

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium antimikrobiálních vlastností
fenolických látek vyskytujících se v medu
proti bakterii *Paenibacillus larvae***

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Autor:	Mgr. Tereza Kolářová
Studijní program:	N1406
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Kombinovaná
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D.
Rok:	2018

Prohlašuji, že jsem rigorózní práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním rigorózní práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Mgr. Tereza Kolářová

Ráda bych poděkovala panu Mgr. Jiřímu Danihlíkovi, PhD. za odborné vedení a poskytnutí materiálů potřebných k vypracování této rigorózní práce. Také bych velmi ráda poděkovala Ing. Sanje Čavar, Ph.D. za pomoc při analýze UHPLC a poskytnutí fenolických látek k testování. V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem zaměstnancům Katedry biochemie za vstřícný přístup během zpracování experimentální části.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Mgr. Tereza Kolářová
Název práce	Studium antimikrobiálních vlastností fenolických látek vyskytujících se v medu proti bakterii <i>Paenibacillus larvae</i>
Typ práce	Rigorózní
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Paenibacillus larvae je původcem závažného onemocnění moru včelího plodu (*Apis mellifera* L.). V současné době reprezentuje jeden z největších problémů pro včelaře z důvodu ekonomických ztrát a z důvodu absence efektivního terapeutického léčiva. Účelem této práce bylo analyzovat antimikrobiální účinek proti *P. larvae*, genotyp ERIC I (CCUG 48979) a genotyp ERIC II (CCUG 48972) devíti fenolických látek izolovaných z českých medů – kyselin *p*-kumarové, *t*-skořicové, ferulové, gallové, chlorogenové, vanillové, 3- a 4-hydroxybenzoové a kávové. Antimikrobiální účinek byl sledován měřením růstových křivek bakterií v tekutém MYPGP médiu (sledování minimální inhibiční koncentrace, MIC) a také pomocí difuzních testů. Ukázalo se, že koncentrace fenolických látek přirozeně se vyskytujících v medu (v řádu fmol/mg) nemají na patogena *P. larvae* vliv, avšak ve vyšších koncentracích má např. kyselina *p*-kumarová v rámci trvání testu úplný inhibiční účinek (MIC=1 mg/ml), následována kyselinami 3- a 4-hydroxybenzoovou (MIC=2 mg/ml). Dále byly vytvořeny směsi látek o koncentraci přirozeně se vyskytujících v medu (fmol/mg) a studován jejich inhibiční účinek na patogena *P. larvae*. Účinek však nebyl prokázán ani na jeden z genotypů patogena. Klastrovou (shlukovou) analýzou bylo možné rozdělit medy s ohledem jejich původ (květový, medovicový, smíšený). Touto analýzou byly také sloučeny látky patřící do stejné biosyntetické dráhy (např. kyseliny *p*-kumarová a ferulová).

Tato práce přispěla k hlubšímu porozumění problematice antimikrobiálního působení fenolických složek medu a jejich možného použití proti bakterii *P. larvae*.

Klíčová slova	Med, fenolické látky, minimální inhibiční koncentrace (MIC), růstové křivky, <i>Paenibacillus larvae</i> , klastrová analýza
Počet stran	82
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Mgr. Tereza Kolářová
Title	Survey of antimicrobial properties of phenolic compounds from honey against <i>Paenibacillus larvae</i>
Type of thesis	Rigorous
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract

Paenibacillus larvae is a bacterium causes American foulbrood disease of honeybee (*Apis mellifera* L.). American foulbrood is the most deleterious bee disease. The disease is still not able to be cure, thus, it causes the great financial losses to beekeepers. The aim of this study is to assess the antimicrobial properties of nine phenolic compounds – *p*-coumaric, *t*-cinnamic, ferulic, gallic, chlorogenic, vanillic, 3- and 4-hydroxybenzoic and caffeic acids - from several samples of Czech honey. The antimicrobial properties were tested against two genotypes of *P. larvae*, genotype ERIC I (CCUG 48979) and genotype ERIC II (CCUG 48972). The ability of phenolic compounds tested to inhibit the bacterial growth rate in liquid MYPGP medium and the diffuse tests were tested. The results showed that the growth of *P. larvae* was not affected by concentrations of phenolic compounds naturally occurring in honey (fmol/mg). However, for example, *p*-coumaric acid (minimal inhibitory concentration MIC, MIC=1mg/ml), 3-hydroxybenzoic acid and 4-hydroxybenzoic acid (MIC=2mg/ml) had a total inhibitory effect. The mixtures of phenolic compounds tested were also prepared and they were used in concentrations naturally occurring in honey (fmol/mg) and their inhibitory effects on *P. larvae* pathogen were studied. However, they had no effect on the growth of both genotypes of *P. larvae*. Besides, the samples of honey from different parts of Czech republic were categorized based on their origin (floral, honeydew and mixed) using cluster analysis. Moreover, the samples of honey were separated into different clusters based on biosynthetic pathway that they belong to. This study contributed to a deeper understanding of the antimicrobial effects of phenolic compound of honey and their possible use against bacterium *P. larvae*.

Keywords	Honey, phenolic compounds, minimal inhibitory concentration, growth curves, <i>Paenibacillus larvae</i>
Number of pages	82
Number of appendices	0
Language	Czech

CÍLE PRÁCE

I. V teoretické části bylo cílem rigorózní práce vypracování literární rešerše zaměřené na včelí produkty, hodnocení kvality medů a antimikrobiální vlastnosti fenolických látek v medu

II. V experimentální části bylo cílem stanovit minimální inhibiční koncentraci (MIC) vybraných fenolických látek izolovaných z medu a jejich směsí u patogena *Paenibacillus larvae*

OBSAH

CÍLE PRÁCE	3
1 Úvod	1
2 Včelí produkty.....	3
2.1 Med	3
2.1.1 Chemické složení medu	4
2.1.1.1 Sacharidy	5
2.1.1.2 Obsah vody	6
2.1.1.3 Proteiny, enzymy a aminokyseliny.....	6
2.2 Propolis	7
2.3 Mateří kašička	7
3 Hodnocení kvality medů.....	9
3.1 Stanovení vlhkosti.....	9
3.2 Stanovení obsahu sacharidů	10
3.3 Stanovení aktivity diastasy.....	10
3.4 Stanovení aktivity invertasy	11
3.5 Stanovení elektrické vodivosti	11
3.6 Stanovení obsahu prolinu	11
3.7 Stanovení obsahu ve vodě nerozpustných látek.....	12
3.8 Stanovení množství hydroxymethylfurfuralu (HMF).....	12
3.9 Stanovení fenolických látek	13
4 Antimikrobiální látky v medu	14
4.1 Sacharidy v medu.....	14
4.2 Peroxid vodíku (H ₂ O ₂).....	14
4.3 Methylglyoxal a defensin-1.....	15
4.4 Fenolické sloučeniny.....	15
4.4.1 Fenolové kyseliny	16
4.4.1.1 Biosyntéza fenolových kyselin	16
4.4.1.2 Významní zástupci fenolových kyselin: deriváty kyseliny hydroxybenzoové	18
4.4.1.3 Významní zástupci fenolových kyselin: deriváty kyseliny skořicové... ..	20
4.4.2 Antioxidační efekt fenolických sloučenin na včely	22
5 <i>Paenibacillus larvae</i>	23
6 Analýza růstu bakterií a statistické vyhodnocení	25

6.1	Spektrofotometrické stanovení MIC	25
6.2	Shluková (klastrová) analýza	26
7	Použitý materiál	29
7.1	Chemikálie.....	30
7.2	Biologický materiál	30
7.3	Přístroje a experimentální vybavení	30
8	Metody	31
8.1	Příprava média	31
8.2	Příprava bakteriálního materiálu k experimentu	31
8.3	Stanovení množství fenolických látek ve vzorcích medu.....	31
8.4	Stanovení a optimalizace vhodného rozpouštědla fenolických látek metodou měření růstových křivek	32
8.5	Difuzní testy	33
8.6	Určení MIC fenolických látek a jejich směsí pomocí měření růstových křivek.....	33
8.7	Kolorimetrické stanovení životnosti bakterií.....	34
9	Výsledky.....	36
9.1	Stanovení množství fenolických látek ve vzorcích medu	36
9.2	Optimalizace vhodného rozpouštědla pro analýzu jednotlivých fenolických látek a jejich vliv na růst bakterií	37
9.3	Difuzní testy	40
9.4	Stanovení MIC jednotlivých fenolických látek pomocí růstových křivek.....	46
9.5	Stanovení MIC směsí fenolových kyselin o koncentraci odpovídající přirozenému obsahu v medu.....	49
9.6	Kolorimetrické stanovení MIC pomocí resazurinu.....	52
9.6	Shluková (klastrová) analýza	54
9.6.1	Shluková analýza fenolických látek	54
9.6.2	Shluková analýza vzorků medů	55
10	Diskuze.....	57
11	Závěr	60
12	LITERATURA.....	61
13	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	71

TEORETICKÁ ČÁST

1 Úvod

První zmínky o včelích produktech se datují již do doby kamenné přibližně 8000-5000 let před Kristem (Nayik *et al.*, 2014; Obr. 1). Za první včelaře byli údajně považováni Kréťané a Egypťané, kteří chovali včely pro med a propolis, neboť věřili v jeho blahodárné účinky na lidské zdraví a krásu (Kieliszek *et al.*, 2018). Mezi včelí produkty dále řadíme mateří kašičku, vosk nebo včelí jed. Tyto produkty byly od pradávna používány jako součást tradiční medicíny (Viuda-Martos *et al.*, 2008). Díky vysokému obsahu antimikrobiálních látek mají široké použití v lidové medicíně; podporují imunitu organismu, med rychle dodává energii po náročných fyzických výkonech, používají se k léčbě kožních vředů a mnoho jiného. Ve všech případech však záleží na typu rostliny, geografickém původu, klimatických podmínkách a správné skladování produktů (Nayik *et al.*, 2014).

Pro plné využití těchto produktů je především potřeba starat se o včely a jejich včelstva. Včela medonosná (*Apis mellifera*) se řadí mezi nedůležitější opylovatelé, na kterých závisí celosvětové výnosy zemědělsky a ekonomicky důležitých plodin. V posledních letech jsou včely čím dál tím víc sužovány biotickým i abiotickým stresem, jako jsou klimatické změny, chemikálie produkované lidmi (xenobiotika) a v neposlední řadě rozšíření parazitů a patogenů z jejich původních oblastí do nových oblastí světa (Goulson *et al.*, 2015). Patogenní bakterie *Paenibacillus larvae* je původcem závažného onemocnění moru včelího plodu (American foulbrood, AFB) které je v souladu s Veterinárním zákonem č. 166/1999 Sb. ve znění pozdějších předpisů řazeno mezi nebezpečné nákazy včel. V současné době reprezentuje jeden z největších problémů pro včelaře z důvodu ekonomických ztrát a z důvodu absence efektivního terapeutického léčiva (Sagona *et al.*, 2017). V některých zemích (např. USA) totiž k boji proti AFB používají antibiotika (tetracyklin) či chemoterapeutikum sulfathiazol. Tyto látky však nezneškodní infekční endospory, dokáží potlačit pouze klinické příznaky. Používání antibiotik navíc vede k bakteriální rezistenci nebo ke kontaminaci včelích produktů (Eguaras *et al.*, 2005). Jedinou „léčbou“ včelstva je v současnosti destrukce infikovaných kolonií spálením (Williams, 2000; Sagona *et al.*, 2017). V roce 2011 byl poprvé sekvenován genom *P. larvae* (Chan *et al.*, 2011), což velmi přispělo k dalšímu boji proti této bakterii.

V této práci byly použity dva nejrozšířenější genotypy *P. larvae*, a to genotyp ERIC I (CCUG 48979) a genotyp ERIC II (CCUG 48972). Byly zkoumány účinky vybraných antimikrobiálních látek získaných z medu na tyto dva genotypy *P. larvae* a jejich potenciální využití v zakrmování včelstev vyváženými směsmi za účelem zvyšování obranyschopnosti proti tomuto patogenu.



Obr. 1: První zmínka o včelařství z Pavoučí jeskyně (Cueva de la Araña) poblíž městečka Bicorp ve Španělsku se datuje do doby kamenné (autor J. Danihlák)

2 Včelí produkty

Biologicky aktivní látky přírodního charakteru byly vždy pod velkým zájmem, což můžeme také aplikovat na včelí produkty – produkty včely medonosné. Radíme mezi ně nejen med, ale také propolis, mateří kašičku nebo včelí jed a vosk.

2.1 Med

Med je nejznámější primární produkt včelařství a historie jeho použití je paralelní k dějinám lidstva; v každé kultuře lze najít důkaz o použití medu jako zdroje potravy, ale také jako symbol používaný v náboženství a magii (Krell, 1996). Naposledy publikované statistiky odhadují roční světovou produkci více než 1,5 milionu tun na světovém trhu v hodnotě zhruba 4000 milionů dolarů. Celosvětovému prodeji medu dominuje Čína (Faostat, 2016).

Med je přírodní sladký produkt, který včely tvoří z nektaru nebo medovice získaných z rostlin. Ve svém těle je obohacují o další látky a vzniklý produkt je poté uskladňován v plástech (Lampeitl, 1995). Cílem tohoto uskladňování a zrání je přeměna tekuté a mikrobiálně nestálé přírodní šťávy na hutné a mikrobiálně stálé zimní zásoby – med. Existují tři druhy medu s ohledem na jeho původ. Prvním z nich je med květový, který pochází z rostlinného nektaru. Dalším je medovicový med, který vzniká tak, že mšice (*Aphidinea*) a další podřády řádu stejnokřídlých (*Homoptera*): mery (*Psyllinea*) a červci (*Coccinea*) nabodávají rostlinná pletiva, kterými proudí míza bohatá na živiny, hlavně sacharidy (floém). V době rozmnožování mají mšice velkou spotřebu proteinů, kterých se ale v míze nachází relativně málo. Nasátou mizu mšice filtrují a přebytečný sladký roztok (medovici) rozstříkují do okolí. Kromě hmyzu je medovice tvořena také houbami, příkladem je paličkovice nachová (*Claviceps purpurea*). K tvorbě mízy také dochází na listech nebo pupenech, kde se objevuje ve formě čirých kapiček (Škrobal, 1967; Halouzka, 2014). Třetím typem medu je med smíšený, který je kombinací medovicového a květového medu. V každém z uvedených typů medu můžeme rozeznávat mnoho variací v závislosti na jejich organoleptických, fyzikálně-chemických vlastnostech a botanickém původu (Bradbear, 2009; Plutowska *et al.*, 2011). Květové a medovicové medy mohou být po svém vytočení dále zpracovány. Na základě mechanismu úpravy a konečného stavu medu ho podle vyhlášky 76/2003 Sb. rozlišujeme na stáčený, lisovaný a plástečkový med. Jakákoliv neodborná manipulace nebo špatný pracovní postup při jeho výrobě má vliv na jeho kvalitu, stejně tak mohou

kvalitu medu ovlivnit nesprávné skladovací podmínky (Hajdušková, 2006; Chuan *et al.*, 2012; Halouzka, 2014).

Kvalita medu je také ovlivněna daným klimatem v určité lokalitě a druhovým složením rostlin. Tyto podmínky jsou úzce spjaty s místem výskytu a potravinovým řetězcem včely, což se dotýká zejména rostlin, které poskytují včelám zdroje potravy (Chuan *et al.*, 2012).

2.1.1 Chemické složení medu

Med je složen převážně ze sacharidů a vody, v malém množství se pak nacházejí další složky jako organické kyseliny, aminokyseliny, proteiny včetně enzymů, vitamíny, fenolické sloučeniny a aromatické substance (Cantarelli *et al.*, 2008). Dvě důležité kategorie neperoxidových antimikrobiálních látek obsažených v medu jsou flavonoidy (např. pinocembrin, quercetin nebo naringenin) a fenolové kyseliny (např. kyselina kávová, skořicová či *p*-kumarová) (Wahdan, 1998; Sagona *et al.*, 2017). Flavonoidy jsou sice přítomny v nepatrném množství, ale dávají medu jeho barvu, chuť a aroma (Alvarez-Suarez, 2017). Med ze stejného zdroje květin se může lišit ve složení a to v důsledku sezónní, klimatické nebo geografické variace. Kromě již jmenovaných organických látek se v medu vyskytují minerály a těžké kovy, které mohou v případě medovicového medu tvořit až 1 % celkové hmotnosti (Tab. 1).

Tab. 1: Složení květového a medovicového medu (data uvedena v g/ 100 g medu; Bogdanov *et al.*, 2008; Alvarez-Suarez, 2017)

	Květový med		Medovicový med	
	Rozsah	Průměr	Rozsah	Průměr
Voda	16 - 19	17,2	16 - 19	16,3
Celkový podíl sacharidů		79,7		80,5
<i>Monosacharidy</i>				
fruktosa	30 - 45	38,2	28 - 40	31,8
glukosa	24 - 40	31,3	19 - 32	26,1
<i>Disacharidy</i>				
sacharosa	0,1 - 4,8	0,7	0,1 - 4,7	0,5
(iso)maltosa, ostatní	2,0 - 8,0	5	1,0 - 6,0	4
<i>Trisacharidy</i>				
oligosacharidy		3,1		10,1
erlosa	0,5 - 6,0	0,8	0,1 - 6,0	0,1
melecitosa		< 0,1	0,3 - 22	4
ostatní	0,5 - 1,0	0,5	0,1 - 6,0	3
Minerály, těžké kovy	0,1 - 0,5	0,1	0,6 - 2,0	0,9
Aminokyseliny, proteiny	0,2 - 0,4	0,3	0,4 - 0,7	0,6
Organické kyseliny	0,2 - 0,8	0,5	0,8 - 1,5	1,1
pH hodnota	3,2 - 4,5	3,9	4,5 - 6,5	5,2

2.1.1.1 Sacharidy

Med je složen ze sacharidů přibližně ze 79-82 %, tvoří cukernou část včelí potravy, je zdrojem energie pro činnost včelstva. Hlavní komponenty jsou monosacharidy glukosa a fruktosa (75 %) a dále asi třicet dalších sacharidů včetně disacharidů sacharosy (disacharid složený z fruktosy a glukosy, které jsou spojeny prostřednictvím α -(1-2) vazby), maltosy a isomaltosy, či trisacharidu erlosy a melecitosy (Tab. 1) (Alvarez-Suarez, 2017). Disacharidy maltosa a sacharosa se nacházejí v rozsahu 1-7 % (Tewari a Irudazara, 2004). Sladkost medu je dána původem nektaru a odvíjí se od počtu květových zdrojů, protože jednodruhové medy jsou obvykle méně sladké (Kamal a Klein, 2011).

Produkce tohoto vysoce cukerného roztoku je možná pouze v úlu při teplotách blízkých 30 °C a s přidávkem enzymu invertasy (EC 3.2.1.26) sekretovaného hltanovými žlázami včel. Enzym invertasa (EC 3.2.1.26) rozkládá sacharosu z nektaru a medovice na glukosu a fruktosu (Crane, 1990). Obecně lze říci, že v medovicových medech nalezneme glukosu (G) a fruktosu (F) v menších koncentracích, avšak poměr F/G je vysoký. Toto pravidlo má však svoje výjimky a vysoký F/G poměr nalezneme

také v některých květových medech, např. ve vřesových medech (*Calluna vulgaris* L.) (Waś *et al.*, 2011).

Během skladování se složení sacharidové složky mění v důsledku aktivity enzymů, mikroorganismů podílejících se na tvorbě medu a také teploty. Když je med skladován při teplotách nižších, než je teplota v úlu, dochází u některých sacharidů (převážně glukosy a fruktosy) ke krystalizaci. Medy s vysokým poměrem F/G (nad 1,33) krystalizují méně, medy s F/G poměrem pod 1,11 krystalizují rychle (Smanalieva a Senge, 2009; Alvarez-Suarez, 2017). Důležitou vlastností pro správnou predikci krystalizace je také poměr mezi glukosou a vodou (W) (G/W). Obecně lze říci, že pomalá krystalizace se objevuje u medů s G/W poměrem menším než 1,7. Escuredo *et al.*, 2014 potvrdili, že obsah glukosy, fruktosy a poměry F/G a G/W jsou hlavními indikátory pro predikci krystalizace v medu.

2.1.1.2 Obsah vody

Vlhkost medu je kvalitativní kritérium, které určuje schopnost medu zůstat stabilní a odolný vůči fermentaci kvasinkami a bakteriemi. Čím je vlhkost vyšší, tím je větší pravděpodobnost, že med bude při skladování kvasit. Ideální je obsah vody v rozmezí 16 – 19g/100g medu (Bogdanov *et al.*, 2008), v Evropské Unii (EU) je limit obsahu vody stanoven na 21g/100g medu. Česká směrnice rady 2001/110/ES ze dne 20. prosince 2001 říká, že by med neměl obsahovat více než 20g/100g medu vody.

2.1.1.3 Proteiny, enzymy a aminokyseliny

Počet studií zabývajících se proteiny je relativně malý, převážně z důvodu jejich malého obsahu v medu a také z důvodu obtížnosti extrakce z prostředí bohatého na sacharidy (Chua *et al.*, 2013). Hlavní metody stanovení koncentrace proteinů jsou Bradfordova a Kjeldahlova, ačkoliv nejsou úplně přesné, neboť např. Kjeldahlova metoda slouží ke stanovení přítomnosti celkového obsahu dusíku (Chua *et al.*, 2013).

Proteiny v medu mohou pocházet z nektaru nebo z pylu rostlin, příležitostně z jejich mízy, častěji však pocházejí ze sekretu včelích žláz, které jsou zodpovědné za rozklad pylu a nektaru. Průměrný obsah proteinů v medu je kolem 0,2 – 0,7 % s molekulovými hmotnostmi v rozmezí 22 až 75 kDa. Hlavním proteinem identifikovaným v medu je major royal jelly protein 1 (MRJP1, uniprot číslo O18330), který je podobný apalbuminu-1 (Bilikova a Simuth, 2010).

Zastoupení aminokyselin patří mezi další významný faktor, který slouží k identifikaci botanického původu a kvality medu. Během skladování a tepelné úpravy medu však může docházet k určitým změnám složení. Tyto změny jsou způsobeny reakcí karbonylové skupiny redukujícího sacharidu s volnou skupinou aminokyselin, peptidů nebo proteinů (Iglesias *et al.*, 2006). Aminokyseliny jsou do medu vpravovány prostřednictvím včel nebo z rostlinných zdrojů, např. z pylu (Czipa *et al.*, 2011). Celkové množství aminokyselin v medu činí 1 % a majoritní aminokyselinou je prolin. Ten tvoří 50 až 85 % celkového zastoupení aminokyselin (Iglesias *et al.*, 2006; Halouzka, 2014).

2.2 Propolis

Propolis (z řeckého „pro“ = před a „polis“ = město) je pryskyřicová hmota, kterou sbírají včely z rostlin. Byl využíván již v antickém Řecku a Egyptě k léčbě zranění a také jako dezinfekční látka (Sforcin a Bankova, 2011), ve starověkém Egyptě sloužil také při mumifikaci (Kuropatnicki *et al.*, 2011). Typicky je složen z rostlinných pryskyřic (50 %), z vosků (30 %), z esenciálních a aromatických olejů (10 %), z pylů (5 %) a posledních 5 % tvoří další organické látky (Huang *et al.*, 2014). V propolisu bylo identifikováno více než 500 sloučenin, nejhojněji zastoupenými skupinami jsou však flavonoidy a fenolové kyseliny s jejich estery, které často tvoří až 50 % propolisové pryskyřice. Tyto látky udávají propolisu jeho antimikrobiální vlastnosti (Bankova *et al.*, 2000; Sforcin a Bankova, 2011; Ristivojević a kol., 2015a). Během tvorby propolisu včely rozmíchávají pryskyřičný rostlinný materiál s vlastním voskem a enzymy. Propolis má ochrannou roli ve včelích koloniích, neboť výsledný materiál využívají včely k utěsnění trhlin a děr a chrání tak úl před útočníky a také před kontaminací a infekcemi (Simone-Finstrom a Spivak, 2010; Abu-Mellal *et al.*, 2012; Tran *et al.*, 2012).

2.3 Mateří kašička

Mateří kašička (MK) je produkována hltanovými žlázami mladých včelích dělnic. Je hlavní složkou potravy včelích larev a nezbytnou komponentou pro vývoj včelí matky. Obsahuje kromě 10-hydroxy-2-decenové kyseliny, která má antimikrobiální účinek, také proteinové složky s antimikrobiální aktivitou, tzv. antimikrobiální peptidy (AmPs). V mateří kašičce se vyskytuje asi 80 % těchto proteinů (Vezeteu *et al.*, 2016). Mezi tyto

peptidy se řadí defensin-1 nebo také royalisin a patří do skupiny obranných AmPs (viz kapitola Methylglyoxal a defensin-1 (UniProtKB - P17722)) (Fujiwara *et al.*, 1990; Kwakman a Zaat, 2012; Danihlik *et al.*, 2016).

Složení MK se v průběhu stáří larvy mění, obecně je však MK tvořena vodou (60 - 70%), proteiny (12-15%), sacharidy (10-16%), lipidy (3-6%), vitamíny a aminokyselinami. Proteiny rozpustné ve vodě tvoří 46-89% z celkového počtu proteinů (Chen a Chen, 1995). Hlavní skupinou proteinů zastoupených v mateří kašičce je rodina proteinů MRJPs (major royal jelly proteins). Tyto proteiny tvoří 82-90 % z celkového proteinového obsahu MK. V roce 1998 bylo na základě analýzy cDNA knihovny detekováno pět základních proteinů z této rodiny – MRJP1 (UniProtKB - O18330), MRJP2 (UniProtKB - O77061), MRJP3 (UniProtKB - Q17060), MRJP4 (UniProtKB - Q17061), MRJP5 (UniProtKB - O97432). Proteiny MRJP3 a MRJP5 byly na základě této analýzy identifikovány jako polymorfní (Schmitzová *et al.*, 1998; Dostálková, 2016). Albert a Klaudivy na základě analýzy cDNA v roce 2004 identifikovali ještě další tři MRJP proteiny - MRJP6 (UniProtKB - Q6W3E3), MRJP7 (UniProtKB - Q6IMJ9), MRJP8 (UniProtKB - Q6TGR0).

MRJP jsou sekreční proteiny syntetizovány s N-koncovým signálním peptidem (16-20 aminokyselin, AK). MRJP proteiny jsou složeny ze sekvence 400-578 AK s teoretickou molekulovou hmotností pohybující se mezi 45-68 kDa (Schmitzová *et al.*, 1998; Albert a Klaudivy, 2004; Dostálková, 2016). Většina MRJP proteinů se ve své sekvenci vyznačuje vysokým obsahem pro včely esenciálních aminokyselin, např. arginin, lysin, isoleucin, methionin nebo fenylalanin. MRJP 1-5 patří mezi nejvíce zastoupené proteiny v MK, předpokládá se tedy, že mají především nutriční (výživovou) funkci (Schmitzová *et al.*, 1998; Albert a Klaudivy, 2004; Dostálková, 2016).

3 Hodnocení kvality medů

V roce 1990 byla založena Mezinárodní komise medu (International Honey Commission). Nyní tato komise doporučuje, jakými metodami se má zjišťovat a zajišťovat kvalita medu. Metody pro posouzení a určení kritérií kvality medu jsou uvedeny v Evropské normě nebo v Kodexu Alimentarius (Bogdanov *et al.*, 2000; Bogdanov, 2009).

Existuje mnoho metod na posouzení kvality medů. Od starších analytických metod, jako je refraktometrické či jodometrické stanovení obsahu vody např. metodou Karl-Fishera (Fisher, 1935; Wedmore, 1955), až po metody nové, jako je např. vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), kterou se zjišťuje množství hydroxymethylfurfuralu (HMF) nebo fenolických látek v medu (Jeuring a Koppers, 1980; Pryzyska a Biesaga, 2009). Evropská legislativa ustanovuje kritéria složení medu. Tato kritéria musí být splněna, aby byl med vyhovující pro prodej. Med obsahuje více jak 200 různých skupin látek a určení fyzikálně-chemických parametrů medu nám pomáhá získat základní informace ohledně jeho chemického složení. Tyto metody považujeme za nepostradatelné také např. pro rozlišení medovicových medů od květových (Escuredo *et al.*, 2014).

3.1 Stanovení vlhkosti

Obsah vody (vlhkost) je jeden z parametrů pro určení kvality každého potravinářského výrobku. Technikou nejběžněji používanou pro tyto analýzy je díky své rychlosti, přesnosti a snadnému provedení titrace podle Karl Fischera. Je založena na principu jodometrického stanovení vody v roztoku báze (např. RN-pyridin nebo imidazol), metanolu s oxidem siřičitým a dalšími rozpouštědly případně aditivy podle rovnice:



Voda stechiometricky reaguje s jódem a dalšími složkami roztoku, stanovení tak lze přenést na velmi přesnou coulometrickou metodu s elektrochemickou generací titračního činidla. Jeden mol jódu se spotřebuje na 1 mol vody a dojde k přenesení náboje odpovídajícímu 1 molu elektronů.

Další hojně používanou metodou stanovení vlhkosti je refraktometrie (Abbeho refraktometr), která je však méně přesná (Wedmore, 1955; Bogdanov, 2009).

3.2 Stanovení obsahu sacharidů

Množství sacharidů můžeme stanovit dvěma způsoby: nespecifickými a specifickými metodami. Nespecificky jsou stanovovány redukující sacharidy jako glukosa a fruktosa, Fehlingovou metodou (Klein, 2012). Množství neredukujících sacharidů je pak spočítáno jako rozdíl celkového množství sacharidů a redukujících sacharidů.

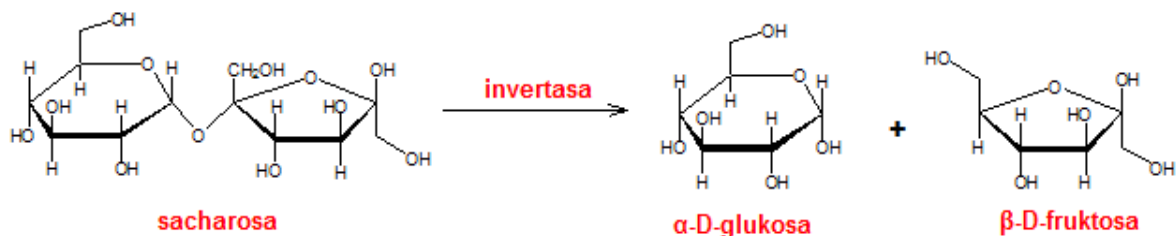
Mezi specifické metody řadíme metody chromatografické (Pourtaillier *et al.*, 1990). Plynová chromatografie využívá kapilární kolony pro separaci silylovaných sacharidových derivátů. HPLC využívá kolony buď na bázi křemíku s refraktometrickou detekcí, nebo iontoměničové kolony s pulsní amperometrickou detekcí (Bogdanov *et al.*, 2000). V rutinní kontrole jsou měřeny hlavně glukosa, fruktosa a sacharosa, které mohou být měřeny také enzymově, kdy dochází k přeměně kofaktoru nebo kosubstrátu. Vznik nebo úbytek těchto složek je sledován spektrofotometricky případně elektrochemicky a nejčastěji jde o dehydrogenace fosforečných esterů sacharidů pyridinovými dehydrogenasami za současné konverze NAD^+ (nebo NADP^+) na $\text{NADH}+\text{H}^+$ (nebo $\text{NADPH}+\text{H}^+$). Redukovaná forma kofaktoru se stanoví měřením absorpance při 340 nm (Guan a Li, 2010).

3.3 Stanovení aktivity diastasy

Diastasa (α -amylasa, EC 3.2.1.1 a β -amylasa, 3.2.1.2) katalyzuje přeměnu škrobu na maltosu. α -amylasa degraduje škrob na směs tvořenou disacharidem maltosou, trisacharidem maltotriosou (která obsahuje tři α (1-4)-vázané zbytky glukosy) a oligosacharidy známé jako dextriny (obsahují α (1-6) větvené řetězce glukosy) (Sakač a Sak-Bosnar, 2012; Halouzka, 2014). Diastasa je indikátorem čerstvosti medu. Škrob ani jeho prekurzory se v medu prakticky nevyskytují, včely však samy diastasu přidávají do medu (Bogdanov, 2009). Pro stanovení aktivity diastasy se využívají dvě metody: Schadeho metoda využívající škrob jako substrát (výsledek vyjádřen ve Schadeho jednotkách) a Phadebasova metoda používající uměle vytvořený, modře zbarvený škrob. Na rozdíl od Schadeho metody je u Phadebasovy metody používán definovaný substrát, protože komerčně dostupný škrob se značně liší v kvalitě a v případě nevhodného škrobového substrátu může dojít k ovlivnění výsledků měřené aktivity. Obě metody slouží pro spektrofotometrické stanovení aktivity enzymu (Bogdanov, 2009).

3.4 Stanovení aktivity invertasy

Invertasa (EC 3.2.1.26) katalyzuje štěpení sacharosy za tvorby glukosy a fruktosy v ekvimolárním poměru (Obr. 2). Slouží jako indikátor čerstvosti. Tento enzym je velmi náchylný na tepelné zacházení a podmínky skladování. Včely jsou schopny invertasu produkovat a přidávat ji do medu při procesu jeho tvorby. Výsledky enzymové aktivity se vyjadřují v jednotkách přeměny invertasy (IU/kg) nebo jako IN (invertasové číslo), kde 1 IN = 7,344732 IU/kg. Jedna jednotka invertasy (IU/kg) je definována jako počet molekul substrátu přeměněných za jednu minutu a vyjádřenou v množství 1 kg medu. V praxi je běžně užívané vyjádření aktivity invertasy v čísle invertasy. V metodě stanovení aktivity invertasy je jako substrát použit p-nitrofenyl- α -D-glukopyranosid. V praxi je invertasa široce využívaná v průmyslové výrobě umělého medu a tekutých sacharidů (Alekseeva *et al.*, 2014; Halouzka, 2014).



Obr. 2: Enzymové štěpení disacharidu sacharosy na monosacharidové jednotky α -D-glukosu a β -D-fruktosu.

3.5 Stanovení elektrické vodivosti

Toto měření závisí na obsahu kyselin, minerálů a těžkých kovů v medu. Čím vyšší je jejich obsah, tím vyšší je vodivost medu. Vodivost je velmi dobrým kritériem pro určení botanického původu medu. Medovicové medy mívají zpravidla vyšší hodnoty pH a konduktivity než medy smíšené a květové (Bogdanov *et al.*, 2000).

3.6 Stanovení obsahu prolinu

Množství aminokyselin je uváděno na základě množství prolinu, protože právě prolin je v medu nejvíce zastoupen. Jeho obsah je měřen spektrofotometricky a je stanoven pomocí intenzity vniklého zbarvení po reakci s ninhydrinem, kdy dochází ke vzniku fialového komplexu (Ough, 1969). Tato metoda má dostačující variabilitu výsledků a dosahuje rozdílných hodnot prolinu, které jsou dány druhem a stářím medu. Jeho množství neustále klesá během skladování a tudíž i obsah prolinu patří mezi ukazatele

zralosti a stáří medu (Czipa *et al.*, 2012). Minimální obsah prolinu podle EU (2002) musí dosahovat množství větší než 180 mg/kg medu (Czipa *et al.*, 2012). V Německu je med s obsahem méně než 180 mg / kg považován buď za nezralý, nebo falšovaný (Bogdanov, 2009; Halouzka, 2014).

3.7 Stanovení obsahu ve vodě nerozpustných látek

Toto stanovení je důležité z hlediska detekce nečistot v medu. Vosk je považován za hlavní zdroj kontaminace těmito látkami. Výsledek je vyjádřen v procentech z celkové váhy medu (Codex Alimentarius Standard for Honey, 1993). Metoda je však velice nepřesná a má velmi vysokou mezilaboratorní variabilitu (mezi 26-85%) (Bogdanov, 2009).

3.8 Stanovení množství hydroxymethylfurfuralu (HMF)

HMF je cyklický aldehyd poprvé publikovaný v roce 1875 vznikající degradací některých sacharidů (Rosatella *et al.*, 2011). Přítomnost mnoha kyselin a také monosacharidů glukosy a fruktosy vyskytujících se v medu vytváří příznivé podmínky pro vznik této látky. Vzniká totiž převážně přeměnou sacharidů pomocí Maillardovy reakce (neenzymové reakce probíhající mezi redukujícími sacharidy) nebo kyselou dehydratací hexos.

HMF je důležitá chemická sloučenina pro posouzení čerstvosti a kvality medu. HMF je obsažen u čerstvě vytočeného medu v malém množství do 5 mg/kg, ale jeho koncentrace se zvyšuje v důsledku vystavení medu teplotě vyšší než 40 °C nebo dlouhodobému skladování. V doposud zjištěných studiích nebyl zjištěn negativní vliv HMF na člověka (Capuano a Fogliano, 2011), pro včely je však vysoce toxický a je nutné se vyvarovat zkrmování včelstva nekvalitním cukrem nebo medem, který byl vystaven teplotám vyšším než 50°C (LeBlanc *et al.*, 2009; Khalil *et al.*, 2010). Ke stanovení HMF se používají tři metody: kolorimetrická (s použitím *p*-toluidinu), spektrofotometrická (s použitím hydrogensířičitanu sodného) a metoda HPLC (Jeuring a Koppers, 1980; White, 1979). Z důvodu potenciální karcinogenity *p*-toluidinu se však upřednostňují zbylé dvě metody, které navíc vykazují lepší opakovatelnost a reprodučibilitu. Limit pro množství HMF v medu je v EU 40 mg na kilogram medu (Bogdanov, 2009), v ČR je dle Normy jakosti č. ČSV 1/1999 limit 20 mg/kg.

3.9 Stanovení fenolických látek

Med je bohatý na řadu fenolových kyselin a flavonoidů, které vykazují široké spektrum biologických účinků, působí například jako přírodní antioxidanty (Pyrzynska a Biesaga, 2009). Ačkoli chemie medu a jeho produktů je v posledních několika desetiletích velice zkoumaným tématem, existuje pouze několik recenzí shrnujících metody, které se používají pro extrakci, separaci a stanovení fenolických sloučenin ve vzorcích medu (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006; Pryzynska a Biesaga, 2009, Ciulu *et al.*, 2016). Jako nejvhodnější extrakce se jeví extrakce na pevné fázi (SPE), která bývá provedena pomocí komerčních SPE kolon a poskytuje jednodušší, rychlejší a levnější metodu ve srovnání s použitím iontoměniče Amberlite XAD-2. Nejlepší výsledky návratnosti u flavonoidů a fenolových kyselin vykazují sorbenty Bond Elut octadecyl C₁₈, Strata-X a Amberlite XAD-2 (Pulcini *et al.*, 2006). Po extrakci jsou fenolické sloučeniny separovány metodou HPLC s reverzní fází, k identifikaci se pak nejčastěji používá UV detekce (da Rosa Neng *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2014). Od doby, co jsou fenolické sloučeniny (zejména fenolové kyseliny a flavonoidy) známy jako taxonomické markery v rostlinách, jsou analýzy těchto sloučenin spolu s těkavými terpenoidy obvykle používány k určení květového a zeměpisného původu (da Silva *et al.*, 2016).

4 Antimikrobiální látky v medu

Antimikrobiální aktivita obecně znamená aktivita látky vedoucí k inhibici nebo úplnému zastavení nemoci způsobené mikroby (Sackett, 1919; Molan, 1992; Khilnani a Wing, 2011; Nafea *et al.*, 2014). V medu byla poprvé popsána již na konci 19. století, konkrétně v roce 1892 nizozemským vědcem van Ketelem, později také v roce 1919 americkým bakteriologem a doktorem W. G. Sackettem (Sackett, 1919; Molan, 1992). V prvotních pokusech, kdy byl použit pouze čistý med v různých koncentracích a kde bylo využito mikrobiologických metod typu difusních testů či zalévání bakteriálních kultur do tekutého média či agaru, byly zaznamenány jak inhibiční zóny růstu, tak také minimální inhibiční koncentrace (Molan, 1992). V těchto pokusech však byl prokázán pouze bakteriostatický účinek (pouze inhibice růstu bakterií po dobu inkubace) a nebylo prokázáno, zda má med i baktericidní účinek (tj. letální pro bakterie).

Dobře prozkoumanými antibakteriálními vlastnostmi medu jsou vysoký obsah sacharidů či nízké pH, sloučeniny jako peroxid vodíku, methylglyoxal a včelí peptid defensin-1 (Kwakman a Zaat, 2012).

4.1 Sacharidy v medu

Jak již bylo zmíněno výše, med obsahuje okolo 80 % sacharidů a dalších cca 18 % tvoří voda. Kombinace vysokého obsahu sacharidů spolu s nízkým obsahem vody způsobuje osmotický stres, který zabraňuje šíření mikroorganismů v medu. Malé naředění medu také zabraňuje růstu kvasinek, nejlepší antibakteriální aktivity sacharidů je dosaženo naředěním medu přibližně na 30 – 40 % (Kwakman a Zaat, 2012).

4.2 Peroxid vodíku (H₂O₂)

V 60. letech 20. století byl peroxid vodíku považován za hlavní sloučeninu přispívající k antimikrobiální aktivitě medu (White *et al.*, 1963; Molan, 1992). Vzniká za aerobních podmínek přeměnou glukosy díky působení enzymu glukosaoxidasu (EC 1.1.3.4), který se přirozeně nachází v medu, kde jej přidávají včely. Množství a aktivita tohoto enzymu závisí na původu nektaru (rostliny). Přispění H₂O₂ k antimikrobiální aktivitě medu může být měřeno přidávkem enzymu katalasy (EC 1.11.1.6), kdy dochází k neutralizaci H₂O₂ (White *et al.*, 1963). Později však bylo zjištěno, že velké množství medů má svou antibakteriální aktivitu nejen díky sacharidům a peroxidu vodíku (Kwakman a Zaat, 2012).

4.3 Methylglyoxal a defensin-1

Methylglyoxal a včelí peptid defensin-1 byly objeveny teprve nedávno v medu z balmínu metlatého (*Leptospermum scoparium*), který roste na Novém Zélandu (Mavric *et al.*, 2008; Kwakman a Zaat, 2012).

Methylglyoxal (MGO) vzniká obecně ze sacharidů působením tepla, v medu je tvořen neenzymatickou konverzí dihydroxyacetonu (Mavric *et al.*, 2008; Adams *et al.*, 2009). Koncentrace MGO v potravinách se pohybuje mezi 3-47 mg/kg, přičemž v medu z manuky začínají koncentrace na 38 mg/kg. V ostatních medech se MGO také nachází, avšak koncentrace nepřesahují 24 mg/kg (Mavric *et al.*, 2008; Kwakman a Zaat, 2012).

Peptid defensin-1 neboli royalisin byl poprvé identifikován ve včelí hemolymfě (Casteels-Josson *et al.*, 1994) a mateří kašičce (Fujiwara *et al.*, 1990; Kwakman a Zaat, 2012). Oba dva defensiny se od sebe sekvenčně odlišují. Defensin-I obsažený v hemolymfě obsahuje na C-konci peptidu fenylalanin (amidový C-konec). Royalisin obsahuje ve své aminokyselinové sekvenci na pozici 50 tyrosin místo argininu vyskytujícího se u defensinu-I z hemolymfy (Casteels, 1998; Dostálková, 2016). Tento peptid má potvrzenou aktivitu proti Gram-pozitivním bakteriím typu *B. subtilis*, *S. aureus*, či *P. larvae* (Kwakman a Zaat, 2012)

4.4 Fenolické sloučeniny

Fenolické sloučeniny jsou jednou z nejdůležitějších skupin sloučenin vyskytujících se v rostlinách, kde jsou široce rozšířeny. Jsou charakterizovány tím, že mají alespoň jeden aromatický kruh s jednou nebo více připojenými hydroxylovými skupinami (Strack, 1997). Koncentrace fenolických sloučenin v extraktech závisí na různých faktorech – od použití roztoků a rozpouštědel pro extrakci, jejich koncentraci až po délku macerace materiálu (Kasparavičienė *et al.*, 2013, Čeksterytė *et al.*, 2016).

Biologické aktivity medu, propolisu a mateří kašičky jsou převážně přičítány fenolickým sloučeninám, jako jsou fenolové kyseliny a flavonoidy. Flavonoidy a fenolové kyseliny (deriváty kyseliny benzoové a kyseliny skořicové) jsou nejdůležitější skupinou polyfenolů s více než 5000 sloučeninami. Flavonoidy lze rozdělit na flavonoly, flavanony, flavony, anthokyanidy a isoflavony (Manach *et al.*, 2004; Pyrzyńska a Biesaga, 2009). Lidé ani zvířata si nedokáží fenolické sloučeniny syntetizovat, proto se stávají zajímavými pro farmaceutické firmy a firmy zabývající se

doplňky stravy díky svým pozitivním účinkům na zdraví (Cook a Samman, 1996; Yao *et al.*, 2004; Waś *et al.*, 2017).

Flavonoidy vykazují širokou škálu biologických aktivit, včetně antialergických a vasodilatačních účinků (Pyrzynska a Biesaga, 2009). Navíc flavonoidy inhibují lipidovou peroxidaci, agregaci krevních destiček, kapilární propustnost a křehkost a aktivitu enzymových systémů včetně cyklooxygenasy (EC 1.14.99.1) a lipoxygenasy (EC 1.13.11.-) (Pyrzynska a Biesaga, 2009). To hlavně znamená, že tyto sloučeniny jsou velmi dobré antioxidanty. Antioxidant může být definován jako jakákoliv látka, která i při relativně nízké koncentraci zabraňuje oxidaci substrátu. Antioxidanty jsou schopny stabilizovat nebo deaktivovat volné radikály předtím, než dojde k útoku na buňku. Jsou důležité pro regulaci různých systémů v buňce. Antioxidační účinek fenolových kyselin spočívá hlavně v jejich redoxních vlastnostech a schopnosti působit jako redukční činidlo nebo donor vodíkových atomů (Atoui *et al.*, 2005).

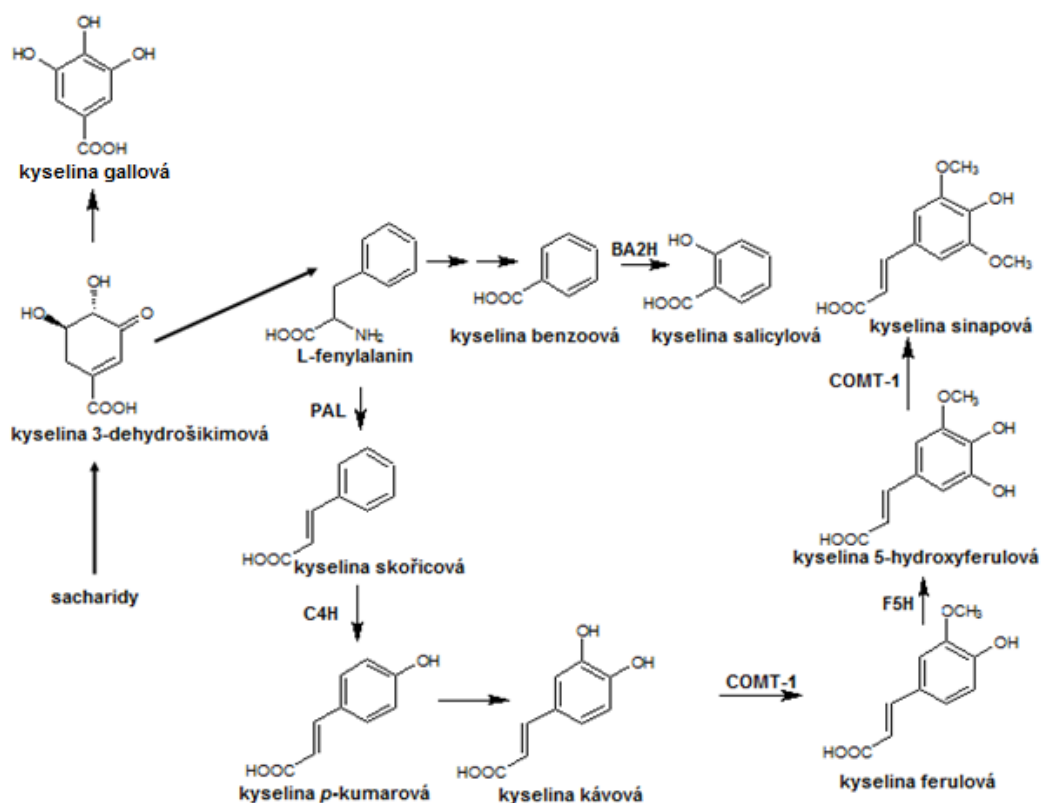
4.4.1 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny byly široce zkoumány jako potenciální modely pro vývoj nových primárních antioxidantů, které mohou zabránit nebo zpomalit *in vitro* a / nebo *in vivo* oxidační procesy (Rajalakshim a Narasimha 1996; Bors 1996; Rice-Evans 1999). Antioxidační aktivita fenolických sloučenin přitahuje velkou pozornost ve vztahu k jejich fyziologickým funkcím, zejména při prevenci koronárních onemocnění srdce, rakoviny nebo zánětu (Surh, 1999; Galati, 2004). Fenolické antioxidanty byly také přidávány do jídla už léta, aby se zabránilo oxidačním procesům, a jsou dnes široce používány k lepší konzervaci potravin (Rajalakshim a Narasimha 1996; Rice-Evans 1999).

4.4.1.1 Biosyntéza fenolových kyselin

Fenolové kyseliny jsou tvořeny převážně skrz šikimátovou dráhu z dehydrošikimové kyseliny. Příkladem může být kyselina gallová (Niemetz a Gross, 2005). Další fenolové kyseliny jsou tvořeny konverzí L-fenylalaninu a tak vstupují do fenylylpropanoidové dráhy (Obr. 3). Fenylylalaninamoniaklyasa (PAL, EC 4.3.1.24) katalyzuje první krok v této cestě, přeměnu L-fenylalaninu na kyselinu skořicovou, která je v reakci katalyzované cinnamát-4-hydroxylasou (C4H, EC 1.14.13.11) přeměněna na *p*-kumarovou kyselinu. Ta je poté díky enzymu *p*-kumarát:CoA ligasy (EC 6.2.1.12)

přeměněna na *p*-kumaroyl-CoA. Přeměnou *p*-kumarové kyseliny vznikají posléze díky řadě hydroxylací a methylací i další fenolové kyseliny (např. kyselina kávová, ferulová a sinapová). Sinapová a ferulová kyselina jsou prekurzory ligninů (Hoffman *et al.*, 2004; Halouzka, 2014). *p*-kumaroyl-CoA je klíčový meziprodukt vedoucí k syntéze flavonoidů a stilbenů. Z kyseliny skořicové může také zpětným tokem vznikat kyselina benzoová a kyselina salicylová za pomoci enzymu benzoát-2-hydroxylasy (BA2H, EC 1.14.12.10), děje se tak však pouze u rostlin vysoce rezistentních vůči chorobám, kde je indukována tvorba kyseliny salicylové. Tato akce působí jako spouštěcí reakce, při níž dochází k tvorbě nekrotických lézí kolem počátečního bodu infekce, které omezují šíření houbových, bakteriálních nebo virových patogenů (Crozier, 2006; Halouzka, 2014).



Obr. 3: Schéma dráhy klíčových enzymů a biosyntézy kyseliny gallové, ferulové a kávové (Upraveno dle Crozier, 2006).

Zkratky enzymů: PAL - fenylalaninamoniaklyasa; BA2H – benzoát-2-hydroxylasa; C4H – cinnamát-4-hydroxylasa; COMT-1 - O-methyltransferasa kyseliny kávové nebo 5-hydroxyferulové; F5H – ferulát-5-hydroxylasa.

4.4.1.2 Významní zástupci fenolových kyselin: deriváty kyseliny hydroxybenzoové

Gallová kyselina

Kyselina gallová je organická kyselina, systematickým názvem 3,4,5-trihydroxybenzoová kyselina, která se nachází v duběnkách, ořeších, dubové kůře, čajových lístcích a v dalších rostlinách, kde se nachází buď volná, nebo vázaná do taninů, ze kterých se získává kyselou hydrolyzou. Reakce kyseliny s železnatými solemi se používala pro tvorbu inkoustu (tzv. duběnkový inkoust). Nejvýznamnější sloučeniny odvozené od této kyseliny jsou taniny (Pengelly, 2004). Tato kyselina má antimikrobiální účinky, působí jako antioxidant a může být použita také jako výchozí sloučenina pro syntetickou výrobu alkaloidu maskalinu (Makepeace, 1951).

2-protokatechová kyselina

2-protokatechová kyselina, je dihydroxybenzoová kyselina. Je to hlavní metabolit fenolických antioxidantů nalezených v zeleném čaji (Pietta *et al.*, 1998). Poprvé byla izolována z kůry stromů *Boswellia* (kadidlovník) a *Diospyros* (ebenovník). Tato kyselina má u některých druhů hmyzu vliv při tuhnutí kutikuly (např. u švába). Velmi vysoký obsah byl nalezen v rostlině euterpe brazilská (*Euterpe oleracea*), česky také kapustoň brazilská (Pacheco-Palencia *et al.*, 2008).

4-hydroxybenzoová kyselina

4-hydroxybenzoová kyselina také známá jako kyselina para-hydroxybenzoová je pevná bílá krystalická látka rozpustná v organických rozpouštědlech, méně pak ve vodě či v chloroformu. Je isomerem kyseliny salicylové. Její význam spočívá v přípravě jejích esterů známých jako parabeny, které jsou používány jako konzervanty převážně v kosmetice či v očních roztocích. Je jedním z hlavních metabolitů vyskytujících se v lidském těle po konzumaci zeleného čaje (Pietta *et al.*, 1998). Byla nalezena např. v třezalce tečkované (*Hypericum perforatum*) nebo v kokosu a vanilce. Velké množství (892 ± 52 mg/kg) se objevuje také v kapustoni brazilské (Pacheco-Palencia *et al.*, 2008).

Vanillová kyselina

Vanillová kyselina, systematickým názvem 4-hydroxy-3-methoxybenzoová kyselina, je oxidovaná forma vanilinu. Je to derivát dihydroxybenzoové kyseliny používaný jako

ochucovadlo. Je také meziproduktem při výrobě vanilinu z ferulové kyseliny. Největší množství této kyseliny bylo nalezeno v rostlině *Angelica sinensis* (tzv. ženský ženšen), tradiční bylině používané v čínské medicíně. V kapustoni brazilské se objevuje ve velmi vysokých množstvích ($1,616 \pm 94$ mg/kg) (Pacheco-Palencia *et al.*, 2008). Tato látka byla detekována také ve víně, octu a arganovém oleji.

Syringová kyselina

Syringová kyselina je přirozeně se vyskytující trihydroxybenzoová kyselina. Látka je obsažena v trnovníku či v palmě a v keřích a stromech rodu klímanů (*Ardisia*, např. *Ardisia elliptica*). V kapustoni brazilské se opět objevuje ve velmi vysokých množstvích ($1,073 \pm 62$ mg/kg) (Pacheco-Palencia *et al.*, 2008). Je to kyselina zpomalující samovolnou oxidaci iontů Fe^{2+} . Je obsažena také ve víně.

3-hydroxybenzoová kyselina

3-hydroxybenzoová kyselina je chemická komponenta látky zvané kastoreum; což je výměšek análních pachových žláz, kterým si bobr evropský a bobr kanadský značkují své teritorium. Kastoreum má výraznou vůni, připomínající vanilku nebo maliny. Používá se k výrobě parfémů, osvěžovačů vzduchu, cukrovinek nebo k ochucení cigaret. Byla také součástí legendárního univerzálního protijedu zvaného mithridate, doporučovalo se jako analgetikum a antipyretikum. 3-hydroxybenzoovou kyselinu můžeme také získat pomocí bakterie *Pseudomonas* z 3-chlorobenzoové kyseliny (Johnston *et al.*, 1972). Je obsažena také v plodech ananasovníku.

Salicylová kyselina

Salicylová kyselina je monohydroxybenzoová kyselina. Jedná se o bezbarvou krystalickou organickou kyselinu, která byla roku 1838 izolována z kůry vrby bílé, později také z tužebníku jilmového. Je široce využívána v organické syntéze a účinkuje jako rostlinný hormon (=fytohormon). Aktivní složka aspirinu - kyselina acetylsalicylová, vzniká právě ze salicylové kyseliny. Zřejmě nejznámější je její použití pro léčbu akné (Schrör, 2016). Používá se také ke konzervování potravin a do zubních past.

4.4.1.3 Významní zástupci fenolových kyselin: deriváty kyseliny skořicové

t-skořicová kyselina

t-skořicová kyselina je organická sloučenina s chemickým vzorcem $C_6H_5CH=CHCOOH$. Tvoří dva izomery cis a trans, převážně se však vyskytuje jako trans isomer.

Jedná se o bílé krystalky mírně rozpustné ve vodě, ale lépe v organických rozpouštědlech. Získává se z oleje skořice nebo z balzámů, například storaxu. Nachází se také v bambuckém másle. Lze ji vyrobit také synteticky. Kyselina skořicová se používá v ochucovadlech, syntetickém indigu a v některých léčivech, jejím primárním použitím je ovšem výroba methyl-, ethyl- a benzylesterů pro parfumářský průmysl - kyselina a její těkavější ethylestery (ethylcinnamát) jsou vonné a chuťové složky esenciálního oleje skořice (Hoffman *et al.*, 2004). Biosyntéza kyseliny z fenylalaninu probíhá za přítomnosti enzymu fenylalaninamoniaklyasy (PAL; Obr. 2).

p-kumarová kyselina

Existují tři isomery této kyseliny (*m*, *o*, a *p*), nejhojněji je zastoupená právě *p*-kumarová kyselina (Boerjan *et al.*, 2003). Vzniká z kyseliny skořicové reakcí katalyzovanou enzymem cinnamát-4-hydroxylasou, pro jehož funkci je nezbytný cytochrom P450 (Obr. 2). Je to bílá krystalická látka slabě rozpustná ve vodě, naopak velmi rozpustná v ethanolu a diethyletheru. *p*-kumarová kyselina je hlavní komponentou ligninu. Kromě pylu je také zastoupena v medu (Kassim *et al.*, 2010). Kyselina byla také nalezena v liáně *Gnetum cleistostachyum*. Je obsažena v oříšcích, rajčatech, česneku, mrkvi a také víně. Má antioxidační vlastnosti. Diestery této kyseliny byly nalezeny v karnaubském vosku.

Kyselina kávová

Kyselina kávová je hydroxyskořicová kyselina nalezena ve všech rostlinách, neboť je důležitou složkou při biosyntéze ligninu (Boerjan *et al.*, 2003). Tato kyselina je antioxidant jak *in vitro*, tak *in vivo*, je dokázaná také její imunomodulační a protizánětlivá aktivita. V redukci aflatoxinové produkce předčila všechny ostatní antioxidanty (Olthof *et al.*, 2001). Byla nalezena v šalvěji, tymiánu, mátě nebo blahovičnicku kulatoplodém (*Eucalyptus globulus*) a v nepukalce obtížné (*Salvinia molesta*). Nejhojněji je zastoupena v brusinkách a arganovém oleji.

Ferulová kyselina

Ferulová kyselina je hojně zastoupena v buněčné stěně rostlin, kde je kovalentně vázána například na arabinoxylany. Jakožto komponenta ligninu je důležitým prekurzorem při syntéze jiných aromatických sloučenin. Pro rostlinnou říši je také nezbytná při syntéze pektinu (Saulnier a Thibault, 1999). Etymologický původ pochází z rodu *Ferula*, odkazující na obrovský fenykl neboli ločidlo obecné (*Ferula communis*). Byla nalezena v kukuřici, žitě, pšenici a také v např. v bambusu. V čínské medicíně je jejích vlastností využíváno především z rostlin *Angelica sinensis* (tzv. ženský ženšen) a zeměžluče okolíkaté (*Centaurium erythraea*) (Kumar a Pruthi, 2014)

5-hydroxyferulová kyselina

5-hydroxyferulová kyselina vzniká v prvním kroku přeměnou fenylalaninu na kyselinu skořicovou za katalýzy enzymu fenylalaninamoniaklyasy. Z ferulové kyseliny poté vzniká za pomoci enzymu ferulát-5-hydroxylasy (F5H, viz. Obr. 2). Je stejně jako kyselina kávová prekurzorem při biosyntéze sinapové kyseliny.

Chlorogenová kyselina

Chlorogenová kyselina (CGA) je ester kávové a chininové kyseliny (Clifford *et al.*, 2003). Je velmi dobře rozpustná v ethanolu a acetonu. Byla nalezena v bambusu (*Phyllostachys edulis*) a vřesu obecném (*Calluna vulgaris*). Je důležitým meziproduktem při biosyntéze ligninu. Tento antioxidant zpomaluje uvolnění glukosy do krevního řečiště po jídle (Johnston *et al.*, 2003). Je to nejhojněji zastoupená fenolová kyselina v dužině lilku a patří také mezi hlavní komponenty kávy. Dále byla nalezena v broskvích a švestkách, některé izomery, jako například 3,4-dikaffeoylchininová kyselina, 3,5-dikaffeoylchininová kyselina a cynarin (1,5-dikaffeoylchininová kyselina) byly nalezeny v bramborech (Tajik *et al.*, 2017).

Kyselina sinapová

Kyselina sinapová je kyselina běžně se vyskytující ve víně a octu. Může tvořit dimery sama se sebou nebo s kyselinou ferulovou. Je hojně užívána jako matrix v metodě MALDI (hmotnostní spektrometrie). Alkaloid sinapin byl nalezen v semíncích brukve černé (Tzagoloff, 1963).

Rosmarínová kyselina

Rosmarínová kyselina je ester kyseliny kávové. Je to sloučenina mající antioxidační vlastnosti nalezena v mnoha rostlinách, jako např. meduňka lékařská (*Melissa officinalis*) nebo majoránka zahradní (*Origanum majorana*). Poprvé byla izolována roku 1958 z rozmarýnu (*Rosmarinus officinalis*).

4.4.2 Antioxidační efekt fenolických sloučenin na včely

Včelaři jsou neustále nuceni se zabývat hrozbami způsobenými patogeny, škůdci, pesticidy a špatnou výživou na zdraví včelstev. Přiměřená výživa podporuje rozvoj zdravých včelích kolonií (Brodshneider a Crailshaim, 2010; Di Pasquale *et al.*, 2013). Antioxidanty obsažené v medu, propolisu či mateří kašičce, jako jsou flavonoidy a fenolové kyseliny, ale také kyselina askorbová, tokoferol, ubichinol-10, glutathion, glutathionperoxidasy a reduktasy chrání lipidy, proteiny a DNA před poškozením způsobeným reaktivními formami kyslíku (Sies, 1997). Jednou z forem sociální imunity ve včelích koloniích je sběr antimikrobiálních rostlinných pryskyřic a jejich použití v úlu, např. propolisu. I když propolis může být také kontaminován pesticidy, má spíše potenciál jako detoxikační činidlo, stejně tak jako přispívá ke zvyšující se včelí životaschopnosti prostřednictvím antioxidačních drah (Simone-Finstrom *et al.*, 2017).

Pyl, který je v podstatě hlavním zdrojem bílkovin, aminokyselin, lipidů, škrobu, sterolů, vitamínů a minerálních látek, je hlavním faktorem, který ovlivňuje život jedinců. Pyl je také označován jako lapač volných radikálů a inhibitor lipidové peroxidace, což jsou vlastnosti související převážně s obsahem fenolických sloučenin (Čeksterytė *et al.*, 2006; Čeksterytė *et al.*, 2016). Dle Almaraz-Abarca *et al.*, 2004 pylы pocházející z různých rostlinných původů mají odlišnou antioxidační kapacitu, která úzce souvisí s obsahem fenolových kyselin, spíše než s celkovým množstvím fenolických látek. Pyl je také důležitý na úrovni včelstev, protože umožňuje produkci kašičky mladými dělnicemi, která je posléze použita k výživě larev, královny a starších včelích dělnic (Di Pasquale *et al.*, 2013). Nové larvy jsou první tři až čtyři dny krmeny kašičkou, která téměř neobsahuje pyl, z důvodu vysokého množství fenolických látek, které mohou být pro larvy toxické. V následujících dnech se v kašičce procento obsahu pylu zvyšuje a mírně snižuje se množství proteinů (Lucchetti *et al.*, 2018).

5 *Paenibacillus larvae*

P. larvae je původcem závažného onemocnění moru včelího plodu (AFB). V posledních letech byla zjištěna řada rozdílů v průběhu onemocnění morem včelího plodu v závislosti na genotypu původce onemocnění. Analýzou metody polymerázové řetězové reakce (PCR), založené na rozdílech repetitivních elementech ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus), byly objeveny 4 základní genotypy *P. larvae* označené ERIC I-IV, kdy první dva genotypy jsou podle prozatím dostupných informací běžné, zatímco genotypy ERIC III a ERIC IV se vyskytují vzácně. Nejdelší dobu množení má genotyp ERIC I, který dokáže usmrtit všechny napadené larvy během 12 dnů, zatímco zbylé tři genotypy už do týdne (Peters *et al.*, 2006).

P. larvae je Gram-pozitivní, fakultativně anaerobní a katalasa-negativní bakterie. Je dlouhá přibližně 2,5 – 5 µm a má tendence tvořit řetězce. Patří mezi velmi nebezpečné patogeny, neboť vytváří vysoce odolné spory (proti teplu i chemikáliím), které se dokážou snadno šířit po okolí (Peters *et al.*, 2006). Spory jsou vysoce infekční pouze pro larvální stádia včel, a to zejména u larev starých 12-36 hodin, která jsou nejnáchylnější (Bamrick a Rothenbuhler, 1961). Do těla včelích larev se spory dostanou prostřednictvím potravy, osidlují střevo, kde se masivně množí, aniž by porušovaly integritu tkáně střevního epitelu. Během tohoto stádia žijí bakterie v symbióze s larvou jako komenzály, tj. živí se potravou přijatou larvou (Genersch, 2010). Ve střevech larev se bakterie množí až do stadia, kdy proniknou skrze střevní epitel do tělní dutiny larvy (Yue *et al.*, 2008). Takové masivní namnožení způsobuje postupný proteolytický rozklad celé larvy, který vede k tvorbě mazlavé tekutiny na dně buněk. Po jejím zaschnutí vzniká tzv. příškvár obsahující spory *P. larvae* (Obr. 4). Včely ve snaze odklidit uhynulý plod odvíčkovávají napadené buňky, čímž dochází k úniku bakterií i spor, jejich zachycení na dospělých včelách a může tak docházet k opětovnému šíření bakterie na další larvy (Genersch, 2010; Spivak a Reuter, 2001). Zbytky rozkládajících se larev jsou po pozření dospělými včelami stráveny, takže včely s dobrým čistícím pudem mohou významně zředit koncentraci bakterií a spor ve včelstvu, načež se včelstvo může samo ozdravit. Mechanismus patří mezi sociální imunitu (Panasiuk *et al.*, 2010; Dostálková, 2016). K nakažení bakteriemi *P. larvae* dochází také tzv. přirozenými cestami, kdy např. „včely zlodějky“ pronikají do infikovaných včelstev, „vylupují“ je a do svých vlastních úlů přináší nakažené medné zásoby. Dalším případem jsou „včely toulavé“, které „uplácejí“ včely zodpovědné za hlídání úlu svými medovými

zásoby, které tak mohou následně nakazit jejich kolonii. Kromě těchto tzv. přirozených cest přenosu bakterie mezi včelstvy jsou možné přenosy způsobené samotným včelařem. Ten může vyměňovat med nebo plásty mezi různými včelstvy, které mohou být spory *P. larvae* už kontaminované (Genersch, 2010). Odolné spory *P. larvae* přežívají v půdě i mnoho desítek let a způsobují dlouhodobé zamoření oblasti nákazy.

V současné době je *P. larvae* velmi studovaným organismem za účelem zlepšení strategií pro lepší kontrolu onemocnění způsobených touto bakterií (de Graaf *et al.*, 2013; Khilnani a Wing, 2015)



Obr. 4: Pohled do napadené buňky včelí larvy a vznik přiškvaru obsahující spory *P. larvae* (autor J. Danihlík).

6 Analýza růstu bakterií a statistické vyhodnocení

Pro správné vyhodnocení růstu mikroorganismů za určitých podmínek je vhodné využívat metod prediktivního modelování. Modely se využívají k popisu chování mikroorganismů v tekutém médiu pod vlivem různých fyzikálních a chemických podmínek (teplota, pH, antimikrobiální látky) (Zweitering *et al.*, 1990). Jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) se označuje nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, při které ještě nepozorujeme bakteriální růst. Vyjadřuje množství antimikrobiální látky (např. v g/ml, mg/l), které úplně potlačí růst kmene pěstovaného *in vitro* (Votava *et al.*, 2010). MIC je možné určit pomocí kvantitativní zředovací metody, která se provádí ve zkumavce nebo na mikrotitrační destičce spektrofotometricky. Difúzní stanovení citlivosti k antimikrobiální látce (kvalitativní test) se dělí dle způsobu nanášení testované látky. Kapkové metody, kdy se látka kape na povrch tuhého média. Diskové metody využívají disky filtračního papíru, které jsou nasyceny testovanou látkou a kladou se na agarové plotny (Greenwood *et al.*, 1999; Votava, 2000; Votava *et al.*, 2010). V této práci bylo použito metody kapkové.

6.1 Spektrofotometrické stanovení MIC

Bakteriální růst často vykazuje fáze, které začínají od hodnoty nula, stoupají až k hodnotě maximálního růstu (μ_m) a v určitém čase se dostávají do lag fáze (λ). Asymptoty (A) neboli maximální hodnoty je dosaženo při finální fázi, když rychlost klesá a dosáhne nuly. Tyto tři parametry (μ_m , λ , A) popisují růstovou křivku bakterií. Ta má sigmoidální tvar a je definována jako logaritmus počtu organismů vnesených proti času (Zweitering *et al.*, 1990). V této práci probíhalo stanovení antimikrobiální aktivity fenolických látek pomocí růstových křivek bakterií dle Biliková *et al.*, 2009.

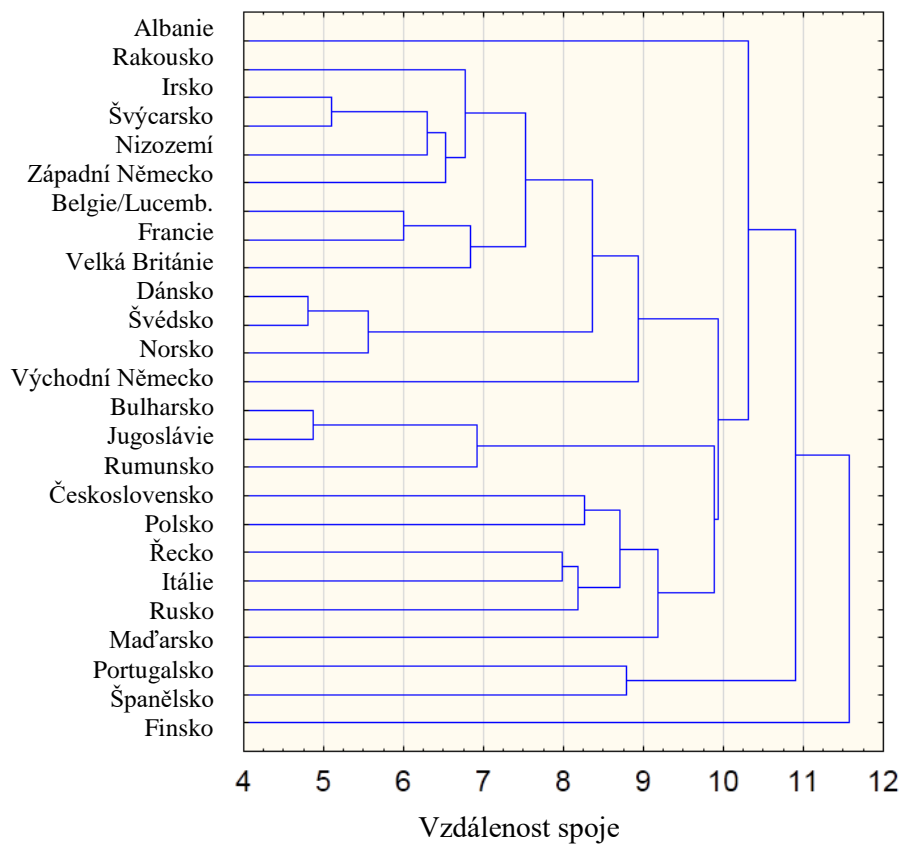
Experimentální stanovení probíhá spektrofotometricky měřením optické hustoty (OD, optical density). Pro měření růstových křivek bakterií se využívá 96ti jamková destička, do které je napipetován daný objem růstového média společně s antimikrobiální látkou (koncentrace látky je udávána v $\mu\text{g/ml}$). Ta bývá obvykle naředěna v geometrické koncentrační řadě s faktorem ředění 2 (Berthold *et al.*, 2013). Do jamky se poté doplní stejný objem bakteriální suspenze, která je naředěna v tekutém médiu na určitou hodnotu optické hustoty.

Ke stanovení vlivu látek se využívají bakterie nacházející se v exponenciální fázi růstu, kdy se bakteriální buňky intenzivně množí a rychlost dělení je tedy konstantní (Hoďák, 1979). Úbytek buněk způsobený odumíráním je v poměru

k přírůstku nových jedinců minimální. K faktorům ovlivňujícím délku log fáze řadíme vedle druhových vlastností bakteriální kultury především složení kultury a délku kultivace. Bakteriální růst je následně zaznamenáván na spektrofotometru po dobu několika hodin měřením absorbance při 600 nm (Madigan *et al.*, 2010). Toto modelování je známo již několik desetiletí (Zweiting *et al.*, 1990).

6.2 Shluková (klastrová) analýza

Metodou využitou pro vyhodnocení naměřených dat (výsledky chromatografické analýzy a analýzy meďů) byla shluková analýza. Jedná se o metodu, která shlukuje objekty do skupin tak, aby objekty náležící do jedné skupiny, byly sobě podobné (Tryon, 1939; Statsoft.cz). V této práci bylo použito hierarchického shlukování, kdy byly shluky vytvořeny v několika krocích – postupně se spojovaly objekty s nejmenší vzdáleností. Existuje několik metod, jak určit vzdálenost mezi shluky. Zde bylo použito Wardovy metody, která je založena na principu analýzy rozptylu. Počítá součet druhých mocnin odchylek případů v potenciálním sloučeném shluku. Sloučí ty dva shluky, pro které je součet nejmenší (program Statistica). Výsledkem je graf zvaný dendrogram (Obr. 5) – ten ukazuje kompletní historii spojování do shluků od jednotlivých objektů (vlevo) až do jednoho shluku se všemi objekty (vpravo). Na ose x je vzdálenost, při které se shluky spojily.



Obr. 5: Příklad dendrogramu za použití hierarchického shlukování. Je zde znázorněno, že v daném parametru se jako první spojilo Dánsko a Švédsko, ve vzdálenosti 4,8. Jako poslední se s ostatními spojilo Finsko, z čehož lze usuzovat, že je nejdále od ostatních.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7 Použitý materiál

Na analýzu bylo použito 67 vzorků medů z celé ČR (Tab. 2).

Tab. 2: Vzorky medů, jejich druh a oblast, ze které pochází.

ID	Druh	Oblast	ID	Druh	Oblast
1	květový	Brno	35	květový	Bouzov
2	květový	Brno	36	květový	Bouzov
3	květový	Zábřeh	37	medovicový	Konstantinovy Lázně
4	medovicový	Zábřeh	38	květový	Dubicko
5	květový	Horní Čermná	39	květový	Ješov
6	medovicový	Horní Čermná	40	medovicový	Mohelnice
7	květový	Horní Čermná	41	medovicový	Vlčice u Trutnova
8	květový	Horní Čermná	42	medovicový	U Dobrušky
9	květový	Horní Čermná	43	květový	Milovice u Mikulova
10	květový	Hukvaldy	44	květový	Milovice u Mikulova
11	medovicový	Praha 6	45	květový	Strakonice
12	květový	Chrást	46	smíšený	Hvožd'any
13	medovicový	Jablonec nad Nisou	47	květový	Hvožd'any
14	květový	Praha 6	48	smíšený	Hvožd'any
15	květový	Praha	49	medovicový	Hvožd'any
16	květový	Valašské Meziříčí	50	smíšený	Hvožd'any
17	květový	Sviadnov	51	květový	Hvožd'any
18	květový	Valašské Meziříčí	52	květový	Samotíšky
19	květový	Dobré	53	květový	Borotice
20	květový	Fryšták	54	květový	Borotice
21	medovicový	Fryšták	55	květový	Božice
22	medovicový	Kozlovice	56	květový	Lednice
23	květový	Kozlovice	57	medovicový	Čermná u m. Libavá
24	medovicový	Havlíčkův Brod	58	medovicový	Čermná u m. Libavá
25	květový	Havlíčkův Brod	59	květový	Ctidružice
26	květový	Havlíčkův Brod	60	medovicový	Čermná u m. Libavá
27	květový	Hustopeče	61	květový	Božice
28	medovicový	Hustopeče	62	květový	Ctidružice
29	květový	Vrchlabí	63	květový	Ctidružice
30	medovicový	Vrchlabí	64	květový	Ctidružice
31	medovicový	Trhanov	65	květový	Božice
32	květový	Trhanov	66	květový	Božice
33	medovicový	Trhanov	67	květový	Borotice
34	medovicový	Trhanov			

7.1 Chemikálie

agar (Carl Roth), glukosa (Sigma Aldrich), hydrogenfosforečnan didraselný (K_2HPO_4 ; Penta), isopropylalkohol (Sigma Aldrich), kyselina nalidixová (Sigma), methanol (Sigma Aldrich), dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma), kyselina *p*-kumarová, kyselina ferulová, kyselina *t*-skořicová, kyselina vanillová, kyselina 3-hydroxybenzoová, kyselina 4-hydroxybenzoová, kyselina gallová, kyselina chlorogenová, kyselina kávová (vše Sigma Aldrich, poskytnuto Ing. Sanjou Ćavar, Ph.D., Centrum region Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Olomouc), kvasničný extrakt (Carl Roth), Mueller-Hinton broth (Honeywell Fluka), pyruvát sodný (Sigma Aldrich), tetracyklin hydrochlorid (TTC, Serva)

7.2 Biologický materiál

Bakteriální kmeny použité pro testování byly poskytnuty ze Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Ecology, Uppsala, Dr. Evou Forsgren.

Testované bakteriální kmeny:

Paenibacillus larvae genotyp ERIC I (CCUG 48979)

Paenibacillus larvae genotyp ERIC II (CCUG 48972)

7.3 Přístroje a experimentální vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo), autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo, automatické pipety (Eppendorf, Německo), densitometr McFarland (BioSan, Lotyšsko), digitální pH metr WTW 526 (InoLab, Německo), digitální předvážky (KERN, Německo), elektromagnetická míchačka IKA (Labortechnik, Německo), flowbox Holten Lamin Air HH 1.2 Plus (Heto-Holten, Dánsko), Flowbox Bioban (Steril, Itálie), chlazená centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo), inkubátor INCUBAT (Melag, Německo), magnetická míchačka (IKA, Německo), mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko), mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA), minicentrifuga MCF 2360 (Vitrum, Česká republika), Petriho misky (SPL life Sciences, Korea), spektrofotometr BioSpec-nano (Shimadzu, USA), spektrofotometr Lightwave II (Biochrom, VB), třepačka Mixing Block MB-102 (BIOER technology, Čína), vortex mixer SA8 (Stuart, UK)

8 Metody

8.1 Příprava média

MYPGP médium bylo připraveno dle Dingman a Stahly, 1983 následovně:

- 10 g/l Mueller-Hinton broth
- 15 g/l kvasničný extrakt
- 3 g/l K_2HPO_4
- 1 g/l pyruvát sodný
- Autoklávováno při 121°C/15 min.
- Přidáno 20 ml 10% glukosy (autoklávována odděleně).

MYPGP agar: viz MYPGP médium, před autoklávováním obohacen o agar (20 g/l)

MYPGPn agar: viz MYPGP médium, po autoklávování obohacen o nalidixovou kyselinu 20 µg/ml (de Graaf *et al.*, 2013). Pevná média byla nalévána do Petriho misek s průměrem 9 a 13 cm do výšky 4 mm.

8.2 Příprava bakteriálního materiálu k experimentu

Kultura *P. larvae* byla uchovávána v mrazicím boxu (-80 °C). Takto zmrazená kultura byla rozsuspendována v 5 ml sterilní destilované vody, rozočkována na pevné MYPGP médium obohacené o kyselinu nalidixovou a kultivována 7 dní při 37 °C. Týdenní kultura byla poté opět přeočkována na nové pevné MYPGP médium a kultivována při 37 °C. Následně bylo pracováno s kulturou starou 48 hodin (Votava *et al.*, 2010). Z takto připravených čerstvých bakteriálních kultur byla pomocí vatové tyčinky vytvořena suspenze v tekutém MYPGP médiu ($OD_{600} = 0,1$), která byla použita pro testování antimikrobiální aktivity.

8.3 Stanovení množství fenolických látek ve vzorcích medu

Toto stanovení bylo provedeno ve spolupráci s Ing. Sanjou Āavar, Ph. D. z Centra regionu Haná. 10 mg medu bylo rozpuštěno v okyselené vodě a přečištěno pomocí SPE (HLB Waters, reverzní fáze). Následně byly tyto vzorky medu analyzovány pomocí UHPLC (BEH Waters, kolona 10 cm). K detekci bylo použito hmotnostní spektrometrie.

V předložených 67 vzorcích medu (Tab. 2) bylo nalezeno 17 fenolických látek – 14 fenolových kyselin a 3 flavonoidy. Na základě četnosti výskytu bylo z tohoto

množství vybráno 9 zástupců fenolových kyselin – gallová, 4-hydroxybenzoová, vanillová, 3-hydroxybenzoová, chlorogenová, kávová, *p*-kumarová, ferulová a *t*-skořicová. S nimi byly dále provedeny uvedené konkrétní analýzy.

8.4 Stanovení a optimalizace vhodného rozpouštědla fenolických látek metodou měření růstových křivek

Pro analýzu byla použita organická rozpouštědla dimethylsulfoxid (DMSO) a methanol (MeOH) v koncentrační řadě 25 - 0,78 %. Měření probíhalo v triplicátu po dobu 15,5 hodiny, kdy byla na spektrofotometru SynergyTM HT (BioTek Instruments, USA) měřena optická hustota buněk (OD). Pro měření růstových křivek bakterií byla využita 96ti jamková mikrodestička, do které bylo napipetováno 75 μ l bakteriální suspenze *P. larvae* společně se 75 μ l rozpouštědla o dané koncentraci a naředěné v tekutém MYPGP médiu. Kontroly byly pipetovány dle Tab. 3. Jako blank bylo použito MYPGP médium buněk se sterilní vodou.

Příprava tetracyklinu (TTC):

Zásobní roztok (10 mM) byl naředěn pomocí MYPGP média na koncentraci 1,25 mM, použitá finální koncentrace byla poté 625 μ M.

Příprava bakteriální suspenze mrtvých buněk:

Z bakteriální suspenze byl odebrán 1 ml, následně byly buňky zcentrifugovány (11 000 \times g, 10 minut). Pelet byl poté rozsuspendován v 1 ml 70 % isopropanolu. Vzorky byly ponechány 1 hodinu na ledu, poté byl centrifugací odstraněn isopropanol (11 000 \times g, 10 minut). Pelet mrtvých bakteriálních buněk byl rozpuštěn v 1 ml tekutého MYPGP média.

K vyhodnocení takto naměřených dat bylo poté využito programů Excel (Microsoft, USA), OriginPro (OriginLab, MA, USA) a STATISTICA 12 software (StatSoft, OK, USA).

Tab. 3: Kontroly použité při stanovování vhodného rozpouštědla fenolických látek.

Kontrolní vzorek	Objem v jamce (75 µl)	Objem v jamce (75 µl)
Pozitivní kontrola	Čisté tekuté MYPGP médium	Suspenze bakteriální kultury
Negativní kontrola	Čisté tekuté MYPGP médium	Suspenze mrtvé bakteriální kultury
Antibiotikum kontrola	Tekuté MYPGP médium s přídavkem antibiotika tetracyklinu (100 µl)	Suspenze bakteriální kultury
Kontrola rozpouštědla	Čisté tekuté MYPGP médium	25% DMSO/MeOH
Slepý vzorek (blank)	Čisté tekuté MYPGP médium	Sterilní voda

8.5 Difuzní testy

Po inkubaci při 37 °C (viz kapitola 8.2) byla vatovou tyčinkou odebrána z pevného MYPGP média (Dingman a Stahly, 1983) čerstvá bakteriální kultura (48 hodin) a rozsuspendována ve sterilní skleněné zkumavce s cca 5 ml sterilní destilované vody až na hodnotu 0,5 McFarland, která přibližně odpovídá hodnotě $OD_{600}=0,1$. Následně byla bakteriální suspenze očkovaná pomocí vatové tyčinky ve třech různých směrech pod úhlem asi 60° na pevné MYPGP médium v Petriho misce obohacené o kyselinu nalidixovou. Po zaschnutí bakteriální suspenze byly na misku s médiem aplikovány testované fenolické látky a to tak, že 10 µl látky o koncentraci 20, 10 a 5 mg/ml bylo aplikováno přímo na povrch naočkovaného média. Takto aplikované látky bylo nutno ponechat zaschnout cca 20-30 minut. Veškeré práce byly prováděny ve sterilním laminárním boxu a takto připravené Petriho misky byly inkubovány dnem vzhůru po dobu minimálně 48 hodin při 37 °C. K vyhodnocení takto naměřených dat bylo poté využito programů Excel (Microsoft, USA), OriginPro (OriginLab, MA, USA) a STATISTICA 12 software (StatSoft, OK, USA).

8.6 Určení MIC fenolických látek a jejich směsí pomocí měření růstových křivek

Spektrofotometrické stanovení antimikrobiální aktivity probíhalo pomocí měření růstových křivek bakterií (Biliková *et al.*, 2009). Pro měření růstových křivek bakterií byla využita 96ti jamková mikrodestička, do které bylo napipetováno 75 µl růstového média společně se 75 µl fenolické látky (koncentrační řady od 4, 2 nebo 1 mg/ml) nebo směsi fenolických látek rozpuštěných ve 2 % methanolu a naředěné v tekutém MYPGP

médiu. Kontroly byly pipetovány dle Tab. 4. Poté byla na spektrofotometru Synergy™ HT (BioTek Instruments, USA) měřena optická hustota (OD) při vlnové délce 600 nm po dobu 16 hodin. Jako blank bylo použito tekuté MYPGP médium buněk se sterilní vodou. Měření bylo prováděno v triplicátu. Pokud se u některých fenolových kyselin stalo, že nebyla stanovena konkrétní MIC, byl problém buď s rozpuštěním látky na požadovanou koncentraci (např. kyselina chlorogenová), nebo je zapotřebí použít vyšší koncentraci dané látky. Tento protokol byl dále optimalizován dle Bilikova *et al.*, 2013, avšak po přidavku NaOH docházelo k tvorbě sraženin, mnohdy také barevných komplexů.

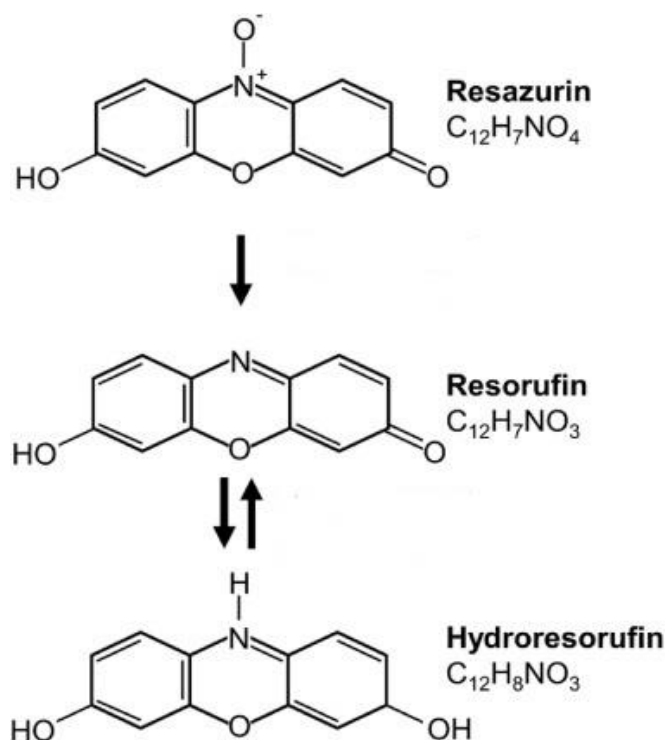
Příprava TTC a suspenze mrtvých bakteriálních buněk probíhala stejně jako v kapitole 8.4. K vyhodnocení takto naměřených dat bylo poté využito programu Excel (Microsoft, USA).

Tab. 4: Kontroly použité při stanovování MIC.

Kontrolní vzorek	Objem v jamce (75 µl)	Objem v jamce (75 µl)
Pozitivní kontrola	Čisté tekuté médium	Suspenze bakteriální kultury
Negativní kontrola	Čisté tekuté médium	Suspenze mrtvé bakteriální kultury
Antibiotikum kontrola	Tekuté médium s přidavkem antibiotika tetracyklinu (100 µl)	Suspenze bakteriální kultury
Kontrola rozpouštědla	Tekuté médium s rozpouštědlem testované látky (naředěno totožně jako testovaná látka)	Suspenze bakteriální kultury
Slepý vzorek (blank)	Čisté tekuté médium	Sterilní voda

8.7 Kolorimetrické stanovení životnosti bakterií

Kolorimetrické stanovení životnosti bakterií probíhalo za pomoci barviva resazurinu (7-Hydroxy-3H-fenoxazin-3-on-10-oxide, AlamarBlue), který se využívá k určování životnosti buněk a jehož přirozená barva je tmavě modrá. Živými buňkami (např. bakteriemi) je redukován na resorufin, který má růžovou barvu a fluoreskuje (Obr. 6).



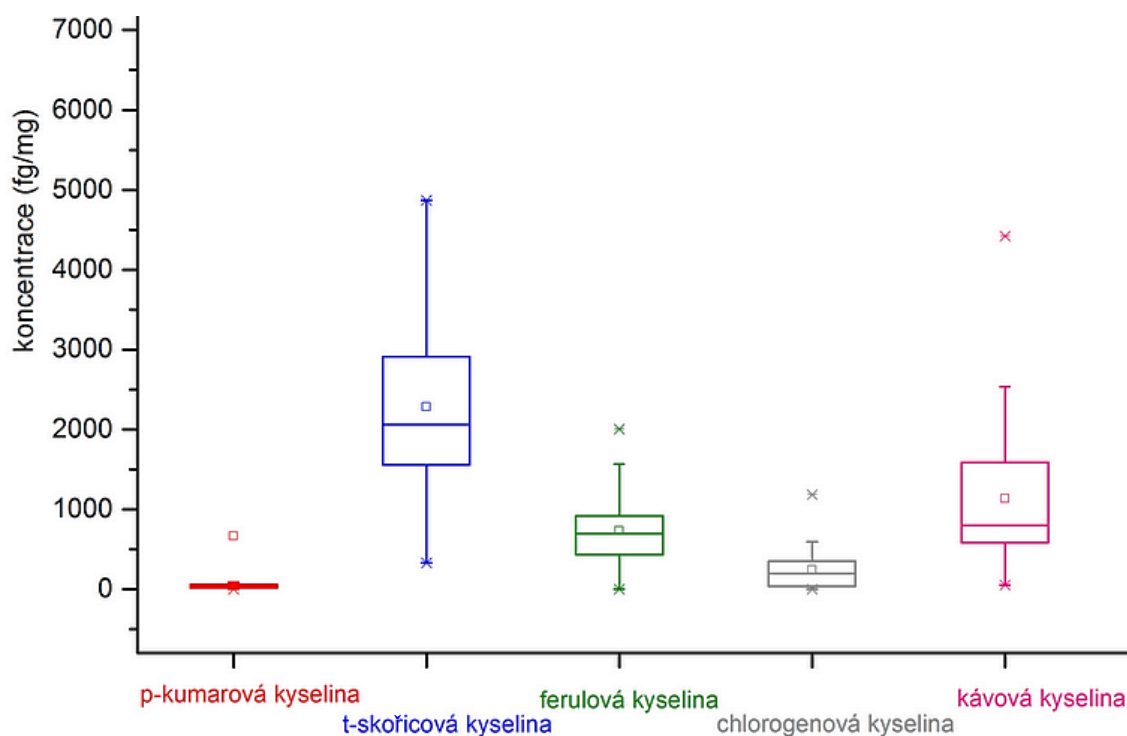
Obr. 6: Přeměna resazurinu na resorufin v živých buňkách. Při sekundární redukci dochází k přeměně až na bezbarvý hydroresorufin.

Bakterie byly rozsuspendovány v tekutém MYPGP médiu ($OD_{600}=0,1$). V 96ti jamkové mikrotitrační destičce bylo smícháno 75 μ l bakteriální kultury se 75 μ l testované fenolické látky (testovány byly kyseliny *p*-kumarová, *t*-skořicová a ferulová) v koncentrační řadě 5000-39 μ g/ml (koncentrační řada fenolické látky byla naředěna v tekutém MYPGP médiu). Při každém testování bylo nutné vytvořit kontrolní jamky (Tab. 3). Ke 150 μ l v jamce bylo přidáno 15 μ l barviva resazurinu (0,03% w/v). Inkubace probíhala 12 hodin, poté byla odečtena MIC.

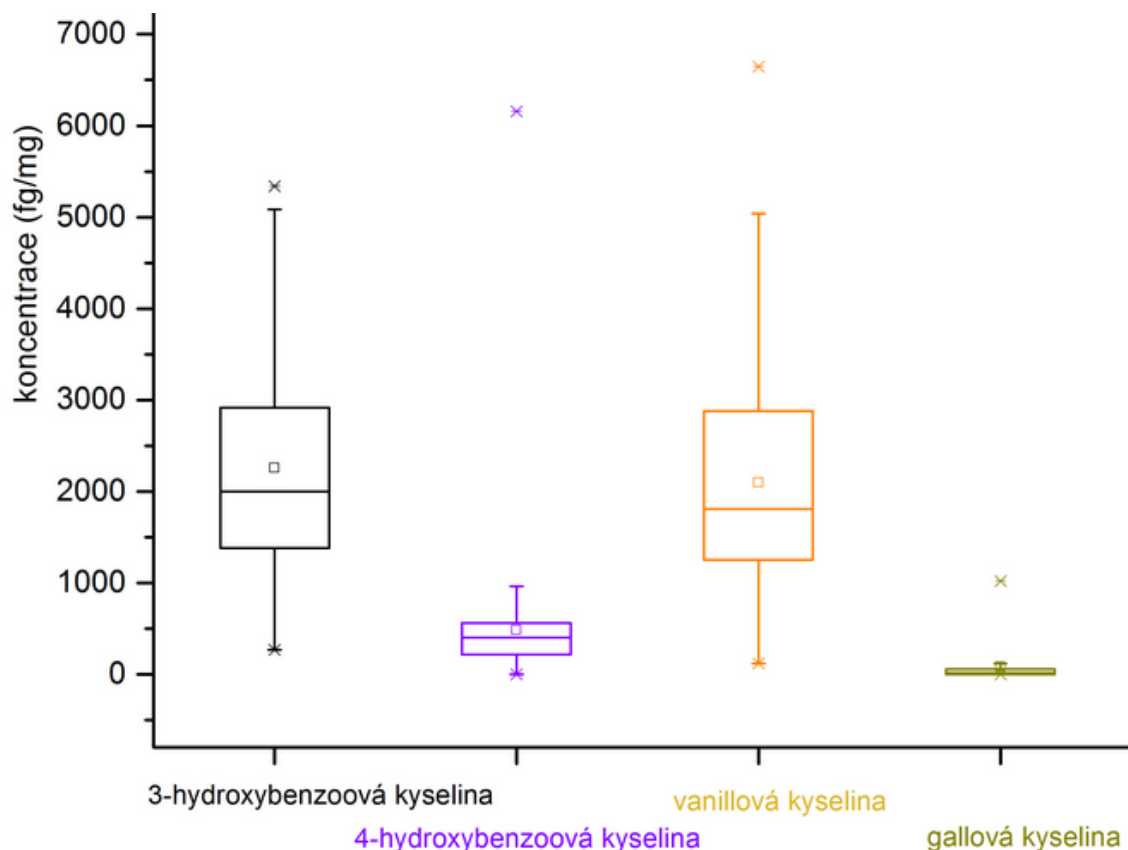
9 Výsledky

9.1 Stanovení množství fenolických látek ve vzorcích medu

Na základě výsledků z chromatografické analýzy 67 vzorků medů provedené ve spolupráci s Ing. Sanjou Čavar, Ph. D. bylo k následujícím experimentům vybráno devět nejhojněji zastoupených fenolových kyselin, které jsou vyjmenovány na obr. 7 (deriváty kyseliny skořicové) a 8 (deriváty kyseliny hydroxybenzoové).



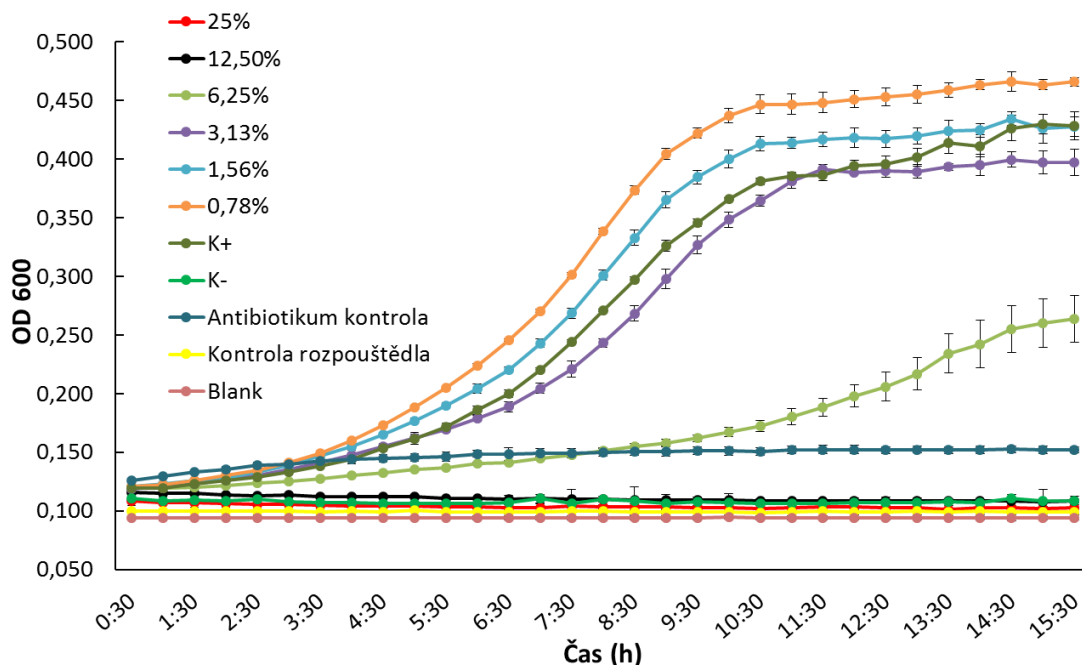
Obr. 7: Box plot fenolových kyselin - derivátů kyseliny skořicové obsažených v 67 vzorcích medu. Koncentrace je vyjádřena v fg/mg.



Obr. 8: Box plot fenolových kyselin - derivátů kyseliny hydroxybenzoové obsažených v 67 vzorcích medu. Koncentrace je vyjádřena v fg/mg.

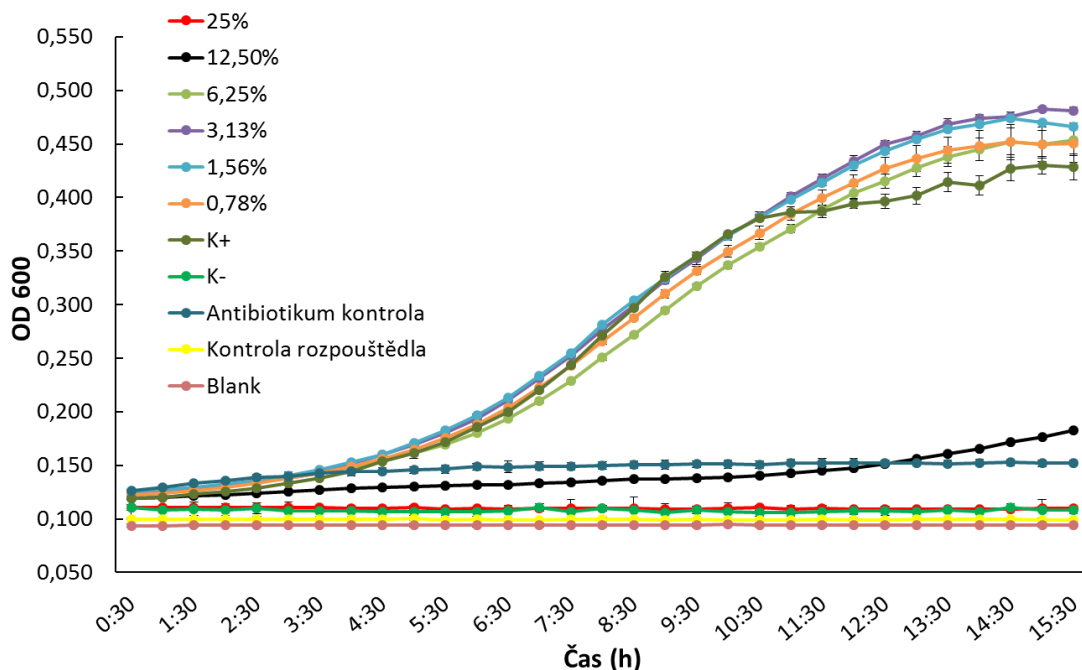
9.2 Optimalizace vhodného rozpouštědla pro analýzu jednotlivých fenolických látek a jejich vliv na růst bakterií

Vhodné rozpouštědlo pro vybrané fenolické látky bylo testováno v přítomnosti bakterie *P. larvae* ERIC I a II v 96ti jamkové mikrotitrační destičce. Pro analýzu byla použita organická rozpouštědla dimethylsulfoxid (DMSO) a methanol (MeOH) v koncentrační řadě 25 - 0,78 %. Měření probíhalo v triplicátu po dobu 15,5 hodiny, kdy byla měřena optická hustota buněk (OD). Bylo zjištěno, že pro rozpouštění vybraných fenolických látek jsou tato dvě rozpouštědla vhodná, avšak v případě DMSO (Obr. 9 a 10) jsou bakterie *P. larvae* genotyp ERIC I schopny života pouze v koncentraci DMSO 3% a méně, v případě genotypu ERIC II se jeví jako vhodné použít koncentrace do 6 % DMSO. V případě MeOH (Obr. 11 a 12) jsou poté oba genotypy bakterie *P. larvae* schopné života v koncentraci MeOH 2 % a méně.



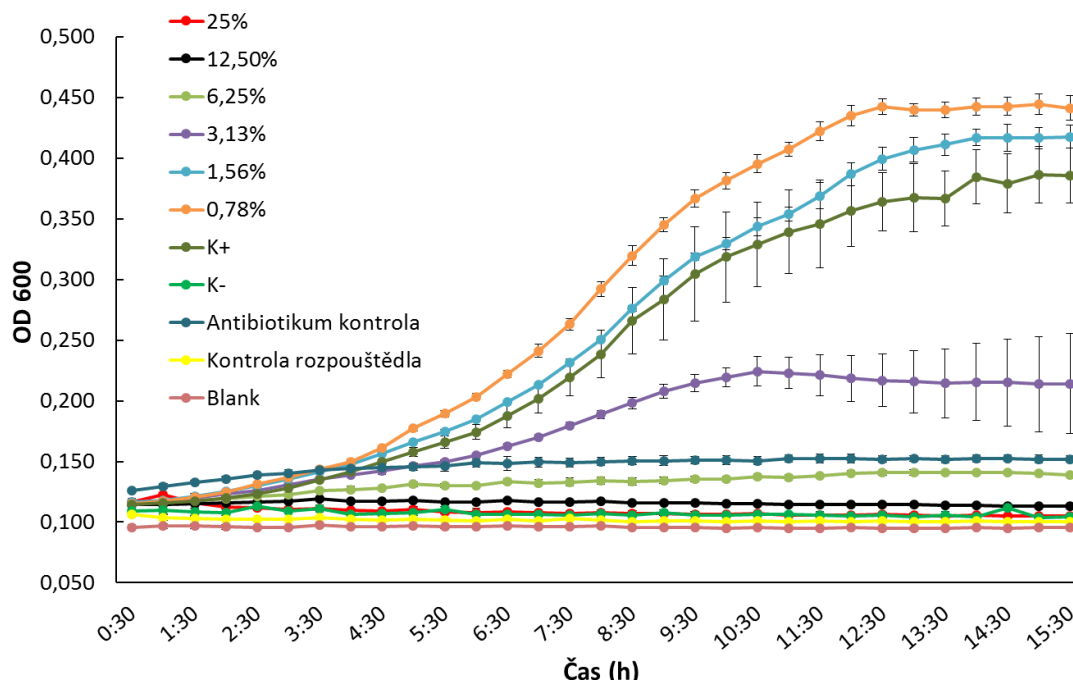
Obr. 9: Růstové křivky bakterie *P. larvae*, genotyp ERIC I, za použití rozpouštědla DMSO. Koncentrační řada DMSO 25 - 0,78 %. Nejvíce bakteriím vyhovuje koncentrace DMSO 3 % a méně.

Vysvětlivky: K+ = pozitivní kontrola (živé bakterie); K- = negativní kontrola (mrtvé bakterie); Antibiotikum kontrola = TTC v konečné koncentraci 625 μ M; MYPGP médium + 25% DMSO; Blank = MYPGP médium + voda



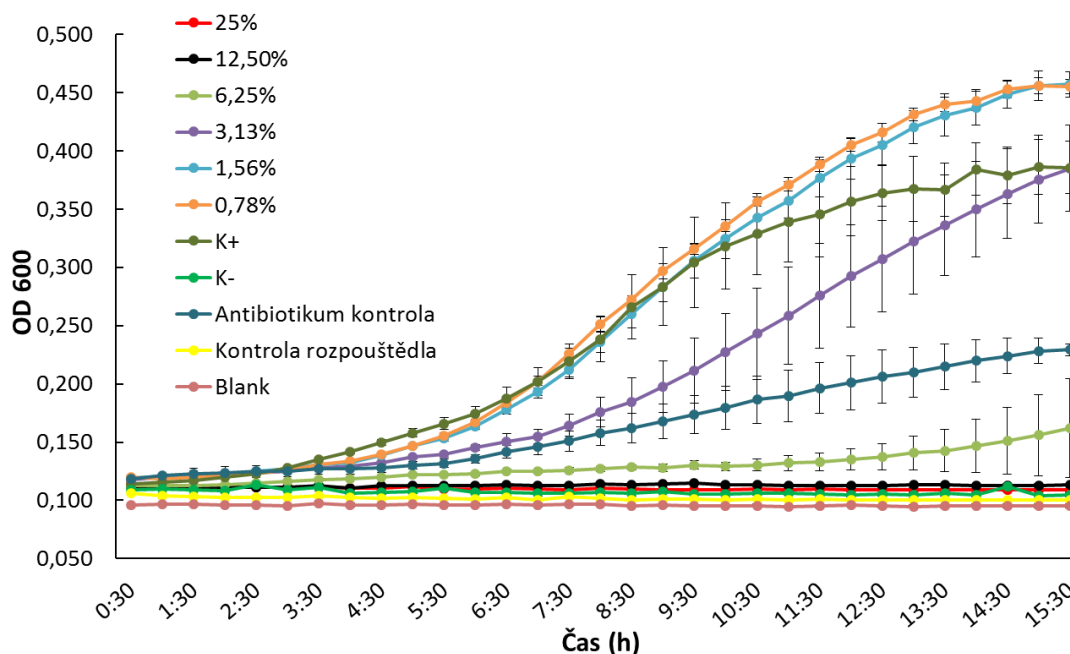
Obr. 10: Růstové křivky bakterie *P. larvae*, genotyp ERIC II, za použití rozpouštědla DMSO. Nejvíce bakteriím vyhovuje koncentrace DMSO 6 % a méně.

Vysvětlivky: K+ = pozitivní kontrola (živé bakterie); K- = negativní kontrola (mrtvé bakterie); Antibiotikum kontrola = TTC v konečné koncentraci 625 μ M; MYPGP médium + 25% DMSO; Blank = MYPGP médium + voda



Obr. 11: Růstové křivky bakterie *P. larvae*, genotyp ERIC I za použití rozpouštědla MeOH. Koncentrační řada 25 - 0,78 %. Nejvíce bakteriím vyhovuje koncentrace MeOH 2 % a méně.

Vysvětlivky: K+ = pozitivní kontrola (živé bakterie); K- = negativní kontrola (mrtvé bakterie); Antibiotikum kontrola = TTC v konečné koncentraci 625 μ M; MYPGP médium + 25% MeOH; Blank = MYPGP médium + voda



Obr. 12: Růstové křivky bakterie *P. larvae*, genotyp ERIC I za použití rozpouštědla MeOH. Koncentrační řada 25 - 0,78 %. Nejvíce bakteriím vyhovuje koncentrace MeOH 2 % a méně.

Vysvětlivky: K+ = pozitivní kontrola (živé bakterie); K- = negativní kontrola (mrtvé bakterie); Antibiotikum kontrola = TTC v konečné koncentraci 625 μ M; MYPGP médium + 25% MeOH; Blank = MYPGP médium + voda

9.3 Difuzní testy

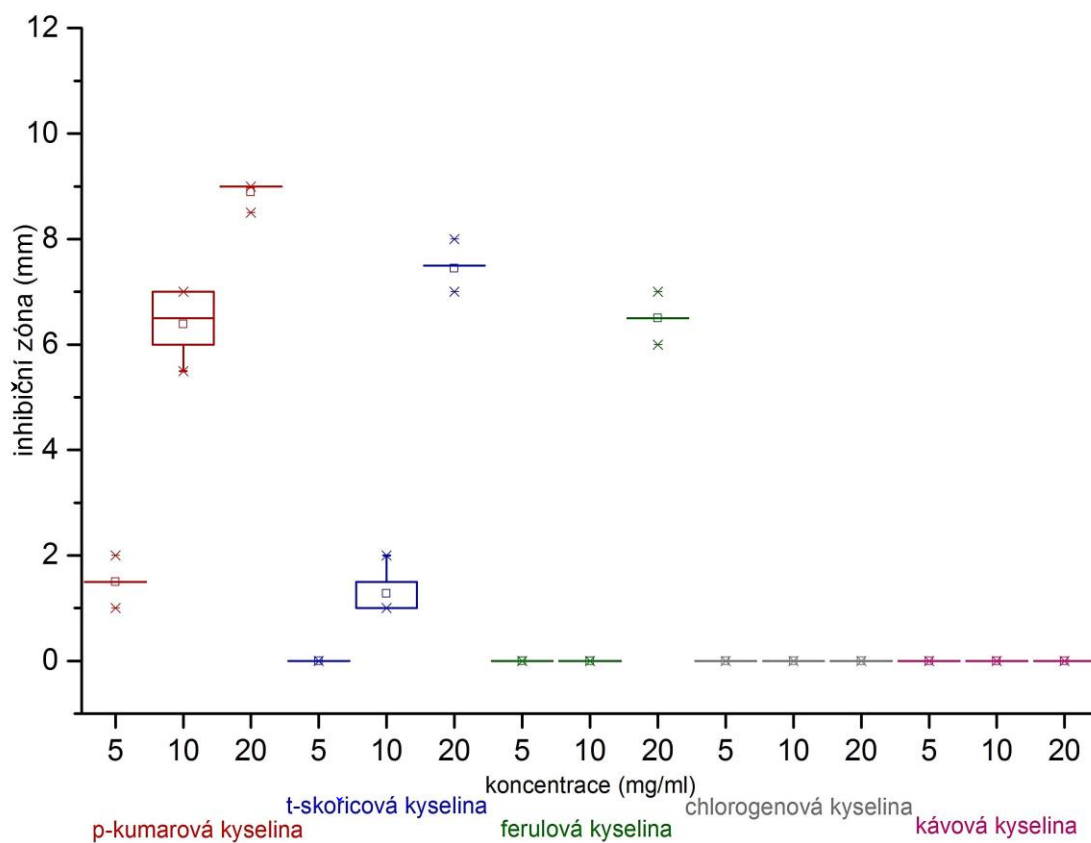
Difuzní testy byly provedeny převážně z důvodu zjištění potenciálního antimikrobiálního působení vybraných fenolických látek na patogena *P. larvae*, genotypy ERIC I a ERIC II. Při difuzních testech dochází po inkubaci za vhodných podmínek k uvolnění potenciální antimikrobiální látky, která v případě pozitivního výsledku vytvoří inhibiční zónu v důsledku inhibice bakteriálního růstu. Je-li testovaná bakterie vůči testované látce rezistentní, inhibiční zóna se nevytvoří (Votava *et al.*, 2010).

K experimentu byly použity čtvercové Petriho misky s bakteriálními kulturami starými 48 hodin. Roztoky látek ve výsledné koncentraci DMSO 2% byly aplikovány v triplikátech přímo na MYPGP médium inokulované bakteriálním kmenem na povrchu. Jako kontrola byl použit 2 % roztok DMSO.

Na obr. 13 a 14 jsou uvedeny box ploty inhibičních zón pro genotyp ERIC I, kde byl pozorován největší vliv kyselin *p*-kumarové, 3-hydroxybenzoové a 4-hydroxybenzoové. Inhibiční zóny tvořily tyto tři kyseliny ve všech třech testovaných koncentracích (5, 10 a 20 mg/ml). Na obr. 15 a 16 pak lze vidět genotyp ERIC II, kde byl pozorován největší vliv na tuto bakterii taktéž u již zmíněných tří kyselin ve všech třech testovaných koncentracích.

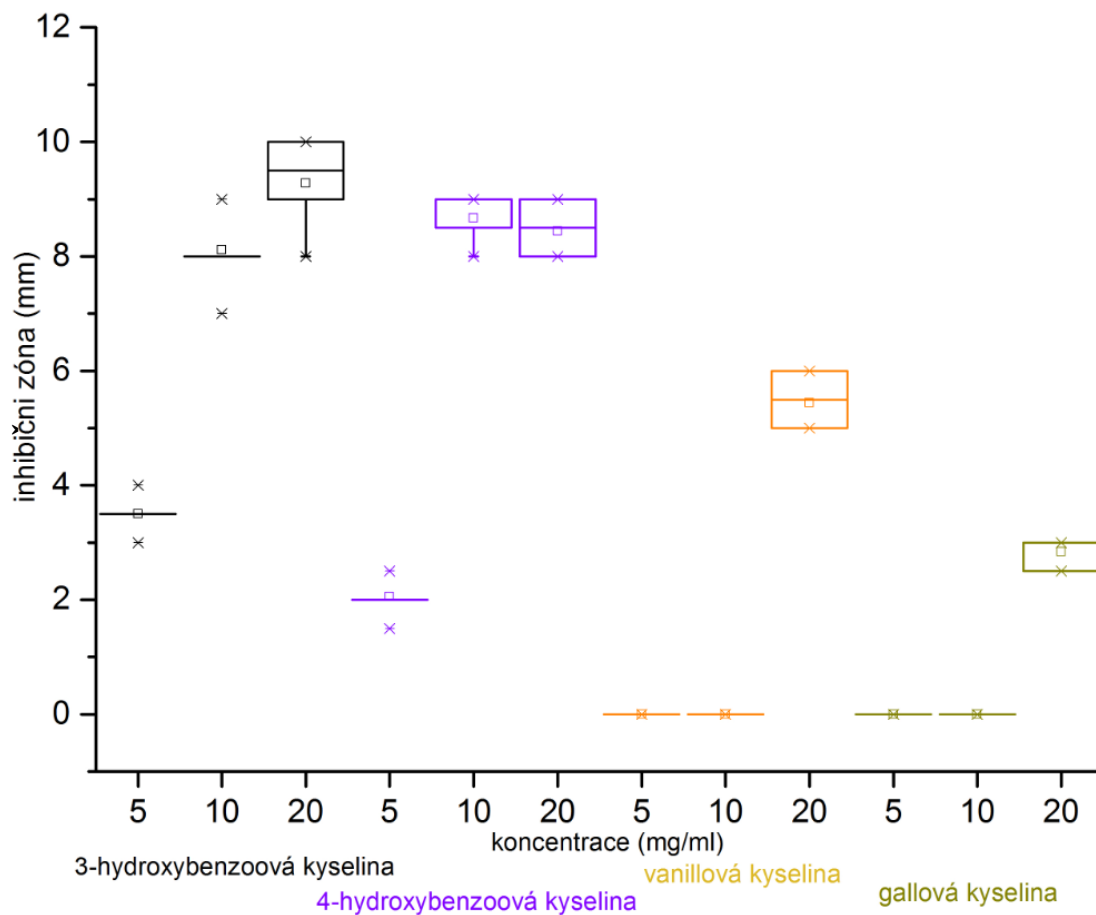
Inhibiční zóny byly viditelně pozorovány na příkladu kyseliny *p*-kumarové (Obr. 17a,b), kde lze vidět mírnou inhibici také u koncentrace c_3 (5 mg/ml). V případě kyseliny *t*-skořicové (Obr. 18 a,b) se u genotypu ERIC I tvoří zóna při koncentraci c_2 (10 mg/ml), u genotypu ERIC II se však již v této koncentraci netvoří žádná viditelná zóna, ERIC I se tudíž v tomto případě jeví jako mírně citlivější.

Ostatní testované fenolické látky vykazovaly citlivost pouze při koncentraci c_1 (20 mg/ml), dvě z testovaných látek - kyselina chlorogenová a skořicová – netvořily inhibiční zónu v žádné testované koncentraci.



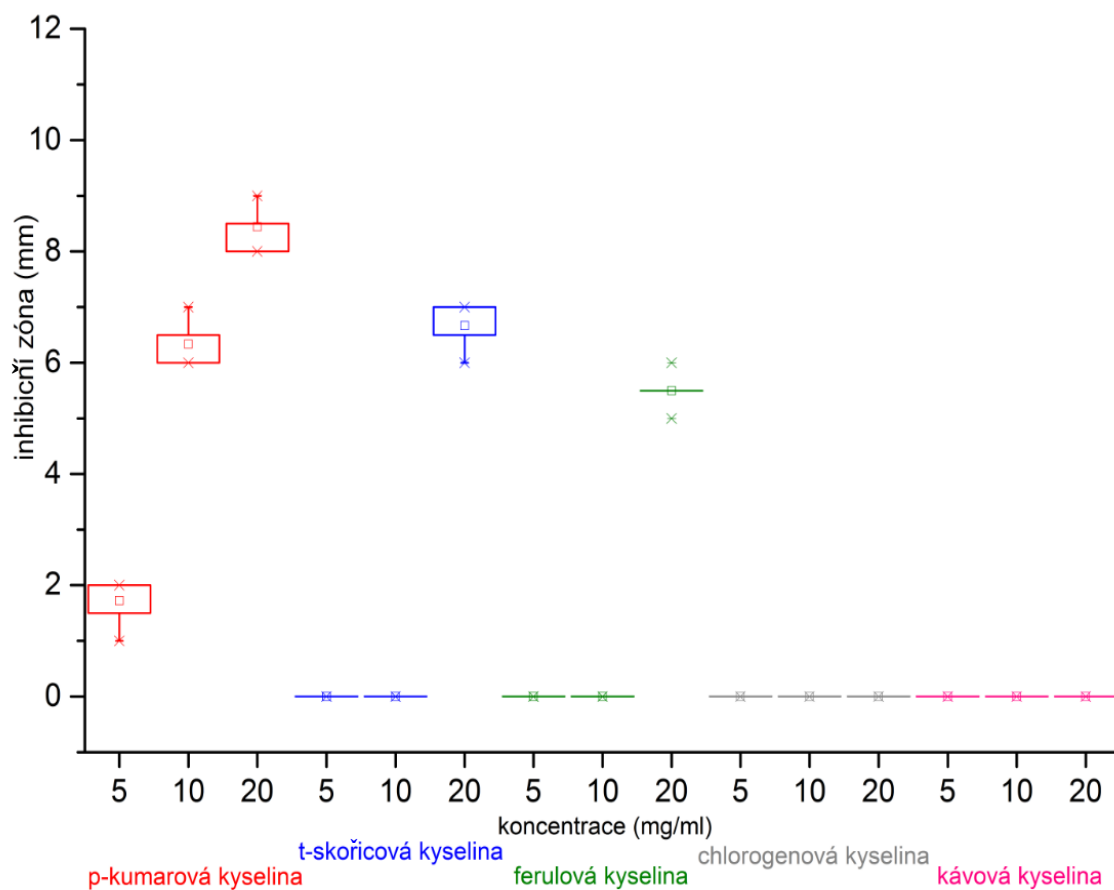
Obr. 13: Box plot genotypu ERIC I a vlivu derivátů kyseliny skořicové. Největší vliv lze pozorovat u kyseliny *p*-kumarové a *t*-skořicové.

Vysvětlivky: c_1 =koncentrace 20 mg/ml, c_2 =koncentrace 10 mg/ml, c_3 =koncentrace 5 mg/ml. K=kontrola (2 % roztok DMSO).



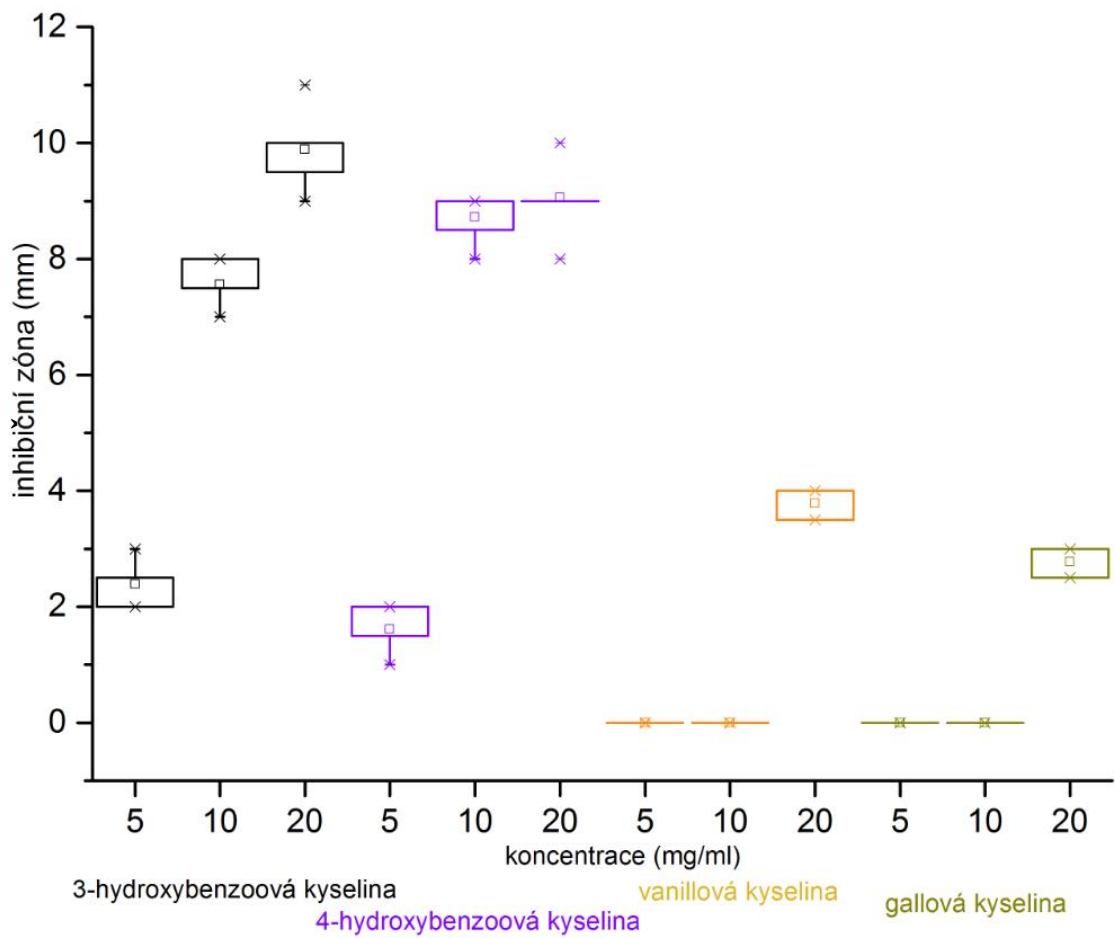
Obr. 14: Box plot genotypu ERIC I a vlivu derivátů kyseliny hydroxybenzoové. Největší vliv lze pozorovat u kyseliny 3-hydroxybenzoové a 4-hydroxybenzoové.

Vysvětlivky: c_1 =koncentrace 20 mg/ml, c_2 =koncentrace 10 mg/ml, c_3 =koncentrace 5 mg/ml. K=kontrola (2 % roztok DMSO).



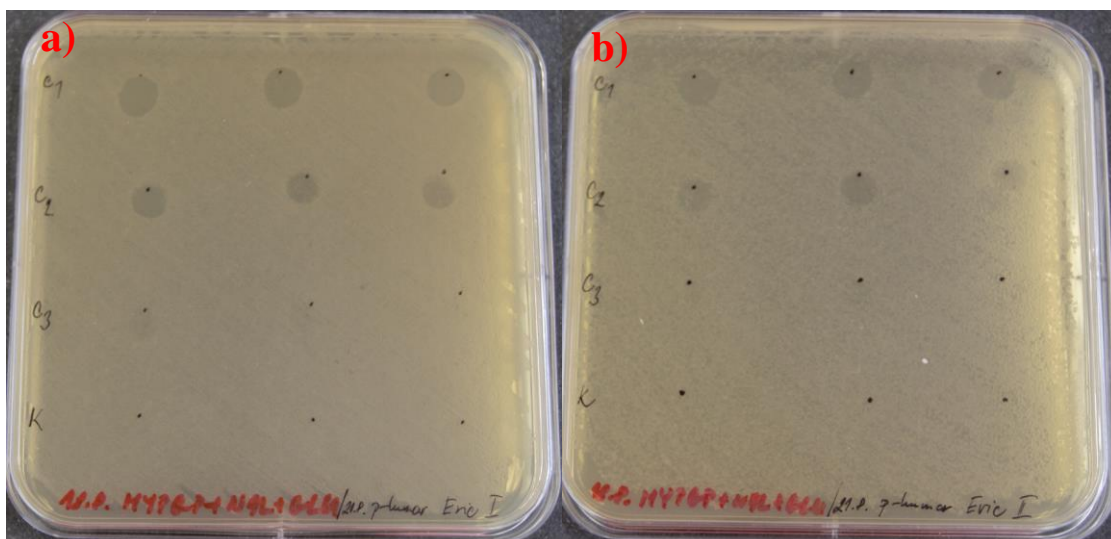
Obr. 15: Box plot genotypu ERIC II a vlivu derivátů kyseliny skořicové. Největší vliv lze pozorovat u kyseliny *p*-kumarové a *t*-skořicové.

Vysvětlivky: c_1 =koncentrace 20 mg/ml, c_2 =koncentrace 10 mg/ml, c_3 =koncentrace 5 mg/ml. K=kontrola (2 % roztok DMSO).



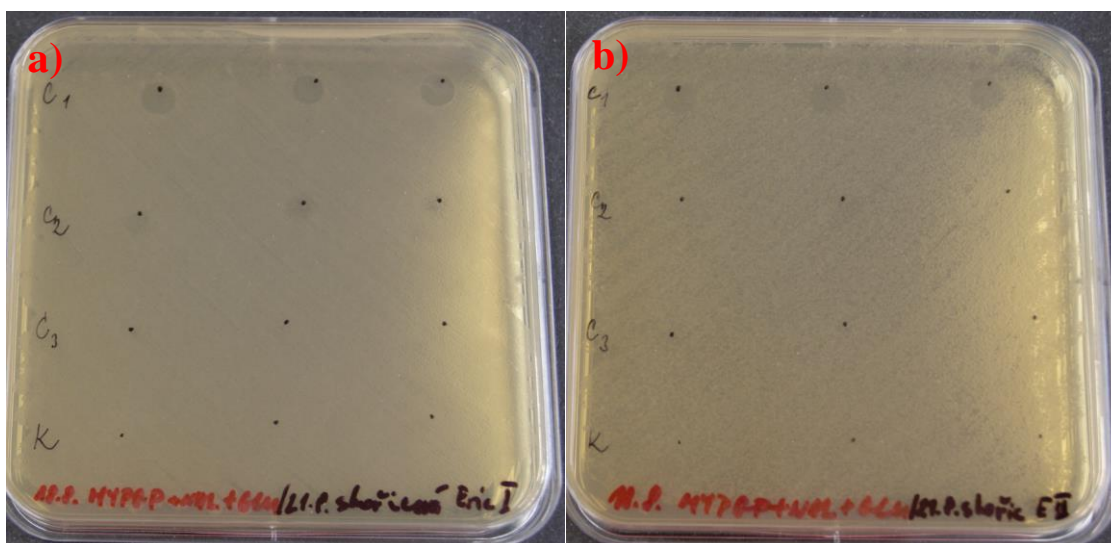
Obr. 16: Box plot genotypu ERIC II a vlivu derivátů kyseliny hydroxybenzoové. Největší vliv lze pozorovat u kyseliny 3-hydroxybenzoové a 4-hydroxybenzoové.

Vysvětlivky: c_1 =koncentrace 20 mg/ml, c_2 =koncentrace 10 mg/ml, c_3 =koncentrace 5 mg/ml. K= kontrola (2 % roztok DMSO).



Obr. 17 a,b: Difuzní testy bakterie *P. larvae* genotyp ERIC I (a) a ERIC II (b) za použití kyseliny *p*-kumarové. Kyselina tvoří viditelné zóny v koncentraci c_1 i c_2 . U koncentrace c_3 lze také pozorovat náznak tvorby zóny, avšak pouze u genotypu ERIC I.

Vysvětlivky: c_1 =koncentrace 20 mg/ml, c_2 =koncentrace 10 mg/ml, c_3 =koncentrace 5 mg/ml. K= kontrola (2 % roztok DMSO).



Obr. 18 a,b: Difuzní testy bakterie *P. larvae* genotyp ERIC I (a) a ERIC II (b) za použití kyseliny *t*-skořicové. Kyselina tvoří viditelné zóny pouze v koncentraci c_1 , U koncentrace c_2 se viditelná zóna tvoří pouze u genotypu ERIC I.

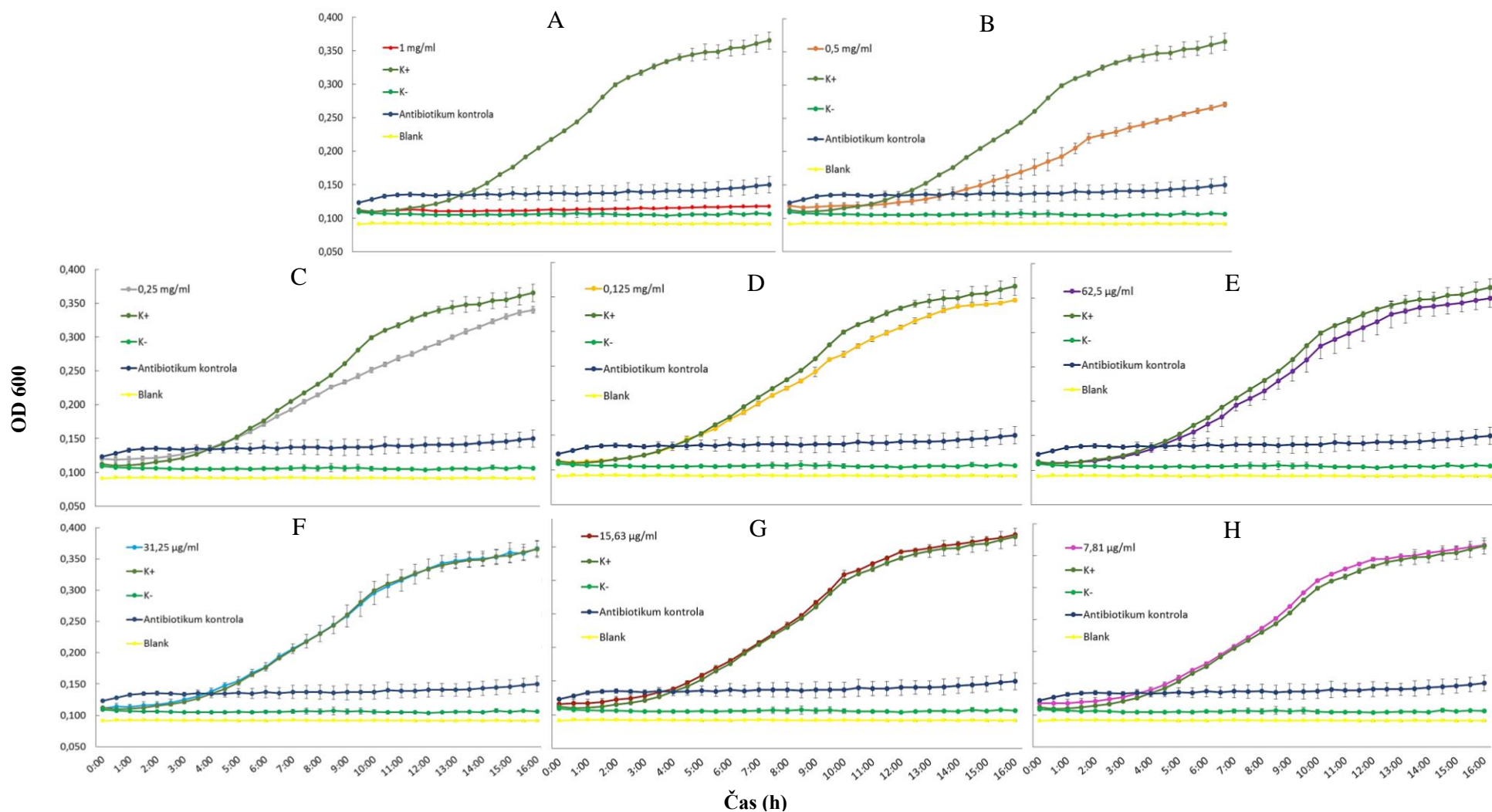
Vysvětlivky: c_1 =koncentrace 20 mg/ml, c_2 =koncentrace 10 mg/ml, c_3 =koncentrace 5 mg/ml. K= kontrola (2 % roztok DMSO).

9.4 Stanovení MIC jednotlivých fenolických látek pomocí růstových křivek

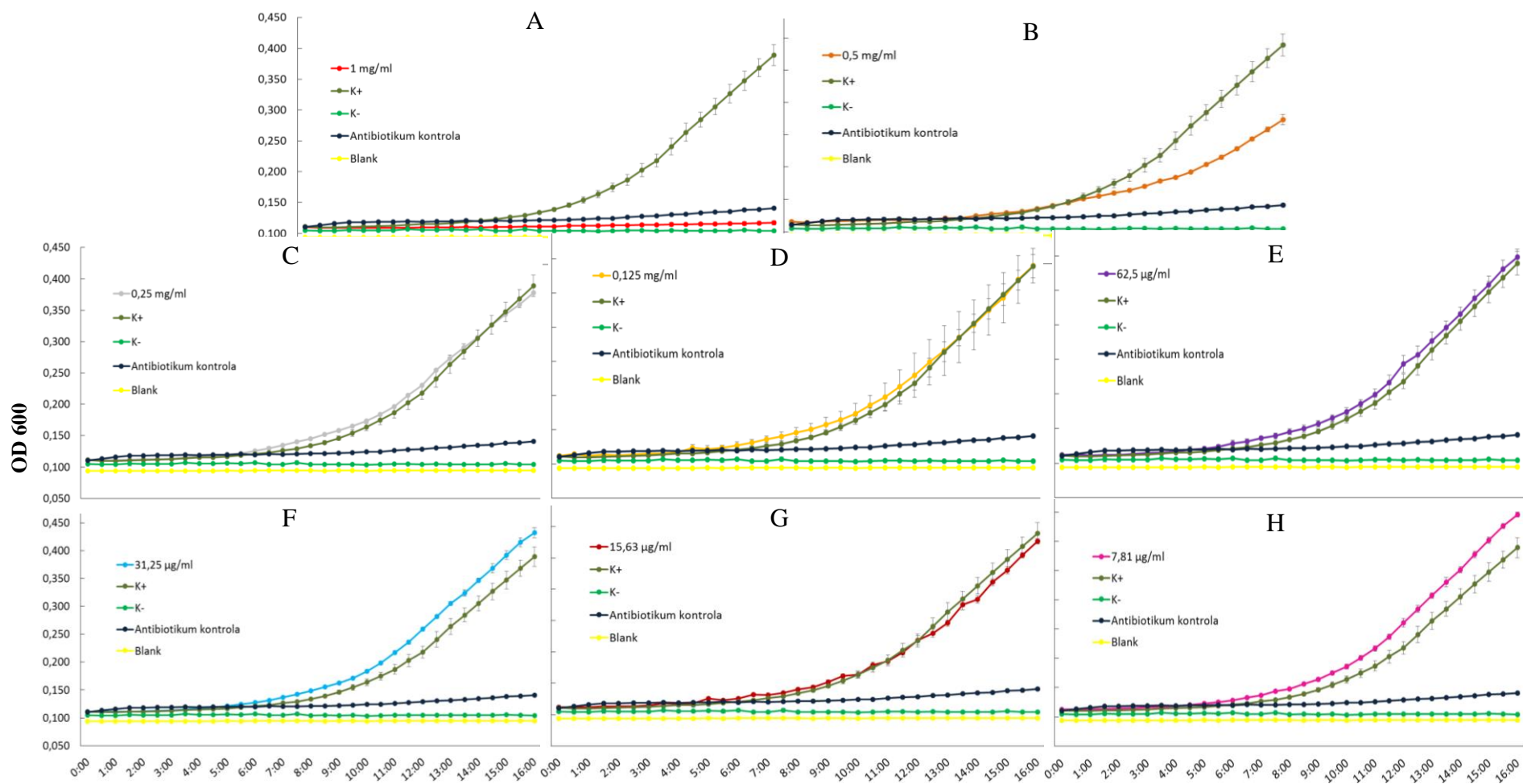
Minimální inhibiční koncentrace (MIC) fenolových kyselin na patogena *P. larvae*, genotypy ERIC I a ERIC II, byla stanovena a shrnuta v tabulce 5. Při měření růstových křivek bakteriálních kmenů *P. larvae* byl největší inhibiční účinek pozorován při aplikaci kyseliny *p*-kumarové (Obr. 19). Inhibiční účinky byly pozorovány již při koncentraci 1 mg/ml. V případě kyselin 3-hydroxybenzoové a 4-hydroxybenzoové se jednalo shodně o inhibiční koncentraci 2 mg/ml. V případě kyseliny *t*-skořicové došlo k inhibici bakteriálního růstu až při koncentraci 4 mg/ml, shodně také v případě kyseliny ferulové. U kyseliny chlorogenové, gallové, kávové a vanilové nebyly pozorovány inhibiční účinky ani u jedné z testovaných fenolických látek. Inhibiční účinky antibiotika tetracyklinu byly pozorovány u obou testovaných kmenů *P. larvae*. Pokud se u některých kyselin stalo, že nebyla stanovena konkrétní MIC, byl problém buď s rozpuštěním látky na požadovanou koncentraci (kyselina chlorogenová), nebo je zapotřebí použít vyšší koncentraci dané látky.

Tab. 5: MIC jednotlivých fenolových kyselin u bakteriálních kmenů *P. larvae*, genotypy ERIC I a ERIC II.

	MIC (mg/ml)	
	ERIC I	ERIC II
<i>p</i> -kumarová kyselina	1	1
<i>t</i> -skořicová kyselina	4	4
Ferulová kyselina	4	4
Chlorogenová kyselina	>2	>2
Gallová kyselina	>2	>2
Kávová kyselina	>2	>2
Vanillová kyselina	>2	>2
3-hydroxybenzoová kyselina	2	2
4-hydroxybenzoová kyselina	2	2



Obr. 19: Růstová křivka bakterie *P. larvae*, genotyp ERIC I s kyselinou *p*-kumarovou. Kyselina byla testována v různých koncentracích (1000 – 7,81 µg/ml). Účinek kyseliny na bakteriální růst byl sledován po dobu 16 hodin. A - koncentrace 1 mg/ml. B – koncentrace 0,5 mg/ml. C – koncentrace 0,25 mg/ml, D – koncentrace 0,125 mg/ml. E – koncentrace 62,5 µg/ml. F – koncentrace 31,25 µg/ml. G – koncentrace 15,63 µg/ml. H – koncentrace 7,81 µg/ml.



Obr. 20: Růstová křivka bakterie *P. larvae*, genotyp ERIC II s kyselinou *p*-kumarovou. Kyselina byla testována v různých koncentracích (1000 – 7,81 µg/ml). Účinek kyseliny na bakteriální růst byl sledován po dobu 16 hodin. A - koncentrace 1 mg/ml. B – koncentrace 0,5 mg/ml. C – koncentrace 0,25 mg/ml, D – koncentrace 0,125 mg/ml. E – koncentrace 62,5 µg/ml. F – koncentrace 31,25 µg/ml. G – koncentrace 15,63 µg/ml. H – koncentrace 7,81 µg/ml.

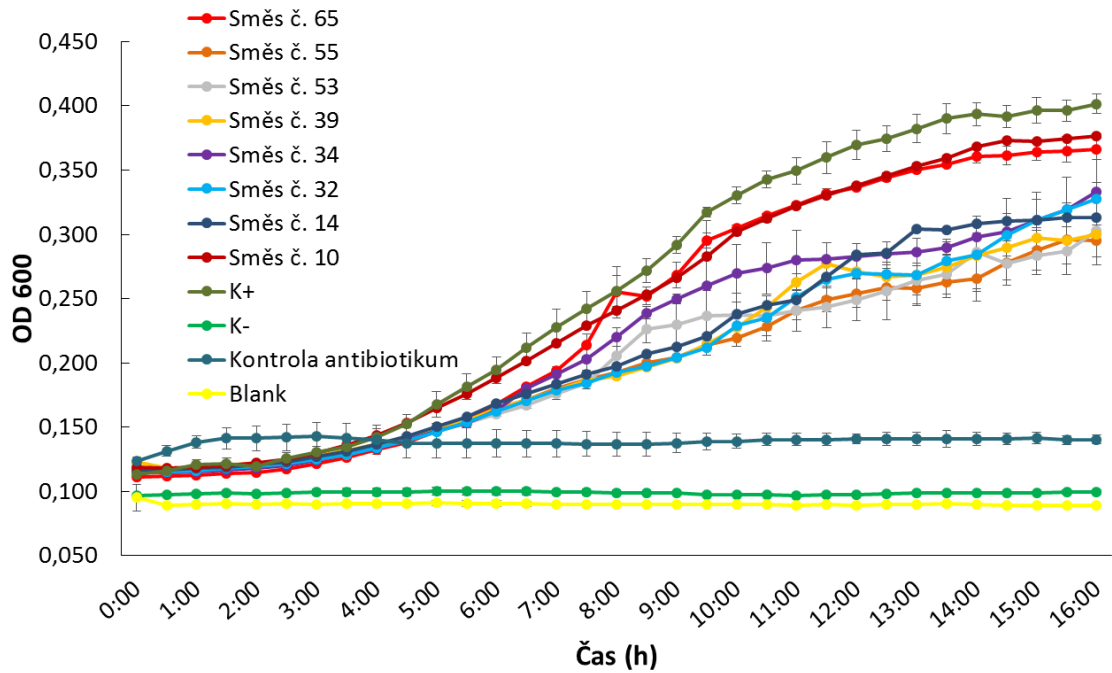
9.5 Stanovení MIC směsí fenolových kyselin o koncentraci odpovídající přirozenému obsahu v medu

Pro simulaci konkrétního zastoupení látek v medu byly vytvořeny směsi – analoga přesného množství devíti vybraných fenolových kyselin v medu, jejichž koncentrace byly zjištěny metodou UHPLC (Tab. 6). Testované směsi byly vybrány na základě zastoupení jednotlivých látek a jejich koncentrací. Směsi byly taktéž testovány na genotypech ERIC I a ERIC II patogenu *P. larvae* měřením růstových křivek a byla sledována MIC jednotlivých směsí.

V případě genotypu ERIC I byl pozorován mírný inhibiční vliv všech testovaných směsí (Obr. 21), největší inhibice bakteriálního růstu byla zaznamenána u směsí č. 53 a 55. Úplná inhibice růstu patogena však nebyla zaznamenána v žádné z vybraných směsí. V případě genotypu ERIC II nebyla u žádné z uvedených směsí pozorována inhibice růstu patogena (Obr. 22).

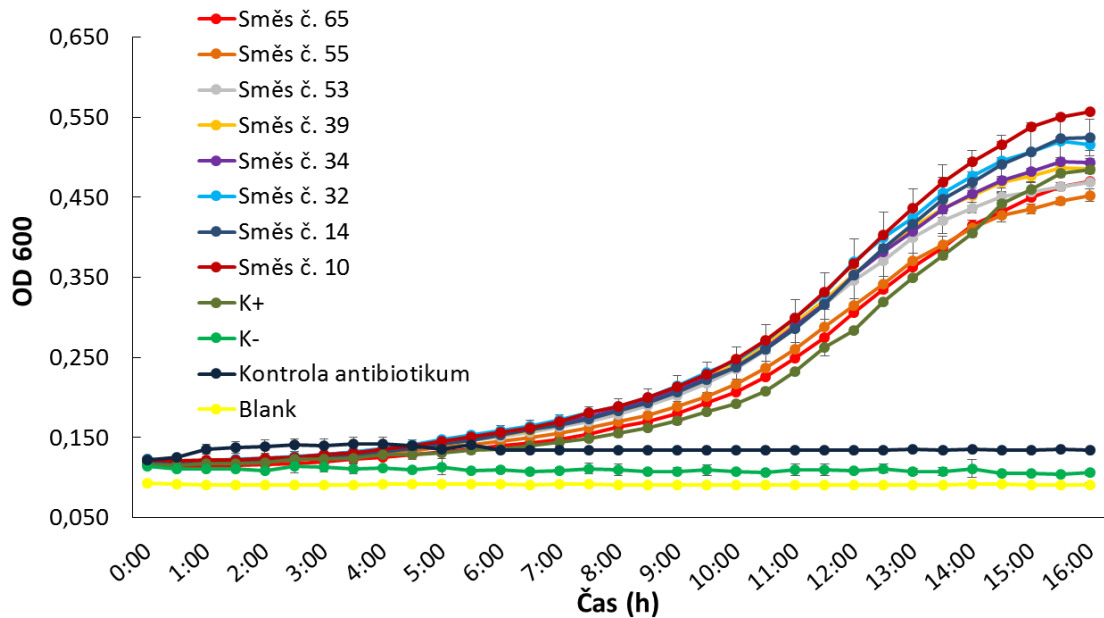
Tab. 6: Koncentrace fenolových kyselin, přirozeně se vyskytujících v medu, ve směsích testovaných na růst *P. larvae*. Koncentrace je uvedena ve fg/mg. Úplný antimikrobiální účinek nebyl zaznamenán ani u jedné z testovaných směsí.

ID směsi	<i>p</i> -kumarová kyselina	<i>t</i> -skořicová kyselina	Ferulová kyselina	Chlorogenová kyselina	3-hydroxybenzoová kyselina	4-hydroxybenzoová kyselina	Vanillová kyselina	Gallová kyselina	Kávoá kyselina	Antimikrobiální aktivita ERIC I	Antimikrobiální aktivita ERIC II
1	2032,14	0,00	2091,12	44,00	37,57	1986,19	1187,35	317,45	1879,85	NE	NE
2	1374,26	0,00	1398,15	50,09	41,86	3076,46	1669,34	390,41	1323,12	NE	NE
4	2617,77	317,65	4458,34	50,71	147,87	3353,67	2001,94	1106,62	1585,38	NE	NE
6	3257,66	0,00	2661,33	0,00	63,32	3840,24	1142,13	393,59	673,68	NE	NE
7	1518,11	351,37	1434,06	44,02	80,57	2659,63	900,92	469,81	402,09	NE	NE
10	2522,60	552,24	3427,34	0,00	0,00	3610,70	1566,71	423,66	942,76	NE	NE
12	2152,95	0,00	3488,56	0,00	0,00	4307,20	1799,36	429,73	575,60	NE	NE
14	2078,28	0,00	1446,68	92,14	15,66	1793,36	553,57	105,14	631,08	NE	NE
22	3034,75	353,41	2339,88	72,10	50,54	2789,90	1031,26	545,27	652,86	NE	NE
23	1995,97	219,08	2997,86	18,61	51,48	1938,99	1806,75	302,52	410,96	NE	NE
26	1264,93	331,68	1671,38	21,09	52,17	4060,93	1005,94	330,18	387,72	NE	NE
32	1343,75	291,35	1075,01	0,00	22,79	930,51	578,81	29,96	214,43	NE	NE
34	1695,43	469,65	1150,98	0,00	47,46	1570,86	431,47	427,02	341,45	NE	NE
36	1604,00	261,63	1582,83	0,00	16,45	812,45	228,52	16,41	957,02	NE	NE
37	267,89	38,21	166,29	0,00	5,31	330,61	77,08	33,60	49,88	NE	NE
39	1819,79	476,99	1474,36	0,00	16,40	1315,01	304,03	28,36	511,59	NE	NE
40	1319,14	454,95	1672,53	0,00	157,95	2648,69	934,32	944,47	410,69	NE	NE
48	4118,21	365,19	2937,02	0,00	0,00	4867,19	1097,53	224,38	980,85	NE	NE
49	3138,32	151,73	2572,27	452,24	17382,06	3445,69	728,95	319,27	717,73	NE	NE
50	1102,49	400,76	1136,70	0,00	66,18	4575,71	675,14	286,60	257,52	NE	NE
53	1887,13	795,25	1968,23	0,00	0,00	844,98	179,75	16,85	1971,36	NE	NE
54	1188,22	216,83	1253,82	0,00	20,73	701,85	148,83	0,00	697,08	NE	NE
55	1771,85	880,76	1657,60	0,00	6155,51	1102,77	268,17	27,77	2273,16	NE	NE
58	3461,66	530,95	2547,01	147,97	47,08	2777,71	567,57	163,40	1991,14	NE	NE
59	2458,23	1186,41	6644,22	0,00	0,00	1657,41	388,46	0,00	1956,81	NE	NE
61	2735,89	829,75	1934,26	373,51	71,67	2800,77	537,27	448,78	4421,81	NE	NE
63	2915,46	439,64	4240,02	0,00	142,67	1898,25	930,94	1186,62	2534,96	NE	NE
64	1936,60	427,64	1736,75	0,00	0,00	982,01	0,00	0,00	2013,51	NE	NE
65	647,61	265,95	678,82	0,00	0,00	763,20	131,59	0,00	1066,96	NE	NE
66	1188,65	356,71	957,58	754,39	0,00	1483,19	337,13	0,00	3431,13	NE	NE
67	1445,12	570,90	1138,58	1020,32	0,00	1659,18	379,30	26,55	2535,40	NE	NE



Obr. 21: Růstové křivky bakterie *P. larvae* ERIC I s vybranými směsmi fenolových kyselin. Účinky směsí na bakteriální růst byly sledovány po dobu 16 hodin.

Vysvětlivky: K+ = pozitivní kontrola (živé bakterie); K- = negativní kontrola (mrtvé bakterie); Antibiotikum kontrola = TTC v konečné koncentraci 625 μ M; Blank = MYPGP médium + voda



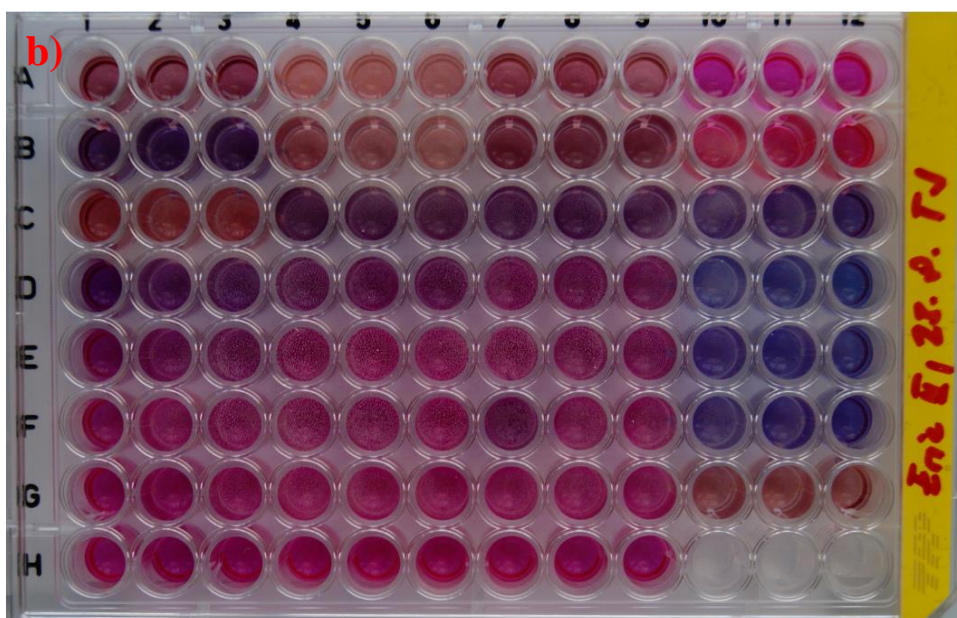
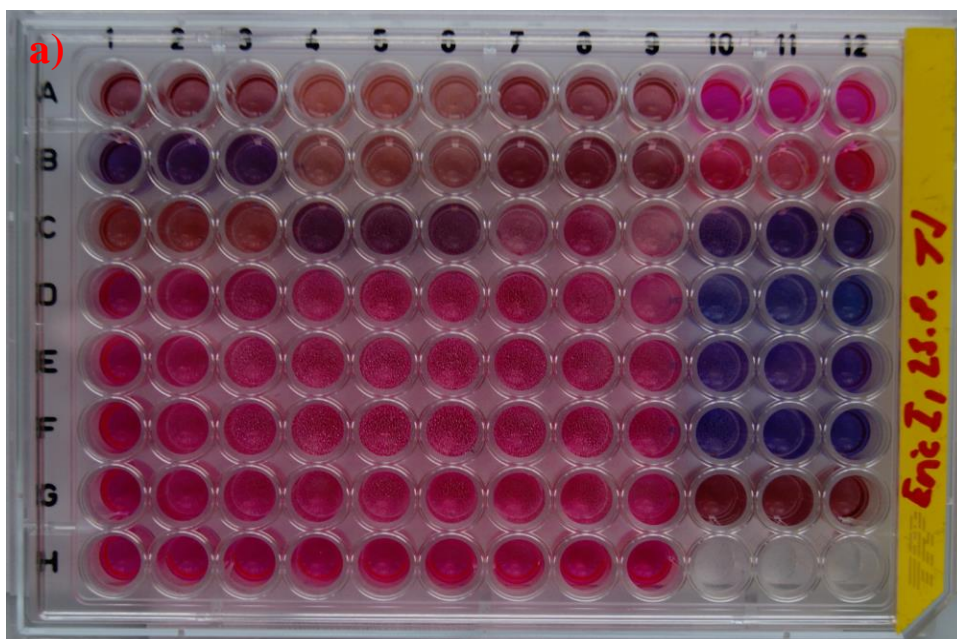
Obr. 22: Růstové křivky bakterie *P. larvae* ERIC II s vybranými směsmi fenolových kyselin. Účinky směsí na bakteriální růst byly sledovány po dobu 16 hodin.

Vysvětlivky: K+ = pozitivní kontrola (živé bakterie); K- = negativní kontrola (mrtvé bakterie); Antibiotikum kontrola = TTC v konečné koncentraci 625 μ M; Blank = MYPGP médium + voda

9.3 Kolorimetrické stanovení MIC pomocí resazurinu

V pilotních pokusech bylo na základě vyhodnocení růstových křivek testováno, zda v jamce mikrodestičky s hodnotou nejvyšší koncentrace fenolické látky, kdy byla metodou růstových křivek prokázána inhibice růstu po dobu 16 hodin, nebude probíhat růst bakterií ani po experimentu. Z jamky mikrodestičky s hodnotou nejvyšší koncentrace bylo po změření růstových křivek odebráno 75 μ l bakteriální kultury a přeočkováno na misku s pevným MYPGP médiem. Inkubace probíhala 72 hodin ve tmě při 37 °C. Bakteriální růst nebyl ani po této době zaznamenán. Pro další potvrzení bakteriocidní funkce vybraných fenolových kyselin byla použita metoda s barvivem resazurinem v 96ti jamkových mikrodestičkách. Stanovení bylo prováděno v triplicátech a do každé jamky bylo po přidání bakteriální suspenze (příprava dle kapitol 8.2 a 8.7 této práce) a fenolické látky přidáváno 15 μ l barviva resazurinu (0,03 % (w/v)). Inkubace probíhala 12 hodin ve tmě při 37 °C.

Na obr. 23a je ukázána bakteriální suspenze *P. larvae*, genotyp ERIC I, kde se v jamkách 1-3 nachází kyselina *p*-kumarová. Zde lze pozorovat výrazné tmavě fialové zbarvení v řadě B (koncentrace 2,5 mg/ml) podobné mrtvým buňkám. Toto zbarvení lze taktéž pozorovat u genotypu ERIC II (Obr. 23b), kde lze podobné zbarvení vidět u kyselin *t*-skořicové a ferulové v řadě C (koncentrace 1,25 mg/ml). Totožnému zbarvení suspenze mrtvých buněk, které se nachází v jamkách 10 – 12C, však zcela neodpovídá žádná jamka použité fenolové kyseliny a fluorescenční vyhodnocení zatím nebylo pro tuto metodu vyvinuto. Problémem může být doba inkubace bakteriálních kmenů *P. larvae* pro dosažení exponenciální fáze růstu (je až 5 hodin), kdy je nejvhodnější sledovat aplikaci fenolické látky. Následná inkubace s resazurinem (90 min) poté zabraňuje sledování přímého účinku fenolické látky ihned po její aplikaci. Z těchto pokusů tedy není zcela zřejmé a identifikovatelné, jak daná fenolická látka působí, proto již nebylo pokračováno s dalšími fenolickými látkami. Inhibiční účinky antibiotika tetracyklinu byly pozorovány u všech testovaných kmenů *P. larvae* (jamky 10-12D).



Obr. 23a,b: Stanovení MIC pomocí resazurinu u *P. larvae*, genotypy ERIC I a II. Porovnání zbarvení média s bakteriální suspenzí po přidavku resazurinu (0,03 % (w/v) a bakteriálního kmene ERIC I (A) a ERIC II (B). Odečet po 16. hodinách.

Koncentrace fenolických látek v řadách: A – 5 mg/ml, B – 2,5 mg/ml, C – 1,25 mg/ml, D – 0,625 mg/ml, E – 0,312 mg/ml, F – 0,156 mg/ml, G – 0,078 mg/ml, H – 0,039 mg/ml.

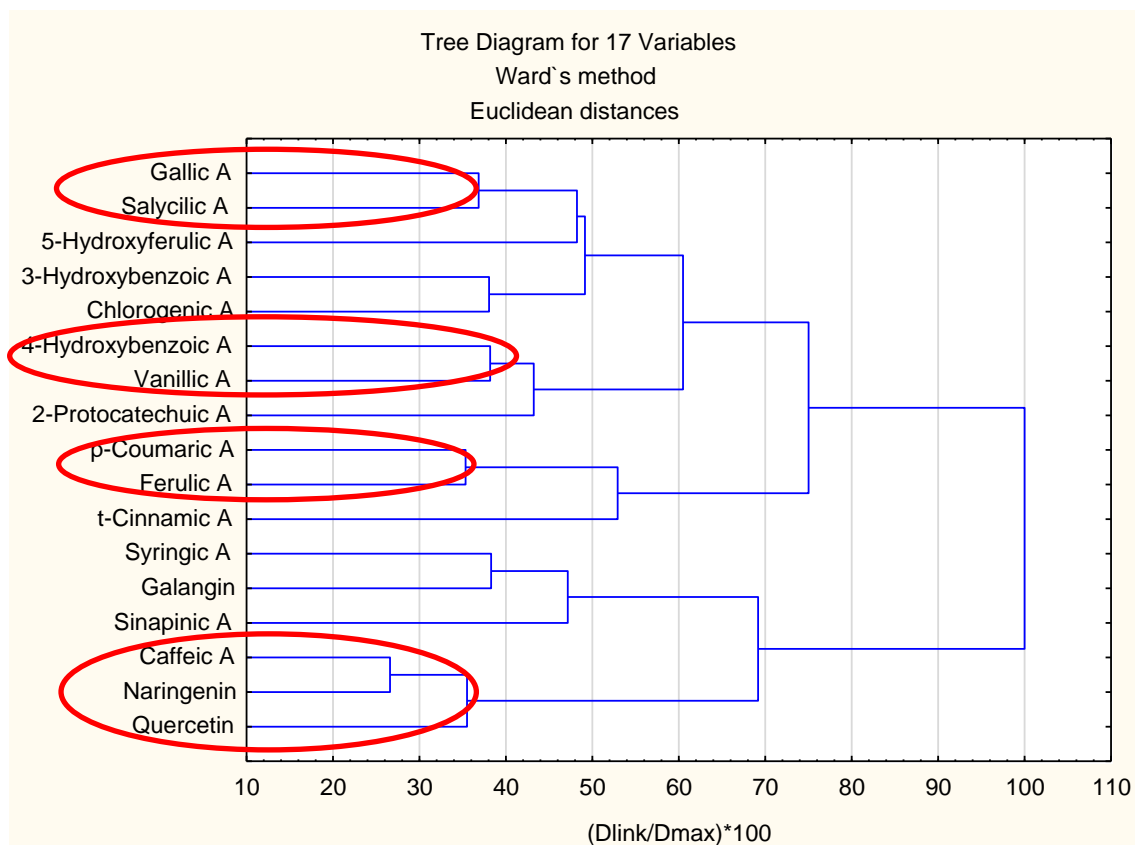
Sloupce 1 – 3: kyselina *p*-kumarová, sloupce 4 – 6:kyselina *t*-skořicová sloupce 7 – 9: kyselina ferulová. 10 – 12A: pozitivní kontrola (živé buňky), 10 – 12B: kontrola rozpouštědla (2% DMSO), 10 – 12C: negativní kontrola, 10 - 12D: Antibiotikum kontrola, 10 – 12E: TTC + MYPGP médium, 10 – 12F: Slepý vzorek, 10 – 12G: kyselina *p*-kumarová (5 mg/ml)

9.6 Shluková (klastrová) analýza

9.6.1 Shluková analýza fenolických látek

Jak již bylo řečeno dříve, na základě výsledků chromatografických analýz provedených na základě spolupráce s Ing. Sanjou Čavar, Ph.D. z Centra regionu Haná bylo v předložených 67 vzorcích medu (Tab. 2) nalezeno 17 fenolických látek – 14 fenolových kyselin a 3 flavonoidy. Data z této analýzy byla podrobena shlukové (klastrové) analýze v softwaru STATISTICA. Díky této metodě jsou shlukovány do klastrů látky na základě podobných vlastností. V této práci bylo použito hierarchické shlukování, což znamená, že byly shluky vytvořeny postupně v několika krocích. Jako první byly spojeny ty, které mají mezi sebou nejmenší vzdálenost (znázorněno na ose x), v tomto případě vzdálenost Euklidovskou (vzdálenost bod od bodu). Tato vzdálenost byla vypočtena programem STATISTICA na základě Wardovy metody (Obr. 24).

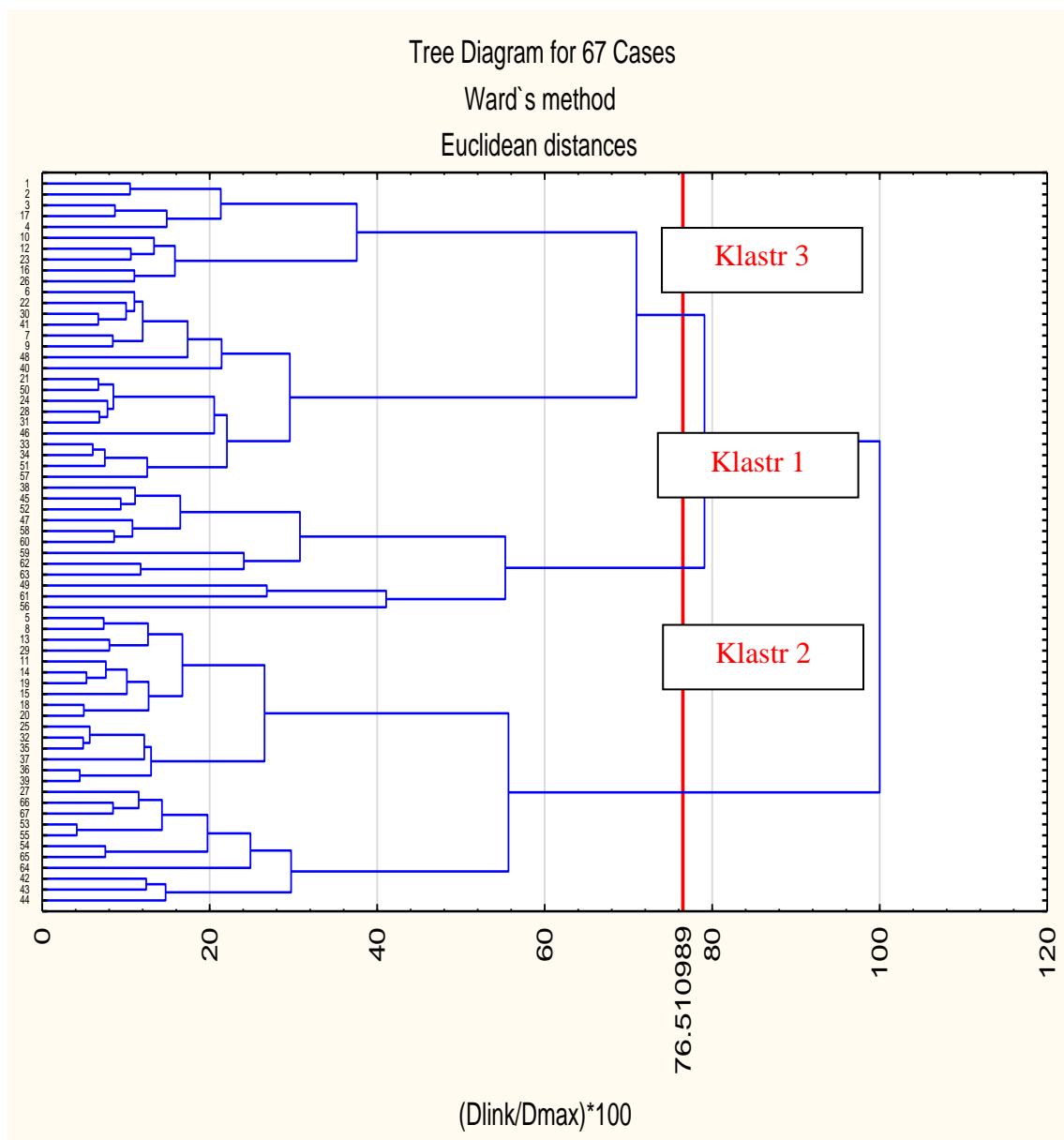
Vyhodnocením metody byly spojeny látky, které patří do stejných biosyntetických drah, jako je tomu v případě kyseliny gallové a salicylové (deriváty hydroxybenzoové kyseliny), kyseliny 4-hydroxybenzoové a vanillové (deriváty hydroxybenzoové kyseliny) a kyseliny *p*-kumarové a ferulové (deriváty kyseliny skořicové). Do klastru byly také spojeny látky zdánlivě odlišné např. flavonoid naringenin a kyselina kávová. Na základě studia biosyntézy je však flavonoid naringenin zcela prokazatelně syntetizován z kyseliny skořicové a jejích derivátů, tedy i z kyseliny kávové. Navíc bylo klastrovou analýzou vzorků medu (Obr. 25) zjištěno, že tyto dvě látky se nacházejí současně v květových medech (ID medu 15, 27, 52, 53, 55, 59, 62 a 64) v mnohem větších množstvích, než v ostatních vzorcích medu. Tyto analýzy však musí být dále potvrzeny s větším množstvím vzorků a za použití dalších metod vyhodnocení.



Obr. 24: Dendrogram shlukové analýzy 17 fenolických látek. Hierarchické shlukování na základě Wardovy metody (Euklidovská vzdálenost). Shlukují se látky patřící do stejných biosyntetických drah.

9.6.2 Shluková analýza vzorků medů

Klastrovou analýzou byly podrobeny také předložené vzorky medů (Tab. 2). Bylo zjištěno, že vzorky mohou být rozděleny do tří klastrů (Obr. 25). V klastru 1 lze nalézt medy obojího druhu a také medy smíšené, v klastru 2 převážně medy květového původu a v klastru 3 medy medovicového původu (Tab. 7). Je tedy možné říci, že takovýmto vyhodnocením lze určit původ medu. Dále bylo potvrzeno, že pokud byly medy od stejného včelaře (stejný geografický původ), shlukly se v rámci klastru k sobě na nejmenší vzdálenost (např. vzorky 1 a 2, 7 a 9, 22 a 23). Medy také nemusely pocházet od stejného včelaře, pokud však byl jejich geografický původ blízký (např. vzorek 36 z Bouzova a 39 z Ješova) a byly stejného (v tomto případě květového) původu, byly v klastru také spojeny s nejmenší možnou vzdáleností. Touto analýzou však bylo testováno pouze 67 medů, pro relevantnější statistické vyhodnocení je potřeba více vzorků.



Obr. 25: Dendrogram shlukové analýzy 67 vzorků medů. Hierarchické shlukování na základě Wardovy metody (Euklidovská vzdálenost).

Tab. 7: Zastoupení jednotlivých druhů medu ve třech nalezených klastrech. Hodnota je uvedena v procentech.

	Kvěťový	Medovicový	Smišený
Klast 1	75,00	25,00	0
Klast 2	85,19	14,81	0
Klast 3	42,86	46,43	10,71

10 Diskuze

Cílem předložené rigorózní práce bylo stanovit minimální inhibiční koncentraci (MIC) vybraných fenolických látek izolovaných z medu a jejich směsí u patogena *Paenibacillus larvae*, genotyp ERIC I (CCUG 48979) a genotyp ERIC II (CCUG 48972). *P. larvae* je původcem závažného onemocnění moru včelího plodu. V současné době reprezentuje jeden z největších problémů pro včelaře z důvodu ekonomických ztrát a z důvodu absence efektivního terapeutického léčiva.

Stanovení antimikrobiální aktivity pomocí metody měření růstových křivek patří mezi jednoduché metody, umožňující určit MIC potenciální antimikrobiální látky. V této práci bylo díky metodě měření růstových křivek prokázáno působení některých fenolových kyselin izolovaných z medu na *P. larvae*.

Vhodnost metody měření růstových křivek byla testována také na bakterii *E. coli* NCTC 10538 s peptidem apidaecinem Ia, kdy byla potvrzena antimikrobiální aktivita peptidu apidaecin Ia s minimální inhibiční koncentrací 25 µg/ml (Dostálková, 2016). Antimikrobiální aktivita peptidů apidaecinu a defensinu 1 byla také testována s bakteriálními kmeny *P. larvae* v rámci práce Khilnani a Wing, 2015, kdy se projevila antimikrobiální aktivita obou peptidů vůči *P. larvae*.

Antimikrobiální a antioxidační aktivita látek nalezených v medu či propolisu je známa již delší dobu. Ve studii Baltrušaitytė *et al.* (2007) byla u 35 fenolických extraktů z litevských medů a 9 vzorků včelího chleba prokázána schopnost lapat volné radikály, ačkoliv rozmezí této aktivity bylo široké (43,0 – 95,7 %). V této studii byly také v předložených biologických materiálech nalezeny metodou HPLC fenolické látky (kyselina *p*-kumarová, kaempferol, chrysin a apigenin), avšak antimikrobiální nebo antioxidační aktivita spojená s těmito látkami nebyla prokázána. Antioxidační aktivita fenolických látek byla testována později (Kassim *et al.*, 2010). V methanolových a (HME) a ethylacetátových (HEAE) extraktech malajsijského medu bylo nalezeno 6 fenolických látek ve vyšších koncentracích – kyseliny ellagová, ferulová, kávová, gallová a chlorogenová a flavonoid myricetin, v menších koncentracích pak kyselina *p*-kumarová a flavonoidy hesperetin, quercetin, chrysin luteolin a kaempferol. Nejhojněji zastoupenou látkou v obou extraktech byla kyselina ellagová 3295,83 µg/100 g (HME) a 626,74 µg/100 g (HEAE). *In vitro* byla také testována schopnost těchto extraktů inhibovat oxid dusnatý. Tato schopnost byla prokázána u všech testovaných extraktů v rozmezí koncentrací 37,5 a 271,7 µg/ml.

Komplexní studie vlivu samotných medů, propolisu či látek z nich izolovaných na patogena *P. larvae* nejsou ještě plně vypracovány. Jednou z mála studií tohoto typu je práce Bilikova *et al.* (2013), kde byl testován propolis a látky z něj izolované na antimikrobiální aktivitu proti *P. larvae*. Bylo zjištěno, že nejvíce aktivní konstituenty byly pinocembrin (MIC=62,5 µg/ml po 48 hodinách), 3-*O*-acetyl pinobanksin (MIC=125 µg/ml po 48 hodinách) a deriváty kyseliny kávové (MIC=125 µg/ml po 48 hodinách). Výhoda propolisu a látek z něj izolovaných je hlavně ta, že se nacházejí přirozeně přímo v úlu, stejně tak jako med. Ačkoliv v této práci nebyl antimikrobiální účinek směsí fenolických látek izolovaných z medu prokázán, Nafea *et al.* (2014) testovali čtyři druhy egyptských medů – luční, citrusový, kafrový a bavlníkový, aby ukázali, že tyto medy mají v různých koncentracích (5, 10 a 20 %) inhibiční účinky proti *P. larvae*. Největší inhibiční účinek (= největší inhibiční zóna v mm) byla zaznamenána u bavlníkového medu v koncentraci 20 %, a to 27,75 mm. Studium antimikrobiálních vlastností medu se zabývali také Erler *et al.* (2014), kde byli použity tři druhy rumunských medů proti některým patogenům včetně *P. larvae* a spojili dohromady inhibiční vlastnosti medu se schopností včelích kolonií adaptovat se v rámci „sociální imunity“ proti různým patogenům. V rámci publikace Sagona *et al.* (2017) bylo testováno patnáct italských medů proti *P. larvae* ATCC 9545. Byla zjišťována MIC a také celkové množství fenolických látek a flavonoidů. Všechny testované vzorky měly zjištěnu inhibiční aktivitu proti *P. larvae*, nejnižší MIC (53,8 mg/ml) pak byla zjištěna u vzorků medů *Arbutus* (planika), které měly také zjištěn nejvyšší obsah fenolických sloučenin (243,2 ± 25,1 mg/kg). V této práci byl antimikrobiální účinek proti *P. larvae* prokázán u *p*-kumarové kyseliny (MIC=1 mg/ml), 3-hydroxybenzoové kyseliny (MIC=2mg/ml), 4-hydroxybenzoové kyseliny (MIC=2mg/ml), ve dvojnásobné koncentraci (MIC=4mg/ml) pak u ferulové a *t*-skořicové kyseliny.

Zajišťování alternativních přirozeně se vyskytujících antimikrobiálních látek působících proti *P. larvae* je v současné době stále aktivní, což dokazuje studie Fernández *et al.* (2018). Zde byly testovány dva extrakty - hydroalkoholický (HE) a esenciální olej (EO) rostliny *Laurus nobilis* L. (Vřes vznešený neboli bobkový list). Bylo zjištěno, že HE extrakt byl schopen inhibovat růst *P. larvae* v koncentraci 580 mg/ml, což zde vědci přičítají přítomnosti fenolických látek, které byly analyzovány pomocí Fourierovy spektroskopie. V této publikaci je navíc tvrzení, že pokud byla včelí kolonie přikrmována cukrem s přísadkou HE vřesového extraktu, bylo pozorováno

zlepšení obecných vlastností v úlu, ačkoliv konkrétní změny např. v hygienickém chování nebyly zaznamenány.

V této práci se použití metody s fluorescenčním barvivem resazurinem zdálo nevhodné pro studium antimikrobiální aktivity látky, jelikož při stanovení je nutné sledovat změnu počtu vitálních bakterií pouze v průběhu růstové („exponenciální“) fáze bakterií (Madigan *et al.*, 2010). Aplikace resazurinu k inkubovaným bakteriálním buňkám omezuje sledování životnosti pouze na 90 min úseky (nutná doba inkubace bakterie s barvivem), což je nevýhodou, protože může dojít ke zkreslení výsledku, například množením přeživších bakterií. Tato metoda je tedy vhodná pro klasickou mikrobiologickou metodu stanovení MIC, kdy se po několikahodinové inkubaci potenciální antimikrobiální látky s bakterií vizuálně odečítá stupeň zákalu v jednotlivých jamkách (živá bakteriální kultura zakalená, mrtvá bakteriální kultura čirá) (Votava *et al.*, 2010), ne však pro sledování inhibičního účinku ihned po aplikaci antimikrobiálních látek ke vzorku. Dalšími metodami zjišťování životnosti bakterií jsou luminiscenční metody či měření pomocí fluorescein diacetátu a propidium jodidu. Vhodnost těchto metod však musí být otestována.

Díky shlukové (klastrové) analýze jsou látky shlukovány do klastrů na základě podobných vlastností. V této práci bylo díky shlukové analýze možno rozdělit testované medy s ohledem na jejich původ (květový, medovicový a smíšený) do tří klastrů. Touto analýzou bylo také možno spojit látky, které patří do stejných biosyntetických drah.

11 Závěr

- Vhodné rozpouštědlo pro fenolické látky je jak DMSO, tak MeOH, avšak aby nedocházelo k úhynu bakterií, musí být maximální koncentrace rozpouštědla 2 %.
- Na základě difuzních testů byl genotyp ERIC I určen jako mírně citlivější k vybraným fenolovým kyselinám (kyselině *p*-kumarové, 3- a 4-hydroxybenzoové a *t*-skořicové) než genotyp ERIC II.
- U jednotlivých fenolových kyselin byla stanovena MIC a difuzní testy – ukázalo se, že ve vysokých koncentracích mají některé látky v rámci trvání testu dokonce úplný inhibiční účinek - kyselina *p*-kumarová v koncentraci 1 mg/ml a kyseliny 3- a 4- hydroxybenzoová v koncentraci 2 mg/ml.
- Velmi malé koncentrace fenolových kyselin (fmol/mg) vyskytujících se přirozeně v medu nemají vliv na růst patogena *P. larvae*, genotyp ERIC I ani na genotyp ERIC II.
- U směsí fenolových kyselin o koncentraci přirozeně se vyskytujících v medu nebyl také prokázán inhibiční účinek ani na jeden z genotypů patogena *P. larvae*
- Díky klastrové (shlukové) analýze bylo možno rozdělit medy s ohledem jejich původ.
- Díky klastrové analýze bylo také možné spojit látky, které patří do stejných biosyntetických drah.

V rámci další práce by měly být optimalizovány metody pro studium viability bakteriálních buněk vhodné pro sledování přímého účinku ihned po aplikaci potenciální antimikrobiální látky na bakterii. Dále by také bylo přínosné najít vhodná rozpouštědla pro všechny získané fenolické sloučeniny a podrobit shlukové analýze více vzorků medů.

12 LITERATURA

Abu-Mellal A., Koolaji N., Duke R. K., Tran V. H., Duke C. C. (2012): Prenylated cinnamate and stilbenes from Kangaroo Island propolis and their antioxidant activity. *Phytochemistry*, **77**, 251-259.

Adams C. J., Manley-Harris M., Molan P. C. (2009): The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr. Res.* **344**, 1050–1053.

Ahmed A. J. B. H., Obbed M. S., Wabaidur S. M., Alothman Z. A., Al-Shaalán N. H. (2014): High-performance liquid chromatography analysis of phenolic acid, flavonoid, and phenol contents in various natural Yemeni honeys using multi-walled carbon nanotubes as a solid-phase extraction adsorbent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**, 5443-5450.

Albert S., Klauđiny J. (2004): The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: identification of new members in the EST library. *J Insect Physiol* **50**, 51–59.

Alekseeva O. V., Sabirzyanova T. A., Selyah I. O., Kalebina T. S., Kulaev I. S. (2014): Export of an invertase by Yeast *Candida utilis* cells. *Applied Biochemistry and Microbiology* **50**, 134-139.

Almaraz-Abarca N., Campos M. G., Avila-Reyes J. A., Naranjo-Jimenez N., Herrera-Corral J., Gonzalez-Valdez L. S. (2004): Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. *Interciencia* **29**, 574–578.

Alvarez-Suarez J. M. (2017): Bee Products - Chemical and Biological Properties. ISBN 978-3-319-59688-4 ISBN 978-3-319-59689-1 (eBook). DOI 10.1007/978-3-319-59689-1

Aronstein K., Holloway B. (2013): Honey bee fungal pathogen, *Ascosphaera apis*; current understanding of host-pathogen interactions and host mechanisms of resistance. In *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them - Science, Technology and Education* (Méndez-Vilas, A). Formatex Research Center, 402–410.

Atoui A. K., Mansouri A., Boskou G., Kefalas P. (2005): Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry* **89**, 27-36.

Audisio C. M., Torres M. J., Sabaté D. C., Ibarguren C., Apella M. C. (2011): Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiol Res* **166**, 1-13.

Baltrušaitytė V., Venskutonis P. R., Čeksterytė V. (2007): Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry* **101**, 502–514.

Bamrick J. F., Rothenbuhler W. C. (1961): Resistance to American foulbrood in honey bees. IV. The relationship between larval age at inoculation and mortality in a resistant and in a susceptible line. *Journal of Insect Pathology* **3**, 381-390.

Bankova V. S., de Castro S. L., Marcucci M. C. (2000): Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, **31** (1), 3–16.

Berthold N., Czihal P., Fritsche S., Sauer U., Schiffer G., Knappe D., Alber G., Hoffmann R. (2013): Novel apidaecin 1b analogs with superior serum stabilities for treatment of infections by Gram-negative pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**, 402-409.

- Bilikova K., Mirgorodskaya E., Bukovska G., Gobom J., Lehrach H., Simuth J. (2009): Towards functional proteomics of minority component of honeybee royal jelly: The effect of post-translational modifications on the antimicrobial activity of apalbumin 2. *Proteomics* **9**, 2131-2138.
- Bilikova K., Popova M., Trusheva B., Bankova V. (2013): New anti-*Paenibacillus larvae* substances purified from propolis. *Apidologie* **44**, 278–285.
- Boerjan W., Ralph J., Baucher M. (2003): Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 519–546.
- Bogdanov S. *et al.* (2000): Honey quality, methods of analysis and international regulatory standards: review of the work of the International honey commission. *Mitt. Lebensm. Hyg.* **90**, 108-125.
- Bogdanov S. (2009): HARMONISED METHODS OF THE INTERNATIONAL HONEY COMMISSION.
- Bors W., Heller W., Michel C., Stettmaier K. (1996): Flavonoids and Polyphenols: Chemistry and Biology; Marcel Dekker Inc.: New York.
- Bradbear N. (2009): Definition and uses of honey. In: Bees and their role in forest livelihoods. FAO, Rome, pp 81–88. <http://www.fao.org/3/a-i0842e.pdf> Accessed Oct 2016
- Brodtschneider R., Crailsheim K. (2010): Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* **41**, 278–294.
- Cantarelli M. A., Pellerano R. G., Marchevsky E. J., Camiña J. M. (2008): Quality of honey from Argentina: study of chemical composition and trace elements. *J. of Argent. Chem. Soc.* **96**, 31-41.
- Capuano E., Fogliano V. (2011): Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT - Food Science and Technology* **44**(4), 793-810.
- Casteels P., Ampe Ch., Jacobs F., Vaeck M., Tempst P. (1989): Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal* **8**, 2387-2391.
- Casteels P., Ampe Ch., Riviere L., van Damme J., Elicone Ch., Fleming M., Jacobs F., Tempst P. (1990): Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honey bee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry* **187**, 381-386.
- Casteels P. (1998) Immune Response in *Hymenoptera*. In: *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. 1st ed. (Brey P. T., Hultmark D.), Chapman & Hall, London, UK, 325 stran.
- Casteels-Josson K., Zhang W., Capaci T., Casteels P., Tempst P. (1994): Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 28569-28575.
- Ciulu M., Spano N., Pilo M. I., Sanna G. (2016): Recent advances in the analysis of phenolic compounds in unifloral honeys. *Molecules* **21**, 451-483.

Clifford M. N., Johnston K. L., Knigh S., Kuhnert N. (2003): Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51** (10), 2900–2911.

Cook N. C., Samman S. (1996): Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry* **7**(2), 66-76.

Codex Alimentarius Standard for Honey, Ref. Nr. CL 1993/14-SH, FAO and WHO, Rome, 1993.

Crane E. (1990): The traditional hive products: honey and beeswax. In: Crane E (ed) Bees and beekeeping: science, practice and world resources. Heinemann Newnes, Oxford, pp 388–413.

Crozier A. (2006): Biosyntheses. In: Plant secondary metabolites occurrence, structure and role in the human diet. (Crozier A., Clifford N. M., Ashihara R. ed.), Blackwell, University of Glasgow, UK, 14-20.

Czipa N., Borbély M., Győri Z. (2011): Proline content of different honey types. *Acta Alimentaria* **41**, 26-32.

Čeksterytė V., Kazlauskas S., Račys J. (2006): Composition of flavonoids in Lithuanian honey and beebread. *Biologija* **2**, 28–33.

Čeksterytė V., Kurtinaitienė B., Venskutonis P. R., Pukalskas A., Kazernavičiūtė R., Balžekas J. (2016): Evaluation of antioxidant activity and flavonoid composition in differently preserved bee products. *Czech J. Food Sci.* **34**, 133–142, doi: 10.17221/312/2015-CJFS.

da Rosa Neng N., Sequeiros R. C. P., Nogueira J. M. F. (2013): Combining bar adsorptive microextraction with capillary electrophoresis - Application for the determination of phenolic acids in food matrices. *Electrophoresis* **35**, 2488-2494.

da Silva P. M., Gauche C., Gonzaga L. V., Costa A. C. O., Fett R. (2016): Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry* **196**, 309-323.

Danihlik J., Aronstein K., Petrivalsky M. (2016): Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity. *J. of Apicultural research*, doi.org/10.1080/00218839.2015.1109919

Dostálková S. (2014): *Testování antimikrobiální aktivity peptidů*. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika.

de Graaf D. C., Alippi A. M., Antúnez K., Aronstein K. A., Budge G., Koker D. D., Smet L. D., Dingman D. W., Evans J. D., Foster L. J., Fünfhaus A., Garcia-Gonzales E., Gregorc A., Human H., Murray K. D., Nguyen B. K., Poppinga L., Spivak M., van Engelsdorp D., Wilkins S., Genersch E. (2013): Standard methods for american foulbrood research. *Journal of Apicultural research* **52**, 1-28

Di Pasquale G., Salignon M., Le Conte Y., Belzunces L. P., Decourtye A., Kretzschmar A., et al. (2013): Influence of pollen nutrition on honey bee health: Do pollen quality and diversity matter? *PLoS ONE* **8**(8): e72016. doi.org/10.1371/journal.pone.0072016

Dingman D. W., Stahly D. P. (1983): Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Applied and Environmental Microbiology* **46**, 860–869.

Dostálková S. (2016): *Úloha antimikrobiálních peptidů v imunitní obraně včel při infekcích bakteriálními patogeny*. Diplomová práce, Univerzita Palackého Olomouc, Česká republika

Eguaras M. J., Fuselli S., Gende L., Fritz R., Ruffinengo S. R., Clemente G., Gonzalez A., Bailac P. N., Ponzi M. I. (2005): An in vitro evaluation of *Tagetes minuta* essential oil for the control of the honeybee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, and the parasitic mite *Varroa destructor*. *Journal of Essential Oil Research* **17**, 336-340.

Erlor S., Denner A., Bobiş O., Forsgren E., Moritz R. F. A. (2014): Diversity of honey stores and their impact on pathogenic bacteria of the honeybee, *Apis mellifera*. *Ecol. Evol.* **4**, 3960-3967.

Escuredo O., Dobre I., Fernández-González M., Seijo M. C. (2014): Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chem* **149**, 84–90.

Evans J. D., Aronstein K., Chen Y. P., Hetru C., Imler J. L., Jiang H., Kanost M., Thompson G. J., Zou Z., Hultmark D. (2006): Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* **15**, 645–656.

Faostat (2016): <http://fenix.fao.org/faostat/beta/es/?#data>. Accessed Sept 2016.

Fernández N. J., Damiani N., Podaza E. A., Martucci J. F., Fasce D., Quiroz F., Meretta P. E., Quintana S., Eguaras M. J., Gende L. B. (2018): *Laurus nobilis* L. Extracts against *Paenibacillus larvae*: Antimicrobial activity, antioxidant capacity, hygienic behavior and colony strength. *Saudi Journal of Biological Sciences*, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.04.008>.

Fischer K. (1935): Neues Verfahren zur maßanalytischen Bestimmung des Wassergehaltes von Flüssigkeiten und festen Körpern". *Angew. Chem.* **48** (26), 394–396. doi:10.1002/ange.19350482605.

Fujiwara S., Imai J., Fujiwara M., Yaeshima T., Kawashima T., Kobayashi K. (1990): A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *The Journal of Biological Chemistry* **265**, 11333-11337.

Galati G., O'Brien P. J. (2004): Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anti-cancer properties. *Free Radical Biol. Med.* **37**, 287–303.

Genersch E. (2010): American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S10-S19.

Gomez-Caravaca A. M., Gomez-Romero M., Arraez-Roman D., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A. (2006): Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**, 1220-1234.

Goulson D., Nicholls E., Botías C., Rotheray E. L. (2015): Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, **347**, 1255957-1-9.

Greenwood D., Slack R. C. B., Peuthere a kol.(1999): *Lékařská mikrobiologie*. GRADA Publishing, ISBN 80-7169-365-0.

Guan J., Li S. P. (2010): Discrimination of polysaccharides from traditional Chinese medicines using saccharide mapping—Enzymatic digestion followed by chromatographic analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **51**, 590-598.

- Hajdušková J., (2006): In: *Včelí produkty očima lékaře*. Český svaz včelařů, Praha, 50.
- Halouzka R. (2014): *Vybrané metody chemické analýzy medu*. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika.
- Hodák K. (1979): Fyziologie a biochemie bakterií. UJEP Brno, Přf, 315 stran.
- Hoffman L., Maury S., Martz F. et al. (2004): Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzymeA shikimate/quininate hydroxycinnamoyltransferase affects fenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **16**, 1446-1465.
- Huang S., Zhang C. – P., Wang K., Li G. Q., Hu F. – L. (2014): Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules* **19**, 19610–19632.
- Chan Q. W. T., Cornman R. S., Birol I., Liao N. Y., Chan S. K., Docking T. R., Jackman S. D., Taylor G. A., Jones S. J. M., de Graaf D. C., Evans J. D., Foster L. J. (2011): Updated genome assembly and annotation of *Paenibacillus larvae*, the agent of American foulbrood disease of honey bees. *BMC Genomics* **12**, 450. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-12-450>
- Chen C., Chen S. Y. (1995): Changes in protein components and storage stability of royal jelly under various conditions. *Food Chemistry* **54**, 195–200.
- Chua L. S., Lee J. Y., Chan G. F. (2013): Honey protein extraction and determination by mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **405**, 3063–3074.
- Chuan L. S., Rahaman N. L. A., Sarmidi M. R., Aziz R. (2012): Multi-elemental composition and physical properties of honey samples from Malaysia. *Food Chemistry* **135**, 880-887.
- Iglesias M. T., Martin-Alvarez P. J., Polo M. C., De Lorenzo C., Gonzales M., Pueyo E. (2006): Changes in the free amino acid contents of honeys during storage at ambient temperature. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 9099-9104.
- Jeuring J., Kupperts F. (1980): High performance liquid chromatography of furfural and hydroxymethylfurfural in spirits and honey. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* **63**, 1215.
- Johnston H. W., Briggs G. G., Alexander M. (1972): Metabolism of 3-chlorobenzoic acid by a pseudomonad. *Soil Biology and Biochemistry* **4** (2), 187–190.
- Johnston K. L., Clifford M. N., Morgan L. M. (2003): Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *The American Journal of Clinical Nutrition* **78** (4), 728–733.
- Kamal M. A., Klein P. (2011): Determination of sugars in honey by liquid chromatography. *Saudi Journal of Biological Sciences* **18**, 17-21.
- Kasparavičienė G., Ramanauskienė K., Savickas A., Velžienė S., Kalvėnienė Z., Kazlauskienė D., Ragažinskienė O., Ivanauskas K. (2013): Evaluation of total phenolic content and antioxidant activity of different *Rosmarinus officinalis L. ethanolic* extracts. *Biologija* **59**, 39–44.
- Kassim M., Mouna A., Mohd Rais M., Mohd M. A., Mohd Yusoff K. (2010): Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity. *Nutrition Research* **30**, 650–659.

- Khalil M. I., Sulaiman S. A., Gan S. H. (2010): High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year. *Food and Chemical Toxicology* **48**, 2388–2392.
- Khilnani J. C., Wing H. J. (2015): Protocols to test the activity of antimicrobial peptides against the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of Microbiological Methods* **117**, 54–56.
- Kieliszek M., Piwowarek K., Kot A. M., Błażej S., Chlebowska-Śmigiel, Wolska I. (2018): Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science & Technology* **71**, 170-180.
- Klein D. (2012): Organic Chemistry (First ed.). John Wiley & Sons. p. 1159. ISBN 978-0471756149.
- Krell R. (1996): Value-added products from beekeeping. In: FAO agricultural services bulletin no.124. <http://www.fao.org/3/a-w0076e/index.html>. Accessed Sept 2016
- Kumar N., Pruthi V. (2014): Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports* **4**, 86–93.
- Kuropatnicki A. K., Szliszka E., Krol W. (2013): Historical aspects of propolis research in moderntimes. *Evid Based Complement Alternat Med* **2013**:964149
- Kwakman P. H. S., Zaat S. A. J. (2012): Antibacterial components of honey. *Life* **64**, 48–55.
- Lampeitl F. (1995). *Chováme včely: Úvod do včelaření*, 1st ed., BLESK, Ostrava, Česká republika, 173 stran.
- LeBlanc B. W., Eggleston G., Sammataro D., Cornett Ch., Dufault R., Deeby T., Cyr E. St. (2009): Formation of hydroxymethylfurfural in domestic high-fructose corn syrup and its toxicity to the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Agric. Food Chem* **57**, 7369–7376.
- Lord D. W., Scotter M. J., Whittaker A.D., Wood R. (1988): The determination of acidity, apparent reducing sugar and sucrose, hydroxymethylfurfural, mineral, moisture, waterinsoluble solids contents in honey; collaborative study. *J.Assoc. Publ. Anal.(UK)* **26**, 51-76.
- Lucchetti M. A., Kilchenmann V., Glauser G., Praz C., Kast C. (2018): Nursing protects honeybee larvae from secondary metabolites of pollen. *Proc. R. Soc. B* **285**: 20172849. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2017.2849>
- Madigan M. T., Martinko J. M., Clark D. P., Stahl D. A., (2010): *Brock biology of microorganisms*. 13th ed., Pearson Education Inc, San Francisco,USA, 1155 stran.
- Makepeace T. (1951): A new synthesis of Mescaline. *Journal of the American Chemical Society* **73** (11), 5495–5496.
- Mavric E., Wittmann S., Barth G., Henle T. (2008): Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Mol. Nutr. Food Res.* **52**, 483–489.
- Molan P. C. (1992): The antibacterial activity of honey 1: The nature of the antibacterial activity. *Bee World* **73**, 5-28.

- Nafea E. A., Nehad M. G., Enas N. D., Hajar A. S. (2014): Physicochemical and antimicrobial properties of four Egyptian honeys with references to American foul Brood disease. *Life science J.* **11**, 40-46.
- Nayik G. A., Shah T. R., Muzaffar K., Wani S. A., Gull A., Majid I. (2014). Honey: Its history and religious significance: A review. *UJP* **3**, 5-8.
- Niemetz R., Gross G. G. (2005): Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry* **66**, 2001-2011.
- Olthof M. R., Hollman P. C., Katan M. B. (2001): Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.* **131** (1), 66–71.
- Ough C. S. (1969): Rapid determination of proline in grapes and wines. *Journal of Food Science* **34**, 228-230.
- Pacheco-Palencia L. A., Mertens-Talcott S., Talcott S. T. (2008): Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from Acai (*Euterpe oleracea Mart.*). *J Agric Food Chem* **56** (12), 4631–4636.
- Panasiuk B., Skowronek W., Bienkowska M., Gerula D. (2010): Process of cleaning dead brood from cells in a honeybee colony. *Journal of Apicultural Science* **54**, 5-11.
- Pengelly A. (2004): The constituents of medicinal plants (2nd ed.). Allen & Unwin, pp. 29–30.
- Peters M., Kilwinski J., Beringhoff A., Reckling D., Genersch E. (2006): American foulbrood of the honey bee: occurrence and distribution of different genotypes of *Paenibacillus larvae* in the administrative district of Arnsberg (North Rhine-Westphalia). *J.of vet. Med. B. Infect Dis. Vet. Public Health* **53**, 100-104.
- Pietta P. G., Simonetti P., Gardana C., Brusamolino A., Morazzoni P., Bombardelli E. (1998): Catechin metabolites after intake of green tea infusions. *BioFactors* **8**, 111–118.
- Plutowska B., Chmiel T., Dymerski T., Wardencki W. A. (2011): Headspace solid-phase microextraction method development and its application in the determination of volatiles in honeys by gas chromatography. *Food Chem* **126**, 1288–1298.1
- Pourtallier J., Rognone C., Davico R. (1990): Une nouvelle technique d'analyse des sucres des miels par chromatographie liquide à haute performance. *L'Abeille de France*, n°754, 448-451.
- Pulcini P., Allegrini F., Festuccia N. (2006): Fast SPE extraction and LC-ESI-MS-MS analysis of flavonoids and phenolic acids in honey. *Apiacta* **4**, 21-27.
- Pyrzynska K., Biesaga M. (2009): Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends in Analytical Chemistry* **28**, 893-902.
- Rajalakshim D., Narasimha S. (1996): Food antioxidant: sources and methods of evaluation. In: Madhavi D. L., Deshpande S. S., Salunkhe D. K., Editors. Food antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives. New York: Marcel Dekker. 65–158.
- Rice-Evans C. (1999): Screening of phenolics and flavonoids for anti-oxidant activity. In antioxidants food supplements in human health; Packer L., Hiramatsu M., Yoshikawa T., Eds.; Academic Press: London; pp 239-253.

- Ristivojević P., Trifković J., Andrić F., Milojkovic-Opsenica D., (2015a): Poplar-type propolis: chemical composition, botanical origin and biological activity. *Nat.Prod. Commun.* **10** (11), 1869–1876.
- Rosatella A. A., Simeonov S. P., Frade R. F. M., Afonso C. A. M. (2011): 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) as a building block platform: Biological properties, synthesis and synthetic applications. *Green Chemistry* **13** (4), 754.
- Sackett W. G. (1919): Honey as a carrier of intestinal diseases. Bulletin 252, The experiment station of Fort Collins, Colorado, 3-18.
- Sagona S., Turchi B., Fratini F., Giusti M., Torracca B., Biondi C., Nuvoloni R., Cerri D., Felicioli A. (2017): Antimicrobial activity of fifteen Italian honeys against *Paenibacillus larvae* ATCC 9545. *J.of Hellenic vet. Med. Soc.* **68**, 547-556.
- Sakač N., Sak-Bosnar M. (2012): A rapid method for the determination of honey diastase activity. *Talanta* **93**, 135– 138.
- Saulnier L., Thibault J.-F. (1999): Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79** (3): 396–402.
- Schrör K. (2016): Acetylsalicylic Acid (2 ed.). John Wiley & Sons. pp. 9–10. ISBN 9783527685028.
- Sforcin J. M., Bankova V. (2011): Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J. Ethnopharmacol.* **133** (2), 253–260.
- Sies H. (1997): Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* **82**, 291–295.
- Simone-Finstrom M., Spivak M. (2010): Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* **41** (3), 295-311.
- Simone-Finstrom M., Borba R. S., Wilson M., Spivak M. (2017): Propolis counteracts some threats to honey bee health. *Insects* **8**(2), 46.
- Schmitzová J., Klaudiny J., Albert S., Schröden W., Schreckengost W., Hanes J., Júdová J., Šimúth J. (1998): A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L.. *Cellular and Molecular Life Sciences* **54**, 1020 – 1030.
- Spivak M., Reuter G. S. (2001): Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* **32**, 555-565.
- Strack D. (1997): Phenolic metabolism. In P.M. Dey and J.B. Harborne (eds), *Plant Biochemistry*. Academic Press, New York, pp. 387–416.
- Surh, Y. J. (1999): Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat. Res.* **428**, 305–327.
- Škrobal D. (1967): Chceme včelařit. In: Včelařův rok. Státní zemědělské nakladatelství Praha, Česká Republika, 137-147.

- Tajik N., Tajik M., Mack I., Enck P. (2017): The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: A comprehensive review of the literature. *European Journal of Nutrition*. PMID 28391515. doi:10.1007/s00394-017-1379-1.
- Tewari J., Irudayara J. (2004): Quantification of sacharides in multiple floral honeys using Fourier transform infrared microattenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **52**, 3237-3243.
- Tran V. H., Duke R. K., Abu-Mellal A., Duke C. C. (2012): Propolis with high flavonoid content collected by honey bees from *Acaia paradoxa*. *Phytochemistry*, **81**, 126-132.
- Tryon, R. C. (1939): Cluster Analysis: Correlation Profile and Orthometric (Factor) Analysis for the Isolation of Unities in Mind and Personality. Edwards Brothers, Ann Arbor.
- Tzagoloff A. (1963): Metabolism of sinapine in mustard plants. I. Degradation of sinapine into sinapic acid & choline. *Plant Physiology* **38** (2), 202–206.
- Vezeteu T. V., Bobis O., Moritz R. F., Buttstedt A. (2016): Food to some, poison to others- honeybee royal jelly and its growth inhibiting effect on European Foulbrood bacteria. *Microbiology Open* **6**, 1-7.
- Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J. and Pérez-Alvarez J.A. (2008): Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of food science* **73**, 117-124.
- Votava M. (2000): *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. Hortus, Brno, Česká republika, ISBN 80-238-5058-X.
- Votava M., Růžička F., Woznicová V., Černohorská L., Dvořáčková M., Dvořáková Heroldová M., Holá V., Zahradníček O. (2010): *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Neptun, Brno, Česká republika, 495 stran.
- Wahdan H. A. L. (1998): Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection* **26**, 26-31.
- Waś E., Rybak-Chmielewska H., Szczęśna T., Kachaniuk K., Teper D. (2011): Characteristics of Polish unifloral honeys. III. Heather honey (*Calluna vulgaris* L.). *J. Apic. Sci.* **55**, 129–137.
- Waś E., Szczęśna T., Rybak-Chmielewska H., Teper D., Jaśkiewicz K. (2017): Application of HPLC-DAD technique for determination of phenolic compounds in bee pollen loads. *J. APIC. SCI.* **61**, 153–162.
- Wedmore E. B. (1955): The accurate determination of the water content of honeys. *Bee World* **36**, 197-206.
- White J. W., Subers M. H., Schepartz A. I. (1963): The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose oxidase system. *Biochim. Biophys. Acta* **73**, 57–70.
- White J. W. (1979): Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* **62**, 509.
- Williams D. L. (2000): A veterinary approach to the European honey bee (*Apis mellifera*). *Vet. J.* **160**, 61-73.

Yao L. H., Jiang Y. M., Shi J., Tomás-Barberán F. A., Datta N., Singanusong, R., Chen S. S. (2004): Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition* **59**, 113-122.

Yue D., Nordhoff M., Wieler L. H., Genersh E. (2008): Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology* **10**, 1612-1620.

Zweitering M. H., Jongenburger I., Rombouts F. M., van 't Riet K. (1990): Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and environmental microbiology* **56**, 1875 – 1881.

Internetové odkazy:

<http://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf> (20.4.2018)

https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_gallov%C3%A1 (15.5.2018)

https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_sko%C5%99icov%C3%A1 (16.5.2018)

<http://www.ceskamedoteka.cz/articles/med> (21.6.2018)

http://www.ach.upol.cz/user-files/files/Jodometricke_stanoveni_vody_KF.pdf (29.4.2018)

http://www.statsoft.cz/file1/PDF/newsletter/2014_10_08_StatSoft_Shlukovani_podobnych_v_softwaru_statistica.pdf (28.8.2018)

13**SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

AFB	american foulbrood (mor včelího plodu)
AmPs	antimikrobiální peptidy
ATP	adenosintrifosfát
BA2H	benzoát-2-hydroxylasa
C4H	cinnamát-4-hydroxylasa
COMT-1	O-methyltransferasa kyseliny kávové nebo 5-hydroxyferulové
DMSO	dimethylsulfoxid
F5H	ferulát-5-hydroxylasa
HEAE	ethylacetátový extrakt
HME	methanolvý extrakt
HMF	hydroxymethylfurfural
HPLC	high-performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
K ₂ HPO ₄	hydrogenfosforečnan disodný
MeOH	methanol
MGO	methylglyoxal
MIC	minimální inhibiční koncentrace (konstanta)
MRJP	major royal jelly protein
OD	optical density (optická hustota)
PAL	fenylalaninamoniaklyasa
TTC	tetracyklin
UHPLC	ultra high performance liquid chromatography (ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie)