. 27 – 37.
- [19] Formica, J. V.; Regelson, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 1995, vol. 33, no. 12, pp. 1061-1080.
- [20] Grotewold, E. *The Science of Flavonoids*. New York: Springer Science+Business Media, Inc., 2006. 274 p. ISBN-13: 978-0387-28821-5.
- [21] Velíšek, J., *Chemie potravin* 3. 2. vyd. Tábor: Nakladatelství OSSIS, 2002. 368S. ISBN 80-86659-02-X.
- [22] ČOPÍKOVÁ, J., WIMMER Z., LAPČÍK O., OPLETAL L.: Přírodní látky svíravé a trpké chuti. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, : 1053-1057 [cit. 2015-05-14]. ISSN 0009-2770. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_11_1053-1057.pdf

- [23] JIRÁSEK, V., STARÝ, F. *Atlas léčivých rostlin*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 504 s. ISBN 08-010-90
- [24] TROMBETTA, D., CASTELLI F., SARPIETRO, M. G., VENUTI, V., CRISTIANI M., DANIELE C., SAIJA, A., MAZZANTI G., BISIQNANO, G.: *Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes*, *Antimicrob. Agents chemotherapy*, 2005, vol. 49, no. 6, s. 2474-2478
- [25] BOURGAUD, F., A. GRAVOT, S. MILESI a E. GONTIER. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* [online]. 2001, vol. 161, issue 5, s. 839-851 [cit. 2015-04-27]. DOI: 10.1016/S0168-9452(01)00490-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945201004903>
- [26] RAMACHANDRA RAO, S a G.A RAVISHANKAR. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* [online]. 2002, vol. 20, issue 2, s. 101-153 [cit. 2015-04-27]. DOI: 10.1016/S0734-9750(02)00007-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975002000071>
- [27] BEQUINOVÁ, Helena. *Rostlinná medicína*. Praha: Reader's Digest výběr, 2003.
- [28] DREYER, Eva-Maria. *Byliny do kuchyně a jejich jedovatí dvojníci*. Líbeznice: Vikend, 2008. ISBN 978-80—86891-77-4.
- [29] ALBERTS, A., P. MULLEN a M. SPOHN. *Léčivé stromy a keře: jednotlivé druhy a jejich léčebné účinky*. Plzeň: Ševčík, 2006. ISBN 80-729-1144-9.
- [30] KOVÁČOVÁ, Jitka. *Léčivky na zahrádce*. Praha: SUN s.r.o., 2007. ISBN 978-80-7371-217-4.
- [31] JANČA, J. *Herbář léčivých rostlin*. Díl 4. Praha: EMINENT, 1996. 287 s. ISBN 80-85876-20-5.
- [32] NOJAVAN, S., et al. Extraction and quantitative determination of ascorbic acid during different maturity stages of *Rosa canina* L. fruit. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2008, vol. 21, no. 4 [cit. 2015-27-4], pp. 300-305. ISSN 0889-1575.
- [33] WENZIG, E. M., et al. Phytochemical composition and in vitro pharmacological activity of two rose hip (*Rosa canina* L.) preparations. *Phytomedicine* [online]. 2008, vol. 15, no. 10 [cit. 2015-04-27], pp. 826-835. ISSN 0944-7113.
- [34] KORBELÁŘ, J. *Naše rostliny v lékařství*. 7. vyd. Praha: Avicem, 1981. 501 s. ISBN 80-201-009-1
- [35] KULLING, Sabine a Harshadai RAWEL. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A Review on the Characteristic Components and Potential Health Effects. *Planta Medica* [online]. 2008, vol. 74, issue 13, s. 1625-1634 [cit. 2015-04-27]. DOI: 10.1055/s-0028-1088306. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0028-1088306>
- [36] HARANT, M., ZACHA, V.: *Pěstujem bobuloviny*. 1. vyd. Praha: SZN, 1974. 258 s.

- [37] Dušková, L., Kopřiva, J. Pěstujeme rybíz, angrešt a jostu. Praha: Grada publishing s. r. o., 2002. 112 s. ISBN 80-247-0223-1.
- [38] 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.
- [39] SOBKOVÁ, Kristýna. Antibakteriální účinky přírodních látek. [online]. 2009 [cit. 2015-04-27]. Dostupné z: https://dspace.upce.cz/bitstream/10195/33854/1/SobkovaK_Antibakterialni%20ucinky_JM_2009.pdf
- [40] DE RIJKE, Eva, Pieter OUT, Wilfried M.A. NIESSEN, Freek ARIESE, Cees GOOIJER a Udo A.Th. BRINKMAN. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, vol. 1112, 1-2, s. 31-63 [cit. 2015-04-27]. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.01.019. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967306001269>
- [41] NACZK, Marian a Fereidoon SHAHIDI. Phenolics in cereals, fruits and vegetables. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2006, vol. 41, issue 5, s. 1523-1542 [cit. 2015-04-27]. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.04.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708506003062>
- [42] GRUBEŠIĆ, Renata Jurišić, Dario KREMER, Marijana Zovko KONČIĆ, Jadranka Vuković RODRÍGUEZ a RANDIĆ. Quantitative analysis of polyphenols and antioxidant activity in four *Daphne L.* species. *Central European Journal of Biology* [online]. 2012, vol. 7, issue 6, s. 1092-1100 [cit. 2015-04-27]. DOI: 10.2478/s11535-012-0102-8. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.2478/s11535-012-0102-8>
- [43] HOŘAVOVÁ, Lenka. Sledování antioxidačních ukazatelů u dětí se zhoubnými nádory. Brno, 2011. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií. Vedoucí práce prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
- [44] Příručka pro uživatele LUCIA NET. Praha: Laboratory Imaging, spol. s. r. o., 2004.
- [45] <http://www.gresik.cz/eshop/caje-necaje/sipek-oplodi.html>
- [46] <http://www.gresik.cz/eshop/ovocne-caje-porcovane/aronie-sipek-cerny-rybiz-porcovany.html>
- [47] HEJAZI, A. a F. R. FALKINER. 1997. *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology*[online]. 46(11): 903-912 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1099/00222615-46-11-903. ISSN 0022-2615. Dostupné z: <http://jmm.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/00222615-46-11-903>
- [48] PIGGOT, P. J. *Bacillus subtilis*. *Encyklopedia of microbiology*. 2009, 45-56.
- [49] AZMIR, J., I.S.M. ZAIDUL, M.M. RAHMAN, K.M. SHARIF, A. MOHAMED, F. SAHENA, M.H.A. JAHURUL, K. GHAFOR, N.A.N. NORULAINI, et al. 2013.

Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* [online]. **117**(4): 426-436 [cit. 2015-05-14]. DOI:

10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014. ISSN 02608774. Dostupné z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877413000277>

- [50] STOJANOVIĆ, G., RADULOVIĆ, N., HASHIMOTO, T., PALIĆ, R.: *In vitro* antimicrobial activity of extracts of four *Achillea* species: the composition of *Achillea clavennae* L. (*Asteraceae*) extract., *J. Ethnopharmacol.*, 2005, vol. 101, no. 1-3, s. 185-190