



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## ŠÍPEK – ZDROJ PŘÍRODNÍCH LÁTEK

ROSEHIP – THE SOURCE OF NATURAL COMPOUNDS

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Eliška Motúzová

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.

BRNO 2016



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

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK1026/2015** Akademický rok: **2015/2016**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Eliška Motúzová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)  
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)  
Vedoucí práce **RNDr. Mária Veselá, Ph.D.**  
Konzultanti:

### Název bakalářské práce:

Šípek – zdroj přírodních látek

### Zadání bakalářské práce:

1. Vypracujte literární rešerši o antimikrobiálních látkách obsažených v šípku.
2. Připravte extrakty ze šípkových plodů a ověřte jejich účinky na vybrané druhy bakterií.
3. Vyhodnoťte a zpracujte experimentální výsledky.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
Eliška Motúzová  
Student(ka)

-----  
RNDr. Mária Veselá, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Cílem této bakalářské práce bylo zkoumání antimikrobiální aktivity extraktů různých druhů šípkových čajů. Dále byla stanovována koncentrace biologicky aktivních látek, polyfenolů a flavonoidů, a celková antioxidační aktivita těchto čajů.

V teoretické části byly shrnuty základní informace o růži šípkové, rozdělení čajů, přehled biologicky aktivních látek a základní metody extrakce. Praktická část byla věnována stanovení antioxidační aktivity, obsahu polyfenolů a flavonoidů extraktů čajů a dále stanovení antimikrobiální aktivity daných extraktů na bakteriální kmeny *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus*.

Z výsledků práce vyplývá, že vodné extrakty vykazují jistou mikrobiální aktivitu. Zároveň zvolené extrakty obsahují velké množství polyfenolických a flavonoidních látek.

## **ABSTRACT**

The goal of this bachelor thesis was to study the antimicrobial activity of various extracts of rosehip tea. As well as to determinate concentration of biologically active compounds, polyphenols and flavonoids, and antioxidant activity in these teas.

Theoretical part describes basic information about *Rosa canina*, general classification of tea, summary of biologically active compounds and basic methods of extraction. Practical part is focused on determination of antioxidant activity, concentration of polyphenols and flavonoids in tea extracts and detection of antimicrobial activity of these extracts against bacterial strains *Serratia marcescens* and *Micrococcus luteus*.

The results of this thesis show that aqueous extracts of rosehips tea are antimicrobially active. It was also found, that these extracts have high contents of polyphenols and flavonoids

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

*Rosa canina*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus*, čaj, rostlinné extrakty, antioxidační aktivita, antimikrobiální aktivita, biologicky aktivní sloučeniny

## **KEYWORDS**

*Rosa canina*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus*, tea, plant extracts, antioxidant activity, antimicrobial activity, biologically active compound

MOTÚZOVÁ, E. *Šípek – zdroj přírodních látek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 35 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Mária Veselá, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

## *Poděkování:*

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



## OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>9</b>
2.1 Růže šípková.....	9
2.1.1 Popis.....	9
2.1.2 Složení plodu .....	9
2.2 Přírodní účinné látky .....	9
2.2.1 Alkaloidy.....	9
2.2.2 Fenoly a polyfenoly .....	10
2.2.3 Flavonoidy .....	10
2.2.4 Třísloviny .....	10
2.2.5 Terpeny .....	11
2.2.6 Silice .....	11
2.3 Antioxidanty .....	11
2.3.1 Významné zdroje antioxidantů .....	11
2.3.1.1 Vitamín E (tokoferol) .....	11
2.3.1.2 $\beta$ -karoten .....	12
2.3.1.3 Vitamín C (kyselina L-askorbová) .....	12
2.3.1.4 Kyselina močová .....	12
2.3.1.5 Syntetické přísady do potravin .....	12
2.4 Čaje – zdroj biologicky aktivních látek.....	12
2.4.1 Dělení čajů .....	13
2.4.1.1 Fermentované čaje .....	13
2.4.1.2 Polofermentované čaje.....	13
2.4.1.3 Nefermentované čaje .....	13
2.5 Ovocné čaje a čajové směsi .....	13
2.5.1 Šípkový čaj.....	13
2.5.2 Černý rybíz.....	14
2.5.3 Aronie .....	14
2.6 Metody získání extraktů .....	14
2.6.1 Konvenční metody extrakce .....	14
2.6.1.1 Extrakce pomocí Soxhleta .....	15

2.6.1.2	Macerace .....	15
2.6.1.3	Hydrodestilace .....	15
2.6.2	Nekonvenční metody extrakce.....	15
2.6.2.1	Ultrazvuková extrakce .....	15
2.6.2.2	Enzymově asistovaná extrakce .....	16
2.6.2.3	Mikrovlnná extrakce .....	16
2.6.2.4	Extrakce pulzním elektrickým polem .....	16
2.6.2.5	Tlaková extrakce.....	16
2.7	Biochemické stanovení aktivních látek .....	17
2.7.1	Stanovení celkových polyfenolů.....	17
2.7.2	Stanovení celkového obsahu flavonoidů .....	17
2.7.3	Stanovení celkové antioxidační aktivity .....	17
2.8	Mikrobiologické metody stanovení aktivních látek .....	18
2.8.1	Difuzní stanovení antimikrobiální aktivity .....	18
<b>3.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>19</b>
3.1	Použité přístroje.....	19
3.2	Použité chemikálie.....	19
3.3	Použitý software .....	19
3.4	Použité vzorky čaje.....	20
3.5	Kultivační médium .....	20
3.5.1	Složení živného média a jeho příprava .....	21
3.6	Použité mikroorganismy .....	21
3.6.1	<i>Serratia marcescens</i> .....	21
3.6.2	<i>Micrococcus luteus</i> .....	21
3.7	Příprava macerátů .....	21
3.8	Příprava výluhů.....	22
3.9	Stanovení celkové antioxidační aktivity.....	22
3.10	Stanovení celkových polyfenolů .....	23
3.11	Stanovení celkových flavonoidů .....	24
3.12	Stanovení biologické aktivity .....	25
3.13	Měření inhibičních zón.....	25
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>26</b>
4.1	Stanovení antioxidační aktivity .....	26

4.2 Stanovení celkových polyfenolů .....	27
4.3 Stanovení celkových flavonoidů .....	28
4.4 Stanovení antimikrobiální aktivity .....	29
4.5 Inhibiční účinek extraktů .....	30
<b>5. ZÁVĚR.....</b>	<b>32</b>
<b>6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>33</b>

## 1. ÚVOD

Potrava člověka je chemicky velmi složitým materiálem. Podle hrubých odhadů se v čerstvých potravinách vyskytuje na půl milionu různých chemických sloučenin. Další velké množství vzniká enzymovými a neenzymovými reakcemi při zpracování, skladování a úpravě potravin. Velké množství různých sloučenin se do potravy přidává uměle jako aditiva ať už pro zvýraznění chuti nebo pro delší životnost a skladovatelnost potravin. [15]

Přírodní materiály používané jako potrava obsahují velké množství látek, které si lidské tělo nedokáže samo vytvořit, musí je tedy získávat z potravy. Řada potravin, zejména rostlinného původu, obsahuje také toxické látky. Ty mohou být toxické pouze pro určité jedince, tehdy se projevuje intolerance na danou potravinu, jejímž projevem mohou být například alergie. [15]

V dnešní době, kdy lze o potravinách snadno najít velké množství informací, se poptávka obrací na bezpečné a zdravé suroviny. Zvyšuje se poptávka po potravinách pěstovaných bez chemických hnojiv a bez úprav aditivy. [21]

Léčivé účinky rostlin byly známy již před dlouhou dobou, stejně jako jejich schopnost konzervovat určité potraviny. Přestože antimikrobiální systémy rostlinných produktů nejsou doposud plně prozkoumány, jsou pro tuto vlastnost hojně využívány a je snaha pro jejich plné pochopení. [22]

Přírodní látky jsou dnes preferované pro jejich nízkou toxicitu a řádově lepší odbouratelnost v porovnání s uměle připravenými antibiotiky. [22]

Cílem práce, kterou držíte v rukou, je stanovení biologicky aktivních látek a antioxidační aktivity extraktů z čajových přípravků plodů růže šípkové a dále stanovení možné antimikrobiální aktivity stejných extraktů na mikroorganismy *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus*.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Růže šípková

#### 2.1.1 Popis

Růže šípková (*Rosa canina*) patří do čeledi růžovitých. Je rozšířena téměř po celé Evropě. Zasaahuje až na Kanárské ostrovy, do severozápadní Afriky, Malé Asie až do Střední Asie. V ČR se jedná o rozšířený druh rostoucí od nížin až po horské oblasti. [1]

Jedná se o keř dorůstající až do 3,5 m výšky. Větve jsou ostnitě, květonosné větévky bezostné. Květy rostou na větévkách po jednom až pěti, korunní lístky se vzájemně dotýkají. Barva květů při rozkvétání bývá sytě růžová, během dokvétání bledne do světle růžové až bílé. Keře kvetou od května do června. Plody jsou nepravé – šípky vejčitého tvaru, po dozrání červené, s tvrdými, špičatě vejčitými, světle hnědými nažkami. [8]

#### 2.1.2 Složení plodu

Šípky jsou cenným zdrojem různých účinných látek. Mezi hlavní patří vitamín C, zde zastoupen kyselinou askorbovou. Množství vit. C se v extraktech šípku pohybuje mezi 0,56 a 7,73 mg/g sušiny. Nejvíce vitamínu C plody obsahují po dosažení plné zralosti, kdy jsou sytě červené a tvrdé. Při skladování se obsah kyseliny askorbové v plodu postupně snižuje. [2]

Šípky dále obsahují flavonoidy, fenoly, vitamíny B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, P a K, další organické kyseliny jako citronová, jablečná nebo nikotinová, sacharidy, pektin, minerální látky a slizy. [3]

### 2.2 Přírodní účinné látky

Určité látky přítomné v prostředí mají na mikroorganismy nepříznivý vliv důsledkem specifického chemického složení (nikoliv tím, že by ovlivňovaly pH nebo oxidačně redukční potenciál prostředí). Takové látky se nazývají antimikrobiální. Mohou pouze zastavovat množení mikroorganismů – mikrobiostatické látky, nebo je rovnou usmrcují – mikrobicidní látky. Pokud látky působí pouze na bakterie, jedná se o bakteriostatické nebo baktericidní, ovlivňují-li kvasinky a plísně, nazývají se fungistatické či fungicidní. Některé antimikrobiální látky mohou v nízkých koncentracích fungovat mikrobiostaticky a až ve vyšších koncentracích mikrobicidně. Jiné naopak i ve velmi vysokých koncentracích pouze zpomalují či zastavují růst a jejich účinek není trvalý. Velká část antimikrobiálních látek naopak ve velmi nízkých koncentracích funguje jako stimulant, protože zrychluje metabolismus mikroorganismů a tak zvyšuje i jejich rozmnožování. [10]

#### 2.2.1 Alkaloidy

Alkaloidy jsou heterocyklické sloučeniny s vázaným aminovým dusíkem. Mají různé farmakologické účinky, pro které jsou hojně využívány v medicíně. První a nejznámější příklad lékařsky využívaného alkaloidu je morfin, který byl izolován v roce 1805 z máku setého. Dva známé deriváty morfinu jsou kodein a kokain. Dále jsou využívány diterpenové alkaloidy izolované z pryskyřníku, vykazující antimikrobiální aktivitu, nebo solamargin, což

je glycoalkaloid používaný proti infekci HIV. Hlavní aktivita alkaloidů je pravděpodobně důsledkem efektivní tranzitní doby v tenkém střevě. Další významný alkaloid je berberin, potenciálně účinný proti rodu *trypanozoma* a *plasmodium*, který zabraňuje rozmnožování mikroorganismů tím, že se vmezeřuje do jejich DNA. [4]

Alkaloidy jsou konečné produkty sekundárního metabolismu a nepodléhají výrazné degeneraci. Většinou vznikají z aminokyselin, které poskytují heterocyklické atomy dusíku. Jsou součástí mechanismů, které pomáhají rostlinám v přečkání nepříznivých podmínek jako přechodný nedostatek živin, nízké teploty, živočišní škůdci. Alkaloidy se svou funkcí neliší od sekundárních metabolitů. [9]

### 2.2.2 Fenoly a polyfenoly

Fenoly jsou alkoholy, které obsahují hydroxylové skupiny navázané přímo na aromatické jádro. Podobně jako alkoholy jsou schopné tvořit oxoniové soli, estery a fenoláty. Ve srovnání s alkoholy jsou kyselější. Základní sloučeninou je fenol. [5]

Například běžné rostliny estragon a tymián obsahují kyselinu kávovou (kyselina 3,4-dihydroxykořicová), která je účinná proti virům, bakteriím a houbám. [4]

Nejjednoduššími aromatickými látkami, se kterými se v rostlinách setkáváme, jsou polyfenoly hydrochinon, pyrokatechin a jeho methylester guajakol, floroglucin a pyrogalol. Tyto polyfenoly jsou přítomné v rostlinách hlavně ve formě různých glykosidů a taninů. [9]

### 2.2.3 Flavonoidy

Flavonoidy jsou fenolické struktury obsahující jednu karbonylovou skupinu. Jedná se o velmi rozsáhlou skupinu. V současné době je známo přes 4000 flavonoidních látek. Jednotlivé deriváty se většinou liší pouze stupněm substituce a oxidace. Jsou důležitou součástí antioxidačního systému, zabraňují peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály, mohou vázat a inaktivovat různé prooxidační kovové ionty jako je měď či železo. [6]

Od doby, kdy byly objeveny, se syntetizují v rostlinách kvůli zjištění jejich reakce na mikrobiální infekci. Je tedy známá jejich antimikrobiální účinnost proti široké řadě mikroorganismů. Jejich aktivita pravděpodobně spočívá v neschopnosti reagovat s extracelulárními proteiny ve stěně mikroorganismů, což vede k degradaci buněčné stěny. Lipofilní flavonoidy mohou narušit mikrobiální membrány. [4]

### 2.2.4 Třísloviny

Třísloviny neboli taniny jsou značnou skupinou polymerních fenolových sloučenin přítomných v potravinách rostlinného původu. Při interakci s bílkovinami dutiny ústní vzniká trpká chuť. Jsou to přirozené složky potravin, které ovlivňují žádoucí i nežádoucí chuťové vlastnosti potravin.

Vzhledem k rozmanité struktuře taninů jsou různé i fyziologické vlastnosti. Například proantokyanidy mají velký antioxidační potenciál a fungují jako lapače volných radikálů, což je důležité pro protizánětlivé a protialergické účinky. Některé kondenzované taniny se používají jako antioxidanty přidávané do potravin. [7]

## 2.2.5 Terpeny

Též jsou nazývané izoprenoidy. Jedná se o rozsáhlou skupinu biomolekul, která je strukturně odvozená od isoprenu a tvoří skupinu nezmýdelnitelných lipidů. Isoprenoidní struktury bývají součástí větších biologicky aktivních molekul jako chlorofyl, ubichinon, vitamíny E a K. V přírodě je známo více než 5 000 isoprenoidů, vyskytují se ve všech typech buněk. [13]

Mezi známé izoprenoidy patří například kaučuk, dále cholesterol a steroidy. Významnými zástupci je skupina vitamínů rozpustných v tucích – A, D, E, K.

Metabolismus terpenů je v rostlinách velmi různorodý. Rostliny totiž z terpenů tvoří řadu vonných látek a silic. Jako příklady lze uvést mentol, kafr a citronelol. [14]

## 2.2.6 Silice

Silice, někdy nazývány etherické oleje, jsou přírodní vonné látky, povahově blízké terpenům, které se využívají při tvorbě aromat a trestí. Chemicky se jedná o směsi těkavých lipofilních látek. Rostliny díky nim mají specifickou vůni nebo je využívají jako obranný mechanismus. Získávají se ze všech částí rostlin. Využívají se v potravinářství, parfumerii i farmacii. Známými zástupci jsou limonen či citral. [9], [15]

## 2.3 Antioxidanty

Peroxidace lipidů vystavených kyslíku je zodpovědná nejen za kažení potravin, ale i za poškozování tkání in vivo, kde se může stát příčinou rakoviny, zánětlivých onemocnění, aterosklerózy, stárnutí apod. Poškození je zahájeno volnými radikály vzniklými během tvorby peroxidů z mastných kyselin, které obsahují dvojně vazby oddělené methylenem, tedy takové, které jsou zastoupeny v přirozeně se vyskytujících nenasyčených mastných kyselinách. Peroxidace lipidů je řetězová reakce poskytující neustálý přísun volných radikálů, které působí další peroxidaci. Jelikož předchůdcem iniciačního procesu je téměř vždy hydroxid ROOH, může mít tato řetězová reakce fatální účinky.

Příroda a organismy využívají antioxidanty ke kontrole a omezení peroxidace lipidů. Jednotlivé antioxidanty mohou působit jako preventivní, omezující iniciační fázi řetězové reakce, nebo jako přerušující řetězovou reakci. Mezi přírodní antioxidanty patří vitamín E, kyselina močová, vitamín C či  $\beta$ -karoten. Jako přísady do potravin se používají propylgallát, butylovaný hydroxyanisol a butylovaný hydroxytoluen. [16]

### 2.3.1 Významné zdroje antioxidantů

#### 2.3.1.1 Vitamín E (tokoferol)

Tokoferoly jsou isoprenovými substituenty 6-hydroxychromanu nebo toklu. Vitamín E je nejdůležitější přirozený antioxidant. Antioxidační aktivita spočívá ve schopnosti přenášet vodík z fenolové skupiny na volný peroxyradikál peroxidované polyenové kyseliny a tím přerušovat řetězové reakce volných radikálů. Aby se tokoferol regeneroval, reaguje s vitamínem C. [16]

### **2.3.1.2 $\beta$ -karoten**

Provitamín A je přítomen v zelenině ve formě žlutého pigmentu, který je tvořen dvěma molekulami retinolu spojenými na aldehydových koncích svých uhlíkových řetězců. Schopnost  $\beta$ -karotenu působit jako antioxidant je umožněna tím, že stabilizuje volné peroxidové radikály vlivem své konjugované alkylové struktury. Protože je účinný i při nízké koncentraci kyslíku, doplňuje antioxidační působení vitamínu E. [16]

### **2.3.1.3 Vitamín C (kyselina L-askorbová)**

Vitamín C je jediná funkční biologická sloučenina kyseliny askorbové. Esenciální je pouze pro člověka a několik dalších živočichů. Podílí se především na významných reakcích probíhajících v organismu. Důležitou funkcí při antioxidačním působení je schopnost reagovat s aktivními formami kyslíku – volnými radikály a s oxidovanými formami vitamínu E zabezpečující jeho ochranu a ochranu membránových lipidů před oxidací. V kombinaci s vitamínem E se jedná o nejsilnější antioxidant. Účinně brzdí autooxidaci reakcí s radikálem mastné kyseliny. Vzniklý askorbyl-radikál není dále schopen řetězové reakce a disproportionuje na askorbovou a dehydroaskorbosou kyselinu. [15]

### **2.3.1.4 Kyselina močová**

Kyselina močová je konečným metabolitem odbourávání purinů. Může být oxidována mnoha biologicky relevantními oxidanty na alantonin (dusíkatá látka s výraznými regeneračními účinky), jehož stanovení je u lidí často navrhováno jako ukazatel míry radikálových reakcí. Kyselina močová velmi dobře odstraňuje volné radikály a singletové kyslíky, pro což se využívá termín *scavenger*. Ochraňuje erytrocyty před peroxidativním poškozením, které může vést až k hemolýze. [17]

### **2.3.1.5 Syntetické přísady do potravin**

Jedná se o synteticky vyráběná aditiva s antioxidační aktivitou. Často používaný je propylgallát, známý pod číselným kódem E310. Vyrábí se esterifikací propyl alkoholu a kyseliny gallové, získávané ze skořápky lískových ořechů. Používá se v tucích a olejích, kde zpomaluje žluknutí. Lze jej najít hlavně v obalových materiálech bramborových lupínků, cereálií, masných výrobků a dalších, kde slouží jako prevence oxidace. [18]

Butylovaný hydroxyanisol (BHA) a butylovaný hydroxytoluen (BHT), známé pod kódy E320 a E321, jsou používány jako stabilizátory v mnoha potravinách. Oba jsou vyráběny z vedlejších produktů při zpracování ropy. Lze je najít ve žvýkačkách, produktech z brambor, pečivu a dalších. Využívají se také ve farmacii. [19]

## **2.4 Čaje – zdroj biologicky aktivních látek**

Dlouhá historie čaje jako nápoje je pozoruhodná. Čaj je pěstován na různých místech a v různých podmínkách po celém světě. Největším vývozcem je Čína následována Indií. Dále jsou známé čaje vyvážené z Keni, Srí Lanky, Turecka a Vietnamu. Základní a pravý čaj je ovšem vyroben z listů rostliny *Camellia sinensis* původem z Číny. V dnešní době je čaj po vodě druhý nejoblíbenější nápoj. [23]



### **2.4.1 Dělení čajů**

Podle způsobu pěstování a následného zpracování jsou čaje děleny do tří hlavních kategorií: fermentované čaje, polofermentované čaje a nefermentované čaje. Pojem fermentace se dnes užívá jen z historických důvodů. Protože na čajové listy nepůsobí mikroorganismy, jak by u fermentace měly, ale kyslík, jedná se ve skutečnosti o antioxidační aktivitu. [24]

#### **2.4.1.1 Fermentované čaje**

Mezi fermentované čaje patří černé čaje a tmavé čaje, zvané pu-erh.

Černý čaj je oblíbený pro vysoký obsah povzbuzujících látek, taninů. Přítomnost tříslovin zase napomáhá k inhibici absorpce non-hem železa. [24]

Pu-erh obsahuje vysoké množství kofeinu. Častá komunikace těchto čajů se nedoporučuje z důvodu rizika vysokého krevního tlaku, cukrovky, problémů se spánkem a dalších. [24]

#### **2.4.1.2 Polofermentované čaje**

Polofermentované čaje, také často nazývány oolongy, tvoří přechod mezi zelenými a černými čaji. Jedná se opět o čaje s vysokým obsahem kofeinu. Studie provedena na japonských mužích prokázala, že dlouhodobé požívání těchto čajů může být příčinou vzniku cukrovky, zároveň ale krátkodobé užívání vykazuje anti-hyperglykemický účinek u osob cukrovkou trpících. [24]

#### **2.4.1.3 Nefermentované čaje**

Nejznámějšími zástupci nefermentovaných čajů jsou čaje zelené. Dále do této skupiny patří čaje bílé.

Bílé čaje snižují vstřebávání železa, pokud jsou konzumovány ve vysokých dávkách. Studie na potkanech ukazují, že nerozpustné komplexy vznikající v trávicím traktu nemají účinek na tělesnou váhu, příjem potravy a efektivitu využití potravy. [24]

Zelené čaje jsou vedle černých nejznámější a nejoblíbenější čajové nápoje. Ve velmi vysokých dávkách může mít kofein v čaji obsažený vliv na vznik osteoporózy a hypertenze. Je známo, že zelený čaj má inhibiční účinky na metabolismus léčiv. Katechiny v čaji obsažené se mohou vázat na účinné složky léčiv a snižovat tak jejich účinek. Z těchto důvodů se pití zeleného čaje nedoporučuje osobám užívajícím léky například k léčbě bipolárních poruch, estrogeny, klozapin a podobné. [24]

## **2.5 Ovocné čaje a čajové směsi**

Označení ovocné čaje je nesprávné, protože tyto výrobky nemají s čajem, původní rostlinou, nic společného. Vhodné označení by mělo být spíše ovocné či bylinné výluhy. Označení čaj je ovšem obecně uznáváno, jednak pro dlouhou historii používání a také pro způsob přípravy.

### **2.5.1 Šípkový čaj**

Růže šípková byla již v minulosti hojně využívána jako potravina. Zpracovávají jsou především okvětní lístky a plody. Nejen díky vysokému obsahu vitamínu C je šípek velmi

oblíbená plodina prospěšná pro celkové posílení organismu, dále jako prevence proti paradentóze a onemocnění dásní. Také se hojně využívá jako mírné diuretikum a při zánětu močových cest. [8]

### **2.5.2 Černý rybíz**

Černý rybíz je po celé Evropě rozšířený keř, který může dorůst až do výšky 2 metry. U nás je s oblibou pěstovaný. Plody jsou typické bobule sladké až trpké chuti. Pro další zpracování se využívají plody a občas také listy. Plody jsou pro svůj vysoký obsah vitamínů nazývané vitamínová bomba. Listy jsou využívány jako spolehlivé antirevmatikum, dále při cévních onemocněních, podávají se i při močových a ledvinových zánětech. Plody jsou využívány čerstvé do džemů a marmelád, případně pro výrobu sirupů a dalších potravin. [25]

### **2.5.3 Aronie**

Aronie, známá pod názvem černý jeřáb, botanicky temnoplodec černoplodý, je keř dorůstající až 3 metrů výšky. Původně pochází ze severní Ameriky, odkud byl dovezen na počátku 20. století do Německa a poté rozšířen po celé Evropě. Plody jsou černé malvice o průměru cca 1,5 cm. Plody obsahují až 60 % šťávy, proto se nejčastěji zpracovávají na sirupy, džemy, kompoty, čaje či víno. Aronie je velmi bohatá na vitamíny C, E, P,  $\beta$ -karoten a vitamíny skupiny B, dále obsahuje flavonoidy, antokyany, pektiny a velké množství jiných, zatím neurčených biologicky aktivních látek. Pro svoji až svíravě kyselou chuť je využívána v kombinaci s jinými druhy ovoce. [25]

## **2.6 Metody získání extraktů**

Separace materiálu je první krok k jeho studiu a studiu látek v něm obsažených. Nesprávnou úpravou vzorku může dojít k jeho znehodnocení a znemožnění další práce. Vzhledem k rozmanitosti rostlinných materiálů a biologicky aktivních látek v nich obsažených existuje velké množství separačních technik. U většiny postupů je nutné nejprve určit biologicky aktivní látky a až ze získaných informací určit vhodnou metodu. Různé metody separace byly vyvíjeny už od starověku. U mnohých se základní postup dodnes nezměnil, pouze byl upraven potřebám dnešní doby. [20]

Přestože jsou metody rozdílné, mají společné některé cíle: extrakce cílené biologicky aktivní sloučeniny z komplexního vzorku rostliny, zvýšení selektivity analytických metod, zvýšení koncentrace požadované cílené látky, převedení biologicky aktivní sloučeniny do formy vhodnější pro detekci a separaci, vytvoření silné, reprodukovatelné metody, která je nezávislá na změně matrice vzorku. [20]

### **2.6.1 Konvenční metody extrakce**

Biologicky aktivní látky z rostlinných materiálů mohou být získávány různými metodami. Většina těchto technik je založena na extrakční síle použitých rozpouštědel v kombinaci s využitím tepla a míchání. Mezi konvenční techniky patří využití extrakce pomocí Soxhleta, macerace a hydrodestilace. [20]

### **2.6.1.1 Extrakce pomocí Soxhleta**

Tento druh extrakce poprvé navrhl německý chemik Franz Ritter von Soxhlet v roce 1879. Původně se jednalo o extrakci lipidů, ale dnes už se používá i na další cenné biologicky aktivní látky. Byla využívána jako model pro porovnání nových extrakčních metod. [20]

### **2.6.1.2 Macerace**

Macerace je využívána pro přípravu domácích tonik či krémů. Jedná se o populární a levnou cestu k získání esenciálních olejů biologicky aktivních látek. [20]

Macerace se skládá ze tří kroků. Nejprve se rostlinný materiál nadrtí na malé kousky, aby plocha, kde rozpouštědlo působí, byla co největší. Poté se přidá vhodné rozpouštědlo, navázané menstruum, a nadržena macerační směs do uzavřené nádoby. V posledním kroku se získaný macerát lisuje z rostlinného vzorku. [20]

### **2.6.1.3 Hydrodestilace**

Hydrodestilace je tradiční metoda získání biologicky aktivních látek a esenciálních olejů z rostlinného materiálu.

Existují dva hlavní typy hydrodestilace, vodní destilace a přímá destilace vodní parou. [20]

## **2.6.2 Nekonvenční metody extrakce**

Konvenční metody trpí několika nedostatky, jako například dlouhá doba extrakce, vysoké nároky na čistotu rozpouštědla, nízká extrakční selektivita a ztráta tepelně labilních látek během extrakce.

Nekonvenční metody slibují překonání nedokonalostí konvenčních metod. Mezi nejslibnější metody se řadí ultrazvuková extrakce, enzymově asistovaná extrakce, mikrovlnná extrakce, extrakce pulzním elektrickým polem a tlaková extrakce.

Nekonvenční metody kladou velký důraz na používání bezpečných chemikálií, využívání obnovitelných zdrojů a energetickou účinnost. Proto jsou někdy také nazývané „zelené techniky“. [20]

### **2.6.2.1 Ultrazvuková extrakce**

Ultrazvuk je druh vlnění nad slyšitelnou hranicí lidského ucha. V chemii se většinou využívá frekvence 20 kHz až 100 MHz. Během děje dochází ke stlačování a opětovné expanzi média, což vede k ději zvanému kavitace. Při tomto ději dochází ke vzniku bublin vlivem poklesu tlaku. Po vyrovnání tlaku bubliny implodují za vzniku rázových vln. Bubliny dosahují vysoké teploty a tlaku. Ultrazvuková extrakce využívá energii těchto kavitačních bublin.

Působení ultrazvuku urychluje přístup rozpouštědla k buněčnému materiálu a zintenzivňuje přestup hmoty. Extrakce pomocí ultrazvuku zahrnuje dva fyzikální jevy, difuzi látek přes buněčnou stěnu a vyplachování buněčného obsahu po rozrušení buněčné stěny. Hlavní faktory ultrazvukové extrakce jsou frekvence, teplota, tlak a doba působení ultrazvuku. Metoda bývá využívána v kombinaci s konvenčními metodami, protože zvyšuje jejich účinnost. [20]

### **2.6.2.2 Enzymově asistovaná extrakce**

Některé fytochemikálie v rostlinných maticích jsou rozpuštěny v buněčné cytoplasmě a některé sloučeniny jsou vázány v polysacharid-ligninové síti pomocí hydrofobních vazeb a není možné je extrahovat pouze pomocí běžných extrakčních technik. Použití enzymů během extrakce se ukázalo jako účinná metoda. Pro hydrolýzu strukturních polysacharidů se využívají specifické enzymy jako celulóza,  $\alpha$ -amyláza a pektináza.

Enzymově asistovaná extrakce se využívá ve dvou variantách: enzymově asistovaná vodní extrakce a enzymově asistované lisování za studena. Právě pomocí druhé varianty se získávají velmi kvalitní oleje lisované z různých semen, které obsahují vyšší množství volných mastných kyselin a fosforu, než běžně získávané.

Enzymově asistovaná extrakce je šetrný a ekologický způsob pro získání biologicky aktivních látek a olejů, protože jako rozpouštědlo využívá vodu. [20]

### **2.6.2.3 Mikrovlnná extrakce**

Mikrovlnná extrakce je mladá metoda využívající pro extrakci biologicky aktivních látek mikrovlnné energie. Mikrovlny jsou elektromagnetické vlny o frekvenci kmitočtu 300 MHz až 300 GHz. Působením vln se elektromagnetická energie mění na tepelnou, což způsobuje otáčení polárních molekul, které do sebe jeho vlivem narážejí a vytváří tak teplo.

Metoda je rozdělena do tří kroků. Nejdříve se oddělí rozpustné látky z rostlinné matrice pomocí tlaku a teploty. Poté probíhá difuze rozpouštědla přes matici a nakonec dochází k uvolňování rozpustných látek z matrice do rozpouštědla.

Mikrovlnná extrakce je vhodná především pro extrakci organických a organokovových sloučenin. [20]

### **2.6.2.4 Extrakce pulzním elektrickým polem**

Principem extrakce je rozrušení buněčné membrány, což zlepšuje účinnost extrakce. Využívá se částí s bipólovým charakterem. Během procesu dojde k překročení kritické hodnoty (přibližně 1 V) transmembránového potenciálu a mezi dipóly se začne tvořit odpor. Od tohoto momentu se začnou tvořit v membráně póry, což zapříčiní uvolňování intracelulárních látek z rostlinné tkáně.

Pro extrakci pulzním elektrickým polem se využívá jednoduché zařízení sestávající se z komory s elektrodami, do které se vkládá rostlinný materiál. Účinnost závisí na síle vstupního pulsu, teplotě a vlastnostech použitého rostlinného materiálu. Protože při rozrušování membrán pomocí pulzního elektrického pole dochází jen k malým změnám teploty, je možné tuto metodu využít i pro extrakci tepelně labilních látek. [20]

### **2.6.2.5 Tlaková extrakce**

Pro tlakovou extrakci se v dnešní době používá několik názvů, například tlaková extrakce rozpouštědlem či zrychlená extrakce rozpouštědlem.

Základ metody spočívá v aplikaci vysokého tlaku, který udržuje rozpouštědlo v tekuté formě i při vysoké teplotě. Vysoký tlak zároveň extrakci urychluje. V dnešní době, kdy se velké množství metod automatizuje, dochází u tlakové extrakce k velkému rozvoji.

Výhodou tlakové extrakce je malá spotřeba rozpouštědla, díky čemuž je řazena mezi ekologicky šetrné metody pro extrakci. Zároveň je alternativou k extrakci kapalinou v nadkritickém stavu. Metoda se využívá pro extrakci organických znečišťujících látek, stabilních za vysoké teploty. [20]

## **2.7 Biochemické stanovení aktivních látek**

Aerobní organismy jsou existenčně závislé na kyslíku. Současně jsou ale vystaveny negativnímu vlivu reaktivních forem kyslíku, volným radikálům, a dalším sloučeninám vznikajícím jako vedlejší produkt oxidačního metabolismu. Živé organismy disponují komplexním systémem antioxidační ochrany. [30]

Pro velké množství stanovení se využívá spektrofotometrických metod, protože se jedná o metody jednoduše proveditelné a levné.

### **2.7.1 Stanovení celkových polyfenolů**

Stanovení celkových polyfenolů se nejčastěji provádí pomocí spektrofotometrické metody s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Metoda spočívá v reakci látek směsi Folinova činidla s fenoly obsaženými ve vzorku. Využívá se redukce fenolů za současného vzniku modrých produktů, chromogenů. Rozsah zbarvení, spektrofotometricky měřený při vlnové délce 750 nm, stanovuje celkový obsah fenolů. Hodnota koncentrace fenolových sloučenin je poté získána přepočtem na ekvivalentní množství kyseliny gallové. [31]

### **2.7.2 Stanovení celkového obsahu flavonoidů**

Ke stanovení obsahu flavonoidů se využívá spektrofotometrická metoda s hlinitou solí a dusitanem. Metoda je známa pod názvem Christ-Mülerova metoda. Jedná se o detekci  $Al^{3+}$  komplexů v alkalickém prostředí. Výsledný roztok je žlutě zbarvený a měří se jeho absorbance při 510 nm. Koncentrace flavonoidů je poté stanovena přepočtem z kalibrační křivky katechinu. [32]

### **2.7.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity**

Hojně využívaná je metoda TEAC, která využívá ABTS radikál. Radikál ABTS je stabilní barevná kapalina. Metoda využívá zhášení radikálů ABTS antioxidanty, které se chovají jako donory vodíku. V přítomnosti látek s antioxidační aktivitou je ABTS odbarvován. Měření antioxidační aktivity probíhá spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm. Koncentrace antioxidačních látek se určí z rozdílu absorbance v čase 0 a 10 minut a následného přepočtu z kalibrační křivky troloxu. [33]

## **2.8 Mikrobiologické metody stanovení aktivních látek**

Stanovení mikrobiologické aktivity je esenciální pro stanovení citlivosti organismů na antibiotika, stejně tak je nutné pro screening nových antimikrobiálních látek. Přírodní produkty, ať čisté nebo jako jejich extrakty, poskytují širokou škálu možností pro výzkum nových přísad vhodných nejen do léčiv.

V současnosti je k dispozici několik metod pro zjištění antimikrobiální aktivity. Ne všechny jsou založeny na stejném principu, získané výsledky jsou proto ovlivněny pouze zvolenou extrakční metodou, ale také stupněm rozpustnosti jednotlivých testovaných sloučenin. [26]

### **2.8.1 Difuzní stanovení antimikrobiální aktivity**

Difuzní metoda se řadí mezi kvalitativní a semikvalitativní metody pro stanovení citlivosti mikroorganismů k látkám s antimikrobiálními účinky.

Metoda využívá tuhé agarové médium, ve kterém je naočkován požadovaný mikroorganismus. Testovaná látka, extrakt, prochází pomocí difuze médiem a vytváří tak inhibiční zóny. Velikost inhibičních zón závisí na několika faktorech, předně na koncentraci testované látky, složení agarového media, době inkubace, pH a tloušťce vrstvy kultivační půdy. Je důležité, aby vrstva agaru byla rovnoměrně vysoká a mikroorganismus naočkován v celém médiu. Jednotlivé vzorky testované látky musí být dostatečně vzdálené od okraje a nesmí se navzájem dotýkat.

Podle způsobu nanášení testované látky se metoda dělí na jamkovou a diskovou difuzní metodu. [26]

#### *Jamková difuzní metoda*

Do ztuhlého agaru se zaočkovanou kulturou jsou pomocí korkovrtu vyhloubeny jamky, do kterých se pipetuje testovaná látka. [29]

#### *Disková difuzní metoda*

Testovaná látka je napuštěna do papírových disků, ze kterých difunduje do ztuhlého media s naočkovanou kulturou. [29]

### **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

#### **3.1 Použité přístroje**

Spektrofotometr – UV/VIS Helios Delta thermospectronic, Anglie

Analytické váhy – AND GR – 202 – EC, Japonsko

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

Mikropipety – Biohit proline

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

Autokláv – Vaposteri BMT, Brno

Vortex – Reax Top, Heidolph, Německo

Fotoaparát

#### **3.2 Použité chemikálie**

Destilovaná voda

Ethanol 96%

Uhlíčan sodný

Folin-Ciocalteuovo činidlo

Dusičnan sodný

Chlorid hlinitý

Katechin

Hydroxid sodný

ABTS<sup>•+</sup>

#### **3.3 Použitý software**

Operační systém Windows

MS Word

MS Excel

IrfanView

### 3.4 Použité vzorky čaje

K testování inhibičního účinku byly použity výluhy a maceráty ze dvou druhů čajů.

1. Směs – šípek oplodí 50 %, aronie plod 40 %, černý rybíz plod 10 %  
od firmy Valdemar Grešík, Natura s.r.o.



Obrázek 1: Čajová směs [27]

2. Bylinný čaj – šípký drcené  
od firmy Jiří Pleskač, Rosa Canina



Obrázek 2: Šípký drcené [28]

### 3.5 Kultivační médium

Jako kultivační médium pro uchování a namnožení používaných mikroorganismů bylo použito živné médium Nutrient agar No. 2 od firmy Himedia.



### 3.5.1 Složení živného média a jeho příprava

Množství udávané na 1000 ml destilované vody:

Masový peptin	10 g
Hovězí extrakt	10 g
Chlorid sodný	5 g
Agar	15 g
pH	7,2

Živné médium se připravuje rozpuštěním 40 g prášku v 1000 ml destilované vody, poté se nechá vysterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

### 3.6 Použité mikroorganismy

Použité mikroorganismy *Serratia marcescens* CCM 303 a *Micrococcus luteus* CCM 210 byly získány z České sbírky mikroorganismů v Brně.

#### 3.6.1 *Serratia marcescens*

Bakterie rodu *Serratia* jsou krátké, většinou pohyblivé gramnegativní tyčinky. Jejich velikost je 0,5 – 0,8 x 0,9 – 2 μm. Produkují polysacharidová pouzdra, neumí tvořit spóry. Jedná se o fakultativně anaerobní organismy. Produkují katalasu. Na masopeptoném agaru tvoří velké cihlově červené ohraničené kolonie. Barva je způsobena pigmentem prodigiosinem. [11]

*Serratia* je v přírodě velmi rozšířená. Bakterie tohoto rodu lze nalézt v půdě, ve vodě, v polnohospodářských produktech. Kontaminují hlavně produkty obsahující škrob, který následně štěpí a zkvasí. Jsou příčinou červených skvrn na potravinách obsahujících škrob (mouku). [12]

#### 3.6.2 *Micrococcus luteus*

Bakterie rodu *Micrococcus* jsou nepohyblivé, ve čtveřicích uspořádané grampozitivní koky. Nevytvářejí spóry. Jedná se o striktně aerobní bakterie s respiračním metabolismem. Produkují katalasu i oxidasu. Při kultivaci vytvářejí 1 – 3 mm velké krémově žluté až oranžové ohraničené kolonie. [11]

### 3.7 Příprava macerátů

#### *Příprava vodného macerátu*

10 g zvoleného čaje bylo zalito 100 ml destilované vody o teplotě 25 °C a macerováno při laboratorní teplotě za nepřístupu světla 7 dní. Macerát byl poté zfiltrován a uchován v lednici při 4 °C.

### *Příprava etanolového macerátu*

10 g zvoleného čaje bylo zalito 100 ml 96% ethanolem o teplotě 25 °C a macerováno při laboratorní teplotě za nepřístupu světla 7 dní. Macerát byl poté zfiltrován a uchován v lednici při 4 °C.

### **3.8 Příprava výluhů**

#### *Příprava vodných výluhů*

10 g zvoleného čaje bylo zalito 100 ml destilované vody o teplotě 25 °C. Extrakt byl poté vložen do vodní lázně, kde se nechal 30 minut extrahovat při teplotě 100 °C. Výluh byl následně zfiltrován a uchován v lednici při 4 °C.

#### *Příprava etanolových výluhů*

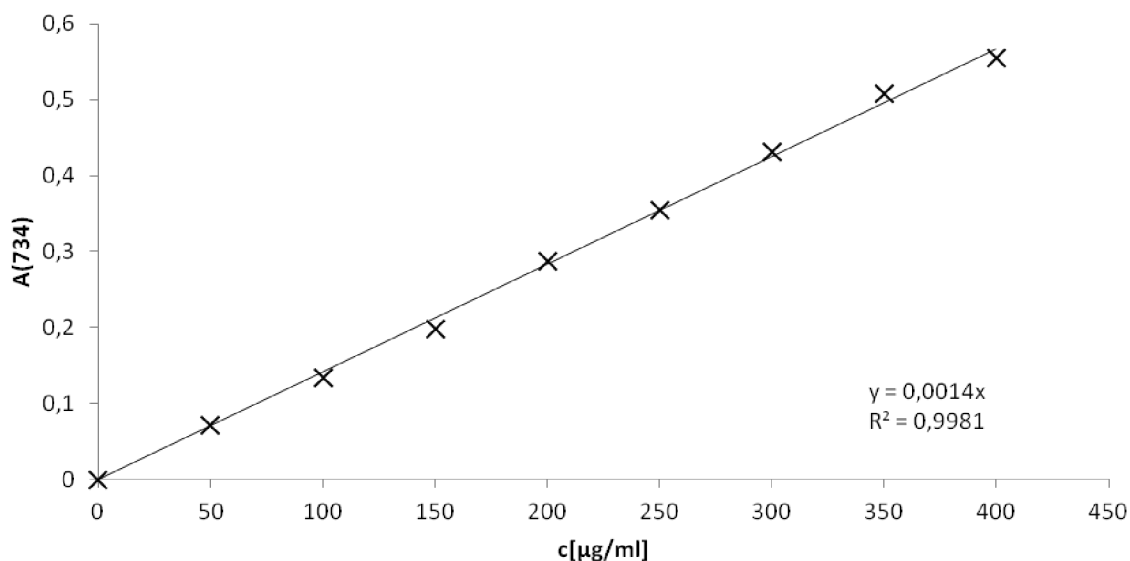
10 g zvoleného čaje bylo zalito 100 ml 96% ethanolu o teplotě 25 °C. Extrakt byl poté vložen do vodní lázně, kde se nechal 30 minut extrahovat při teplotě 50 °C. Výluh byl následně zfiltrován a uchován v lednici při 4 °C.

### **3.9 Stanovení celkové antioxidační aktivity**

ABTS byl rozpuštěn v destilované vodě na koncentraci 7 mM. Radikálový kationt z ABTS byl připraven reakcí s 2,45 mM peroxosíranem draselným. Získaný roztok byl ponechán 12 hodin ve tmě. Ve tmě byl uchováván i nadále.

Před použitím byl ABTS<sup>•+</sup> zředěn ethanolem pro UV/VIS na absorbanci  $0,70 \pm 0,02$  při 734 nm, měřeno proti ethanolu pro UV/VIS. Do zúžené kyvety bylo napipetováno 1 ml ABTS<sup>•+</sup>, 10 µl extraktu vzorku a kyveta byla uložena do tmy. Pokles absorbance byl zaznamenán v 10. minutě.

Pro výpočet celkové antioxidační aktivity byla použita kalibrační rovnice troloxu.

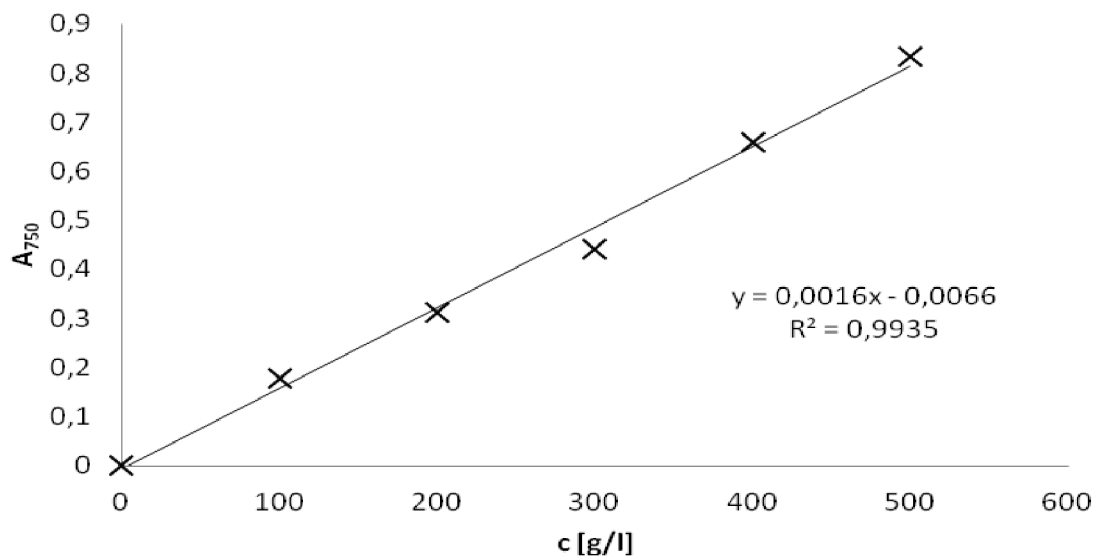


Obrázek 3: Kalibrační křivka troloxu

### 3.10 Stanovení celkových polyfenolů

Stanovení obsahu celkových polyfenolů bylo provedeno spektrofotometrickou metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Každý vzorek byl analyzován ve 3 paralelních stanoveních. Do zkumavky byl připraven roztok Folin-Ciocalteuova činidla a vody v poměru 1:9. Do zkumavky bylo napipetováno vždy 1 ml zředěného Folin-Ciocalteuova činidla, 1 ml destilované vody a 50  $\mu\text{l}$  extraktu vzorku. Roztok ve zkumavkách byl zamíchán a ponechán stát. Po 5 minutách bylo do každé zkumavky k roztoku přidáno 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného a vše bylo opět promícháno. Po 15 minutách byla změřena absorbance pomocí UV/VIS spektrofotometru při 750 nm proti slepému vzorku – destilované vodě.

Obsah celkových polyfenolů byl vypočten dosazením do rovnice absorbance získané z kalibrační křivky pro kyselinu gallovou v rozmezí 0,1 – 0,5 mg/ml. Jednotlivé roztoky pro naměření kalibrační křivky byly připraveny stejně jako vzorky extraktu, pouze místo extraktů byly použity roztoky kyseliny gallové o požadované koncentraci.



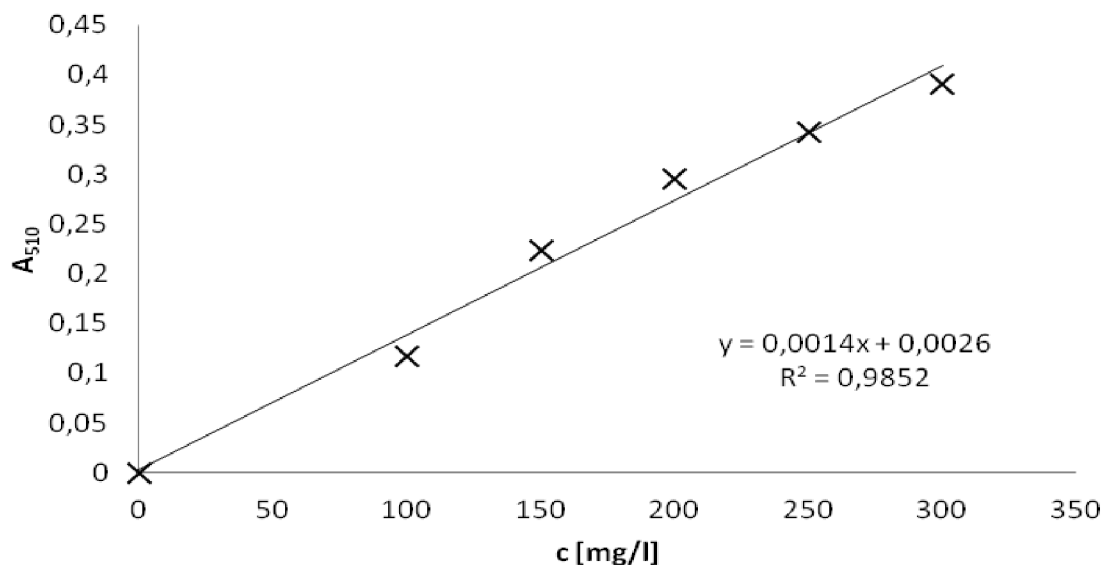
Obrázek 4: Kalibrační křivka kyseliny gallové

### 3.11 Stanovení celkových flavonoidů

Obsah celkových flavonoidů v extraktech byl stanoven spektrofotometrickou reakcí s hlinitou solí a dusitanem.

Do zkumavky bylo vždy napipetováno 0,5 ml extraktu, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% roztoku dusičnanu sodného. Roztok ve zkumavkách byl důkladně promíchán a nechán 5 minut v klidu. Poté bylo přidáno 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého a roztok byl opět ponechán 5 minut stát. Nakonec bylo přidáno 1,5 ml roztoku hydroxidu sodného a 1 ml destilované vody. Po 15 minutách byly vzorky analyzovány pomocí UV/VIS spektrofotometru při vlnové délce 510 nm proti blanku. Dále byl připraven slepý vzorek smícháním 0,5 ml extraktu vzorku a 4,4 ml destilované vody. Hodnoty absorpance byla odečtena od připravených vzorků.

Množství celkových flavonoidů bylo spočteno z rovnice kalibrační křivky katechinu v rozmezí 0,1 – 0,3 mg/ml. Roztoky pro kalibrační křivku byly připraveny stejnou cestou jako roztoky extraktů.



Obrázek 5: Kalibrační křivka katechinu

### 3.12 Stanovení biologické aktivity

Pro ověření inhibičních účinků extraktů použitých vzorků byla zvolena difuzní jamková metoda na agarových plottách. Jako živné médium byl zvolen Nutrient agar No. 2. Byly použity Petriho misky o průměru 9 cm a korkovrt o průměru 1 cm.

Do zkumavek s 4,5 ml živného bujONU No. 2 byla naočkováána kultura bakterií, která byla následně v termostatu inkubována 24 hodin při 30 °C. Po této době byly 2 ml kultury napipetovány do 200 ml vysterilizovaného, na 40 – 45 °C zchlazeného agaru. Připravené médium bylo rozléváno do Petriho misek po cca 28 ml. Do ztuhlého média bylo korkovrtem vyhloubeno šest jamek. Do pěti jamek byly následně napipetovány po 100 µl vzorky extraktů. Vzorky macerátů byly zkoumány v koncentracích 2 g/l, 5 g/l a 10 g/l, což je koncentrace původního vzorku. Výluhy byly pouze 10 g/l. Do šesté jamky bylo napipetováno 100 µl blanku, tedy čistého ethanolu nebo destilované vody. Petriho misky byly poté uloženy na 72 hodin do inkubátoru při teplotě 30 °C. Poté byla změřena velikost inhibičních zón a provedena fotodokumentace jednotlivých Petriho misek.

### 3.13 Měření inhibičních zón

Pro měření inhibičních zón byla využita metoda měření délky. Inhibiční zóny byly změřeny ve dvou na sebe kolmých směrech. Pro každou zónu byla vypočtena průměrná hodnota a z pěti zón na Petriho misce potom byla potom zjištěna průměrná hodnota pro danou koncentraci. [29]

## 4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Předměty této práce byly šípkový čaj a čajová směs s převládajícím obsahem šípku.

Cíle při analýze těchto čajů byly určeny dva. Zprvce posouzení antimikrobiální aktivity na zvolené baterie *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus*. Zadruhé stanovení množství biologicky aktivních látek, v našem případě polyfenolů a flavonoidů.

### 4.1 Stanovení antioxidační aktivity

Pro stanovení celkové antioxidační aktivity byla zvolena metoda ABTS, která spočívá ve schopnosti vzorku zhaset radikál ABTS<sup>+</sup>. Radikál byl připraven smíšením peroxosíranu draselného s diamoniou solí ABTS. Metoda je prováděna spektrofotometricky na základě rozdílné absorbance v čase.

Výsledná absorbance byla vypočtena pomocí vzorce

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

kde  $A_0$  je absorbance extraktu vzorku s ABTS<sup>+</sup> v čase  $t = 0$  s a  $A_{10}$  je absorbance změřená po 10 minutách. Měření pro každý vzorek bylo provedeno třikrát a pro výpočet byla použita průměrná hodnota. Získaná absorbance byla dosazena do rovnice kalibrační přímky troloxu a byla vypočtena celková antioxidační aktivita.

Kalibrační rovnice troloxu:

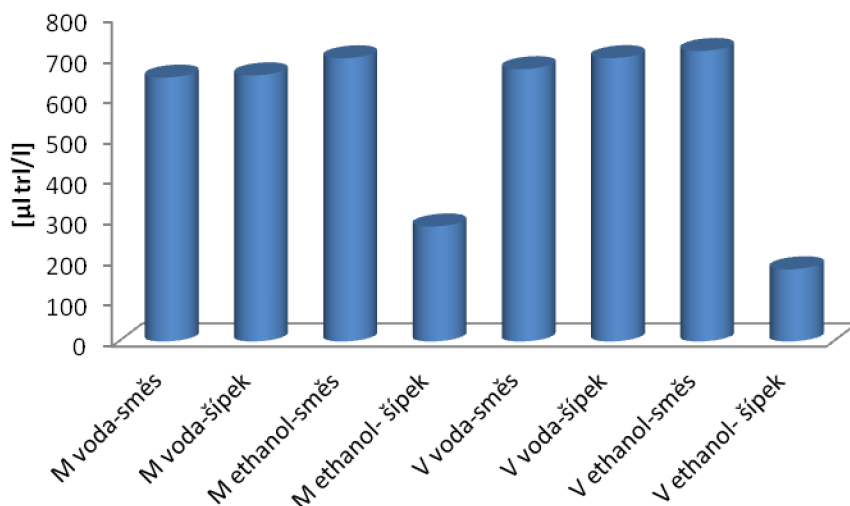
$$A = 0,0014 \cdot c$$

Výsledky jsou uvedeny v  $\mu\text{g}$  troloxu / ml vzorku a jsou uvedeny v Tabulka 1.

Nejvyšší koncentrace aktivních látek byla pozorována u výluhu obsahujícího čajovou směs v ethanolu. Všechny vzorky dosáhly velmi podobných hodnot, kromě extraktů šípku v ethanolu.

Tabulka 1: Vypočtené hodnoty celkové antioxidační aktivity stanovovaných extraktů

extrakt		A $\pm$ SD	c [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] $\pm$ SD
macerát	voda – směs	0,912 $\pm$ 0,006	651,3 $\pm$ 3,90
	voda – šípek	0,919 $\pm$ 0,059	656,8 $\pm$ 41,9
	ethanol – směs	0,979 $\pm$ 0,020	698,9 $\pm$ 14,0
	ethanol – šípek	0,397 $\pm$ 0,079	283,8 $\pm$ 56,4
výluh	voda – směs	0,941 $\pm$ 0,056	672,1 $\pm$ 39,7
	voda – šípek	0,979 $\pm$ 0,022	699,2 $\pm$ 15,9
	ethanol – směs	1,004 $\pm$ 0,001	717,1 $\pm$ 0,60
	ethanol – šípek	0,249 $\pm$ 0,044	178,1 $\pm$ 31,5



Obrázek 6: Stanovení celkové antioxidační aktivity (M – macerát, V – výluh)

## 4.2 Stanovení celkových polyfenolů

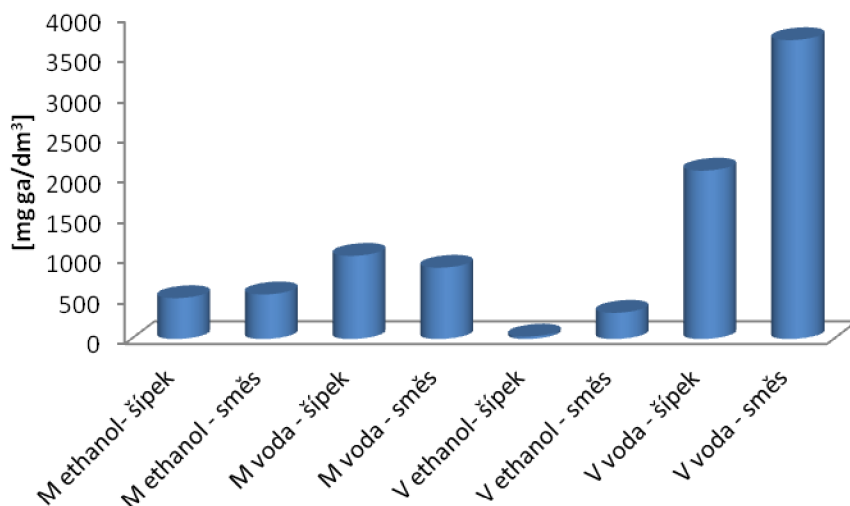
Celkový obsah polyfenolů byl stanoven pomocí metody s Folin-Ciocalteho činidlem. Metoda spočívá v redukci fenolických sloučenin obsažených ve vzorcích čajů. Metoda je prováděna spektrofotometricky. Každý vzorek byl proměřen třikrát a výsledky byly zprůměrovány. Z rovnice lineární regrese kalibrační přímky kyseliny gallové byl vypočítán obsah polyfenolů. Výsledné hodnoty jsou vyjádřeny v mg kyseliny gallové / 1 l vzorku.

Naměřené a vypočtené hodnoty jsou uvedeny v Tabulka 2.

Z Obrázek 7 lze vyčíst, že nejvyšší obsah polyfenolů má výluh směsi ve vodě. Obecně vodné extrakty obsahují větší množství polyfenolů než etanolové. Je zde vidět i velký rozdíl mezi vodnými maceráty a výluhy, kdy výluhy dosahují mnohem vyššího množství aktivních látek.

Tabulka 2: Průměrné hodnoty celkového obsahu polyfenolů ve vzorcích (\* u hodnoty absorbance značí, že roztok byl 10krát zředěn)

	extrakt	absorbance ± SD	FCM (mg GA/dm <sup>-3</sup> ) ± SD
macerát	ethanol – šípek	0,806 ± 0,021	507,7 ± 12,9
	ethanol – směs	0,879 ± 0,053	553,9 ± 32,9
	voda – šípek	*0,145 ± 0,032	1033,3 ± 202,5
	voda – směs	*0,141 ± 0,053	885,4 ± 328,8
výluh	ethanol – šípek	0,041 ± 0,003	29,8 ± 1,7
	ethanol – směs	0,512 ± 0,034	325,4 ± 21,3
	voda – šípek	*0,351 ± 0,073	2091,6 ± 456,3
	voda – směs	*0,591 ± 0,006	3713,5 ± 36,6



Obrázek 7: Stanovení množství celkových polyfenolů (M – macerát, V – výluh)

### 4.3 Stanovení celkových flavonoidů

Stanovení celkových flavonoidů v extraktech bylo provedeno pomocí metody reakce s hlinitou solí a dusitanem. Stanovení bylo provedeno spektrofotometricky. Každý vzorek byl proměřen třikrát a hodnoty byly zprůměrovány. Celkový obsah flavonoidů byl získán dosazením naměřené absorbance do kalibrační rovnice katechinu.

Naměřené a vypočtené hodnoty jsou uvedeny v Tabulka 3.

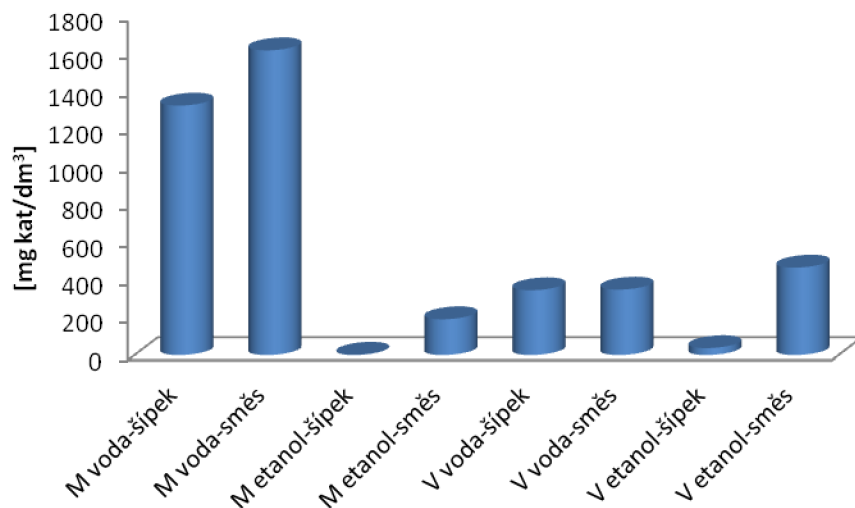
Nejvyšší obsah flavonoidů byl stanoven u macerátu obsahujícího směs ve vodě. Stejně jako u polyfenolů je zřejmé, že vodní extrakty obsahují větší množství biologicky aktivních látek.

Zároveň je i zde vidět rozdíl mezi obsahem aktivních látek ve vodných macerátech a výluzích. Maceráty dosahují lepších výsledků, na rozdíl od stanovení polyfenolů, kde jsou na tom mnohem lépe výluhy.

Tabulka 3: Průměrné hodnoty celkového množství flavonoidů měřených vzorků (\* u hodnoty absorbance značí, že roztok byl 10krát zředěn)

extrakt		absorbance ± SD	C ± SD
macerát	voda – šípek	*0,199 ± 0,041	1326,2 ± 295,8
	voda – směs	*0,241 ± 0,011	1620 ± 75
	etanol – šípek	0,081 ± 0,005	1,45 ± 3,5
	etanol – směs	0,421 ± 0,101	190,1 ± 72
výluh	voda – šípek	*0,057 ± 0,006	344,3 ± 39,3
	voda – směs	*0,054 ± 0,011	347,7 ± 76,4
	etanol – šípek	0,064 ± 0,007	36,5 ± 4,8
	etanol – směs	0,849 ± 0,057	464,8 ± 40,4





Obrázek 8: Stanovení celkového obsahu flavonoidů (M – macerát, V – výluh)

#### 4.4 Stanovení antimikrobiální aktivity

Pro ověření antimikrobiální účinnosti stanovených vzorků na mikroorganismy *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus* byla využita difuzní jamková metoda. Byl sledován vliv přípravy extraktu, macerát a výluh, a vliv použitého rozpouštědla, ethanol a destilovaná voda.

Při prvním měření byly použity jak původní koncentrované extrakty, tak jejich zředěné varianty. U zředěných extraktů nebyla pozorována inhibiční aktivita, proto byly pro opakování měření použity pouze původní vzorky o koncentraci 10 g / 100 ml.

Při prvním pokusu byly inhibiční zóny pozorované pouze u vodných výluhů působících na bakterii *Micrococcus luteus*. Při opakování pokusu byla inhibiční zóna potvrzena opět jen pro bakterii *Micrococcus luteus*, opět jen pro vodní extrakty.

Tabulka 4: Získané hodnoty inhibičních zón pro výluhy (první pokus)

mikroorganismus	extrakt + rozpouštědlo	množství aktivní látky ve 100 g rozpouštědla [g]		
		10	5	2
		inhibiční zóny [mm]		
<i>Serratia marcescens</i>	voda – šípek	-	-	-
	voda – směs	-	-	-
	ethanol – šípek	-	-	-
	ethanol – směs	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	voda – šípek	21,3 ± 1,07	-	-
	voda – směs	19,75 ± 0,38	-	-
	ethanol – šípek	-	-	-
	ethanol – směs	-	-	-

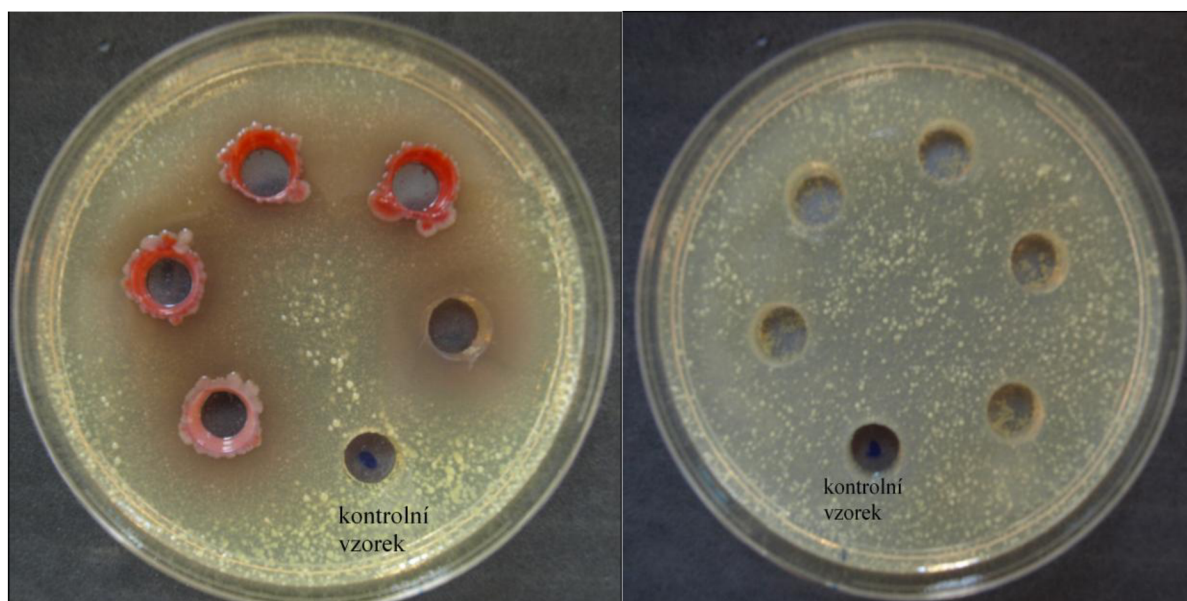
#### 4.5 Inhibiční účinek extraktů

Při druhém měření byly využity pouze koncentrované extrakty. Pro každý mikroorganismus byly provedeny dvě paralelní měření a výsledky byly zprůměrovány. Výsledky inhibičních zón jsou uvedeny v Tabulka 5.

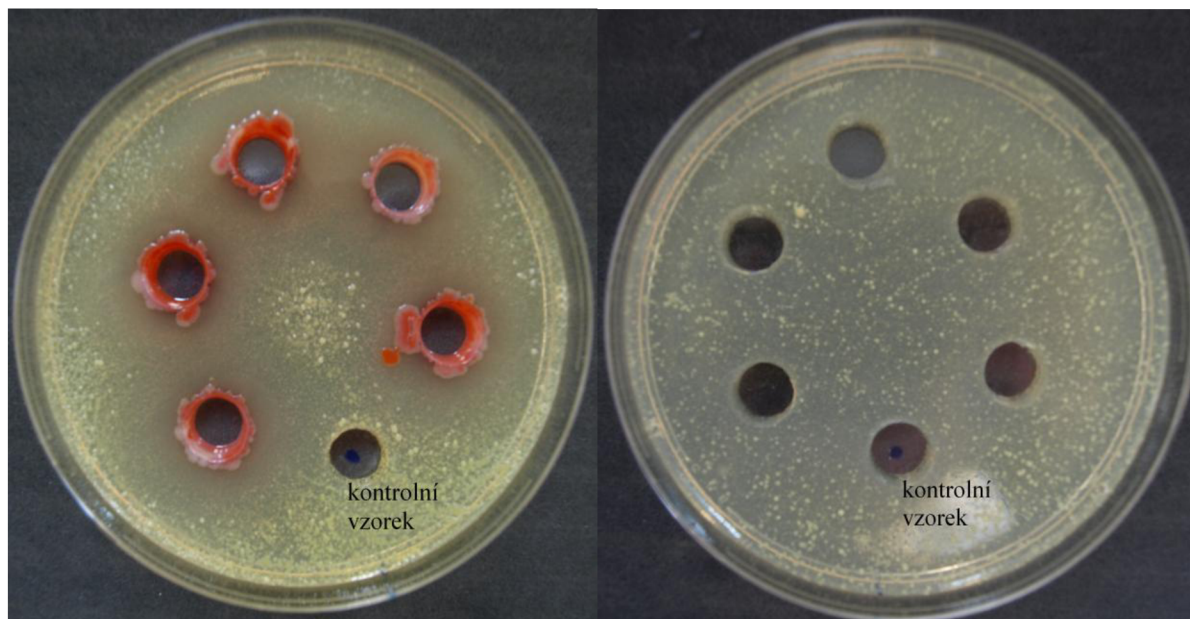
Tabulka 5: Výsledky měření inhibičních zón pro vodné výluhy (druhý pokus)

mikroorganismus	extrakt + rozpouštědlo	vyhodnocení inhibiční zóny metoda měření délky [mm]
<i>Mircococcus luteus</i>	voda – šípek	$19,2 \pm 0,88 \times 19,5 \pm 0,63$
	voda – směs	$20,9 \pm 0,9 \times 20,4 \pm 0,72$
	ethanol – šípek	-
	ethanol – směs	-

Stanovení inhibičních zón vyšlo kladně pouze pro vodné výluhy působící na *Micrococcus luteus*. U extraktů vodných macerátů nebyla pozorována tvorba inhibičních zón. V případě *Serracia marcescens* nebyla inhibiční aktivita u vodných výluhů či macerátů prokázána. U etanolových extraktů působících na obě bakterie nebyla antimikrobiální aktivita opět prokázána.



Obrázek 9: Vlevo vodný výluh směsi, vpravo ethanolový výluh směsi na agaru naočkovaném *Micrococcus luteus*



Obrázek 10: Vlevo vodný výluh šípku, vpravo ethanolový výluh šípku na agaru naočkovaném *Micrococcus luteus*

## 5. ZÁVĚR

Předmětem této bakalářské práce bylo studium antimikrobiálního účinku vodných a ethanolových extraktů, výluhů a macerátů na bakterie. Zástupcem gram pozitivních bakterií byla bakterie *Micrococcus luteus*, za gram negativní byla zvolena *Serratia marcescens*. Dále byla testována celková antioxidační aktivita a množství biologicky aktivních látek, polyfenolů a flavonoidů.

Pro testování byly zvoleny dva vzorky čajů. První obsahoval pouze sušené plody růže šípkové, v druhém byly šípky ve směsi s plody rybízu a aronie.

Extrakty byly připravovány dvěma způsoby, jako maceráty a jako výluhy, každý se dvěma typy rozpouštědel, ethanolem a destilovanou vodou.

Antimikrobiální aktivita byla stanovena difúzní jamkovou metodou.

Z měřených vzorků vyšla pozitivní aktivita pouze u vodných výluhů působících na bakterii *Micrococcus luteus*. Hodnoty inhibičních zón byly pro vzorky čajů srovnatelné. Ethanolové extrakty nevykazovaly žádnou antimikrobiální aktivitu. U vzorků působících na *Serratia marcescens* nebyl pozorován vznik inhibičních zón.

Výsledky antimikrobiální aktivity byly porovnány s výsledky stanovení biologicky aktivních látek. U stanovení celkových polyfenolů byla nejvyšší hodnota zjištěna u vodného výluhu čajové směsi. Nejvyšší koncentraci flavonoidů měl vodný macerát čajové směsi.

Lze také pozorovat vztah mezi množstvím stanovených biologicky aktivních látek v ethanolových extraktech a pozorováním antimikrobiální aktivity ethanolových extraktů.

## 6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] *Botany.cz* [online]. 2007 [cit. 2016-02-22]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/rosa-canina/>
- [2] LESJAK, Marija M., Filip S. ŠIBUL, Jelena D. NADPAL, Goran T. ANAČKOV, ČETOJEVIĆ-SIMIN, Neda M. MIMICA-DUKIĆ a Ivana N. BEARA. *Comparative study of biological activities and phytochemical composition of two rose hips and their preserves: Rosa canina L. and Rosa arvensis Huds.* [online]. 2015 [cit. 2016-02-24]. ISSN 907-914. Dostupné z: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)
- [3] *Rosa canina - růže šípková* [online]. 2015 [cit. 2016-02-24]. Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/549-rosa-canina-ruze-sipkova>
- [4] COWAN, M. M.: Plant products as microbial agents, *Clin. Microbiol. Reviews*, 1999, vol. 12, no. 4, s. 564 – 582
- [5] *Arnika* [online]. 2014 [cit. 2016-02-28]. Dostupné z: <http://arnika.org/fenoly>
- [6] *Flavonoidy* [online]. 2012 [cit. 2016-02-28]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92217.aspx>
- [7] *Třísloviny* [online]. 2012 [cit. 2016-02-28]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92418.aspx>
- [8] ENDRIS, Zdeněk a Jaroslav KOBELÁŘ. *Naše rostliny v lékařství*. 7. vyd. Ilustrace Jindřich Krejča. Praha: Avicenum, 1990. ISBN Naše rostliny v lékařství.
- [9] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. Vyd. 2. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [10] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vyd., ve VP 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0571-6.
- [11] MOSIO, Petra. *Atlas bakterií*. Vyd. 1. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2012. ISBN 978-80-7395-467-3.
- [12] TVRDOŇ, Milan. *Školský atlas mikroorganizmov pre 1. až 4. ročník SPŠPT*. Bratislava: Alfa, 1979. Edícia potravinárskej literatúry (Alfa).
- [13] KODÍČEK, Milan. *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004. ISBN 80-708-0551-X.
- [14] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [15] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-866-5900-3.
- [16] MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.), v H. Jinočany: H, 2002. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.



- [17] Antioxidační vlastnosti kyseliny močové u lidí. *Www.vitamins.cz* [online]. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2003 [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: [www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/I/L\\_18AC.doc](http://www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/I/L_18AC.doc)
- [18] *E310 - Propylgallát* [online]. Praha: Zdravá potravina, 2015 [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: <http://www.zdravapotravina.cz/seznam-ecek/E310>
- [19] *The truth about food additive BHA* [online]. New York: My health news daily, 2012 [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: <http://www.livescience.com/36424-food-additive-bha-butylated-hydroxyanisole.html>
- [20] AZMIR, J., I. S. M. ZAIDUL, M. M. RAHMAN, K. M. SHARIF, A. MOHAMED, F. SAHENA, M. H. A. JAHURUL, K. GHAFUOR, N. A. N. NORULAINI, et al. 2013. 45 Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* [online]. 117(4): 426-436 [cit. 2016-05-14]. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014. ISSN 02608774. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877413000277>
- [21] TAJKARIMI, M. M., S. A. IBRAHIM a D. O. CLIVER. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* [online]. 2010, vol. 21, issue 9, s. 1199-1218 [cit. 2016-04-17]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.02.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713510000459>
- [22] FARZANEH, Vahid a Isabel S. CARVALHO. A review of the health benefit potentials of herbal plant infusions and their mechanism of actions. *Industrial Crops and Products* [online]. 2015, vol. 65, s. 247-258 [cit. 2016-04-17]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.10.057. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092666901400675X>
- [23] JAIN, Aditi, Chanchal MANGHANI, Shrey KOHLI, Darshika NIGAM a Vibha RANI. Tea and human health: The dark shadows. *Toxicology Letters*. 2013, **220**(1), 82-87 [cit. 2016-04-17]. DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.04.010. ISSN 03784274. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427413001653>
- [24] ALMAJANO, M. Pilar, Rosa CARBÓ, J. Angel López JIMÉNEZ a Michael H. GORDON. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry* [online]. 2008, vol. 108, issue 1, s. 55-63 [cit. 2016-04-17]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.10.040. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607010631>
- [25] JANČA, Jiří a Josef Antonín ZENTRICH. *Herbář léčivých rostlin*. Ilustrace Magdalena Martínková. Praha: Eminent, 1994. ISBN 80-858-7602-7.
- [26] KLANČNIK, Anja, Saša PISKERNIK, Barbara JERŠEK a Sonja Smole JEŽINA. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*. 2010, č. 81, s. 121-126 [cit. 2016-04-17].
- [27] <http://www.gresik.cz/caje/ovocne-caje/ovocne-caje-porcovane/19-aronie-sipek-cerny-rybiz-porcovany/>
- [28] <http://www.babycinobchod.cz/p/sipky-drcene-100-g/>

- [29] VESELÁ, Mária: Praktikum z obecné mikrobiologie. 3. vyd., 2004, VUT FCH. ISBN 80-214-2567-9
- [30] MÁROVÁ, Ivana a Stanislav OBRUČA. *Vybrané instrumentální úlohy z aplikované biochemie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. ISBN 978-80-214-4788-2.
- [31] NACZK, Marian a Fereidoon SHAHIDI. Phenolics in cereals, fruits and vegetables. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2006, vol. 41, issue 5, s. 1523-1542 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.04.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708506003062>
- [32] GRUBEŠIĆ, Renata Jurišić, Dario KREMER, Marijana Zovko KONČIĆ, Jadranka Vuković RODRÍGUEZ a RANDIĆ. Quantitative analysis of polyphenols and antioxidant activity in four *Daphne L.* species. *Central European Journal of Biology* [online]. 2012, vol. 7, issue 6, s. 1092-1100 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.2478/s11535-012-0102-8. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.2478/s11535-012-0102-8>
- [33] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. 2004, (98), 174-179.