

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



**Proteomická analýza antimikrobiálních účinků terpenů
pomocí MALDI-TOF**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Linda Nezbedová

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: doc. Ing. Pavel Klouček, Ph.D.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Proteomická analýza antimikrobiálních účinků terpenů pomocí MALDI-TOF" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. 4. 2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Pavlovi Kloučkovi, Ph.D. za odborné vedení a lidský přístup. Mé velké poděkování patří také Ing. Matějovi Božíkovi za cenné rady, věcné připomínky a čas, který mi věnoval při vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Pavlovi Cejnarovi za vyhodnocení dat.

Proteomická analýza antimikrobiálních účinků terpenů pomocí MALDI-TOF

Souhrn

Antimikrobiální aktivita složek silic, je známa od pradávna, mechanismus jejich antibakteriálního účinku byl však objasněn teprve nedávno; tyto látky způsobují rozsáhlé změny na buněčné membráně: ovlivňují propustnost membrány, porušují lipidovou dvojvrstvu a podmiňují změny v syntéze proteinů. Právě syntéza proteinů způsobená stresem podmíněným antibakteriální látkou je neprozkoumanou oblastí a dosud bylo publikováno jen několik studií zabývajících se touto problematikou.

Tato diplomová práce se zabývá identifikací nízkomolekulárních proteinů vytvořených po ošetření buněk *E. coli* K-12 různými složkami silic, převážně terpeny. Pro všechny složky silic byla nejprve mikrodiluční metodou stanovena minimální inhibiční koncentrace. Ze všech 42 testovaných složek silic významnou antibakteriální aktivitu prokazovalo pouze 12 složek v různých MIC pohybujících se v rozmezí od 256 mg/L do 2048 mg/L. Tyto složky silic spolu s antibiotikem tetracyklin, peroxidem vodíku a chlornanem sodným, byly následně použity k ošetření buněk *E.coli* pro analýzu stresové reakce. Pro samotnou analýzu proteinů byla využita metoda MALDI-TOF, což je efektivní a rychlá metoda, která v proteomické analýze představuje metodu první volby. Velké množství získaných dat bylo poté statisticky vyhodnoceno analýzou hlavních komponent.

Výsledky experimentu potvrdily vliv terpenů a ostatních složek silic na tvorbu nízkomolekulárních proteinů *E. coli* K-12. Z 297 naměřených m/z jsme identifikovali 94 různých proteinů s odlišnými vlastnostmi a funkcemi. Mezi identifikovanými proteiny byly ribozomální proteiny; membránové proteiny; stresové proteiny; proteiny, které ovlivňují rezistenci bakteriálních buněk vůči antibiotikům; ale také proteiny podílející se na tvorbě biofilmu. Dále byla zjištěna významná podobnost mezi složkami silic navzájem (např. karvakrolu, karvonu a karvomentenolu nebo citronellolu a citralu), a mezi některými složkami silic a komerčně užívanými antibakteriálními látkami, konkrétně guajakolu a tetracyklinu. Této synergie by mohlo být využito v boji proti rezistenci bakteriálních buněk vůči antibiotikům a dezinfekčním prostředkům. Získané poznatky mohou posloužit dalšímu výzkumu.

Klíčová slova: proteomika, proteiny, silice, terpeny, antibakteriální, MALDI-TOF

MALDI-TOF proteomic analysis of antimicrobial effect of terpenes

Summary

Antimicrobial activity of essential oils components has been known for many years, but the mode of their antibacterial action has been clarified recently; these substances cause many changes in the cell membrane structure: affect membrane permeability, break lipid bilayer and affect changes in protein synthesis. Only few studies have been published in the area of the protein synthesis induced by stress after cell treatment with antibacterial agent.

The aim of this study was to identify low molecular weight proteins synthesized after treatment of *E. coli* K-12 cells with various components of essential oils, mainly terpenes. By using microdilution method was first determined a minimum inhibitory concentration for all tested components. From 42 tested essential oils components only 12 components showed significant antibacterial activity in different MIC ranging from 256 mg/L to 2048 mg/L. This components plus antibiotic tetracycline, hydrogen peroxide and sodium hypochloride, were used for *E. coli* cells treatment in stress response analysis. For the analysis of proteins, the MALDI-TOF was used, this method is efficient and fast and represents a first choice method in proteomics. The large amount of obtained data was statistically evaluated by principal component analysis.

In the experiment we proved the effect of terpenes and other essential oils components on the low molecular weight proteins production by *E. coli* K-12. From 297 measured m/z we were able to identify 94 different proteins with different properties and functions. Identified proteins include ribosomal proteins; membrane proteins; stress proteins; proteins that affect the resistance of bacterial cells to antibiotics; also proteins involved in biofilm formation. Furthermore we have found significant synergy in protein profiles for some essential oils components (carvacrol, carene and carvomenthenol or citral and citronellol) and synergy of some essential oils components with commercially used antibacterial agents, particularly guaiacol and tetracycline This synergy could be used to combat the resistance of bacterial cells to antibiotics and disinfectants. The obtained results can help in further research.

Keywords: proteomics, proteins, essential oils, terpenes, antibacterial, MALDI-TOF

Obsah

1 ÚVOD	8
2 VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE	9
3 LITERÁRNÍ REŠERŠE	10
3.1 Terpeny	10
3.1.1 Vlastnosti a zástupci terpenů	12
3.1.2 Antimikrobiální účinky terpenů.....	16
3.2 Proteomika	18
3.3 Hmotnostní spektrometrie.....	19
3.3.1 Hmotnostní spektrometrie v proteomice.....	21
3.3.2 MALDI – TOF hmotnostní spektrometrie.....	22
3.3.3 Příprava vzorků pro identifikaci bakteriálních proteinů pomocí MALDI TOF	25
4 MATERIÁL A METODIKA	29
4.1 Složky silice	29
4.2 Kultivační metoda	30
4.3 Stanovení minimální inhibiční koncentrace.....	30
4.4 Analýza stresové reakce	31
4.4.1 Ošetření buněk E. coli složkami silice.....	31
4.4.2 Příprava vzorků pro identifikaci na MALDI TOF	32
4.4.3 MALDI TOF analýza.....	33
4.5 Statistické vyhodnocení	34
5 VÝSLEDKY	35
5.1 Vyhodnocení MIC.....	35
5.2 Vyhodnocení stresové reakce.....	36
5.3 Identifikace proteinů	37

6 DISKUZE.....	39
7 ZÁVĚR.....	43
8 SEZNAM LITERATURY	44
9 SEZNAM ZKRATEK.....	57
10 SEZNAM OBRÁZKŮ	58
11 SEZNAM TABULEK	59
12 PŘÍLOHY	59

1 Úvod

Silice jsou sekundární metabolity rostlin. Složky silic jsou chemické látky s různými chemickými vlastnostmi, hlavní složkou většiny silic jsou terpeny. Terpeny plní v rostlinách mnohé biologické a ekochemické funkce; lákají opylovače, chrání rostliny před predátory a škůdci a umožňují komunikaci mezi rostlinami. Pro člověka je jejich hlavním přínosem nejen vůně, pro kterou se hojně využívají v kosmetickém průmyslu, ale také jejich antimikrobiální aktivita. Mechanismus antibakteriálního účinku silic byl předmětem mnoha studií, v současné době je přičítán schopnosti silic ovlivňovat vlastnosti buněčné membrány. Jedním z projevů reakce bakteriální buňky na antibakteriální látku je změna v syntéze proteinů a produkce různých druhů stresových proteinů. Studium proteinů, jejich funkcí, vlastností a struktury se zabývá obor proteomika. Jednou z možností identifikace proteinů je analýza hmotnostního spektra bílkovinného vzorku různými metodami, v současné době se za tímto účelem hojně využívá moderní metoda MALDI-TOF. Tato metoda nevyžaduje složitou přípravu vzorku, je rychlá a šetrná. Analýza proteinů vytvořených vlivem stresové reakce po působení antibakteriální látky může přispět k pochopení mechanismu antibakteriálního účinku látek a může dopomoci k rozvoji nových strategií boje v rezistenci bakterií vůči antibakteriálním látkám.

2 Vědecká hypotéza a cíl práce

Vědecká hypotéza:

Terpeny, jakožto hlavní složky silic, mají významný vliv na mikrobiální proteom a ovlivňují syntézu některých nízkomolekulárních proteinů v bakteriálních buňkách. Tyto změny v proteomu mohou být detekovány metodou MALDI-TOF.

Cíl práce:

Cílem této práce je pomocí MALDI-TOF identifikovat změny v proteinových spektrech *Escherichia coli* vzniklé vlivem stresové reakce, vyvolané působením různých druhů terpenů a ostatních složek obsažených v silicích.

3 Literární rešerše

3.1 Terpeny

Esenciální oleje, v českém jazyce silice (Pleváčová, 1960), jsou přírodní látky rostlin, složené ze široké škály chemicky odlišných látek, hlavní součástí silic jsou však terpeny (Burt, 2004). Pojem esenciální oleje pochází ze 16. století, kdy švédský lékař Paracelsus von Hohenheim poprvé pojmenoval účinnou látku rostliny *Quinta essentia*. Silice se získávají metodou destilace, destilace jako metoda produkce silic byla poprvé použita na východě (Egypt, Indie a Persie) před více než 2000 lety, v 9. století byla zlepšena Araby (Guenther, 1952).

Termín terpen pochází ze slova terpentýn. Terpentýn, název odvozený z latinského *balsamum terebinthinae*, je příjemně vonící balzám, který se nachází ve dřevě několika druhů borovic (*Pinaceae*) a hlavní součástí tohoto oleje jsou terpeny. Terpeny jsou přírodní sloučeniny vytvořené z izoprenových jednotek, syntetizované jako sekundární metabolity rostlinami (Nerio et al., 2010), ale i některými živočichy a houbami (Gross et König, 2006; Cimmino et al., 2014). Terpeny jsou jednou z nejpočetnějších skupin přírodních látek, v současné době je popsáno přibližně 15 tisíc terpenů. Tyto lipofilní látky mohou být syntetizovány všemi rostlinnými orgány, tj. pupeny, květy, listy, stonky, semeny, plody, kořeny, dřevem nebo kůrou a hromadí se v sekrečních buňkách, kanálcích, epidermálních buňkách nebo žlázových trichomech (Bakkali et al., 2008). Terpeny jsou také významnou složkou rostlinných pryskyřic. Terpeny ovlivňují vlastnosti rostliny, ve které jsou přítomny a ovlivňují vůni a chuť (Seigler, 1998; Loza-Tavera, 1999).

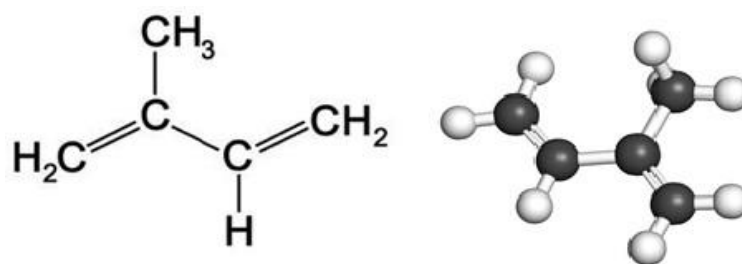
Nejprve byly terpeny považovány a další sekundární metabolity považovány za odpadní produkty rostlinného metabolismu, nemající žádnou biologickou funkci, pozdější výzkum terpenů však prokázal, že se terpeny v rostlinách podílejí na různých biochemických procesech, a kromě toho mají různé biologické a ekochemické funkce. Mnoho rostlin produkuje terpeny, aby přilákaly specifický hmyz pro opylení (atraktanty) (Kleinhentz et al., 1999), jako obranu před škůdci a predátory (repelenty) (Habermehl et Fliegner, 1997), některé terpeny jsou ve vysokých koncentracích toxické, což také napomáhá ochraně proti predátorům (Coats et al., 1991). V neposlední řadě mají terpeny důležitou roli jako signální sloučeniny a regulátory růstu (fytohormony) rostlin (Urbanová et al., 2011). Kromě výše zmiňovaných biologických funkcí mají terpeny také řadu pozitivních vlivů na zdraví člověka, mají chemoprotektivní efekt na vznik rakoviny, antimikrobiální a antifungální efekt, působí

jako antivirotika, působí na hladinu hyperglykemie a v neposlední řadě mají protizánětlivý a antiparazitický efekt (Breitmaier, 2006; Paduch et al., 2007). V posledních letech je středem zájmu jejich vliv na propustnost membrán a využití terpenů jako součást léčiv podporující vstřebávání léku kůží (Furuishi et al., 2013).

Terpeny jsou velkou a různorodou skupinou uhlovodíků. Základní stavební jednotkou je izopren s pěti uhlíky (sumární vzorec C_5H_8 , Obrázek č. 1), působením různých enzymů se mění jejich funkce a stupeň oxidace (Tidgewell et al., 2010). Vzorec terpenových uhlovodíků je tedy $(C_5H_8)_n$, kde n je počet izoprenových jednotek. Strukturu terpenů objasnil Otto Wallach v roce 1887 a zavedl tzv. izoprenové pravidlo, podle kterého je většina terpenů tvořena spojením izoprenových jednotek. Na základě toho klasifikoval terpeny do skupin podle počtu izoprenových jednotek (Silvestre et Gandini, 2008; Aldred et al., 2009):

- 1) Hemiterpeny, které mají jednu izoprenovou jednotku a 5 atomů uhlíku.
- 2) Monoterpeny, které mají dvě izoprenové jednotky a 10 atomů uhlíku.
- 3) Seskviterpeny, které mají 3 izoprenové jednotky a 15 atomů uhlíku.
- 4) Diterpeny, které mají 4 izoprenové jednotky a 20 atomů uhlíku.
- 5) Triterpeny, které mají 6 izoprenových jednotek a 30 atomů uhlíku.
- 6) Tetraterpeny, které mají 8 izoprenových jednotek a 40 atomů uhlíku.

Empirické izoprenové pravidlo je vhodné pro zařazení terpenů do skupin, ovšem existují výjimky napříč celou skupinou, toto pravidlo o 30 let později zdokonalil Robinson, který zjistil, že uspořádání izoprenových skupin terpenů je téměř vždy od hlavy k ocasu (head-to-tail) (Banthorpe et al., 1972), později bylo zjištěno, že vyšší terpeny a některé monoterpeny toto pravidlo nespĺňují nemají head-to-tail uspořádání, proto bylo pravidlo v 50. letech minulého století upraveno Leopoldem Růžičkou, který formuloval tzv. biogenetické izoprenové pravidlo, popisující, že terpeny mohou být tvořeny kondenzací, cyklizací a přeskupením definovaného počtu hypotetických prekurzorů, které mají společnou biosyntetickou dráhu, jako je např. geraniol, farnesol, geranylgeraniol a skvalen (Ruzicka, 1953; Silvestre et Gandini, 2008).



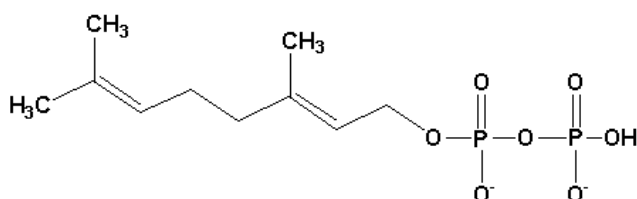
Obrázek č. 1: Chemická struktura izoprenové jednotky a její trojrozměrné zobrazení

3.1.1 Vlastnosti a zástupci terpenů

Jak již bylo zmíněno, terpeny jsou velká skupina látek, proto se liší i ve svých fyzikálních, chemických a biologických vlastnostech.

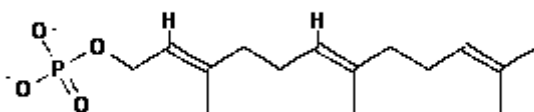
V současné době je známo přibližně tisíc druhů monoterpenů. Monoterpeny mají antibakteriální, sedativní, protinádorové, cytotoxické, protizánětlivé a insekticidní účinky, pro jejich léčivé účinky a vůni jsou důležitou součástí léčiv a kosmetických výrobků. V rostlinách se vyskytují nejčastěji volné (nevázané), ale mohou být i vázané např. v glykosidech, pokud jsou vázané, ztrácejí svou těkavost (Seigler, 1998). Prekurzorem většiny druhů monoterpenů je geranylpyrofosfát (GPP) (Obrázek č. 2), monoterpeny jsou syntetizovány enzymem monoterpen syntázou. Je známo třicet druhů možných strukturních uspořádání monoterpenů a mohou být rozděleny na monocyklické a bicyklické formy, které vznikají cyklizací GPP, a formy acyklické. U monocyklických forem je známo více než deset strukturních uspořádání. Velkou skupinou jsou iridoidy, tento druh monoterpenů je hojně zastoupen ve dvouděložných rostlinách, často vázaný v glykosidech. Jsou to významné chemotaxonomické markery a mají různé biologické účinky, existují studie potvrzující, že některé skupiny iridoidů působí proti hepatitidě typu C (Dev, 1989; Zhang et al., 2011). Typickým příkladem struktury acyklických monoterpenů je linalool a citronellol (Dev, 1989); β -myrcen a jeho izomer β -ocimen jsou součástí silic bazalky (*Ocimum basilicum*), chmele (*Humulus lupulus*), pomerančovníku hořkého (*Citrus vulgaris*) aj. (Breitmaier, 2006), známým zástupcem této skupiny je také citral vyskytující se v citronové trávě (Katsukawa et al., 2010). Velmi rozšířeným zástupcem monocyklických monoterpenů je limonen, který je obsažen v silicích citrusů (Sun, 2007); mentol je zase nejvíce obsažen v mnoha druzích máty (*Mentha canadensis*, *Mentha piperita*) (Kamatou et al., 2013), dále karvakrol a jeho izomer tymol vyskytující se v dobromysli (*Origanum vulgare*), mateřídoušce (*Thymus* spp.), saturejce (*Satureja montana*), mají významný antiseptický efekt (Can Baser, 2008). Do skupiny bicyklických monoterpenů patří α -pinen, který je obsažen v silici borovice (*Pinus*) a jiných jehličnanů (Yang et al., 2016); eukalyptol, neboli 1,8-cyneol, se vyskytuje v *Eucalyptus cinerea*, rozmarýnu (*Rosmarinus*

officinalis) aj. (Tripathi et Mishra, 2016); dalším zástupcem je thujon izolovaný z pelyňku (*Artemisia vulgaris*) (Chan et Lin, 2010).



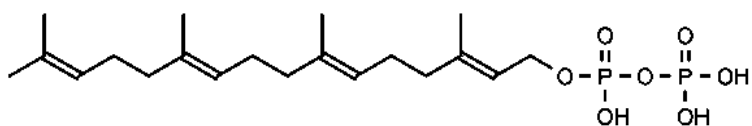
Obrázek č. 2: Strukturální vzorec geranyl pyrofosfátu.

Seskviterpeny v porovnání s monoterpeny nejsou tolik těkavé, ale vykazují větší stereochemickou rozmanitost a mají silnější vůni. Prekurzorem seskviterpenů je farnesyl fosfát (Obrázek č. 3). Seskviterpeny jsou velmi různorodá skupina, dělí se do několika tříd na základě jejich acyklické a cyklické povahy. Kromě jednoduchého farnesanu a některých nepravidelných acyklických seskviterpenoidů, má většina cyklickou strukturu. Cyklické seskviterpeny jsou nejčastěji monocyklické, bicyklické nebo tricyklické. Seskviterpeny v průběhu času oxidují na seskviterpenoly (Awouafack et al., 2013; Buckle, 2015). Například chamuzalen, jeden z nejvíce protizánětlivých seskviterpenů, má pouze 14 uhlíků, i přesto se řadí mezi seskviterpeny. Chamuzalen a karyofylen mají silnou antioxidační aktivitu a působí proti vzniku nádorů. Chamuzalen se nachází v heřmánku pravém (*Matricaria chamomilla*) (Buckle, 2015), karyofylen je nejvíce zastoupen v černém pepři, ale velké množství je ho také v hřebíčku, rozmarýnu, chmelu a konopí (Hartsel et al., 2016). V černém pepři a v heřmánku pravém je také zastoupen α -bisabolen (Buckle, 2015). Seskviterpenový lakton artemisin izolovaný z pelyňku (*Artemisia annua*), se využívá jako antimalarikum (Webster et Lehnert, 1994). Humulen, zastoupený hlavně v chmelu (*Humulus lupulus*), má protizánětlivou aktivitu (Hartsel et al., 2016) a také se podílí na typické chuti a vůni piva (Verhagen, 2010). V zázvoru (*Zingiber officinale*) je zastoupen gingerol, který působí cytotoxicky proti nádorovým buňkám, ale má také antibakteriální efekt (Mbaveng et Kuete, 2017).



Obrázek č. 3: Strukturální vzorec farnesyl fosfátu (PubChem, 2016).

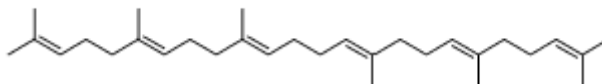
Prekurzorem diterpenů je geranylgeranyl difosfát (GGDP) (Obrázek č. 4). Mohou být rozděleny do čtyř skupin na základě kombinace dvou základních typů cyklizačního procesu: typ A, typ B, typ A typu B a typ B typu A. Strukturní a funkční rozmanitost je způsobena různými funkcemi diterpenových enzymů způsobujících cyklizaci a chemickou modifikaci (Toyomasu et Sassa, 2010). Diterpeny mohou být také rozděleny podle počtu cyklů (acyklické, bicyklické, tricyklické, tetracyklické a makrocyclické diterpeny) (De Oliveira et al., 2008). Jsou to látky s vysokým bodem varu složené z velkých molekul. V rostlinách jsou obsaženy hlavně v pryskyřicích, vyskytují se v polyoxygenované formě s keto a hydroxylovými skupinami, esterifikované alifatickými nebo aromatickými kyselinami (Buckle, 2015). Někteří zástupci působí proti vzniku kardiovaskulárních chorob, např. marrubenol z jablečnicku (*Marrubium vulgare*), eleganolon, forskolin (De Oliveira et al., 2008), tansinon ze šalvěže (*Salvia* spp.) (Aldred et al., 2009). V zrních kávy přítomný kafestol a kahweol zase mají antikancerogenní efekt (Nkondjock, 2009). Steviosid neboli steviol glykosid pocházející ze stévie (*Stevia* spp.) má uplatnění v potravinářském průmyslu jako sladidlo, ale také byl prokázán jeho efekt na snížení krevního tlaku (Chan et al., 2012), ferriginol z *Podocarpus ferrugineus*, resin a enmein z *Isodon trichocarpus* vykazují antibakteriální a fungicidní efekt (Lanzotti, 2013). Ginkgolidy izolované ze stromu *Ginkgo biloba* mají hemoreologický účinek, působí jako antagonisté faktoru aktivujícího krevní destičky (platelet-activating factor, PAF), kromě toho mají také antioxidační a neuroprotektivní efekt (Cragg et al., 2010).



Obrázek č. 4: Strukturní vzorec geranylgeranyl difosfátu

Prekurzorem triterpenů je skvalen (Obrázek č. 5), který je syntetizován ze dvou molekul farnesyl difosfátu. Nejvíce se vyskytují triterpeny v cyklické formě s 1–5 cykly (Muranaka et Saito, 2010). Mezi nejčastější cyklické formy patří triterpeny steroidní (tetracyklické triterpeny a saponiny) a pentacyklické triterpeny. Pokud jsou triterpeny součástí glykosidů nazývají se saponiny. Triterpeny jsou jednou z největších tříd rostlinných přírodních produktů s více než 20 tisíci známých zástupců. Jednoduché triterpeny jsou

komponenty povrchových vosků a membrán a mohou působit jako signální molekuly, zatímco komplexní saponiny poskytují ochranu proti patogenům a škůdcům (Aldred et al., 2009; Thimmappa et al., 2014). Rozšířeným triterpenem je lupeol, který je zastoupený v mangu, olivách, jahodách a hroznech vinné révy, tento triterpen vykazuje širokou škálu účinků, působí protizánětlivě, proti vzniku artritidy a nádorů a má chemoprotektivní účinky (Wal et al., 2011). α a β -amyrin z rostlin čeledi *Burseraceae* mají antibakteriální, fungicidní efekt a protizánětlivý efekt (Hernandez et al., 2012). Glycyrrhizin se nachází v kořenu lékořice (*Glycyrrhiza glabra*), tento triterpenový glykosid má antiulcerózní, protizánětlivý, antivirový, antikaryogenní a antispasmodický efekt, kromě toho se využívá v potravinářském průmyslu pro jeho typickou chuť a také jako sladidlo (Glória, 2003). Mezi triterpenické glykosidy patří také ginsenosidy, které jsou obsaženy v kořeni ženšenu (*Panax ginseng*), tyto saponiny mají hepatoprotektivní efekt (Silva et al., 2016), snižují hladinu krevního tlaku (Yang et Wu, 2016), dále mají neuroprotektivní, protizánětlivý a imunologický efekt (Khan et al., 2015). Betulinová kyselina, pentacyklický triterpen přítomný v kůře mnoha druhů stromů, vykazuje protirakovinný efekt a působí proti stárnutí (Gill et al., 2016). Kukurbitacin izolovaný z rostlin čeledi Tykvovité (*Cucurbitaceae*) působí proti rakovině a využívá se k léčbě jater (Izawa et al., 2010). Celastrol pocházející z tradičních čínských léčivých rostlin, má protizánětlivé, antioxidační a protirakovinné účinky (Venkatesha et Moudgil, 2016).



Obrázek č. 5: Strukturní vzorec skvalenu.

Prekurzorem tetraterpenů je geranylgeranyl pyrofosfát. Existuje jen málo druhů tetraterpenů, největší skupinou jsou karotenoidy (Rodríguez-Concepción, 2014). Karotenoidy mohou být rozděleny na karoteny (např. β -karoten, lykopen) a na xantofyly (např. lutein, kryptoxanthin). Všechny karotenoidy jsou velmi lipofilní a vykazují velmi nízkou rozpustnost ve vodě (Boysen et Hearn, 2010). Karotenoidy mají významný efekt v prevenci běžných chronických onemocnění, působí jako antioxidanty a působí proti vzniku rakoviny. β -karoten a β -kryptoxanthin, jsou dobře známé jako provitaminy vitamínu A. (Miyashita et Hosokawa, 2014). Smíšené karotenoidy mohou být izolovány z řas, β -karoten z palmového oleje, lutein

a estery luteinu z rostlin rodu *Calendula*, lykopen z rajčat a kryptoxantin z citrusů a tropického ovoce (Astley, 2003).

3.1.2 Antimikrobiální účinky terpenů

Antimikrobiální vlastnosti aromatických a léčivých rostlin a jejich silic byly známy již od starověku, první laboratorní pokusy charakterizující tyto vlastnosti se objevují počátkem 19. století, kdy Martindale (1910) ve své publikaci uvedl, že součástí silic jsou z největší části terpeny. Od této doby bylo publikováno mnoho výzkumů, označujících terpeny za chemické látky odpovědné za léčivé, chuťové a vonné vlastnosti rostlin (Dorman et Deans, 2000). Terpeny jsou účinné proti bakteriím, houbám a některým druhům prvoků, přičemž bylo zjištěno, že 60 % terpenů inhibuje houby, zatímco 30 % inhibuje spíše bakterie (Cowan, 1999). Studie ukazují, že oxidované formy terpenů (alkoholové a fenolové terpeny) a terpeny s aromatickými jádry mají vyšší inhibiční aktivitu než ostatní druhy terpenů, a to nejspíš kvůli schopnosti tvorby vodíkových vazeb s aktivními místy cílových enzymů. Mechanismus antibakteriálního účinku terpenů není zcela objasněn, ale ve většině studií je přičítán lipofilnímu charakteru terpenů. Terpeny se naváží na buněčnou membránu buňky, výsledkem je porušení lipidové frakce buněčné membrány mikroorganismů, což vede ke změně propustnosti, k úniku intracelulárních struktur (ATP), narušení membránově vázaných proteinů a změnám syntézy proteinů, inhibici dýchání a změně iontových transportních procesů (Zengin et Baysal, 2014; Trombetta et al., 2005). Sirolì et al. (2015) ve své studii prokázal antibakteriální aktivitu tymolu, karvakrolu a citralu (v subletálních koncentracích), způsobujících modifikaci složení mastných kyselin buněčné membrány bakterií *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* během jejich růstu. Antibakteriální aktivitu terpenů potvrdila ve své studii také Burt et al. (2007), zkoumali změny v syntéze proteinů bakterií *E.coli* po působení subletální dávky tymolu a karvakrolu. Přítomnost těchto dvou terpenů výrazně zvýšila produkci HSP 60 proteinu (heat-shock protein). Tento protein tepelného šoku a ostatní stresové proteiny bakterie produkují po vystavení stresu způsobeného toxickou látkou nebo vystavení různým fyzikálně-chemickým faktorům (Arsène et al., 2000).

V současné době roste zájem potravinářského průmyslu o přírodní antibakteriální látky, jakožto vhodné alternativy k chemickým prostředkům, z tohoto důvodu se zvyšuje počet studií zabývajících se použitím silic ke konzervaci potravin (Hyltdgaard et al., 2012; Tongnuanchan et Benjakul, 2014; Adelakun et al., 2016) a k ošetření a dezinfekci (Bouaziz et al., 2009; Deans et Ritchie, 1987; Delaquis, 2002). Terpeny tymol a karvakrol jsou užitečné pro inaktivaci významných potravinářských patogenů jako je *Listeria monocytogenes* (Aureli

et al., 1992), *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., *Shigella sonnei* (Gallucci et al., 2009). Wan et al (1998) prokázal, že silice bazalky obsahující linalool, aplikovaná na list salátu, má stejný dezinfekční účinek jako 125 ppm chloru, proto by mohly být silice bazalky a jiných rostlin vhodnou alternativou k čištění zeleniny. Dlouhodobým problémem v potravinářství je tvorba bakteriálního biofilmu v potravinářském provozu a rezistence přítomných bakterií na čisticí prostředky. Oliveira et al. (2010) ve své studii prokázal dezinfekční efekt silic z rostliny *Cymbopogon citratus*, jejichž hlavními komponenty jsou monoterpeny geranial a neral, na biofilm tvořený bakterií *Listeria monocytogenes*.

Antibakteriální aktivity terpenů se využívá také v medicíně a farmacii. Je známo, že grampozitivní bakterie jsou více senzitivní na účinky terpenů než bakterie gramnegativní. Monoterpeny terpinen-4-ol, α -terpineol, eukalyptol a linalool vykazují antibakteriální aktivitu proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím izolovaných z kůže, dutiny ústní a dýchacího ústrojí (Paduch et al., 2007). *Staphylococcus aureus* je velmi často rezistentní vůči antibiotikům, proto se použití silic jeví jako možný prostředek k vyřešení této problematiky. Bylo zjištěno, že nejvíce je *Staphylococcus aureus* senzitivní na působení terpenů farnesol, nerolidol a plaunotol (Inoue et al., 2004). Terpeny přítomné v tea tree oleji narušují membránu *Staphylococcus aureus* a tím napomáhají snadnějšímu průchodu antibiotik do bakteriální buňky (Carson et al., 2002). Eugenol, α a β pinen inhibují růst gram pozitivních bakterií způsobujících infekční endokarditidu (Leite et al., 2007). Kyselina betulínová má mnohé účinky, ale v posledních letech je středem pozornosti její schopnost inhibovat virus HIV (Aiken et Chen, 2005).

Terpeny působí také proti plísním a kvasinkám. Terpeny přítomné v citrusech (limonen, β -pinen, citral) působí proti *Saccharomyces cerevisiae* (Belletti et al., 2004). Proti *Saccharomyces cerevisiae* působí také karvon, který navíc působí i proti *Aspergillus niger* (Hassan et al., 2017) a *Candida albicans* (Decarvalho et Dafonseca, 2006). Kvasinka *Candida albicans* je jedním z nejčastějších lidských patogenů a způsobuje různorodé infekční onemocnění, kromě výše zmíněného inhibuje její aktivitu také karvakrol, geraniol a tymol (Dalleau et al., 2008). Široké spektrum plísní inhibuje mentol a cineol (Pattnaik et al., 1997). Nevýhodou využití terpenů proti houbám a kvasinkám je potřeba vysoké dávky terpenů. Z tohoto důvodu může docházet k vážným vedlejším účinkům. Nicméně terpeny mohou sloužit jako doplňkové látky, které by mohly zlepšit standartní konvenční antifungální léčbu (Paduch et al., 2007).

3.2 Proteomika

Proteiny jsou důležité biomolekuly v živém organismu, studiem proteinů se zabývá obor proteomika. Termín proteomika byl poprvé definován v roce 1995 jako analýza celého proteinového komplementu buňky, tkáně nebo organismu za specifických, definovaných podmínek (Graves et Haystead, 2002; Shah et Misra, 2011). Podle Lieblera (2002) je proteomika studium proteomu (proteinový a peptidový komplement buňky, orgánu nebo organismu, včetně všech izoform a posttranslačních variant). Zabývá se studiem proteinových systémů, ve kterých se zaměřuje na interakce mezi proteiny a na jejich funkce. Proteomika může být také definována jako přímá kvalitativní a kvantitativní analýza souboru proteinů v organismu, tkáni, buňce. Výhoda proteomické analýzy spočívá v tom, že zkoumá přímo biopolymery a jejich soustavy, tedy látky, které jsou nejvíce zodpovědné za fungování systému (Ferguson et Smith, 2003).

Poznatky získané díky proteomice se využívají např. v biochemii, genetice a molekulární biologii, imunologii, mikrobiologii, farmacii, medicíně, potravinářství a neurovědách. Proteomika napomáhá porozumět adaptaci buněk na signály z vnějšího prostředí, mechanismu buněčné diferenciaci a vývoji organismů, buněčným aspektům chorobných procesů (exprese proteinů, biomarkery), buněčné reakci na stárnutí a napomáhá zjistit rozdíly mezi jedinci uvnitř jednoho druhu (Garrels, 2001). Nejběžnějším typem proteomických studií jsou studie zabývající se kvantitativním porovnáním profilu proteinů, tyto studie se zaměřují na porovnání proteinů v kontrolní buňce a analyzované buňce nebo tkáni, nebo zkoumají podněty na environmentální podněty a stres (Aebersold et Mann, 2003). Dalším častým typem proteomických studií jsou studie zabývající se interakcemi mezi proteiny, tyto studie často doplňují předcházející kvantitativní studie profilu proteinů. Třetí typ proteomické analýzy zahrnuje identifikaci a detekci co největšího počtu bílkovinných složek v jednoduchém až středně složitým proteomu nebo sub-proteomu. Jako příklad lze uvést proteiny buněčné stěny. (Ali-Khan et al., 2001).

Garrels (2001) datuje počátek proteomiky do poloviny 70. let 20. století, kdy byla poprvé použita metoda separace proteinů pomocí 2 D (dvojrozměrné) gelové elektroforézy. Pro separaci a izolaci proteinů se stále využívá metody 2 D elektroforézy, ale také 1 D gelové elektroforézy. Jednou z prvních metod pro identifikaci proteinů byla metoda Edmanova sekvenování, použití této metody v posledních letech upadá s rozvojem hmotnostní spektrometrie (MS). Vývoj technologií založených na hmotnostní spektrometrii je jednou

z nejdůležitějších změn v identifikaci proteinů. S rozvojem hmotnostní spektrometrie se citlivost analýzy a přesnost výsledků zvýšila o několik řádů (Graves et Haystead, 2002).

3.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je účinný nástroj v analýze rozdílných biomolekul zahrnujících proteiny, nukleové kyseliny a sacharidy (Cao et Limbach, 2017). Hmotnostní spektrometrie je analytická technika, při níž jsou chemické sloučeniny ionizovány na nabitě molekuly a měří se poměr jejich hmotnosti k náboji (m/z). Ačkoli principy MS byly objeveny už na počátku 20. století, její rozsah byl omezen pouze na chemické vědy, avšak s postupným rozvojem techniky se začala MS využívat i v dalších vědních disciplínách, jako je genetika, buněčná biologie, farmacie, medicína, aj. (Singhal et al., 2015). Hmotnostní spektrometr sestává z iontového zdroje (ionizátoru); hmotnostního analyzátoru, který měří poměr hmotností k náboji ionizovaných analytů; a z detektoru, který zaznamenává množství iontů v každé hodnotě m/z (Aebersold et Mann, 2003).

V iontových zdrojích jsou analyzované vzorky ionizovány před analýzou v hmotnostním spektrometru. Pro hmotnostní spektrometrii se používá řada ionizačních technik. Nejdůležitějšími faktory je množství vnitřní energie přenesené během ionizačního procesu a fyzikálně-chemické vlastnosti analytu. Některé ionizační techniky, označované jako tvrdé, využívají velké ionizační energie a způsobují rozsáhlou fragmentaci. Oproti tomu, techniky označované jako měkké, produkují méně fragmentů a lze pozorovat i molekulové ionty. Zvolený způsob ionizace záleží na chemicko-fyzikálních vlastnostech analytu. Mezi tvrdé ionizační techniky patří: elektronová ionizace (EI), chemická ionizace (CI); mezi měkké ionizační techniky patří: desorpce laserem (LD), ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization), ionizační techniky za atmosférického tlaku (API) zahrnující ionizaci elektrospřejem (ESI), chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizaci za atmosférického tlaku (APPI). Další techniky ionizace jsou: ionizace polem (FI), hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů (SIMS), ionizace termosprejem (TSP), ionizace urychlenými atomy (FAB) a ionty (FIB), indukce vázaným plazmatem (PD) (De Hoffmann et Stroobant, 2001).

Hmotnostní analyzátor je jednou z nejdůležitějších částí hmotnostního spektrometru. Jeho hlavní funkcí je rozdělit ionty, které do něho vstoupí z ionizátoru, podle jejich m/z , tedy podle jejich poměru hmotnosti k náboji. Všechny hmotnostní analyzátoři používají statické nebo dynamické elektrické a magnetické pole. Většina základních rozdílů mezi běžnými typy hmotnostních analyzátorů spočívá v tom, jakým způsobem se používají tato pole k dosažení

rozdělní iontů. Každý hmotnostní analyzátor má své výhody a omezení. Analyzátoři lze rozdělit na základě rozdílných způsobů procesu analýzy. Skenující analyzátoři postupně přenášejí ionty různých hmotností v časovém měřítku, do této třídy analyzátorů se řadí kvadrupól. Další třídou jsou zachytové analyzátoři, tyto typy analyzátorů nejprve ionty zachytí a potom je až analyzují, tento typ analyzátoru je např. orbitrap, iontová cyklotronová rezonance nebo iontová past. Průletové analyzátoři umožňují současný přenos všech iontů a měří dobu, při které ionty překonají určitou vzdálenost, tímto druhem analyzátoru je např. disperzní magnetický analyzátor, hmotnostní analyzátor TOF (time of flight, analyzátor doby letu). Analyzátoři mohou být různě seskupeny, čímž jsou zajištěny vhodnější podmínky analýzy (Jocelyn Paré et Yaylayan, 1997).

Ionty procházející hmotnostním analyzátořem jsou poté detekovány a transformovány do potřebného signálu pomocí detektoru. V současnosti existuje několik typů detektorů. Volba detektoru závisí na konstrukci přístroje a analytických postupech, které mají být provedeny. Detekce iontů je vždy založena na jejich náboji, jejich hmotnosti nebo rychlosti. Některé detektory (Faradayův pohár) jsou založeny na měření přímého proudu, který se vytváří, když ion dopadne na povrch a je neutralizován. Jiné (elektronové násobiče nebo elektrooptické iontové detektory) jsou založeny na přenosu kinetické energie dopadajících iontů kolizí s povrchem, který zase generuje sekundární elektrony, ty se dále zesilují a poskytují elektrický proud. U orbitrapu a iontové cyklotronové rezonanci s Furierovou transformací je detektor součástí analyzátoru. Některé detektory jsou vyráběny pro detekci všech iontů postupně v jednom bodě, ty se nazývají bodové sběrače iontů. Jiné detektory, jako jsou fotografické desky, obrazové proudové detektory nebo detektory pole, mají schopnost detekovat všechny ionty současně, tyto druhy se nazývají sběrače polí (Koppelaar et al., 2005).

Hmotnostní spektrometrie se využívá: v metabolomice (screening a diagnostika rakoviny, objev a profilování biomarkerů, metabolické poruchy, aj.); k environmentálním analýzám (testování pitné vody, analýza pesticidů, monitoring znečištění oxidem uhličitým, analýza vyluhování těžkých kovů); ve farmacii (výzkum léčiv a jejich vstřebávání, vývoj nemocí, metabolický screening, aj.); ve forenzní analýze (analýza stopových, vyšetřování žhářství, potvrzení zneužívání drog a identifikace výbušných zbytků); v potravinářství; a velké využití má hmotnostní spektrometrie v proteomice (De Hoffmann et Stroobant, 2001).

3.3.1 Hmotnostní spektrometrie v proteomice

Hmotnostní spektrometrie je v současné době nejvíce využívanou metodou v proteomické analýze, kde MS většinou představuje metodu první volby. Pro jakoukoliv analýzu by se měl nejdříve zvážit typ instrumentace, metoda fragmentace a strategie analýzy, která je vhodná pro analyzovaný vzorek (Han et al., 2008). Výhoda hmotnostní spektrometrie v proteomice je její vysoká senzitivita, jelikož množství bílkovin je omezeno, mnohdy se analyzují bílkoviny v množství 10^{-15} mol. Další výhodou je vysoké rozlišení a přesnost (Liebler, 2002).

Pro většinu proteomických analýz se využívá měkkých ionizačních technik. Nejvíce se využívá MALDI a ESI. Tyto dva typy fungují zcela odlišně a poskytují rozdílné druhy dat, proto se používají za rozdílnými účely analýzy (Liebler, 2002; Yates et al., 2009). V obou případech ESI a MALDI se biomolekuly nejprve převedou na ionty buď přidáním nebo ztrátou jednoho či více protonů. MALDI hmotnostní spektrometrie má určité výhody oproti ESI hmotnostní spektrometrii. MALDI produkuje jednou nabitě ionty, takže interpretace dat je snadná ve srovnání s ESI, pro analýzu pomocí ESI je často za potřebí předcházející chromatografie, která není nutná pro MALDI hmotnostní analýzu (Everley et al., 2008). Pro určení sekvence aminokyselin, při které dochází k fragmentaci specifického peptidu na menší peptidy, se využívá nejčastěji MS/MS (tandemová hmotnostní spektrometrie), která v může zahrnovat dva a více druhů analyzátorů (Henzel et al., 1993).

MALDI-TOF je jednou z metod, které přispěly k velkému rozvoji proteomiky, pochopení proteinové chemie a získání nových poznatků v buněčné biologii. Bez této metody by pravděpodobně proteomika neměla takový význam, jaký má dnes (Welker, 2011). Pomocí MALDI dokážeme ionizovat biopolymery o velikosti až do 100 kDa za použití vzorku v koncentracích v řádech pikomolů (Karas et al., 1991; Hillenkamp et al., 1991). V současné době se MALDI-TOF využívá hlavně k identifikaci neznámých proteinů (metoda PMF-peptide mass fingerprinting) (Pappin, 1996), k identifikaci mikroorganismů (biotyping), tuto metodu poprvé použil Holland a kolegové v roce (1999). Dále se používá v analýze syntetických polymerů (Nielen, 1999) a v poslední řadě k diagnostice rakoviny (kvantifikace hladin biomarkerů, zobrazení tkání) (Merlos Rodrigo et al., 2014).

3.3.2 MALDI–TOF hmotnostní spektrometrie

Metodu MALDI vyvinuli Hillenkamp a Karas (1985), kteří poprvé použili pro metodu laserové desorpce matrici. Zjistili, že alanin může být lépe analyzován, když je smíchán s tryptofanem, tryptofan totiž absorbuje energii z laserového paprsku a pomáhá tak ionizaci alaninu, který není schopný paprsek laseru jinak absorbovat. Kromě toho, zjistili, že i ostatní proteiny mohou být lépe analyzovány v přítomnosti matrice. Zjistili také, že analyzované molekuly jsou díky matrici chráněny před fragmentací během ionizace. Hillenkamp a Karas (1988) zjistili schopnost techniky generovat hmotnostní spektra proteinů s hmotností od 10 kDa do 20 kDa. Ke zdokonalení techniky přispěl Koichi Tanaka v roce 1988, rozpustil proteiny o velké molekulové hmotnosti, konkrétně karboxypeptidázu A (molekulová hmotnost je 34,3 kDa), v roztoku glycerolu s částicemi kobaltu, čímž prokázal, že za použití vhodné matrice a vlnové délky laseru je možné analyzovat polymery a proteiny o velké molekulové hmotnosti. Za tento objev získal v roce 2002 Nobelovu cenu za chemii za vývoj měkké desorpční ionizační techniky pro hmotnostní spektrometrickou analýzu biologických makromolekul (Beavis et Chait, 1996; Raeder et Schrepp, 1998; Tanaka et al., 1988).

Čtyři desetiletí před vznikem MALDI, v roce 1946, W. E. Stephens vynalezl technologii TOF MS (Hübschmann, 2001), ovšem dřívější technologie analyzátoru TOF měla malé rozlišení, a proto byla v hmotnostní analýze aplikována jen omezeně. Teprve později bylo zjištěno, že kombinace MALDI a analyzátoru TOF je vysoce citlivá technika, kterou dnes známe jako MALDI-TOF. V uplynulém desetiletí se MALDI-TOF stala jednou z nejlepších a nejpoužívanějších metod v analýze biopolymerů i syntetických polymerů a poznatky získané díky této metodě napomohly rozvoji mnoha vědních oborů (Hosseini et Martinez-Chapa, 2017).

3.1.1.1 Princip MALDI

Ionizace probíhá ve dvou krocích. První krok probíhá mimo hmotnostní spektrometr, v prvním kroku je analyt, který má být analyzován smíchán s matricí, tedy s rozpouštědlem obsahujícím malé organické molekuly. Tato směs je nanášena na MALDI kovový terčík a před analýzou usušena. Výsledkem je vznik krystalů tvořených matricí prostoupených analytem (ko-krystalizace). Příprava vzorku a výběr vhodné matrice ovlivňuje průběh, přesnost a rozlišení analýzy. Vhodná matrice umožňuje ko-krystalizaci analytu homogenním způsobem. Použití matrice napomáhá zvyšovat desorpci a ionizační procesy, čímž je umožněna analýza netěkavých a tepelně labilních molekul (De Hoffmann et Stroobant, 2001;

Sze et al., 1998; Singhal et al., 2015). Molekuly matrice musí mít absorpční, která pohlcuje paprsek laseru v různých rozmezích vlnových délek. Vhodná matrice je většinou kyselé povahy, působí jako zdroj protonů a napomáhá tak ionizaci; dalším faktorem je specifický rozsah molekulové hmotnosti, který umožní snadné odpařování matrice (Zenobi et Knochenmuss, 1998).

Druhým krokem je samotná ionizace vzorku, ionizace probíhá ve vakuu. Směs analytu a matrice je ozářena na několik nanosekund paprskem laserového záření o určité vlnové délce. Nejčastěji se používá dusíkový laser o vlnové délce 337 nanometrů, který je v rozsahu UV (ultrafialového) záření. Druhý typ je laser o vlnových délkách v oblasti IR (infračerveného) záření, tento druh laseru se používá méně, ovšem jeho výhodou je, že ionizace IR laserem je jemnější. Ozařování laserem způsobuje velké zahřívání krystalů a molekuly matrice pohlcují značnou část energie fotonů. Přijatá energie způsobuje excitaci (desorpci) molekul matrice, prostřednictvím této excitace jsou unášeny neporušené ionty analytu a molekuly matrice s analytem přecházejí do plynného skupenství, což se projeví uvolněním plynu ve vakuové komoře. Vznik iontů analytu stále není objasněn, nejpravděpodobněji excitované molekuly matrice předají proton neutrálním molekulám analytu pomocí srážek mezi nimi. K přenosu protonu může docházet buď v pevné fázi před desorpcí, nebo po desorpci v plynné fázi. Ionty se potom pohybují ve vakuu urychleny elektrostatickým polem směrem k hmotnostnímu analyzátoru (Hosseini et Martinez-Chapa, 2017; Jurinke et al., 2004; De Hoffmann et Stroobant, 2001).

3.1.1.2 Analyzátor doby letu TOF

Ionty vygenerované ionizátorem jsou buď ionty matrice, ionty analytu nebo ionizované fragmenty molekul analytu. Těmto iontům je dodána konstantní kinetická energie elektrickým polem a tím jsou ionty urychleny a jsou vedeny polem směrem ke „driftovací“ oblasti analyzátoru, tj. oblasti, kde nepůsobí žádné pole. Na konci dráhy letu je umístěn iontový detektor, který dokáže zaznamenat letový čas a intenzitu jednotlivých iontů, které doputují do detektoru, přičemž větší ionty dosáhnou detektoru později než malé ionty, čas doby letu je úměrný druhé odmocnině jejich hmotností, jak ukazuje Rovnice č. 1 (Cotter, 1999; Guilhaus, 1995; Guilhaus et al., 1997).

Rovnice č. 1: Rovnice vyjadřující dobu letu t

$$t = \left(\frac{m}{2eV} \right)^{1/2} D$$

V této rovnici je e základní náboj, V je náboj dodávající zrychlení, m je hmotnost iontu a D je délka driftovací zóny analyzátoru.

Rozlišení je odvozeno ze vztahu mezi dobou letu a poměru m/z , proto je možné rovnici č. 1 převést na hmotnostní spektrum podle následující Rovnice č. 2

Rovnice č. 2: Rovnice vyjadřující poměr hmotnosti k náboji

$$m/z = 2eV \left(\frac{t}{D} \right)^2$$

kde m/z je poměr hmotnosti k náboji iontů, ostatní proměnné zůstávají stejné jako u Rovnice č. 1.

Vzhledem k tomu, že hmotnostní rozlišení je úměrné času letu a dráze letu, viz Rovnice č. 2, je jedním z řešení pro zvýšení rozlišení TOF analyzátoru prodloužení letové trubice. Nicméně příliš dlouhá letová trubice snižuje jeho výkon, kvůli ztrátě iontů rozptylem po kolizi s molekulami plynu. Také je možné prodloužit dobu letu snížením zrychlovacího napětí. Snížením tohoto napětí však snížíme citlivost. Jediným způsobem, jak dosáhnout vysoké citlivosti a vysokého rozlišení, je použití letové trubice o délce 1 až 2 m pro vyšší rozlišení a akcelerační napětí minimálně 20 kV (De Hoffmann et Stroobant, 2001).

Analyzátor doby letu, oproti skenovacím analyzátorům, dokáže analyzovat ionty s neomezeným hmotnostním rozsahem (v kombinaci s MALDI mohou být analyzovány ionty o velikosti větší než 300 kDa). Další výhodou TOF je jeho vysoká účinnost přenosu, která vede k velmi vysoké citlivosti, např. dokáže detekovat proteiny (lysozym, ribonukleáza, cytochrom C a myoglobin) v množstvích 100-200 attomolů. Rychlost analýzy je velmi rychlá, poskytuje spektrum v širokém rozsahu hmotností v řádu mikrosekund. Další výhodnou vlastností TOF analyzátoru je jeho snadná kalibrace s pouze dvěma referenčními body (De Hoffmann et Stroobant, 2001). Jediné omezení TOF analyzátoru je jeho rozlišovací schopnost, která není moc vysoká, jelikož ionty o stejné hmotnosti nedorazí k detektoru ve stejný čas. Jedním z důvodů je, že ionty mají počáteční kinetickou energii, jakmile dosáhnou letové trubice, jejich kinetická energie není konstantní, tato rozdílná distribuce energie

způsobí různé rychlosti a různé časy letu iontů o stejné hmotnosti; dalším důvodem je délka pulzu tvorby iontů v ionizátoru a rozložení prostoru. Proto se v současné době používají tzv. reflektory a opožděná extrakce iontů. Opožděnou extrakci iontů vyvinul Wiley a Mc Laren (1955), tento způsob extrakce napomáhá k vyrovnání rozdílů v kinetických energiích iontů o stejných m/z. Metoda je založená na časovém zpoždění mezi tvorbou iontů a extrakcí iontů. Ionty se v oblasti bez pole pohybují různou rychlostí, v závislosti na jejich počáteční kinetické energii. Po aplikaci extrakčního napětí, které má zpoždění stovky nanosekund až několik mikrosekund, dojde k přenosu energie na ionty, které zůstaly delší dobu ve zdroji, v důsledku toho zpočátku méně energetické ionty přijímají více energie a dorazí k detektoru za stejnou dobu, jako ionty, které měly původně více kinetické energie (Cotter, 1999; Vestal et al., 1995). Reflektor, který poprvé použil Alikanov a Mamyrin je složen z části, která je za oblastí bez pole, tedy před detektorem a z iontového zrcadla, které je na straně od detektoru. Iontové zrcadlo sestává zpravidla ze série rovnoměrně rozmístěných prstencových elektrod nebo výhodněji jedné kruhové elektrody, na těchto elektrodách je urychlující a zpomalující elektrické pole, toto pole odrazí dopadající ionty a pošle je zpět do letové trubice, přičemž ionty s větší kinetickou energií a tedy větší rychlostí proniknou do reflektoru hlouběji (jsou zadrženy déle) než ionty s menší kinetickou energií, tím dojde k vyrovnání rozdílu rychlostí způsobeného různým množstvím kinetické energie iontů o stejném m/z a ionty dorazí k detektoru za stejnou dobu (De Hoffmann et Stroobant, 2001; Schmid et Weickhardt, 2001).

3.3.3 Příprava vzorků pro identifikaci bakteriálních proteinů pomocí MALDI TOF

Spolehlivost a přesnost analýzy je ovlivněna mnoha faktory, jedním z nich je příprava vzorku pro analýzu. Velmi důležité je před analýzou připravit přesný a standardizovaný postup pro přípravu vzorku zahrnující kultivaci bakterií, chemický postup k porušení bakteriální buněčné stěny a extrakci proteinů (Freiwald et Sauer, 2009). V návrhu experimentu musí být zahrnuty jak biologické, tak technické faktory, jako je výběr vhodné matrice, vhodných rozpouštědel, koncentrace vzorku a odsolování vzorku. Růstová fáze a věk kultury jsou také důležité, protože bakterie reagují rychle na změny životních podmínek (Momo et al., 2013).

Při přípravě vzorku je prvním krokem sběr potřebného množství bakteriálních buněk z kultivačního média, následuje usmrcení buněk, porušení jejich buněčné stěny a uvolnění bakteriálních proteinů (Demirev et Sandrin, 2016). Pro efektivní analýzu by mělo být použito, v závislosti na způsobu extrakce, 10^7 - 10^{12} bakteriálních buněk. K usmrcení a oddělení bakteriálních buněk se nejčastěji využívají alkoholy, k následnému porušení buněčné

membrány bakterií a extrakci se hojně používají silné organické kyseliny a acetonitril (Freiwald et Sauer, 2009). Každý bakteriální druh reaguje na jiné druhy látek. Při výběru vhodného extrakčního činidla hrají také důležitou roli vnější faktory, jako je pH, koncentrace solí a teplota (Demirev et Sandrin, 2016)

Nejvíce používaným postupem pro usmrcení buněk a oddělení je ošetření buňky směsí etanolu. Etanol se používá v různých koncentracích, literární zdroje uvádějí koncentrace etanolu 40 % (Madonna et al., 2000), 50 % (Momo et al., 2013), 70 % (Schott et al., 2016), 75 % (Šedo et al., 2011). Za účelem porušení buněčné stěny a extrakce se nejčastěji využívá kyselina mravenčí, literární zdroje uvádí koncentrace 17 % (Madonna et al., 2000), 70 % (Kern et al., 2013; Schott et al., 2016). Matrice pro překrytí vzorku naneseného na terčíku je složena většinou z CHCA (α -kyano-4-hydroxysočicová kyselina) (Ryzhov et Fenselau, 2001; Kern et al., 2013; Schott et al., 2016), z CHCA v kombinaci s acetonitrilem a vodou (Šedo et al., 2011), ale také z ferulové kyseliny (Madonna et al., 2000) a sinapové kyseliny (Ryzhov et Fenselau, 2001). Příprava vzorku s použitím etanolu, směsi kyseliny mravenčí a acetonitrilu, je poměrně levná a může se použít pro většinu bakteriálních druhů, díky tomu je tento způsob extrakce jedním z nejvíce používaných, u jednotlivých autorů se však liší v množství a koncentraci daných látek (Freiwald et Sauer, 2009).

Extrakci za použití kyseliny mravenčí, acetonitrilu a vody uvádí ve své studii Šedo et al. (2011). Ve své studii nejprve buňky sterilizovali 75% etanolem, extrakce byla provedena třepáním v 50 μ l směsi acetonitrilu / kyseliny mravenčí / vody (50:35:15, v/v) po dobu 1 minuty. Vzorek byl nanesen na terčík a při pokojové teplotě usušen, poté překryt 0,3 μ l nasyceného roztoku matrice CHCA ve směsi acetonitrilu, vody a v poměru (50:47,5:2,5, v/v). Obdobný způsob extrakce uvádí také Schott et al., (2016). Ve své studii se zabývají analýzou proteinů *Lactobacillus paracasei*. Příprava vzorku se prováděla nejprve centrifugací po dobu 5 minut, kdy došlo oddělení supernatantu, a inaktivace buněk se provedla pomocí 70% etanolu. Poté byly buňky opět centrifugovány po dobu 2 minut, supernatant byl odstraněn a proteiny byly extrahovány za přidání 70% kyseliny mravenčí a acetonitrilu (50:50 v/v). Jeden mikrolitr suspenze byl poté přenesen na terčík a překryt matricí CHCA.

Alternativní metodou k porušení buněčné membrány je ošetření pomocí TFA (trifluoroctové kyseliny) v kombinaci s acetonitrilem. Ryzhov et Fenselau (2001) uvádí ve své studii extrakci proteinů acetonitrilem a 0,1% TFA, (70:30 v/v) a následné přidání 0,2 μ l roztoku matrice. TFA využil ve své studii také Holland et al. (1999) ve které extrahovali proteiny *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* a *Shigella flexneri* pomocí HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) Bakteriální kolonie byly rozptýleny v 1 ml

směsi 0,1% TFA, destilované vody s acetonitrilem (2:1), poté byly vzorky centrifugovány. Supernatant ze vzorku byl odebrán a zfiltrován. V případě bakterií *P. putida* a *P. aeruginosa* byl zfiltrovaný analyt odpařen ve vakuu a znovu rozpuštěn v 200 μ l roztoku vody a acetonitrilu (2:1) s 0,1% TFA. Bakteriální složky z buněčných extraktů byly odděleny a izolovány na HPLC. Mobilní fází byl acetonitril s 0,1% TFA.

Další zmiňovanou metodou je metoda přímého přenosu, bakteriální buňky jsou přeneseny přímo na MALDI terčik a smíchány s matricí, která je složena např. z acetonitrilu a TFA nebo jsou vzorky nanесeny přímo na terčik a na vzorek se aplikuje organická kyselina, čímž proběhne extrakce přímo na terčiku. Metoda přímého přenosu se jeví jako rychlejší (Freiwald et Sauer, 2009).

Metodu přímého přenosu s extrakcí přímo na MALDI terčiku ve své studii použil Madonna et al. (2000). Analyzuje bakteriální proteiny o molekulové hmotnosti vyšší než 15 kDa. Jednotlivé kolonie bakterií byly odebrány z agaru a přeneseny rovnou na MALDI terčik. Poté bylo na každý spot nanесeno 2 μ l 40% etanolu a po dobu 3 minut při pokojové teplotě došlo k odpaření. Inaktivované a suché buňky byly poté překryty 1,5 μ l matrice ferulové kyseliny. Takto připravené vzorky se nechaly na vzduchu uschnout. Metaani et Voorhees (2005) k detekci proteinů o molekulové hmotnosti 140 kDa používají také metodu přímého přenosu. K extrakci proteinů ze vzorků nanесených na terčiku použili surfaktant 0,1 mM n-oktyl-B-D-galaktopyranosid, který působí na strukturu buněčné stěny porušením vazby mezi lipidy, proteiny a mezi lipidy a proteiny navzájem. Vzorky se poté nechaly při pokojové teplotě uschnout.

Kern et al. (2013) ve své studii o identifikaci bakterií porovnává výše zmíněné způsoby přípravy vzorku a to, metodu přímého přenosu a různé druhy extrakce proteinů. Pro metodu přímého přenosu byly bakteriální buňky nanесeny přímo na terčik a překryty matricí tvořené z CHCA, 50% acetonitrilu a 2,5% TFA a vody; druhou metodou přímého přenosu byla metoda přímého přenosu s extrakcí na terčiku, na usušený vzorek nanесený na terčiku byl přidán 1 μ l kyseliny mravenčí. Pro přípravu vzorku metodu extrakce byl použit etanol a směs 70% kyseliny mravenčí, destilované vody a acetonitrilu (35:15:50, v/v). Poté byly vzorky odstředěny, přeneseny na terčik, překryty matricí CHCA a usušeny na vzduchu. V porovnání těchto dvou metod přípravy vzorku došli k závěru, že výsledky analýzy byly přesnější a správnější u vzorků připravených metodou extrakce před nanесením vzorku na terčik než u vzorků připravených metodou přímého přenosu.

3.3.3.1 Extrakce proteinů *E.coli*

Pro získání proteinů *E. coli* existuje více metod a více chemických činidel. Také se využívá různých organických kyselin, hojně se využívá TFA, ale také různé pufrы, nejčastěji používaným pufrem je SDS (sodiumdodecyl sulfát), který velmi dobře porušuje buněčnou stěnu a rozpouští proteiny (Demirev et Sandrin, 2016)

Jeden z možných způsobů extrakce uvádí Momo et al. (2013) pro analýzu proteinů *E. coli* byly vzorky odebrány v každé růstové fázi. Pro exponenciální fázi byly vzorky odebrány z 3,5 hodiny starých kultur, pro stacionární fázi byly vzorky odebrány z 12 hodin starých kultur, pro fázi odumírání byly vzorky odebrány z 26 hodin starých kultur. Alikvotní podíl každého vzorku byl centrifugován při 10 000 rpm po dobu 10 minut. Získané vzorky byly dvakrát promyty 1 ml PBS (phosphate buffer saline, fosfátový pufr s NaCl). Takto promyté vzorky byly umístěny do třepačky, po oddělení supernatantu se přidal znovu 1 ml PBS a buňky byly resuspendovány na třepačce. Suspenze byla znovu promyta a vzorky uchovávány při -70°C. Vzorky byly poté rozpuštěny v 300 µl destilované vody a v 900 µl čistého 50% etanolu. Poté byly vzorky odstředěny.

Další způsob extrakce bakteriálních proteinů *E. coli* a přípravu vzorku uvádí Ochoa et Harrington (2005) ve své studii k extrakci proteinů z bakteriální buňky použili 0,1% TFA v kombinaci s acetonitrilem v poměru (2:3). Bakteriální suspenze byla promíchána na Vortexu po dobu 2 minut, dokud nebyl získán zakalený homogenní roztok.

Arnold et al. (1999) ve své studii uvádějí extrakci proteinů *E.coli* metodou přímého přenosu s extrakcí na MALDI terčíku, buňky byly nejprve rozptýleny v destilované vodě, aby bylo na každém spotu terčíku přibližně stejné množství bakteriálních buněk, směs byla nanášena na terčík a překryta CHCA ve směsi 0,1% TFA a acetonitrilu v poměru (2:1).

4 Materiál a metodika

4.1 Složky silic

Použité složky silic byly získány od dodavatele Sigma-Aldrich, byly skladovány při teplotě 4 °C ve vzduchotěsných skleněných vialkách, nebo v původním obalu. Všechny pořízené složky silic jsou uvedené v tabulce č. 1. Jednalo se o širokou škálu chemických látek, zahrnující terpeny a jejich deriváty, aldehydy, ketony, fenylpropanoidy, fenoly, oxidy.

Tabulka č. 1: Složky silic s identifikačním CAS číslem

Název složky	CAS číslo	Název složky	CAS číslo
karvakrol	499-75-2	cedrol	77-53-2
<i>trans</i> -skořicový aldehyd	14371-10-9	cineole	470-82-6
eugenol	97-53-0	(±)-citronellal	106-23-0
(-)-karvon	6485-40-1	citronellyl propionát	141-14-0
(+)- α -pinen	7785-70-8	<i>p</i> -cymen	99-87-6
(±)- β -citronellol	106-22-9	2-dekanol	1120-06-05
(1S)-(+)-3- karen	498-15-7	D-dihydrokarvon	7764-50-3
tymol	89-83-8	farnesen	směs izomerů
4-karvomentenol	562-74-4	(+)-fenchon	4695-62-9
citral	5392-40-5	geranyl acetát	105-87-3
geraniol	106-24-1	hexyl hexanoát	6378-65-0
guajakol	90-05-1	(-)-isopulegol	89-79-2
4-allylanisol	140-67-0	(R)-(+)-limonen	5989-27-5
allyl disulfid	2179-57-9	(-)-linalool	126-91-0
<i>trans</i> -anetol	4180-23-8	(-)-menton	14073-97-3
anisol	100-66-3	(-)- β -pinen	18172-67-3
(-)-bornyl acetát	5655-61-8	α -felandren	99-83-2
(-)- α -bisabolol	23089-26-1	(+)-růžový oxid	16409-43-1
butyl isothiokyanát	592-82-5	α -terpinen	99-86-5
β -karyopyllen	87-44-5	γ -terpinen	99-85-4
(-)- <i>trans</i> -karyopyllen	87-44-5	terpinolen	586-62-9

4.2 Kultivační metoda

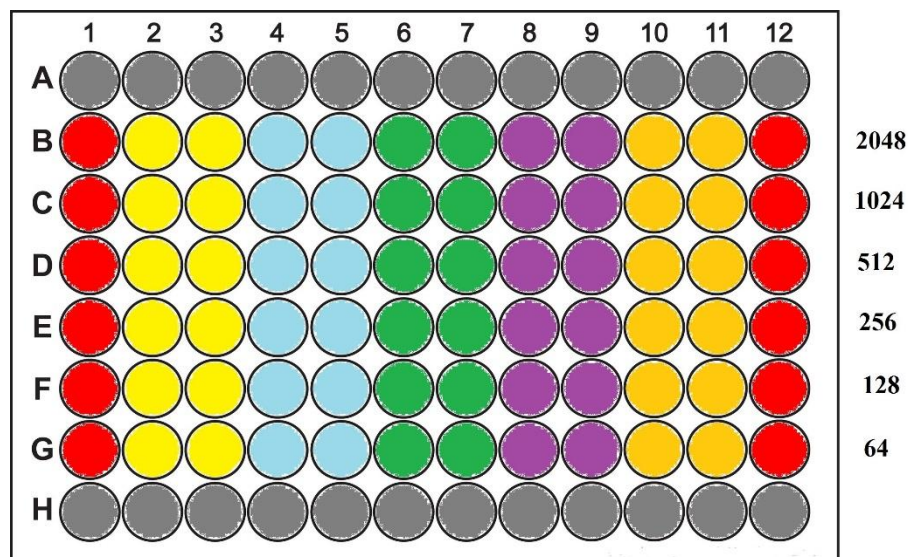
Pro experiment byl použit typový kmen bakterie *E. coli* DSMZ 18039 z německé sbírky mikroorganismů (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). Bakteriální kultura byla uchovávána v Mueller-Hinton bujónu (Oxoid, CZ) s 50 % glycerinu a skladována při teplotě -80 °C. Pro kultivaci buněk byl použit LB bujón Lennox (Oxoid, CZ), kultivace probíhala při teplotě 37 °C 24 hodin před zahájením testu. Takto připravená bakteriální kultura byla použita nejprve pro stanovení MIC (minimální inhibiční koncentrace) složek silic a poté pro samotnou analýzu stresové reakce.

4.3 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

Po 24 hodinové kultivaci bylo do PBS (fosfátový pufr s NaCl, Sigma-Aldrich) připraveno inokulum o koncentraci 10^8 KTJ ml⁻¹ (kolonii tvořící jednotka na ml), což odpovídá 0,5 standardu McFarlanda měřeno pomocí densitometru (DEN-1B, Densitometer-Biosan).

Pro zjištění antibakteriální aktivity byla použita mikrodiluční metoda EUCAST 2003 v modifikované formě. Jako testovací médium byl použit bujón LB lennox s 1 % Tween 80 (polysorbát 80). Mikrodiluční metoda byla provedena na 96 jamkových mikrotitračních destičkách (Gama Group). Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo napipetováno 100 µl testovacího média, první řada sloužila ke kontrole čistoty, poslední řada sloužila ke kontrole nárůstu. V postranních sloupcích destičky bylo čisté médium. Do zbylých jamek druhé řady byl napipetován zásobní roztok složky silice, z této jamky bylo pipetou odebráno 100 µl a přeneseno do jamky ve sloupci následující, takto byly dvojitým ředěním připraveny koncentrace testovaných látek od 2048 do 64 mg/l, design mikrotitrační destičky zobrazen na obrázku č.6.

Jamky byly poté zaočkovány pomocí trnového replikátoru. Vzorky se nechaly přes noc inkubovat v mikrotitrační destičce při teplotě 37 °C, následně byla odečtena minimální inhibiční koncentrace, tedy nejnižší koncentrace, při které byl inhibován pouhým okem viditelný růst bakterií-v jamce nebyl viditelný zákal. Všechny testy byly připraveny ve třech nezávislých opakováních a finální MIC byly určeny jako medián ze zjištěných hodnot.



Obrázek č.6: Znáznornění mikrotitrační destičky při stanovení MIC

Šedivě-kontrola čistoty (řada A), kontrola nárůstu (řada H), červeně-kontrolní neošetřené medium v jamkách nevhodných pro analýzu – problémy s vypařováním, ostatní barvy-testované antimikrobiální látky ve dvou opakováních se zvyšující se koncentrací 64 mg/l-2048 mg/l

4.4 Analýza stresové reakce

Časná exponenciální fáze (Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader, BioTek) bakteriálního růstu, byla experimentálně vyhodnocena jako nevhodnější pro analýzu stresové odpovědi bakteriálních buněk (Cherchi et Gu, 2011).

4.4.1 Ošetření buněk *E. coli* složkami silice

Podobně jako v testech antimikrobiální aktivity, byly mikrotitrační destičky naplněny 100 μ l LB Lennox s 1 % Tween 80 a následně zaočkovány kulturou *E. coli*. Mikrotitrační destičky se vzorky byly poté inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 5 hodin, což je doba odpovídající konci lag fáze (Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader, BioTek). Ze složek silic byly použity pouze ty, které vykazovaly antibakteriální aktivitu, seznam použitých látek je uveden v tabulce č. 2. Zásobní roztoky pro každou z aktivních látek byly připraveny ve dvojnásobné minimální inhibiční koncentraci s LB bujónem a 1 % Tween 80. Z takto připravených roztoků bylo 100 μ l přidáno k bakteriálním buňkám. Tento postup byl zopakován pro každou aktivní látku v 10 jamkách a 3 nezávislých opakováních. Jako referenční vzorky vyvolávající stresové podmínky byl použit tetracyklin v koncentraci 5 mg/l

(Migliore et al., 2013), chlornan sodný (NaClO) také v koncentraci 5 mg/l a peroxid vodíku v koncentraci 3 g/l (Zubko et Zubko, 2013). Buňky byly odebrány v čase 0 těsně před aplikací látek a následně 30, 60, 90 a 120 minut po aplikaci účinné látky. Obsahy dvou jamek od každé látky v každém čase byly přeneseny do eppendorfy a smíchány s 1 ml PBS, vzorky poté byly centrifugovány na centrifuze Rotanta 450 R (Hettich, Německo) při 20 000 g po dobu 2 minut a vzniklý supernatant byl odstraněn.

Tabulka č. 2: Použité komponenty k analýze stresové reakce

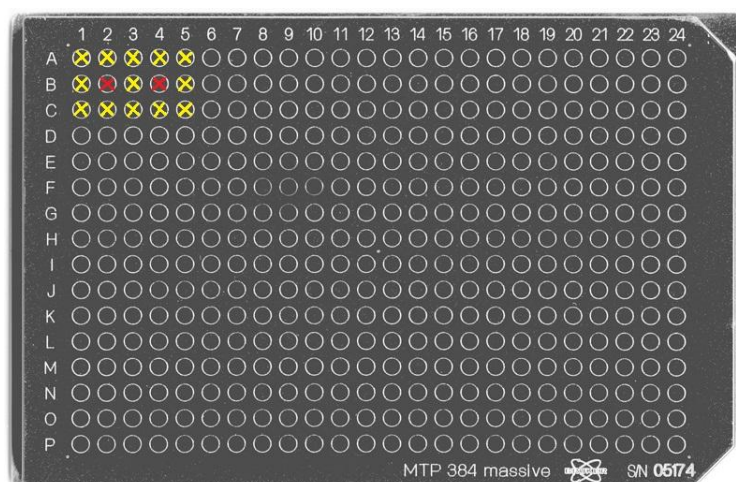
Název komponentu	CAS číslo
karvakrol	499-75-2
trans-skořicový aldehyd	14371-10-9
eugenol	97-53-0
(-)-karvon	6485-40-1
(+)- α -pinen	7785-70-8
(\pm)- β -citronellol	106-22-9
(1s)-(+)-3- karen	498-15-7
tymol	89-83-8
4-karvomentenol	562-74-4
citral	5392-40-5
geraniol	106-24-1
guajakol	90-05-1

4.4.2 Příprava vzorků pro identifikaci na MALDI TOF

Vzorek byl připraven podle standardního postupu Bruker pro MALDI Biotarget. K usmrcení bakteriálních buněk byl použit etanol. Extrakce proteinů byla provedena 70% kyselinou mravenčí (Sigma-Aldrich, Německo) a acetonitrilem (Fluka, Německo). Jako matrice pro samotnou analýzu byla použita CHCA (Bruker, Německo) v kombinaci s acetonitrilem, vodou a trifluoroctovou kyselinou.

Usazené buněčné pelety z kroku 4.4.1 byly resuspendovány v 1 ml 70% ethanolu. Vzorky byly znovu centrifugovány po dobu 2 minut při 20 000 g. Vzniklý supernatant byl odstraněn. Usazená část vzorku byla znovu centrifugována, čímž došlo k oddělení zbytku ethanolu, který byl následně odebraný pipetou. Vzorky se nechaly sušit 30 minut při pokojové

teplotě, aby se zvýšila účinnost extrakce. Poté se k usušeným buňkám přidalo 5 μ l 70% kyseliny mravenčí a následně se roztok homogenizoval na vortexu. Ke zhomogenizovanému vzorku bylo přidáno 5 μ l ultra čistého acetonitrilu. Vzorek byl znovu promíchán a odstředěn po dobu 1 minuty při 20 000 g. 1 μ l extraktu byl poté nanesen na ocelový terčík pro MALDI (MTB 384, Bruker, Německo). Každý vzorek byl na destičku nanesen ve třech spotech pro každou testovanou antibakteriální látku v každém čase. Vzorky byly nanášeny okolo kalibračních spotů (BTS, Bruker) (Obrázek č. 7), vzorky se poté nechaly při pokojové teplotě uschnout. Ihned po zaschnutí byly všechny vzorky na destičce překryty 1 μ l roztoku matrice složeného z CHCA (v koncentraci 10 mg/ml) s acetonitrilem, vodou a TFA (50 %:47,5 %:2,5 %). Poté se vzorky opět nechaly uschnout při pokojové teplotě. Takto usušené vzorky byly použity k analýze.



Obrázek č. 7: Znárodnění systému nanášení vzorků na MALDI terčík; žlutě – testované vzorky, červeně – kalibrační spot

4.4.3 MALDI TOF analýza

Samotné měření probíhalo na přístroji MALDI TOF Autoflex speed (Bruker, Německo), k analýze byl použitý software flexControl 3.4 (Build 135). Pro analýzu bylo použito dvou rozsahů ionizačního napětí, a to 19,38 kV a 18,18 kV. Mód detekce byl nastaven na rozmezí velikostí od 1000 do 15 500 Da. Pro každý vzorek byly naměřeny tři spektra složená z 5000 výstřelů.

4.5 Statistické vyhodnocení

Pro statistické vyhodnocení byl použit volně přístupný software R-project multiMS-toolbox a Mass Spectrum Analysis a Data Conversion Tool (Hrdlickova Kuckova et al., 2015). Všechna spektra byla předběžně zpracována použitím multiMS-toolbox 2.08 a vyhlazena filtrem Savitzky-Golay. Intenzita signálu byla normalizována na stejnou střední hodnotu poměrů intenzity. Následující analýza hlavních komponent (PCA) byla provedena pomocí softwaru multiMS-toolbox 2.08 a statistického programu R-project 3.4.2. Hierarchická klastrová analýza intenzit píků extrahovaných z průměrných spekter ošetřených vzorků v 90 a 120 minutě byla provedena pomocí nástroje "hclust" v softwaru R 3.4.2. Vzdálenostní matice byla vypočtena metodou manhattan vycházející z analýzy hlavních komponent transformovaného skóre prostorů průměrných dat plného spektra. Hierarchické shlukování bylo provedeno metodou nejbližšího souseda (complete linkage). Korelační matice byla vypočítána pomocí Pearsonových korelačních koeficientů PCA skóre průměrných dat plného spektra. Vzorky v matici byly poté uspořádány podle identifikovaného hierarchického shluku. Hierarchické shlukování bylo vypočteno za použití metody nejbližšího souseda. Vzorky v mapě byly změněny podle určeného hierarchického shluku. Naměřené hodnoty m/z byly porovnány s online databázemi UniProtKB/Swiss-Prot (verze 2017_08) pomocí nástroje TagIdent, který je volně dostupný online (<https://web.expasy.org/tagident/>) a s již naměřenými výsledky (Ryzhov et Fenselau, 2001; Arnold et al., 1999; Holland et al., 1999; Momo, 2013).

5 Výsledky

5.1 Vyhodnocení MIC

Z 61 hodnocených složek silic pouze 12 vykazovalo antibakteriální efekt v různých koncentracích, tyto složky byly poté použity k analýze stresové reakce (Tabulka č. 3, tučně označené). S rostoucí koncentrací látek se snižoval zákal v médiu. Hodnota MIC byla určena jako mediánová hodnota ze třech naměřených opakování. Největší antibakteriální aktivitu vykazoval karvakrol a skořicový aldehyd v koncentracích 256 mg/L a eugenol v koncentraci 512 mg/L; celý seznam použitých látek a jejich MIC uvedený v tabulce č.3.

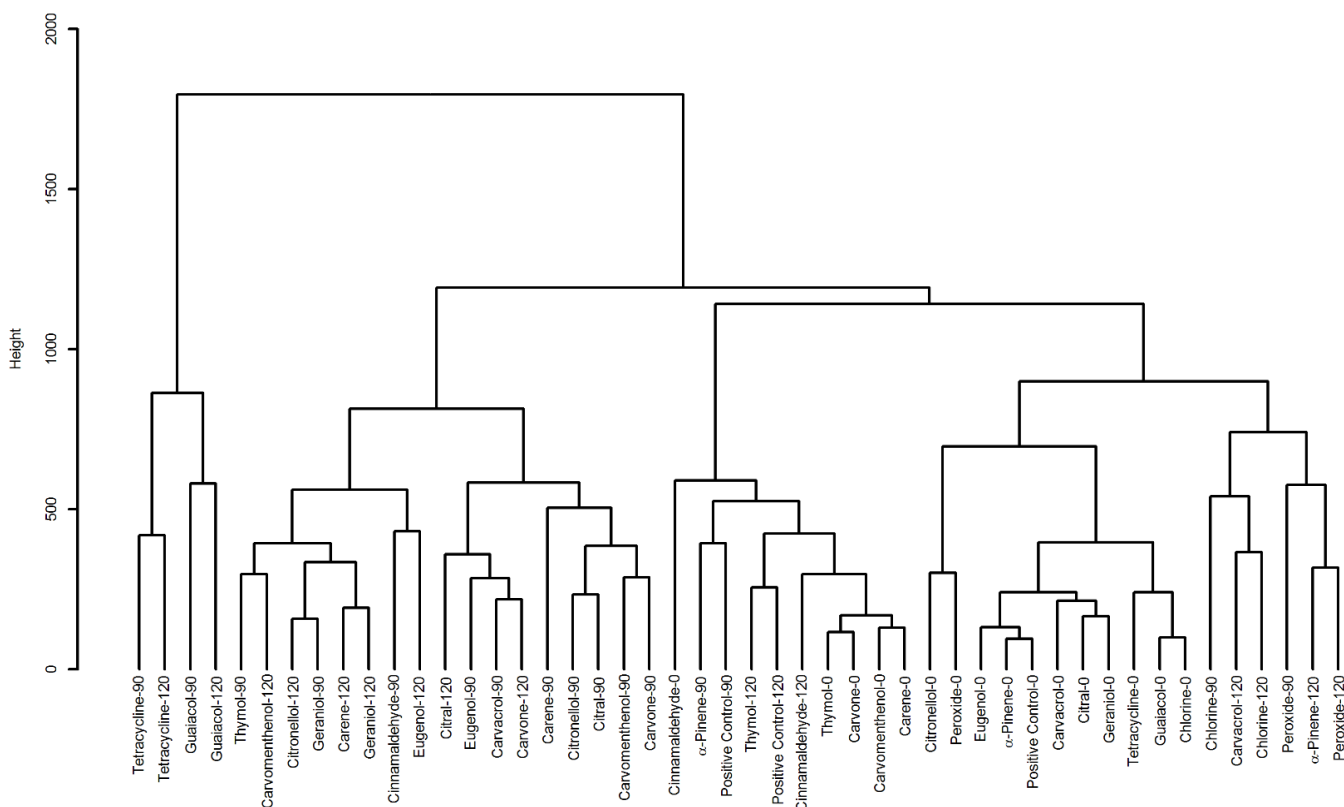
Název složky	CAS číslo	MIC mg/L	Název složky	CAS číslo	MIC mg/L
karvakrol	499-75-2	256	cedrol	77-53-2	>2048
trans-skořicový aldehyd	14371-10-9	256	cineole	470-82-6	>2048
eugenol	97-53-0	512	(±)-citronellal	106-23-0	>2048
(-)-karvon	6485-40-1	1024	citronellyl propionát	141-14-0	>2048
(+)-α-pinen	7785-70-8	1024	p-cymen	99-87-6	>2048
(±)-β-citronellol	106-22-9	1024	2-dekanol	1120-06-05	>2048
(1S)-(+)-3-karen	498-15-7	1024	d-dihydrokarvon	7764-50-3	>2048
tymol	89-83-8	1024	farnesen	směs izomerů	>2048
4-karvomentenol	562-74-4	2048	(+)-fenchon	4695-62-9	>2048
citral	5392-40-5	2048	geranyl acetát	105-87-3	>2048
geraniol	106-24-1	2048	hexyl hexanoát	6378-65-0	>2048
guajakol	90-05-1	2048	(-)-isopulegol	89-79-2	>2048
4-allylanisol	140-67-0	>2048	(r)-(+)-limonen	5989-27-5	>2048
allyl disulfid	2179-57-9	>2048	(-)-linalool	126-91-0	>2048
trans-anetol	4180-23-8	>2048	(-)-menton	14073-97-3	>2048
anisol	100-66-3	>2048	(-)- β -pinen	18172-67-3	>2048
(-)-bornyl acetát	5655-61-8	>2048	α -felandren	99-83-2	>2048
(-)- α -bisabolol	23089-26-1	>2048	(+)-růžový oxid	16409-43-1	>2048
butyl isothiokyanát	592-82-5	>2048	α -terpinen	99-86-5	>2048
β -karyopyllen	87-44-5	>2048	γ -terpinen	99-85-4	>2048
(-)-trans-karyopyllen	87-44-5	>2048	terpinolen	586-62-9	>2048

Tabulka č. 3: Hodnoty naměřených MIC u jednotlivých složek

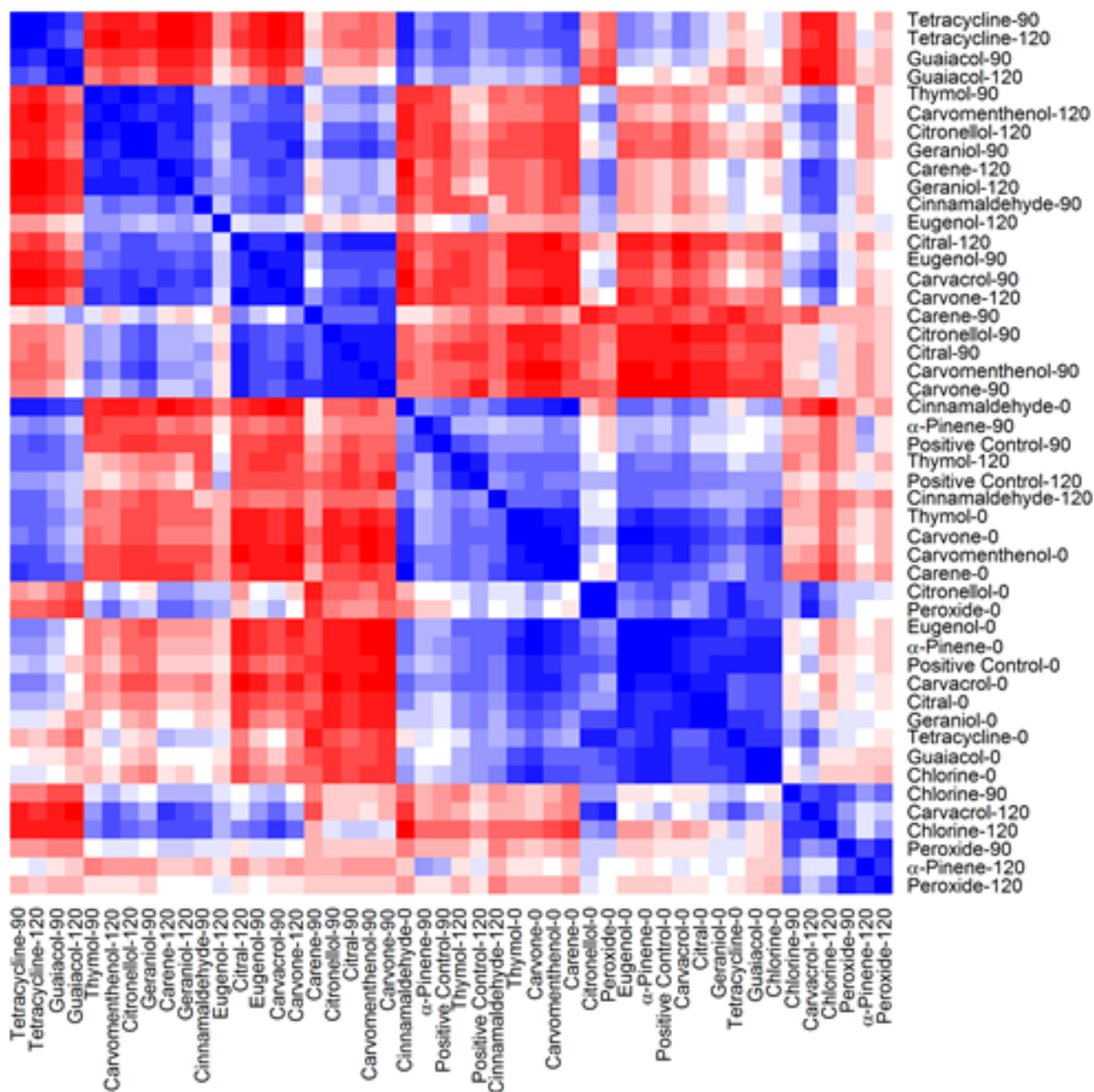
5.2 Vyhodnocení stresové reakce

Z měření bylo získáno velké množství dat pro každou účinnou látku v každém čase. Ke zhodnocení spekter byla použita analýza PCA. PCA analýza snížila množství původních proměnných na základě použití tří hlavních komponent. Výstupem PCA analýzy je rozptylový diagram PCA skóre (Příloha č.1).

Na základě PCA analýzy byl sestaven dendrogram (Obrázek č. 8) z naměřených výsledků všech testovaných vzorků v časech 0, 90 a 120 minut. Dendrogram ukazuje rozdílnosti spekter pro každou skupinu látek, na základě PCA analýzy jsou látky v dendrogramu seskupeny do 6 skupin (klastřů) podle jejich podobnosti, blíže vzdálené vzorky mají mezi sebou větší podobnost než vzorky od nich vzdálené více. Jednou skupinou je skupina vzorků ošetřených tetracyklinem, další tři skupiny jsou vzorky ošetřené různými druhy terpenů, dále skupina neošetřených vzorků v čase 0 minut a skupina vzorků ošetřená peroxidem vodíku a chlornanem sodným. Podobnost mezi naměřenými spektry jednotlivých vzorků byla znázorněna také pomocí diagramu korelační matice (Obrázek č. 9). Diagram znázorňuje korelaci proteinových spekter vzorků v různých časech.



Obrázek č. 8: Dendrogram analýzy hlavních komponent pro vzorky v 0, 90 a 120 minutách



5.3 Identifikace proteinů

Pro detekci píků a vytvoření seznamu píků byl použit software mMass 5.5.0. Pro každý vzorek bylo naměřeno téměř 97 píků. Z celkového počtu zjištěných píků bylo v databázi identifikováno 94 proteinů. Proteiny byly identifikovány pomocí nástroje TagIdent tool

Obrázek č. 9: Diagram korelační matice vzorků v čase 0, 90, 120 minut

Modře jsou vyznačeny vzorky s přímou korelační závislostí, červeně jsou vyznačeny vzorky s nepřímou korelační závislostí. Tmavě modrá přímka uprostřed označuje průsečíky identických vzorků.

shromažďující data z databáze UniProtKB/Swiss-Prot, identifikace byla založena na porovnání jednotlivých hodnot m/z se shodnými hodnotami v databázi (Příloha č. 2), každému proteinu bylo přiřazeno jméno, identifikační číslo a funkce. Identifikované proteiny mají různé funkce: podílejí se na replikaci a transkripci DNA; podílejí se na různých buněčných procesech, jako je růst buňky, buněčná smrt; ovlivňují propustnost membrán; umožňují vazby různých látek např. RNA, lipidů, oxidoreduktáz; podílejí se na stresové odpovědi po působení např. antibiotik, látek s kyselým pH, zinku, hořčičku, ozáření; dále se podílejí na různých metabolických dějích, jako je např. metabolismus pyruvátu, biosyntéza threoninu, alaninu. Identifikované proteiny jsou součástí různých struktur bakteriální buňky, z identifikovaných proteinů bylo 25 ribozomálních, 26 membránových, 9 proteinů cytosolu a DNA, 4 byly identifikovány jako stresové indikátory, zbylé proteiny nejsou charakterizovány. Přičemž u ribozomálních proteinů naměřené intenzity píků dosahovaly největších intenzit a tvorba proteinů byla indukována nejširším spektrem testovaných antibakteriálních látek.

Každá z testovaných látek podněcovala tvorbu proteinů různou měrou, intenzita píků byla vysoká ve čtyřech případech identifikovaných proteinů, a to u proteinu o m/z 5381.68a (50S ribozomální protein L34), u proteinu o m/z 6255.36a (ribosomální protein L33), u proteinu o m/z 7274.14a (50S ribosomální protein L29) a u proteinu o m/z 9554.84 (30S ribozomální protein S20). Tvorba některých proteinů byla podmíněna více testovanými látkami současně s různými hodnotami intenzit; u jiných byla tvorba proteinů podmíněna pouze jednou látkou. Ze všech testovaných látek nejširší škálu vytvořených proteinů indukoval tymol a guajakol, další látky podporující tvorbu stresových proteinů byl peroxid vodíku a chlornan sodný použité u referenčních vzorků, nejnižší variabilitu v tvorbě proteinů prokazoval citral, citronellol a α -pinen.

6 Diskuze

Všechny z testovaných složek vedly k expresi nebo inhibici různých druhů proteinů s různou intenzitou. Z výstupu PCA analýzy (Příloha č. 1), korelační matice (Obrázek č. 9) a dendrogramu (Obrázek č. 8) vyplývá, že existují rozdíly v produkci proteinů mezi jednotlivými skupinami antibakteriálních látek. Komerčně používané antibiotikum tetracyklin a dezinfekce peroxid vodíku a chlornan sodný vykazují jiné výsledky než použité složky silic. Peroxid vodíku a chlornan sodný podmiňoval tvorbu proteinů se shodnými m/z a s podobnými hodnotami intenzit, v čase 120 minut měl peroxid vodíku podobný proteinový profil jako karvakrol v čase 120 minut; chlornan sodný se v čase 120 minut proteinovým profilem podobal α -pinenu v čase 120 minut. 50S ribosomální protein L33 (m/z 6255,36) byl hlavním detekovaným proteinem v kulturách ošetřených peroxidem vodíku, chlornanem sodným a α -pinenem. Peroxid vodíku středně intenzivně ovlivňoval produkci proteinu o m/z 5473,64, v menší míře tvorbu tohoto proteinu ovlivňoval také chlornan sodný a karvakrol. Chlornan sodný i peroxid vodíku jsou antibakteriální látky u kterých je prokázáno, že způsobují značné změny a porušení buněčné membrány (Virto et al., 2005; Folmer et al., 2008), nejspíš právě kvůli tomuto faktu, jako jediné dvě z testovaných antibakteriálních látek významně ovlivňovaly (s intenzitou nad 50 %) tvorbu necharakterizovaného lipoproteinu YqhH, který je důležitou součástí vnější lipidové dvojvrstvy. Další protein, který byl ve velké míře ovlivněn peroxidem vodíku a chlornanem sodným byl 50S ribosomální protein L35 (m/z 7290,90), podílející se na translaci DNA, produkci tohoto proteinu podobnou měrou ovlivňoval také skořicový aldehyd a méně intenzivně karen.

Z výsledků měření také vyplývá podobnost proteinových spekter tetracyklinu a guajakolu, tyto dvě látky se dle dendrogramu (Obrázek č. 8) v časech 90 a 120 minut podobaly nejvíce. Podobnost mezi těmito dvěma látkami je potvrzena i tím, že v několika případech guajakol a tetracyklin jako jediné z testovaných antibakteriálních látek podporovaly tvorbu určitého proteinu, nebo naopak jako jediné dvě látky tvorbu určitých proteinů neovlivňovaly vůbec. Tetracyklin spolu s guajakolem, ovlivňovaly tvorbu 50S ribosomálního proteinu L27 (m/z 8994.70) nebo 50S ribosomálního proteinu L35 (m/z 7158.74). Tetracyklin je kvůli jeho nízké toxicitě a širokému spektru aktivity široce používaným antibiotikem. Ovšem jeho použití má značná omezení vzhledem k rostoucí rezistenci bakterií vůči této antibakteriální látce (Speer et al., 1992). Synergie mezi tetracyklinem a guajakolem by se proto mohlo využít v boji proti rezistenci bakterií vůči tomuto antibiotiku, jelikož pár

synergických antibakteriálních látek má větší efekt na bakteriální buňky než součet působení samostatných antibakteriálních látek.

Guajakol je často používanou antibakteriální látkou. Guajakol podmiňoval tvorbu mnoha odlišných druhů proteinů s vysokými hodnotami intenzit. Například proteinu 50S ribozomální protein L34 (m/z 5381.68), jehož tvorbu ovlivňoval společně s tetracyklinem nejvíce z testovaných látek. Tento protein se podílí na translaci DNA. Jako jediný z testovaných látek guajakol indukoval tvorbu neznámého YhcN proteinu (m/z 6960,26), který ovlivňuje tvorbu biofilmu a je zahrnutý ve stresové reakci buňky (Lee et al., 2010); dále jako jediný z testovaných látek guajakol podněcoval tvorbu 23S rRNA metylázového leader proteinu (Erythromycin resistance leader peptid, m/z 3802,46), který je zapojen v mechanismu rezistence vůči antibiotikům (Tenson et al., 1996).

Tymol ze všech testovaných antibakteriálních látek podněcoval tvorbu nejširšího spektra proteinů. Námi stanovené MIC odpovídalo 1024 mg L^{-1} , v dostupné literatuře jsou ovšem stanovené dávky MIC tymolu značně variabilní od 200 mg L^{-1} (Xu et al., 2008) po 3200 mg L^{-1} (Santurio et al., 2014). Rozdílné MIC mohou být podmíněné různými postupy při stanovení, finální výsledek ovlivňuje doba inkubace inokula a také koncentrace Tween 80, který slouží jako disperzní činidlo při přípravě inokula, vyšší koncentrace Tween 80 podmiňuje vyšší hodnoty MIC (Gomez-Lopez et al., 2005). V našem případě jsme použili raději nižší dávku Tween 80 (0.5 % v/v). V porovnání s guajakolem podněcoval tymol sice tvorbu různých typů proteinů s různými vlastnostmi, ale změny jejich exprese byly nižší, pouze v jednom případě, a to u proteinu 30S ribozomálního proteinu S19 (m/z 10301.04). Tento protein se nachází v cytosolu buňky, konkrétně v malé ribosomální podjednotce, podílí se na translaci DNA a ovlivňuje vazbu tRNA. Tento protein je také zahrnutý v mechanismu účinku tetracyklinu, tetracyklin se na něj naváže a inhibuje jeho tvorbu (Roberts, 1996; Griffin et al., 2010). U vzorku ošetřeného tetracyklinem jeho tvorba byla indukována nejméně ze všech testovaných látek. Tymol také středně ovlivňoval tvorbu proteinu o m/z 7851.78, tento protein se neobjevil v kontrolním vzorku, proto je možné, že je jeho produkce ovlivněna právě vzniklým stresem způsobeným antibakteriálními látkami, kromě tymolu totiž jeho produkci v menší míře podmiňoval také karvakrol, geraniol, karvomentenol, citronellol. Funkce tohoto proteinu je dosud neobjasněna, ovšem Herzberg et al. (2006) ve své studii zabývající se tvorbou biofilmu *E. coli* K12 uvádí, že gen kódující tento protein se v biofilmu vytvořil po odstranění genu YdgG, který má vliv na tvorbu biofilmu a má pravděpodobně vliv na rezistenci buněk proti antibakteriálním látkám.

Skořicový aldehyd podněcoval nejvíce tvorbu ribosomálních proteinů, s největší intenzitou ovlivňoval tvorbu 50S ribosomálního proteinu L29 (m/z 7274.14), tvorba tohoto proteinu byla podmíněna také karvakrolem a karvonem. Jako jediný z testovaných antibakteriálních látek skořicový aldehyd ovlivňoval tvorbu 50S ribosomálního proteinu L22 (m/z 12227.96), který je součástí velké ribozomální podjednotky a má vliv na resistenci bakterií vůči antibiotikům (Gregory et Dahlberg, 1999). Skořicový aldehyd podmiňoval tvorbu proteinů s podobnými m/z jako karen, jejich podobnost je patrná i z výstupu PCA analýzy, téměř s totožnými hodnotami intenzit podmiňovaly obě zmíněné složky také tvorbu 50S ribosomálního proteinu L29 (m/z 3637,60). Námi zjištěné MIC 256 mg l⁻¹ skořicového aldehydu, odpovídá již dříve zjištěným MIC (Burt et al., 2007; Du et al., 2015). Karvakrol ovlivňoval produkci proteinů podobných spekter v blízkých intenzitách jako karvon a karvomentenol. Karvakrol spolu s karvomentenolem podněcovaly tvorbu 50S ribosomálního proteinu L36 1 (m/z 4365.42), podobně tomu tak bylo i u ribozomálního proteinu o m/z 7871.08, tento protein je schopný vázat kovové ionty, konkrétně ionty zinku (Eistetter et al., 1999). Eugenol jako jediný z antibakteriálních látek podmiňoval tvorbu lipoproteinu vnější membrány RzoR (Prophage outer membrane lipoprotein RzoR, m/z 4586.76), tento protein je součástí spaninového komplexu, který se podílí na porušení vnější membrány buňky a lýzi buňky během vývoje viru (Young, 2014).

Necharakterizovaný protein YthA (m/z 4777,60) je zástupcem stresových proteinů, jeho tvorba byla podmíněna všemi z testovaných látek, kromě peroxidu vodíku; v největší míře byla tvorba ovlivněna působením tymolu, karvonu, geraniolu a citralu, v malé míře produkci ovlivňoval chlornan sodný. V kontrolním vzorku se tento stresový protein objevil také, ovšem v menším množství než u vzorků ošetřených výše zmíněnými antibakteriálními látkami. Dalším stresovým proteinem je necharakterizovaný protein YoaJ (m/z 2690,98), tvorba tohoto proteinu byla ovlivněna s nízkou intenzitou u guajakolu, α -pinenu a tetracyklinu, s větší intenzitou se protein vytvořil v kontrolním vzorku. Guajakol jako jediný podněcoval tvorbu dvou Acid shock proteinů (m/z 4756.80, 4726.30), tyto proteiny jsou stresové proteiny, jsou produkovány bakteriální buňkou v reakci na kyselé prostředí a pomáhají buňce přežít při extrémně nízkém pH (pH 2,0) (Heyde et Portalier, 1990). Další identifikovaný stresový protein je Acid stress chaperone HdeA protein (m/z 9740.44), který je také aktivován při nízkém pH buňky. Vykazuje chaperonovou aktivitu tím, že potlačí agregaci denaturovaných periplazmatických proteinů, napomáhá ve fungování ostatních buněčných chaperonů a tím pomáhá buňce přežít v kyselém prostředí (Malki et al., 2008); tento protein byl vytvořen s intenzitou více než 50 % u vzorků ošetřených eugenolem, karvakrolem,

skořicovým aldehydem, karvomentenolem a karvonem, produkci tohoto proteinu naopak vůbec neovlivnil tymol, chlornan sodný a peroxid vodíku. Další Acid shock protein (m/z 4685,02) se objevil v nízké intenzitě u vzorku ošetřeného eugenolem.

Dalo by se předpokládat, že pokud je tvorba proteinů ovlivněna antibakteriální látkou ve velké míře, tak se daný protein nevyskytne v kontrolním neošetřeném vzorku. Ovšem v několika případech proteinů intenzita tvorby u kontrolního vzorku překročila intenzity tvorby proteinů testovaných antibakteriálních látek. V takových případech lze předpokládat, že tvorba proteinů byla naopak potlačena. Takovým příkladem je 50S ribosomální protein L32 (m/z 6316,44), kde tvorba tohoto proteinu u kontrolního vzorku dosahovala nejvyšší intenzity, méně pak jeho tvorba byla ovlivněna tetracyklinem, guajakolem a α -pinenem; 100% intenzity u kontrolního vzorku dosahovala také tvorba ribosomálního proteinu o m/z 5381,68, jehož tvorba byla stejnou měrou podmíněna i tetracyklinem a guajakolem; již zmiňovaný 50S ribosomální protein L33 (m/z 6255,36), jehož tvorba byla podmíněna peroxidem vodíku, chlornanem sodným a α -pinenem se 100% intenzitou, byl ovšem také indukován v kontrolním vzorku s intenzitou 98 %. V kontrolním vzorku se také nejvíce projevila tvorba ribosomálního proteinu stacionární fáze (m/z 5096,84), tvorba tohoto proteinu je ovlivněna vstupem buňky do stacionární fáze, ve které jsou bakteriální buňky nejvíce odolné vůči působení antibakteriálních látek (Cherchi et Gu, 2011). Vyšší intenzita produkce některých proteinů u neošetřených vzorků může být vysvětlena tím, že exponenciální fáze růstu buňky má různé trvání a po nějakém čase mohlo dojít u některých vzorků ošetřených antibakteriální látkou k usmrcení buňky, tím pádem nemohlo dojít k produkci proteinu; nebo se naopak bakteriální buňka vypořádala s indukovaným stresem, čímž byla produkce proteinu zastavena, pravděpodobně proto se některé složky silic při delším působení na bakteriální buňky (90, 120 minut) podobaly spíše kontrolnímu vzorku.

7 Závěr

V této diplomové práci byl zkoumán efekt dvanácti antibakteriálních složek silic (převážně terpenů) na produkci nízkomolekulárních proteinů bakterií *Escherichia coli* vytvořených vlivem stresové reakce pomocí nástroje MALDI-TOF. Použití MALDI-TOF se jeví jako účinná a efektivní metoda v analýze nízkomolekulárních proteinů. Všechny z dvanácti testovaných látek tvorbu proteinů ovlivňovaly různou měrou. Z 297 nalezených m/z bylo 94 proteinů identifikováno. Nejširší změny ve spektru proteinů indukoval guajakol, tymol, skořicový aldehyd a karvakrol, ovšem stresové proteiny byly indukovány i dalšími složkami silic, jako je například eugenol, α -pinen, karvon, karvomentenol. Hypotéza práce byla tedy potvrzena.

V této práci byla také zjištěna podobnost v získaných proteinových profilech mezi některými přírodními antibakteriálními látkami a komerčně užívanými antibakteriálními látkami (tetracyklin, peroxid vodíku a chlornan sodný). Vhodná kombinace složek silic s komerčně používanými antibakteriálními látkami by mohla mít význam v boji proti rezistenci bakteriálních buněk vůči některým druhům antibakteriálních látek, např. antibiotik. V potravinářství by tento poznatek mohl mít přínos v problematice tvorby a rezistence biofilmu. K potvrzení této synergie mezi komerčně používanými antibakteriálními látkami a přírodními antibakteriálními látkami je ovšem za potřebí provést mnoho dalších výzkumů.

8 Seznam literatury

- Adelakun, O., Oyelade, O., Olanipekun, B. 2016. Use of Essential Oils in Food Preservation. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. Elsevier. Cambridge, Massachusetts, USA. 71-84. ISBN: 9780124166417.
- Aebersold, R., Mann, M. 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 422 (6928). 198-207. ISSN: 0028-0836.
- Aiken, C., Chen, C. 2005. Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals. *Trends in Molecular Medicine*. 11 (1). 31-36. ISSN: 14714914.
- Aldred, E., Buck, C., Vall, K. 2009. Terpenes. *Pharmacology*. 1. Elsevier. Churchill Livingstone. 167-174. ISBN: 9780443068980.
- Ali-Khan, N., Zuo, X., Speicher, D. 2001. Overview of Proteome Analysis. Coligan, John E. (ed.), Ben M. Dunn (ed.), David W. Speicher (ed.) a Paul T. Wingfield (ed.), John Coligan, Ben Dunn, David Speicher, Paul Wingfield. *Current Protocols in Protein Science*. 1st. John Wiley & Sons. Hoboken, NJ, USA. 22.1.1-22.1.19. ISBN: 0471140864.
- Arnold, R., Karty, J., Ellington, A., Reilly, J. 1999. Monitoring the Growth of a Bacteria Culture by MALDI-MS of Whole Cells. *Analytical Chemistry*. 71 (10). 1990-1996. ISSN: 0003-2700.
- Arsène, F., Tomoyasu, T., Bukau, B. 2000. The heat shock response of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*. 55 (1-3). 3-9. ISSN: 01681605.
- Astley, S. 2003. ANTIOXIDANTS | Role of Antioxidant Nutrients in Defense Systems. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2nd. Elsevier. s. 282-289. ISBN: 9780122270550.
- Aureli, P., Costatini, A., Zolea, S. 1992. Antimicrobial Activity of Some Plant Essential Oils Against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 55 (5). 344-348. ISSN: 0362-028X.
- Awouafack, M., Tane, P., Kuete, V., Eloff, J. 2013. Sesquiterpenes from the Medicinal Plants of Africa. *Medicinal Plant Research in Africa*. 1st. Elsevier. London. s. 33-103. ISBN: 9780124059276.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46 (2). 446-475. ISSN: 02786915.
- Banthorpe, D., Charlwood, B., Francis, M. 1972. Biosynthesis of monoterpenes. *Chemical Reviews*. 72 (2). 115-155.

- Beavis, R., Chait, B. 1996. Matrix-assisted laser desorption ionization mass-spectrometry of proteins. *High Resolution Separation and Analysis of Biological Macromolecules Part A: Fundamentals*. Elsevier. 519-551. ISBN: 9780121821715.
- Belletti, N., Ndagijimana, M., Sisto, C., Guerzoni, M., Lanciotti, R., Gardini, F. 2004. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Citrus Essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (23). 6932-6938. ISSN: 0021-8561.
- Bouaziz, M., Yangui, T., Sayadi, S., Dhouib, A. 2009. Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*. 47 (11). 2755-2760.
- Boysen, R., Hearn, M. 2010. High Performance Liquid Chromatographic Separation Methods. *Comprehensive Natural Products II*. 1st. Elsevier. s. 5-49. ISBN: 9780080453828.
- Breitmaier, E. 2006. Terpenes: Importance, General Structure, and Biosynthesis. Breitmaier, Eberhard. *Terpenes*. 1. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim, Germany. 1-9. ISBN: 9783527609949.
- Buckle, J. 2015. Basic Plant Taxonomy, Basic Essential Oil Chemistry, Extraction, Biosynthesis, and Analysis. *Clinical Aromatherapy*. 3rd. Elsevier. London. s. 37-72. ISBN: 9780702054402.
- Burt, S., van der Zee, R., Koets, A., de Graaff, A., van Knapen, F., Gaastra, W., Haagsman, H., Veldhuizen, E. 2007. Carvacrol Induces Heat Shock Protein 60 and Inhibits Synthesis of Flagellin in *Escherichia coli* O157: H7. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (14). 4484-4490. ISSN: 0099-2240.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 94 (3). 223-253. ISSN: 01681605. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160504001680>>
- Can Baser, K. 2008. Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. *Current Pharmaceutical Design*. 14 (29). 3106-3119. ISSN: 13816128.
- Cao, X., Limbach, P. 2017. Mass Spectrometry: Nucleic Acids and Nucleotides Studied Using MS. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. Elsevier. s. 764-771. ISBN: 9780128032244.
- Carson, C., Mee, B., Riley, T. 2002. Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46 (6). 1914-1920. ISSN: 0066-4804.

- Cimmino, A., Andolfi, A., Evidente, A. 2014. Phytotoxic Terpenes Produced by Phytopathogenic Fungi and Allelopathic Plants. *Natural product communications*. 9 (3). 401-408.
- Coats, J., Karr, L., Drewes, C. 1991. Toxicity and Neurotoxic Effects of Monoterpenoids: In Insects and Earthworms. *Naturally Occurring Pest Bioregulators*. 449 (20). 305-316.
- Cotter, R. 1999. Peer Reviewed: The New Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 71 (13). 445-451. ISSN: 0003-2700.
- Cowan, M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 (4). 564-582.
- Cragg, G., Newman, D., Kingston, D. 2010. Terrestrial Plants as a Source of Novel Pharmaceutical Agents. *Comprehensive Natural Products II*. 1st. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. s. 5-39. ISBN: 9780080453828.
- Dalleau, S., Cateau, E., Bergès, T., Berjeaud, J., Imbert, C. 2008. In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 31 (6). 572-576.
- De Hoffmann, E., Stroobant, V. 2001. *Mass spectrometry: principles and applications*. 2nd ed. John Wiley & Sons. Chichester. ISBN: 0-471-48566-7.
- De Oliveira, A., Tirapelli, C., Ambrosio, S., da Costa, F. 2008. Diterpenes: A Therapeutic Promise for Cardiovascular Diseases. *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery*. 3 (1). 1-8. ISSN: 15748901.
- Deans, S., Ritchie, G. 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 5 (2). 165-180. ISSN: 01681605.
- Decarvalho, C., Dafonseca, M. 2006. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chemistry*. 95 (3). 413-422. ISSN: 03088146.
- Delaquis, P. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 74 (1-2). 101-109. ISSN: 01681605.
- Demirev, P., Sandrin, T. 2016. *Applications of mass spectrometry in microbiology: from strain characterization to rapid screening for antibiotic resistance*. 2016. Springer Science+Business Media. New York, NY. ISBN: 9783319260686.
- Dev, S. 1989. Terpenoids. Rowe, John W. (ed.). *Natural Products of Woody Plants*. 1. Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg. s. 691-807. Springer Series in Wood Science. ISBN: 978-3-642-74077-0.
- Dorman, H., Deans, S. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88 (2). 308-316. ISSN: 1364-5072.

- Du, E., Gan, L., Li, Z., Wang, W., Liu, D., Guo, Y. 2015. In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 6 (1). ISSN: 2049-1891.
- Eistetter, A. J., Butler, P. D., Traut, R. R., Fanning, T. G. 1999. Characterization of *Escherichia coli* 50S ribosomal protein L31. *FEMS Microbiology Letters*. 180 (2). 345-349. ISSN: 03781097.
- Everley, R., Mott, T., Wyatt, S., Toney, D., Croley, T. 2008. Liquid chromatography/mass spectrometry characterization of *Escherichia coli* and *Shigella* species. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 19 (11). 1621-1628. ISSN: 1044-0305.
- Ferguson, P., Smith, R. 2003. Proteome Analysis by Mass Spectrometry. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 32 (1). 399-424. ISSN: 1056-8700.
- Folmer, V., Pedroso, N., Matias, A. C., Lopes, S. C. D. N., Antunes, F., Cyrne, L., Marinho, H. S. 2008. H₂O₂ induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1778 (4). 1141-1147. ISSN: 00052736.
- Freiwald, A., Sauer, S. 2009. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nature Protocols*. 4 (5). 732-742. ISSN: 1754-2189.
- Furuishi, T., Kato, Y., Fukami, T., Suzuki, T., Endo, T., Nagase, H., Ueda, H., Tomono, K. 2013. Effect of terpenes on the skin permeation of lomerizine dihydrochloride. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 16 (4). 551-563.
- Gallucci, M., Oliva, M., Casero, C., Dambolena, J., Luna, A., Zygadlo, J., Demo, M. 2009. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour and Fragrance Journal*. Wiley. 24 (6). 348-354.
- Garrels, J. 2001. Proteome. Brenner, Sydney a Jeffrey Miller. *Encyclopedia of Genetics*. 1st. Elsevier. San Diego. s. 1575-1578. ISBN: 9780122270802.
- Gill, B., Kumar, S. Navgeet, . 2016. Triterpenes in cancer: significance and their influence. *Molecular Biology Reports*. 43 (9). 881-896. ISSN: 0301-4851.
- Glória, M. 2003. SWEETENERS | Others. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2nd. Elsevier. s. 5695-5702. ISBN: 9780122270550.
- Gomez-Lopez, A., Aberkane, A., Petrikkou, E., Mellado, E., Rodriguez-Tudela, J. L., Cuenca-Estrella, M. 2005. Analysis of the Influence of Tween Concentration, Inoculum Size, Assay Medium, and Reading Time on Susceptibility Testing of *Aspergillus* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 43 (3). 1251-1255. ISSN: 0095-1137.

- Graves, P., Haystead, T. 2002. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66 (1). 39-63. ISSN: 1092-2172.
- Gregory, S. T., Dahlberg, A. E. 1999. Erythromycin Resistance Mutations in Ribosomal Proteins L22 and L4 Perturb the Higher Order Structure of 23 S Ribosomal RNA. *Journal of Molecular Biology*. 289 (4). 827-834. ISSN: 00222836.
- Griffin, M., Fricovsky, E., Ceballos, G., Villarreal, F. 2010. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 299 (3). 539-548. ISSN: 0363-6143.
- Gross, H., König, G. 2006. Terpenoids from Marine Organisms: Unique Structures and their Pharmacological Potential. *Phytochemistry Reviews*. 5 (1). 115-141. ISSN: 1568-7767.
- Guenther, E. 1952. The essential oils. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)*. 41 (8). 456-. ISSN: 00959553.
- Guilhaus, M., Mlynski, V., Selby, D. 1997. Perfect Timing: Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*. 11 (9). 951-962.
- Guilhaus, M. 1995. Special feature: Tutorial. Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry. Physical and instrumental concepts. *Journal of Mass Spectrometry*. 30 (11). 1519-1532. ISSN: 1076-5174.
- Habermehl, G., Fliegner, W. 1997. Terpenes and their biological relevance. *Structure and Chemistry (Part F)*. 20. Elsevier. s. 3-24. *Studies in Natural Products Chemistry*. ISBN: 9780444501059.
- Han, X., Aslanian, A., Yates, J. 2008. Mass spectrometry for proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*. 12 (5). 483-490.
- Hartsel, J., Eades, J., Hickory, B., Makriyannis, A. 2016. *Cannabis sativa and Hemp. Nutraceuticals*. 1st. Elsevier. Cambridge, Massachusetts, USA. s. 735-754. ISBN: 9780128021477.
- Hassan, B., Soumya, E., Amal, A., Sanae, G., Saad, I. 2017. Antifungal Activities of B - Ionone, Carvone and 1,8 - Cineole Essential Oil Components Against *Aspergillus niger* Spores. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 9 (6). 52-56.
- Henzel, W., Billeci, T., Stluts, J., Wong, S., Grimley, C., Watanabe, C. 1993. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90 (11). 5011-5015.
- Hernandez, L., Palazon, J., Navarro-Oca, A. 2012. The Pentacyclic Triterpenes , -amyrins: A Review of Sources and Biological Activities. Rao, Venketeshwer (ed.). *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. Dr. Venketeshwer Rao ed. InTech. s. 487-502. ISBN: 978-953-51-0296-0.

- Herzberg, M., Kaye, I., Peti, W., Wood, T. 2006. YdgG (TqsA) controls biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through autoinducer 2 transport. *Journal of bacteriology*. 188 (2). 587-98.
- Heyde, M., Portalier, R. 1990. Acid shock proteins of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. 69 (1-2). 19-26. ISSN: 03781097.
- Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R., Chait, B. 1991. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Analytical Chemistry*. 63 (24). 1193-1203. ISSN: 0003-2700.
- Holland, R., Duffy, C., Rafii, F., Sutherland, J., Heinze, T., Holder, C., Voorhees, K., Lay Jr, J. 1999. Identification of Bacterial Proteins Observed in MALDI TOF Mass Spectra from Whole Cells. *Analytical Chemistry*. 71 (15). 3226-3230. ISSN: 0003-2700.
- Hosseini, S., Martinez-Chapa, S. 2017. Principles and Mechanism of MALDI-ToF-MS Analysis. Hosseini, Samira a Sergio O. Martinez-Chapa. *Fundamentals of MALDI-ToF-MS Analysis*. Springer Singapore. Singapore. s. 1-19. SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology. ISBN: 978-981-10-2355-2.
- Hrdlickova Kuckova, S., Rambouskova, G., Hynek, R., Cejnar, P., Oltrogge, D., Fuchs, R. 2015. Evaluation of mass spectrometric data using principal component analysis for determination of the effects of organic lakes on protein binder identification. *Journal of Mass Spectrometry*. 50 (11). 1270-1278. ISSN: 10765174.
- Hübschmann, H. 2001. *Handbook of GC/MS Fundamentals and Applications*. 2nd. John Wiley & Sons. Weinheim, Germany. ISBN: 3-529-30170-4.
- Hylgaard, M., Mygind, T., Meyer, R. 2012. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology*. 3 (12). ISSN: 1664-302X.
- Chan, K., Lin, Z. 2010. Treatments used in complementary and alternative medicine. Side Effects of Drugs Annual 32 - A worldwide yearly survey of new data and trends in adverse drug reactions and interactions. Elsevier. s. 879-889. Side Effects of Drugs Annual. ISBN: 9780444535504.
- Chan, K., Zhang, H., Lin, Z. 2012. Treatments used in complementary and alternative medicine. A worldwide yearly survey of new data in adverse drug reactions and interactions. 1st. Elsevier. London. s. 769-783. Side Effects of Drugs Annual. ISBN: 9780444594990.
- Cherchi, C., Gu, A. 2011. Effect of bacterial growth stage on resistance to chlorine disinfection. *Water Science & Technology*. 64 (1). 7-. ISSN: 0273-1223.

- Inoue, Y., Shiraishi, A., Hada, T., Hirose, K., Hamashima, H., Shimada, J. 2004. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*. 237 (2). 325-331. ISSN: 03781097.
- Izawa, K., Amino, Y., Kohmura, M., Ueda, Y., Kuroda, M. 2010. Human–Environment Interactions – Taste. *Comprehensive Natural Products II*. 1st. Elsevier. s. 631-671.
- Jocelyn Paré, J., Yaylayan, V. 1997. Chapter 7 Mass spectrometry: Principles and applications. *Instrumental Methods in Food Analysis* [online]. Elsevier. s. 239-266. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*. ISBN: 9780444818683.
- Jurinke, C., Oeth, P., van den Boom, D. 2004. MALDI-TOF Mass Spectrometry: A Versatile Tool for High-Performance DNA Analysis. *Molecular Biotechnology*. 26 (2). 147-164. ISSN: 1073-6085.
- Kamatou, G., Vermaak, I., Viljoen, A., Lawrence, B. 2013. Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry*. 96 (2013). 15-25.
- Karas, M., Bachmann, D., Hillenkamp, F. 1985. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Analytical Chemistry*. 57 (14). 2935-2939. ISSN: 0003-2700.
- Karas, M., Hillenkamp, F. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*. 60 (20). 2299-2301. ISSN: 0003-2700.
- Karas, M., Bahr, U., Gießmann, U. 1991. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 10 (5). 335-357. ISSN: 0277-7037.
- Katsukawa, M., Nakata, R., Takizawa, Y., Hori, K., Takahashi, S., Inoue, H. 2010. Citral, a component of lemongrass oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1801 (11). 1214-1220.
- Kern, C., Usbeck, J., Vogel, R., Behr, J. 2013. Optimization of Matrix-Assisted-Laser-Desorption–Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometry for the identification of bacterial contaminants in beverages. *Journal of Microbiological Methods*. 93 (3). 185-191. ISSN: 01677012.
- Khan, S., Tosun, A., Kim, Y. 2015. Ginsenosides as Food Supplements and Their Potential Role in Immunological and Neurodegenerative Disorders. *Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease*. 1st. Elsevier. s. 303-309. ISBN: 9780124114623.
- Kleinhentz, M., Jactel, H., Menassieu, P. 1999. Terpene Attractant Candidates of *Dioryctria sylvestrella* in Maritime Pine (*Pinus pinaster*) Oleoresin, Needles, Liber, and Headspace Samples. *Journal of Chemical Ecology*. 25 (12). 2741-2756. ISSN: 00980331.

- Koppelaar, D., Barinaga, C., Denton, M., Sperline, R., Hieftje, G., Schilling, G., Andrade, F., Barnes, J., IV, I. 2005. MS Detectors. *Analytical Chemistry*. 77 (21). 418-427. ISSN: 0003-2700.
- Lanzotti, V. 2013. Diterpenes for Therapeutic Use. Ramawat, Kishan Gopal (ed.) a Jean-Michel Mérillon (ed.). *Natural Products*. 1st. Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg. s. 3173-3191. ISBN: 978-3-642-22143-9.
- Lee, J., Hiibel, S. R., Reardon, K. F., Wood, T. K. 2010. Identification of stress-related proteins in *Escherichia coli* using the pollutant cis-dichloroethylene. *Journal of applied microbiology*. 108 (6). 2088-102.
- Leite, A., Lima, E., Souza, E., Diniz, M., Trajano, V., Medeiros, I. 2007. Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 43 (1). 121-126. ISSN: 1516-9332.
- Liebler, D. 2002. *Introduction to proteomics: tools for the new biology*. Humana Press. Totowa, NJ. ISBN: 0-89603-992-7.
- Loza-Tavera, H. 1999. Monoterpenes in Essential Oils. Shahidi, Fereidoon (ed.), Paul Kolodziejczyk (ed.), John R. Whitaker (ed.), Agustin Lopez Munguia (ed.) a Glenn Fuller (ed.). *Chemicals via Higher Plant Bioengineering*. 1. Springer US. Boston, MA. s. 49-62. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. ISBN: 978-1-4613-7143-4.
- Madonna, A., Basile, F., Ferrer, I., Meetani, M., Rees, J., Voorhees, K. 2000. On-probe sample pretreatment for the detection of proteins above 15 KDa from whole cell bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 14 (23). 2220-9.
- Malki, A., Le, H. -T., Milles, S., Kern, R., Caldas, T., Abdallah, J., Richarme, G. 2008. Solubilization of Protein Aggregates by the Acid Stress Chaperones HdeA and HdeB. *Journal of Biological Chemistry*. 283 (20). 13679-13687. ISSN: 0021-9258.
- Martindale, W. 1910. Martindale, W. H. (1910). Essential oils in relation to their antiseptic powers as determined by their carbolic coefficients. *Perfumery and Essential Oil Research*. 1. 266-296.
- Mbaveng, A., Kuete, V. 2017. *Zingiber officinale*. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*. 1st. Elsevier. Cambridge, Massachusetts, USA. s. 627-639. ISBN: 9780128092866.
- Merlos Rodrigo, M., Zitka, O., Krizkova, S., Moulick, A., Adam, V., Kizek, R. 2014. MALDI-TOF MS as evolving cancer diagnostic tool: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 95. 245-255. ISSN: 07317085.

- Metaani, M., Voorhees, K. 2005. MALDI Mass Spectrometry Analysis of High Molecular Weight Proteins from Whole Bacterial Cells: Pretreatment of Samples with Surfactants. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 16 (9). 1422-1426.
- Migliore, L., Rotini, A., Thaller, M. 2013. Low Doses of Tetracycline Trigger the E. coli Growth: A Case of Hormetic Response. *Dose Response*. 11 (4). 550-7.
- Miyashita, K., Hosokawa, M. 2014. Carotenoids as a Nutraceutical Therapy for Visceral Obesity. *Nutrition in the Prevention and Treatment of Abdominal Obesity*. Elsevier. s. 329-340. ISBN: 9780124078697.
- Momo, R. A. M. 2013. MALDI-ToF mass spectrometry biomarker profiling via multivariate data analysis application in the biopharmaceutical bioprocessing industry. PhD Thesis. Newcastle University. Dostupné z: <<https://theses.ncl.ac.uk/dspace/handle/10443/1939>>
- Momo, R., Povey, J., Smales, C., O'Malley, C., Montague, G., Martin, E. 2013. MALDI-ToF mass spectrometry coupled with multivariate pattern recognition analysis for the rapid biomarker profiling of Escherichia coli in different growth phases. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 405 (25). 8251-8265. ISSN: 1618-2642.
- Muranaka, T., Saito, K. 2010. Production of Pharmaceuticals by Plant Tissue Cultures. *Comprehensive Natural Products II*. 1st. Elsevier. Amsterdam, Netherlands. s. 615-628. ISBN: 9780080453828.
- Nerio, L., Olivero-Verbel, J., Stashenko, E. 2010. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*. 101 (1). 372-378. ISSN: 09608524.
- Nielen, M. 1999. Maldi time-of-flight mass spectrometry of synthetic polymers. *Mass spectrometry reviews*. 18 (5). 309-344.
- Nkondjock, A. 2009. Coffee consumption and the risk of cancer: An overview. *Cancer Letters*. 277 (2). 121-125. ISSN: 03043835.
- Ochoa, M., Harrington, P. 2005. Immunomagnetic Isolation of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157: H7 from Ground Beef and Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry and Database Searches. *Analytical Chemistry*. 77 (16). 5258-5267. ISSN: 0003-2700.
- Oliveira, M., Brugnera, D., Cardoso, M., Alves, E., Piccoli, R. 2010. Disinfectant action of Cymbopogon sp. essential oils in different phases of biofilm formation by Listeria monocytogenes on stainless steel surface. *Food Control*. 21 (4). 549-553. ISSN: 09567135.
- Paduch, R., Kandefer-Szerszeń, M., Trytek, M., Fiedurek, J. 2007. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 55 (5). 315-327. ISSN: 0004-069X.

- Pappin, D. 1996. Peptide Mass Fingerprinting Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. Smith, Bryan John. Protein Sequencing Protocols. 1. Humana Press. New Jersey. s. 165-174. ISBN: 0-89603-353-8.
- Pattnaik, S., Vemulapad, S., Bapaji, M., Kole, C. 1997. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios.* 89 (359). 39-46.
- Plevačová, H. 1960. O původu slova silice. *Naše řeč* [online]. 43 (9-10). 275-278. Dostupné z: <<http://nase-rec.ujc.cas.cz/archiv.php?art=4791>>
- PubChem, . 2016. (2E,6E)-Farnesyl phosphate. In: PubChem Substance and Compound databases [online]. National Center for Biotechnology Information. Dostupné z: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/46926298#section=Top>>
- Raeder, H., Schrepp, W. 1998. MALDI-TOF mass spectrometry in the analysis of synthetic polymers. *Acta Polymerica.* 49 (6). 272-293.
- Roberts, M. 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Reviews.* 19 (1). 1-24. ISSN: 01686445.
- Rodríguez-Concepción, M. 2014. Plant Isoprenoids: A General Overview. Rodríguez-Concepción, Manuel (ed.). *Plant Isoprenoids.* 1. Springer New York. New York, NY. s. 1-5. *Methods in Molecular Biology.* ISBN: 978-1-4939-0605-5.
- Ruzicka, L. 1953. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia.* 9 (10). 357-367. ISSN: 0014-4754.
- Ryzhov, V., Fenselau, C. 2001. Characterization of the Protein Subset Desorbed by MALDI from Whole Bacterial Cells. *Analytical Chemistry.* 73 (4). 746-750. ISSN: 0003-2700.
- Santurio, D., Zanette, R., de Jesus, F., Fries, L. 2014. Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Thyme and of Thymol against *Escherichia coli* Strains. *Acta Scientiae Veterinari.* 42 (1).
- Seigler, D. 1998. Monoterpenes. Seigler, David S. *Plant Secondary Metabolism.* 1. Springer US. Boston, MA. s. 324-352. ISBN: 978-1-4613-7228-8.
- Seigler, D. 1998. Introduction to Terpenes. Seigler, David S. *Plant Secondary Metabolism.* 1. Springer US. Boston, MA. s. 312-323. ISBN: 978-1-4613-7228-8.
- Shah, T., Misra, A. 2011. Proteomics. Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics. 1st. Elsevier. London. s. 387-427. ISBN: 9780123849649.
- Schmid, R., Weickhardt, C. 2001. Designing reflectron time-of-flight mass spectrometers with and without grids: a direct comparison. *International Journal of Mass Spectrometry.* 206 (3). 181-190. ISSN: 13873806.

- Schott, A., Behr, J., Quinn, J., Vogel, R., Nychas, G. 2016. MALDI-TOF Mass Spectrometry Enables a Comprehensive and Fast Analysis of Dynamics and Qualities of Stress Responses of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19. PLOS ONE. 11 (10). 0165504-. ISSN: 1932-6203.
- Silva, C., Portari, G., Vannucchi, H. 2016. Antioxidant Treatment and Alcoholism. Molecular Aspects of Alcohol and Nutrition. 1st. Elsevier. Cambridge, Massachusetts, USA. s. 119-131. ISBN: 9780128007730.
- Silvestre, A., Gandini, A. 2008. Terpenes: Major Sources, Properties and Applications. Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources. 1. Elsevier. Amsterdam. s. 17-38. ISBN: 9780080453163.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P., Viridi, J. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Frontiers in Microbiology. 6. ISSN: 1664-302x.
- Siroli, L., Patrignani, F., Gardini, F., Lanciotti, R. 2015. Effects of sub-lethal concentrations of thyme and oregano essential oils, carvacrol, thymol, citral and trans-2-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile molecule profile of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*. Food Chemistry. 182 (2015). 185-192. ISSN: 03088146.
- Speer, B., Shoemaker, N., Salyers, A. 1992. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. Clinical Microbiology Reviews. 5 (4). 387-399. ISSN: 0893-8512.
- Sun, J. 2007. D-Limonene: Safety and Clinical Applications. Alternative medicine review. 12 (3). 259-264.
- Sze, E., Chan, T., Wang, G. 1998. Formulation of matrix solutions for use in matrix-assisted laser desorption/ionization of biomolecules. Journal of the American Society for Mass Spectrometry. 9 (2). 166-174. ISSN: 1044-0305.
- Šedo, O., Voráč, A., Zdráhal, Z. 2011. Optimization of mass spectral features in MALDI-TOF MS profiling of *Acinetobacter* species. Systematic and Applied Microbiology. 34 (1). 30-34. ISSN: 07232020.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., Matsuo, T. 1988. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2 (8). 151-153. ISSN: 0951-4198.
- Tenson, T., DeBlasio, A., Mankin, A. 1996. A functional peptide encoded in the *Escherichia coli* 23S rRNA. Proceedings of the National Academy of Sciences. 93 (11). 5641-5646. ISSN: 0027-8424.

- Thimmappa, R., Geisler, K., Louveau, T., O'Maille, P., Osbourn, A. 2014. Triterpene Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology*. 65 (1). 225-257. ISSN: 1543-5008.
- Tidgewell, K., Clark, B., Gerwick, W. 2010. The Natural Products Chemistry of Cyanobacteria. *Comprehensive Natural Products II*. 1. Elsevier. s. 141-188. ISBN: 9780080453828.
- Tongnuanchan, P., Benjakul, S. 2014. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*. 79 (7). 1231-1249. ISSN: 00221147.
- Toyomasu, T., Sassa, T. 2010. Diterpenes. *Comprehensive Natural Products II*. 1st. Elsevier. London. s. 643-672. ISBN: 9780080453828.
- Tripathi, A., Mishra, S. 2016. Plant Monoterpenoids (Prospective Pesticides). *Ecofriendly Pest Management for Food Security*. 1. Elsevier. London. s. 507-524. ISBN: 9780128032657.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., Bisignano, G. 2005. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49 (6). 2474-2478. ISSN: 0066-4804.
- Urbanová, T., Tarkowská, D., Strnad, M., Hedden, P. 2011. Gibberellins – terpenoid plant hormones: Biological importance and chemical analysis. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 76 (12). 1669-1686. ISSN: 1212-6950.
- Venkatesha, S., Moudgil, K. 2016. Celastrol and Its Role in Controlling Chronic Diseases. Gupta, Subash Chandra (ed.), Sahdeo Prasad (ed.) a Bharat B. Aggarwal (ed.). *Anti-inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases*. 1st. Springer International Publishing. Cham. s. 267-289. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. ISBN: 978-3-319-41332-7.
- Verhagen, L. 2010. Beer Flavor. *Comprehensive Natural Products II*. 1st. Elsevier. London. s. 967-997. ISBN: 9780080453828.
- Vestal, M., Juhasz, P., Martin, S. 1995. Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 9 (11). 1044-1050. ISSN: 0951-4198.
- Virto, R., Manas, P., Alvarez, I., Condon, S., Raso, J. 2005. Membrane Damage and Microbial Inactivation by Chlorine in the Absence and Presence of a Chlorine-Demanding Substrate. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (9). 5022-5028. ISSN: 0099-2240.
- Wal, A., Rai, A., Wal, P., Sharma, G. 2011. Biological activities of lupeol. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 2 (2). 96-. ISSN: 0975-8453.
- Wan, .Wilcock, .Coventry, . 1998. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*. 84 (2). 152-158. ISSN: 13645072.

- Webster, H., Lehnert, E. 1994. Chemistry of artemisinin: an overview. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 88 (1). 27-29. ISSN: 00359203.
- Welker, M. 2011. Proteomics for routine identification of microorganisms. *PROTEOMICS*. 11 (15). 3143-3153. ISSN: 16159853.
- Wiley, W., McLaren, I. 1955. Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Review of Scientific Instruments*. 26 (12). 1150-1157. ISSN: 0034-6748.
- Xu, J., Zhou, F., Ji, B., Pei, R., Xu, N. 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*. 47 (3). 174-179. ISSN: 02668254.
- Yang, H., Woo, J., Pae, A., Um, M., Cho, N., Park, K., Yoon, M., Kim, J., Lee, C., Cho, S. 2016. - Pinene, a Major Constituent of Pine Tree Oils, Enhances Non-Rapid Eye Movement Sleep in Mice through GABAA-benzodiazepine Receptors. *Molecular Pharmacology*. 90 (5). 530-539. ISSN: 1521-0111.
- Yang, M., Wu, M. 2016. *Chinese Ginseng. Nutraceuticals*. 1st. Elsevier. s. 693-705. ISBN: 9780128021477.
- Yates, J., Ruse, C., Nakorchevsky, A. 2009. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 11 (1). 49-79. ISSN: 1523-9829.
- Young, R. 2014. Phage lysis: Three steps, three choices, one outcome. *Journal of Microbiology*. 52 (3). 243-258. ISSN: 1225-8873.
- Zengin, H., Baysal, A. 2014. Antibacterial and Antioxidant Activity of Essential Oil Terpenes against Pathogenic and Spoilage-Forming Bacteria and Cell Structure-Activity Relationships Evaluated by SEM Microscopy. *Molecules*. 19 (11). 17773-17798.
- Zenobi, R., Knochenmuss, R. 1998. Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*. 17 (5). 337-366.
- Zhang, H., Qiu, M., Chen, Y., Chen, J., Sun, Y., Wang, C., Fong, H. 2011. Plant terpenes. *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)* [online]. Eolss Publishers. Paris. Dostupné z: <<https://www.eolss.net/sample-chapters/C06/E6-151-05-00.pdf>>
- Zubko, E., Zubko, M. 2013. Co-operative inhibitory effects of hydrogen peroxide and iodine against bacterial and yeast species. *BMC Research Notes*. 6 (1). 272. ISSN: 1756-0500.

9 Seznam zkratek

GPP–geranylpyrofosfát
GGDP–geranylgeranyl difosfát
HSP–heat shock protein, protein teplotního šoku
MS–hmotnostní spektrometrie
2 D– dvojrozměrná (gelová elektroforéza)
EI–elektronová ionizace
CI–chemická ionizace
LD–desorpce laserem
MALDI–ionizace laserem za přítomnosti matrice
TOF–time of flight, analyzátor doby letu
API–ionizační techniky za atmosférického tlaku
ESI–ionizace elektrosprejem
APCI–chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI–fotoionizace za atmosférického tlaku
FI–ionizace polem
SIMS–hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů
TSP–ionizace termosprejem
FAB–ionizace urychlenými atomy
FIB–ionizace urychlenými ionty
PD–indukce vázaným plazmatem
MS/MS–tandemová hmotnostní spektrometrie
HPLC–vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IR–infračervené
UV–ultrafialové
CHCA– α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
TFA–trifluoroctová kyselina
SDS–sodiumdodecyl sulfát
PBS–phosphate buffer saline, fosfátový pufr s NaCl
NaClO–chlornan sodný
KTJ–kolonii tvořící jednotka
MIC–minimální inhibiční koncentrace
PCA–analýza hlavních komponent

10 Seznam obrázků

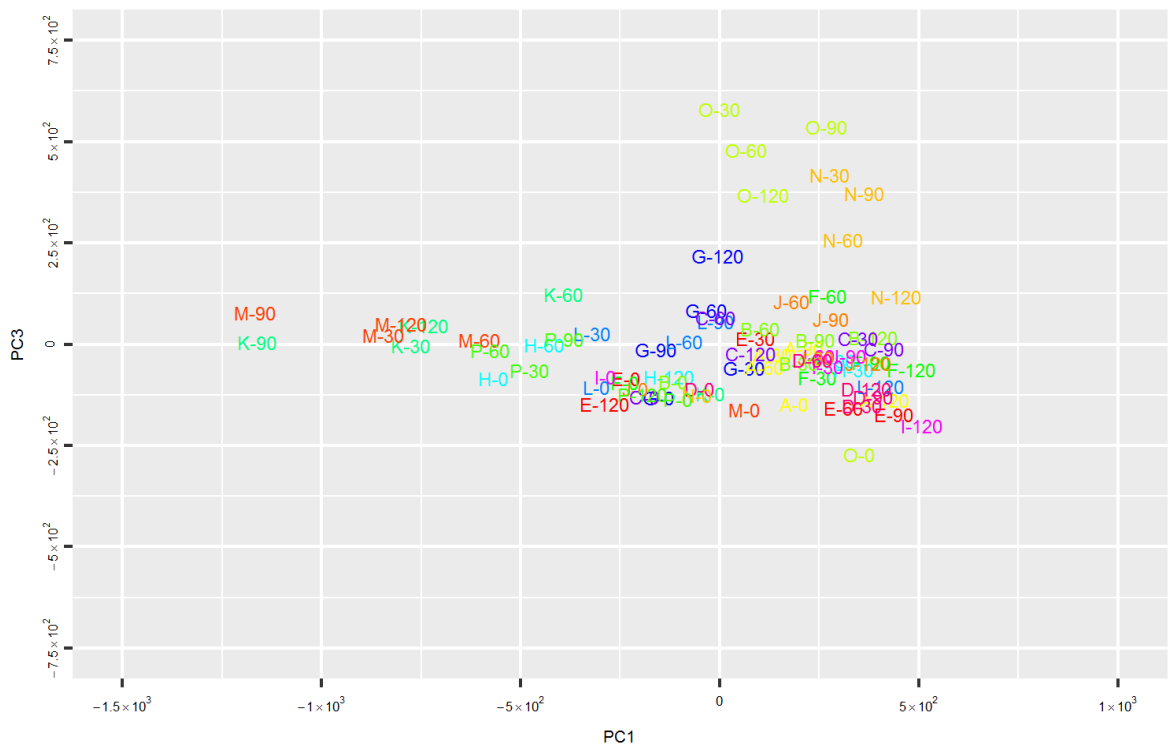
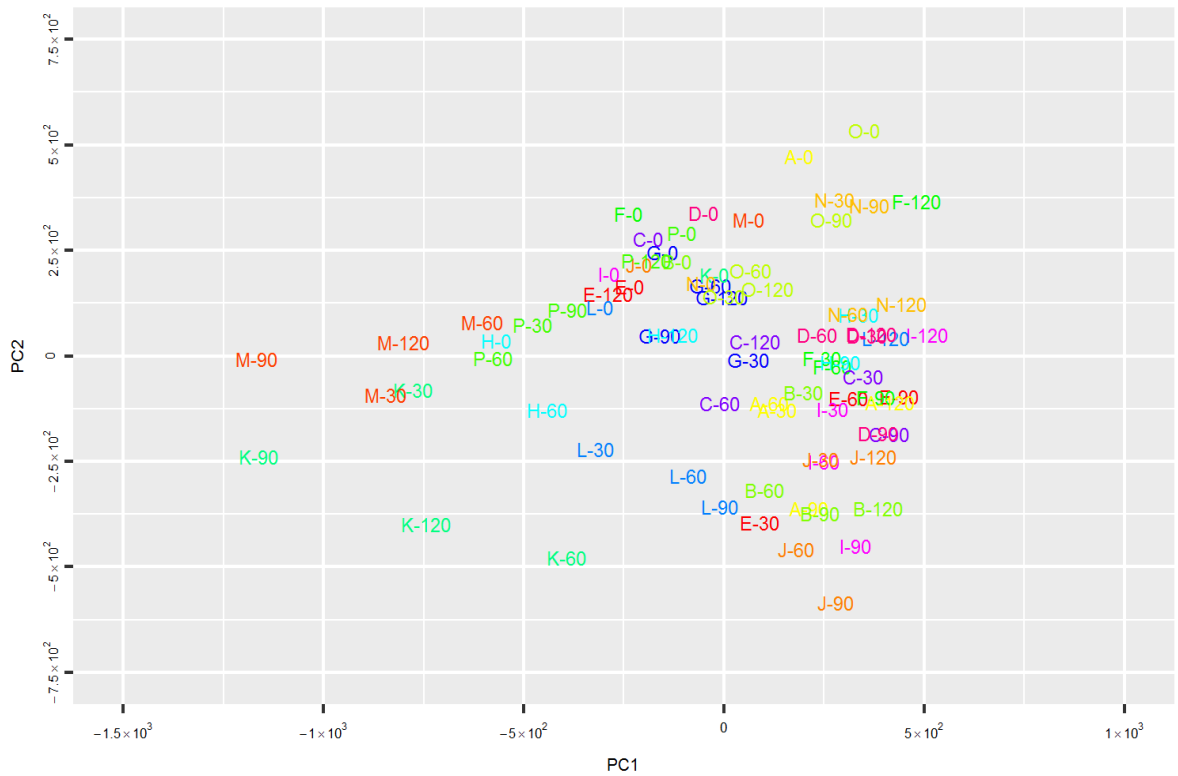
Obrázek č. 1: Chemická struktura izoprenové jednotky a její trojrozměrné zobrazení.....	12
Obrázek č. 2: Strukturní vzorec geranyl pyrofosfátu.....	13
Obrázek č. 3: Strukturní vzorec farnesyl fosfátu	13
Obrázek č. 4: Strukturní vzorec geranylgeranyl difosfátu	14
Obrázek č. 5: Strukturní vzorec skvalenu.	15
Obrázek č.6: Znázornění mikrotitrační destičky při stanovení MIC	31
Obrázek č. 7: Znázornění systému nanášení vzorků na MALDI terčik; žlutě – testované vzorky, červeně – kalibrační spot	33
Obrázek č. 8: Dendrogram analýzy hlavních komponent pro vzorky v 0, 90 a 120 minutách	36
Obrázek č. 9: Diagram korelační matice vzorků v čase 0, 90, 120 minut	37

11 Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Složky silic s identifikačním CAS číslem.....	29
Tabulka č. 2: Použité komponenty k analýze stresové reakce.....	32
Tabulka č. 3: Hodnoty naměřených MIC u jednotlivých složek	36

12 Přílohy

Příloha č. 1: PCA rozptylový diagram komponentních skóre v 0, 30, 60, 90 a 120 minutách



A cintonellol, B citral, C eugenol, D geraniol, E tymol, F karvakrol, G α -pinen, H skořicový aldehyd, I karvomentenol, J karvon, K guajakol, L karen, M tetracyklin, N NaClO, O peroxid, P kontrola

Příloha č. 2: Seznam identifikovaných proteinů v UniProtKB podle jejich m/z a antibakteriální látka, která nejvíce působila na produkci daného proteinu, tučně označené proteiny vyskytující se nejvíce v kontrolním vzorku

m/z	UniProtKB	Gen	Skupina	Označení	Název a popis proteinu	Antibak.látka
2589.18	P56980	repL	D	REPL1_ECOLI	Positive regulator of RepFIC repA1 expression (repA1 leader peptide)	Peroxid
2642.46	P07003	poxB	M C	POXB_ECOLI	Pyruvate dehydrogenase [ubiquinone] (EC 1.2.5.1) (Pyruvate oxidase) (POX) [Cleaved into: Alpha-peptide]	Guajakol
2690.98	C1P603	yoaJ	M	YOAJ_ECOLI	Uncharacterized protein YoaJ	Kontrolní vzorek
2770.80	Q8XA85	thrL	B	LPT_ECO57	thr operon leader peptid (thr operon attenuator)	Guajakol
2835.68	P0A790	panD	C	PAND_ECOLI	Aspartate 1-decarboxylase (EC 4.1.1.11) (Aspartate alpha-decarboxylase) [Cleaved into: Aspartate 1-decarboxylase beta chain; Aspartate 1-decarboxylase alpha chain]	Skořicový aldehyd
2997.98	A5A618	ynhF	M	YNHF_ECOLI	Uncharacterized protein YnhF	Tymol
3021.56	A5A624	dinQ	M	DINQ_ECOLI	Uncharacterized protein DinQ	Skořicový aldehyd
3205.74	P03061	ivbL	B	LPIV_ECOLI	ilv operon leader peptid (ilvBN operon attenuator peptid)	Tymol
3221.74	A5A627	tisB	M	TISB_ECOLI	Small toxic protein TisB (LexA-regulated protein TisB)	NaClO
3235.60	A5A617	ydgU	M	YDGU_ECOLI	Uncharacterized protein YdgU	Guajakol
3433.60	P52134	ypjK		YPJK_ECOLI	Uncharacterized protein YpjK	Tymol
3509.84	A5A616	yneM	M	YNEM_ECOLI	Uncharacterized protein YneM	Karvomentenol
3637.60a	A7ZSK1	rpmC	R	RL29_ECO24	50S ribosomal protein L29	Karvon Karvakrol

m/z	UniProtKB	Gen	Skupina	Označení	Název a popis proteinu	Antibak.látka
3802.46	P10739	ermC	A	LPRM_ECOLX	23S rRNA methylase leader peptide (Erythromycin resistance leader peptide)	Guajakol
3917.96	Q6BF25	ldrD	M	LDRD_ECOLI	Small toxic polypeptide LdrD	Geraniol
4115.20	Q2EES1	yniD	M	YNID_ECOLI	Uncharacterized protein YniD	Guajakol
4365.42	B1X6F1	rpmJ1	R	RL361_ECODH	50S ribosomal protein L36 1	Tymol Karvakrol Karvomentenol
4586.76	P58042	rzoR	M	RZOR_ECOLI	Prophage outer membrane lipoprotein RzoR (o-spanin) (Outer membrane lipoprotein Rz1 from lambdaoid prophage Rac) (Spanin from lambdaoid prophage Rac, outer membrane subunit)	Eugenol
4685.02	B6IB31	asr		ASR_ECOSE	Acid shock protein	Eugenol
4726.30	B7M9V0	asr		ASR_ECO45	Acid shock protein	Guajakol
4756.80	P36560	asr		ASR_ECOLI	Acid shock protein	Guajakol
4777.60	A8DYQ1	ythA	M	YTHA_ECOLI	Uncharacterized protein YthA	Tymol Karvon Geraniol
4858.34	P64567	yqgB	C	YQGB_ECOLI	Uncharacterized protein YqgB	Tymol
5096.84a	P68191	sra	R C	SRA_ECOLI	Stationary-phase-induced ribosome-associated protein (Protein D) (SRA) (30S ribosomal protein S22)	Kontrolní vzorek
5213.14	P64508	yobF	S	YOBF_ECOLI	Protein YobF	Tetracyklin
5381.68a	B1X9T1	rpmH	R	RL34_ECODH	50S ribosomal protein L34	Kontrolní vzorek
5473.64	P14504	ydfA		YP54_ECOLX	Uncharacterized 5.4 kDa protein in replication origin region (ORF2)	Peroxid
5523.20	B7MBN2	mgrB	M	MGRB_ECO45	PhoP/PhoQ regulator MgrB	Tetracyklin
5553.46	P64512	mgrB	M	MGRB_ECOLI	PhoP/PhoQ regulator MgrB	Tetracyklin
5592.62	Q8XBW9	hokE	M	HOKE_ECO57	Protein HokE	Skořicový aldehyd
5792.06	P0ACW8	ydfA		YDFA_ECOLI	Uncharacterized protein YdfA	NaClO
5895.50	P64442	yceO	M	YCEO_ECOLI	Uncharacterized protein YceO	Tetracyklin

m/z	UniProtKB	Gen	Skupina	Označení	Název a popis proteinu	Antibak.látka
6104.42	P0ACW2	ydbJ		YDBJ_ECOLI	Uncharacterized protein YdbJ	Tymol
6255.36a	P0A7N9	rpmG	R C	RL33_ECOLI	50S ribosomal protein L33 (Large ribosomal subunit protein bL33)	Kontrolní vzorek
6316.44	P0A7N4	rpmF	R C	RL32_ECOLI	50S ribosomal protein L32 (Large ribosomal subunit protein bL32)	Kontrolní vz. Tetracyklin Guajakol
6411.04	P0AG51	rpmD	R	RL30_ECOLI	50S ribosomal protein L30 (Large ribosomal subunit protein uL30)	Tymol
6444.58	B1X9Z9	rpmF	R	RL32_ECODH	50S ribosomal protein L32	NaClO
6504.60	P0AFW2	rnf	C	RMF_ECOLI	Ribosome modulation factor (RMF) (Hibernation factor RMF) (Protein E)	Karen Karvakrol
6532.04	P0AB40	bhsA	M	BHSA_ECOLI	Multiple stress resistance protein BhsA (Copper-induced outer membrane component)	Guajakol
6553.22	P64646	ghoT	M	GHOT_ECOLI	Toxin GhoT	Peroxid
6851.64	B1X8M1	ycaR		YCAR_ECODH	UPF0434 protein YcaR	Peroxid
6960.26	P64614	yhcN	S	YHCN_ECOLI	Uncharacterized protein YhcN	Guajakol
7158.74	P0A7Q1	rpmI	R	RL35_ECOLI	50S ribosomal protein L35 (Large ribosomal subunit protein bL35) (Ribosomal protein A)	Guajakol Tetracyklin
7206.48	P64619	yhdU	M	YHDU_ECOLI	Inner membrane protein YhdU	NaClO
7274.14a	B1X6G4	rpmC	R	RL29_ECODH	50S ribosomal protein L29	Skořicový aldehyd Karvakrol Karvon
7290.90	B1XG24	rpmI	R	RL35_ECODH	50S ribosomal protein L35	Skořicový aldehyd
7306.22	P65298	yqhH	M	YQHH_ECOLI	Uncharacterized lipoprotein YqhH	Peroxid
7459.84	P64545	yfgG	M	YFGG_ECOLI	Uncharacterized protein YfgG	Tetracyklin
7468.88	P0AAS9	ybdD		YBDD_ECOLI	Uncharacterized protein YbdD	Citral
7480.52	Q59385	copA	M	COPA_ECOLI	Copper-exporting P-type ATPase (EC 3.6.3.54) (Copper-exporting P-type ATPase A) (Cu(+)-exporting ATPase)	Peroxid

m/z	UniProtKB	Gen	Skupina	Označení	Název a popis proteinu	Antibak.látka
7690.78	Q52279	kleB	D	KLEB1_ECOLX	Protein KleB (KcrA2 protein)	Peroxid
7851.78	P75688	b0309		Y309_ECOLI	Putative uncharacterised protein b0309	Tymol
7871.08	B1XBA2	rpmE	R	RL31_ECODH	50S ribosomal protein L31	Karvoment enol Karvakrol
8119.38	P69222	infA	C	IF1_ECOLI	Translation initiation factor IF-1	Skořicový aldehyd
8369.42	P68679	rpsU	R C	RS21_ECOLI	30S ribosomal protein S21 (Small ribosomal subunit protein bS21)	Guajakol Tetracyklin
8417.68	P64467	cnu	D	CNU_ECOLI	OriC-binding nucleoid-associated protein (H-NS/StpA-binding protein 2) (Transcription modulator YdgT)	Peroxid
8484.18	B7MCX0	yheU		YHEU_ECO45	UPF0270 protein YheU	NaClO
8876.32	P0A7M2	rpmB	R C	RL28_ECOLI	50S ribosomal protein L28 (Large ribosomal subunit protein bL28)	Tymol
8943.24	P0AE63	chaB	D	CHAB_ECOLI	Putative cation transport regulator ChaB	Peroxid
8994.70	P0A7L8	rpmA	R	RL27_ECOLI	50S ribosomal protein L27 (Large ribosomal subunit protein bL27)	Tymol
9026.32	P32696	pspG	M	PSPG_ECOLI	Phage shock protein G	NaClO
9064.40	P0AET2	hdeB	M	HDEB_ECOLI	Acid stress chaperone HdeB (10K-L protein)	Eugenol
9191.88	B1XBT1	rpsP	R	RS16_ECODH	30S ribosomal protein S16	Tymol
9208.20	P76544	yffM		YFFM_ECOLI	Uncharacterized protein YffM	Peroxid
9227.14	P0ACF4	hupB	C	DBHB_ECOLI	DNA-binding protein HU-beta (HU-1) (NS1)	Tymol
9242.80	Q1R1V4	yubK		YUBK_ECOU	Uncharacterized protein YubK	NaClO
9270.74	P08365	chpS	D	CHPS_ECOLI	Antitoxin ChpS	Karen Karvon
9537.34	P0ACF0	hupA	M C	DBHA_ECOLI	DNA-binding protein HU-alpha (HU-2) (NS2)	Tymol Karvakrol
9554.84	P0A7U7	rpsT	R C	RS20_ECOLI	30S ribosomal protein S20 (Small ribosomal subunit protein bS20)	Karen Karvoment enol Citral Citronellol Eugenol

m/z	UniProtKB	Gen	Skupina	Označení	Název a popis proteinu	Antibak.látka
9602.80	P13959	repA2	D	COPB1_ECOLI	Replication regulatory protein RepA2 (Protein CopB)	NaClO
9740.44	P0AES9	hdeA	M C	HDEA_ECOLI	Acid stress chaperone HdeA (10K-S protein)	Karvakrol Eugenol
9935.50	B1XEX1	iraP	C	IRAP_ECODH	Anti-adapter protein IraP	Karen
9997.52	P04482	imm	S	IMM2_ECOLX	Colicin-E2 immunity protein (ImmE2) (Microcin-E2 immunity protein)	Karvakrol
10139.02	P0ADZ4	rpsO	R C	RS15_ECOLI	30S ribosomal protein S15 (Small ribosomal subunit protein uS15)	Tymol
10301.04a	P0A7U3	rpsS	R C	RS19_ECOLI	30S ribosomal protein S19 (Small ribosomal subunit protein uS19)	Tymol Karvoment enol
10446.02	B7UI00	yggU		YGGU_ECO27	UPF0235 protein YggU	Geraniol
10470.22	P39274	yjdJ		YJDJ_ECOLI	Uncharacterized protein YjdJ	Geraniol
10650.96	B1X852	ihfB	D	IHFB_ECODH	Integration host factor subunit beta (IHF-beta)	Tymol
10695.38	B1X883	rplY	R	RL25_ECODH	50S ribosomal protein L25	Skořicový aldehyd
10743.00	B1IPV6	tusB	C	TUSB_ECOLC	Protein TusB (tRNA 2-thiouridine synthesizing protein B)	Peroxid
11036.66	P0A9V5	viaG	D	YIAG_ECOLI	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YiaG	Tymol
11200.62	Q0TCE3	rplW	R	RL23_ECOL5	50S ribosomal protein L23	Tymol
11226.64	P0C077	relE	D	RELE_ECOLI	mRNA interferase toxin RelE (EC 3.1.-.-) (Endoribonuclease RelE) (Toxin RelE)	Peroxid
11451.6	P0AG59	rpsN	R	RS14_ECOLI	30S ribosomal protein S14 (Small ribosomal subunit protein uS14)	Karen Guajakol
11532.18	P0ADU2	ygiN	C	YGIN_ECOLI	Probable quinol monooxygenase YgiN (QuMo) (EC 1.-.-.-)	Peroxid
11701.66	P0CK94	eltB	S	ELBH_ECOLX	Heat-labile enterotoxin B chain (LT-B, human) (LTH-B)	Tetracyklin
12171.26	Q46835	yghG	M	YGHG_ECOLI	Uncharacterized lipoprotein YghG	Tymol
12213.04	A1AHX3	cyaY		CYAY_ECOK1	Protein CyaY	Karvon
12227.96	P61175	rplV	R C	RL22_ECOLI	50S ribosomal protein L22 (Large ribosomal subunit protein uL22)	Skořicový aldehyd

m/z	UniProtKB	Gen	Skupina	Označení	Název a popis proteinu	Antibak.látka
12656.06	P0AD50	yfiA		YFIA_ECOL6	Ribosome-associated factor Y (pY) (Ribosome associated inhibitor A)	Guajakol
12775.12	P0A8M6	yeeX	C	YEEX_ECOLI	UPF0265 protein YeeX	Tymol
12971.22	P0A7S9	rpsM	R C	RS13_ECOLI	30S ribosomal protein S13 (Small ribosomal subunit protein uS13)	Tymol