

**Mendelova univerzita v Brně**

**Zahradnická fakulta v Lednici**

**STUDIUM ANTIMIKROBIÁLNÍHO EFEKTU  
HROZNOVÝCH SEMEN**

**Diplomová práce**

Vedoucí diplomové práce

doc. Ing. Jiří Sochor, Ph.D.

Vypracovala

Bc. Ivana Koláčková

Lednice 2017

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Studium antimikrobiálního efektu hroznových semen vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 Autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Lednici dne:

.....

podpis

## **Pod'akovanie**

Touto cestou by som chcela poďakovať predovšetkým pánovi doc. Jiřímu Sochorovi za jeho čas, cenné rady a postrehy a celkové vedenie práce. Ďalej pánovi Ing. Liborovi Kalhotkovi PhD., za umožnenie a pomoc s experimentálnou časťou tejto práce na Agronomickej fakulte a Ing. Eve Burdovej za pomoc pri realizácii samotných pokusov. Vďaka patrí aj Ing. Lenke Tomáškovej a Ing. Adamovi Záhorovi za pomoc pri príprave extraktu.

## **OBSAH**

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>2. CIEĽ PRÁCE .....</b>	<b>10</b>
<b>3. LITERÁRNY PREHLAD .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Látkové zloženie semien <i>Vitis vinifera</i> L. ....</b>	<b>11</b>
<b>3.2 Možnosti využitia viničných extraktov .....</b>	<b>12</b>
3.2.1 Extrakt ako konzervačná látka .....	12
3.2.1 Extrakty v medicíne .....	14
3.2.1 Ostatné využitia extraktu .....	17
<b>3.3 Štúdium antimikrobiálneho efektu .....</b>	<b>18</b>
3.3.1 Štúdium pomocou rastovej krivky .....	18
3.3.2 Štúdium priamym počítaním buniek .....	18
3.3.3 Štúdium meraním inhibičných zón .....	19
<b>3.4 Študované mikroorganizmy .....</b>	<b>20</b>
3.4.1 <i>Bacillus cereus</i> .....	20
3.4.2 <i>Candida tropicalis</i> .....	21
3.4.3 <i>Enterococcus faecalis</i> .....	23
3.4.4 <i>Escherichia coli</i> .....	24
3.4.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	26
<b>4. MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Získanie a úprava hroznových semien .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Tvorba extraktu .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3 Stanovenie celkových polyfenolických zlúčenín .....</b>	<b>29</b>
<b>4.4 Stanovenie antioxidačnej aktivity pomocou DPPH metódy .....</b>	<b>30</b>
<b>4.5 Modelové mikroorganizmy .....</b>	<b>30</b>
<b>4.6 Stanovenie antimikrobiálneho efektu .....</b>	<b>31</b>
4.6.1 Laboratórne pomôcky a prístroje .....	31

4.6.2 Zloženie a príprava média.....	31
4.6.3 Disková difúzna metóda .....	32
<b>5. VYHODNOTENIE A VÝSLEDKY .....</b>	<b>34</b>
<b>5.1 Stanovenie celkových polyfenolických zlúčenín a flavonolov .....</b>	<b>34</b>
<b>5.2 Stanovenie antioxidačnej aktivity pomocou DPPH metódy .....</b>	<b>34</b>
<b>5.3 Stanovenie antimikrobiálneho efektu .....</b>	<b>35</b>
5.3.1 Vodný extrakt podrobený oxidácii .....	35
5.3.2 Metanolvý extrakt .....	38
5.3.3 Štatistické vyhodnotenie .....	41
<b>6. DISKUSIA .....</b>	<b>47</b>
<b>7. ZÁVER .....</b>	<b>50</b>
<b>8. SÚHRN A RESUMÉ .....</b>	<b>51</b>
<b>9. POUŽITÁ LITERATÚRA .....</b>	<b>52</b>

## **Zoznam obrázkov**

Obrázok 1: Príprava bezmetanolového extraktu vo vákuovej odparke

Obrázok 2: Kultivácia inokula v trepačke

Obrázok 3: Meranie inokula densitometrom

Obrázok 4: Príprava Petriho misiek na inokulum

Obrázok 5: Inhibičné zóny okolo diskov v kultúre *C. tropicalis* po 24 h

Obrázok 6: Inhibičné zóny okolo diskov v kultúre *E. faecalis* po 24 h

Obrázok 7: Inhibičné zóny okolo diskov v kultúre *E. coli* po 24 h

Obrázok 8: Inhibičné zóny metanolového GSE okolo diskov v kultúre *B. cereus* po 24 h

Obrázok 9: Inhibičné zóny metanolového GSE okolo diskov v kultúre *C. tropicalis* po 24 h

Obrázok 10: Inhibičné zóny metanolového GSE okolo diskov v kultúre *E. faecalis* po 24 h

## Zoznam tabuliek a grafov

Tabuľka 1: Rozkladová tabuľka popisných štatistík u varianty 10% GSE

Tabuľka 2: Rozkladová tabuľka popisných štatistík u varianty 50% GSE

Tabuľka 3: Rozkladová tabuľka popisných štatistík u varianty 100% GSE

Tabuľka 4: Jednorozmerné výsledky pre vybrané závislé premenné

Tabuľka 5: Výsledky Tukeyovho HSD testu podľa použitých koncentrácií GSE

Graf 1: Obsah celkových polyfenolických zlúčenín a flavonolov v extrakte

Graf 2: Porovnanie výsledkov meraní antioxidačnej aktivity tromi metódami

Graf 3: Grafické znázornenie priemerov inhibičných zón v závislosti na koncentrácii GSE a doby jeho pôsobenia na *C. tropicalis*

Graf 4: Grafické znázornenie priemerov inhibičných zón v závislosti na koncentrácii GSE a doby jeho pôsobenia na *E. faecalis*

Graf 5: Grafické znázornenie priemerov inhibičných zón v závislosti na koncentrácii GSE a doby jeho pôsobenia na *E. coli*

Graf 6: Grafické znázornenie priemerov inhibičných zón v závislosti na koncentrácii metanolového GSE a doby jeho pôsobenia na *B. cereus*

Graf 7: Grafické znázornenie priemerov inhibičných zón v závislosti na koncentrácii metanolového GSE a doby jeho pôsobenia na *C. tropicalis*

Graf 8: Grafické znázornenie priemerov inhibičných zón v závislosti na koncentrácii metanolového GSE a doby jeho pôsobenia na *E. faecalis*

Graf 9: Grafické znázornenie priemerov inhibičných zón v závislosti na koncentrácii metanolového GSE a doby jeho pôsobenia na *E. coli*

Graf 10: Súhrn meraní inhibičných zón pri použití 10% extraktu

Graf 11: Súhrn meraní inhibičných zón pri použití 50% extraktu

Graf 12: Súhrn meraní inhibičných zón pri použití 100% extraktu

## **Zoznam použitých skratiek**

- ABTS - spektrofotometrická metóda s použitím radikálu 2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonovej kyseliny
- BHT - butylated hydroxytoluen
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute
- DPPH - 2,2-diphenyl-1-pikrylhydrazyl
- Esp - enterococcal surface protein
- FRAP - ferric reducing antioxidant power (označenie spektrofotometrickej metódy)
- G<sup>-</sup> - Gram-negatívny mikroorganizmus
- G<sup>+</sup> - Gram-pozitívny mikroorganizmus
- GAE - gallic acid equivalent
- GSE - grape seed extract
- HDL-C - high density lipoprotein cholesterol
- CHL - chloramphenicol glucose agar
- LDL - low density lipoprotein
- MLEE - multilocus enzymatic electroforesis
- MRSA - methicilin-resistant *Stafylococcus aureus*
- PCA - plate count agar
- PSE - papaya seed extract
- RGO - reduced graphen oxide
- RSA - radical scavenging activity
- SRB assay - sulforhodamine B colorimetric assay
- TBHP - tert-butyl hydroperoxid
- TSB - tripton soy broth



## 1. ÚVOD

*Vitis vinifera* L. je jedným z najpestovanejších ovocných druhov na svete, v najnovších dátach z roku 2013 bola zaznamenaná produkcia 77 181 122 ton. V minulosti bolo dokázaných mnoho pozitívnych účinkov čerstvých bobúľ alebo hroznových produktov (napríklad vína alebo šťavy) na ľudské zdravie. Ich efekt pramení najmä z vysokého obsahu fenolických látok, ktoré umožňujú znižovať oxidatívny stres v organizme.

Biologická hodnota hroznových semien však až v posledných rokoch nadobúda svoju popularitu. Fenoly v semenách predstavujú 60–70 % celkových extrahovateľných fenolov hrozna. Fenoly, ako aj iné bioaktívne látky a všeobecne hroznové semená sú v súčasnosti predmetom skúmania mnohých odvetví. Ich využitie je čoraz častejšie vo farmaceutickom priemysle ako doplnky stravy vďaka ich dietetickej hodnote. V potravinárstve nachádzajú svoje uplatnenie ako prírodné konzervačné látky. Vďaka ich antimikrobiálnym vlastnostiam sú schopné dopĺňať zaužívané technológie v oblasti spracovania potravín. Ďalším uplatnením je podpora liečby mykotických a zápalových ochorení. Semená pozitívne pôsobia na organizmus aj podporou rastu probiotických baktérií. Najrozšírenejšia je aplikácia extraktov z vedľajších produktov pri výrobe vína (hroznových semien, šupiek alebo drte) v liečbe hypertenzie, ochorení srdca, rakovinových ochorení vďaka ich antioxidačným účinkom.

Výskum presného mechanizmu pôsobenia a rozsahu vlastností prírodných extraktov je nevyhnutný v ich procese začlenenia do praxe. Vzhľadom na časté korelácie medzi bioaktívnymi látkami býva ich efekt často nejednoznačný alebo nepreukázateľný. Preto bude účinok extraktu z hroznových semien na päť bežných patogénov a jeho uplatnenie v praxi skúmané a vyhodnotené v tejto práci.

## **2. CIEĽ PRÁCE**

Cieľom tejto diplomovej práce je spracovanie informácií o semenách viniča vínného a predovšetkým antimikrobiálnych účinkoch semien, rešeršným spôsobom. Ďalej sa práca bude sústrediť na prípravu extraktu, stanovenie obsahu celkových polyfenolických zlúčenín a antioxidačnej aktivity. Pomocou diskovej dufúznej metódy bude stanovené antimikrobiálne pôsobenie na modelových organizmoch a dáta budú spracované.

### 3. LITERÁRNY PREHLAD

#### 3.1 Látkové zloženie semien *Vitis vinifera* L.

Bobuľa viniča vínného je zložená z perikarpu, tvoreného exokarpom (šupkou), mezokarpom (dužinou) a endokarpom (pletivom ohraničujúceho semená), a zo samotných semien. Semená, ktoré sú predmetom štúdie tejto diplomovej práce, majú hruškovitý tvar a predĺžený zobáčik. Zaraďujú sa medzi anatrofické semená. Morfológia je odrodovou charakteristikou, ich počet a hmotnosť sa ale mení podľa vonkajších vplyvov pôsobiacich vo vinici (Chadha a Randhawa, 1974; Hardie a Aggenbach, 1996 in Pavloušek, 2011). Hmotnosť semien predstavuje približne 0–6 % z celkovej hmotnosti bobule. Ich šírka je 3–5 mm, dĺžka 3–8 mm (Pavloušek, 2011).

Veľká časť obsahu proteínov v semenách zbavených tukov bola nájdená v endosperme (40 % dosiahnutých dusíkatou analýzou). Najviac sa tam vyskytovali proteíny príbuzné globulínu, ktoré majú ukladaciu funkciu. Obal semena pozostáva najmä z vlákniny (Gazzola et al., 2014).

Hlavnou skúmanou časťou viniča v tejto práci sú semená. Zo 40 % sú semená hrozna zložené z vlákniny, 16 % tvoria oleje, 11 % proteíny. Ďalšie zastúpené látky sú minerálne soli a cukry (Murga et al., 2000). Obsahujú taktiež množstvo biologicky aktívnych flavonoidov - resveratrol, oligoméne prokyanidíny a kyselinu linoleovú (Friedman 2014). Proantokyanidíny, ktoré sú hojne zastúpené v semenách, majú antioxidačnú schopnosť až 50 krát vyššiu ako jeden z najznámejších antioxidantov, vitamín C, a až 20 krát vyššiu ako vitamín E (Shi et al., 2003).

Vedci z Holandska pri meraní podielu olejov niekoľkých ovocných druhov zistili, že vinič v semenách obsahuje 20,2 % oleja. Z fytosterolov sa v semenách nachádza najmä beta-sitosterol. Ďalej je v oleji možné nájsť množstvo mastných kyselín (Ozcan et al., 2015).

Shi et al. (2003) uvádza, že presný obsah polyfenolov v semenách závisí od odrody, pohybuje sa však v rozmedzí 5–8 %. Pri použití dvojitej extrakcie v metanole boli schopní vedci z Kanady extrahovať až 11,4 % polyfenolov z celkovej váhy semien (Nawaz et al., 2006). Najväčší podiel fenolov v semenách tvorili pri výskume v Srbsku flavan-3-oly, najmä gallokatechín gallát a katechín. Ich presné množstvo ale závisí na odrode, z testovaných modrých odrôd obsahoval najviac flavanolov 'Pinot noir' ( $102.98 \pm 0.58$  mg GAE/g), z bielych 'Pinot gris' ( $96.89 \pm 2.51$  mg GAE/g). Ďalej sa v semenách nachádzalo až päť druhov hydroxybenzoových kyselín a obsah kyseliny gallovej bol

väčší u modrých odrôd. Dva druhy hydroxyškoricových kyselín a flavonoly (quercetín, rutín a myricetín) boli taktiež predmetom merania (Pantelic et al., 2016). Bolo dokázané, že sa behom dozrievania obsah flavanolov v semenách znižuje, naopak obsah prokyanidínov sa postupne zvyšuje (Romeyer et al., 1985).

Pri porovnávaní amerických druhov viniča (konkrétne *V. cinerea* (Engelm.) Engelm. ex Millardet, *V. californica* Benth., *V. arizonica* Engelm.) s kultivarmi európskeho druhu (*V. vinifera* L.) vedci zistili, že v semenách a šupke *V. vinifera* L. sa nachádza vyšší podiel prokyanidínov (test pomocou fluoroglycynolýzy) a na rozdiel od amerických druhov bežne obsahuje terpenoidy a glykosidy. Americké druhy však v šupkách obsahovali hydrolyzovateľné taníny (a ich prekurzory) a obsahujú viac antokyanidov a stilbenoidov (Narduzzi et al., 2016).

## **3.2 Možnosti využitia viničných extraktov**

### **3.2.1 Extrakt ako konzervačná látka**

Syntetické konzervačné látky sú často využívané v potravinárstve. Niekoľko experimentov ale naznačuje, že je možné ich množstvo v potravinách znížiť alebo dokonca úplne vylúčiť. Štúdia zaoberajúca sa vo vode rozpustným GSE vyrobeným z odrôd 'Ison' a 'Carlos' ukázala vysoký potenciál extraktu ako prírodnej konzervačnej látky použiteľnej v nápojoch vďaka vysokému inhibičnému účinku u *E.coli* (Kim et al., 2008). Použitie GSE (ako prípravku ActiVin) bolo testované taktiež v mletom hovädzom mäse. Boli dokázané pozitívne antimikrobiálne účinky (pokles množstva *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, a *Listeria monocytogenes* približne o 1 log CFU/g) a zastavenie oxidácie tukov (Ahn et al., 2004).

Vďaka výsledkom meraní antioxidačného a antimikrobiálneho efektu GSE Reddy et al. (2014) je možné predpokladať, že GSE môže z časti nahradiť syntetické konzervačné látky, napr. butylhydroxyanizol (BHA). V pokuse boli porovnávané tri varianty ošetrovania baranieho mäsa: kontrola, GSE a BHA a ich účinok na jeho uchovávanie v chladiarenských podmienkach. Už 0,1% koncentrácia GSE zlepšila mikrobiálnu kvalitu a senzorické vlastnosti (šľavnatosť, farbu aj celkovú chuťnosť) nad úroveň BHA a kontroly. Bola zvýšená uchovateľnosť mäsa v chlade na minimálne 28 dní. O dva roky skôr boli na antioxidačné účinky GSE testované mrazené predvarené klobásy. GSE bolo porovnávané s kyselinou citrónovou a propyl galátom. V porovnaní s kontrolou si varianty s GSE a propyl galátom zachovali čerstvú vôňu a chuť dlhšie. GSE navyše potlačilo vôňu skazeného mäsa aj po 4 mesiacoch skladovania v mraze.

Množstvo reaktívnych foriem thiobarbiturovej kyseliny sa v priebehu skladovania takmer nemenilo (Kulkarni et al., 2011). Sušená saláma *chorizo* bola taktiež predmetom skúmania vo vzťahu k antioxidačnej aktivite GSE. GSE nielen že spomalil degradáciu oxidovaním tukov, ale obmedzili aj biologickú aktivitu a počet plesní, kvasiniek a baktérií mliečneho kvasenia. V porovnaní s antioxidantom BHT bol efekt rovnaký až vyšší (Pateiro et al., 2015).

Pri porovnaní GSE s PSE *in vitro* diskovou difúznou metódou kolektív vedcov zistil, že GSE má väčší inhibičný účinok na  $G^+$  mikroorganizmy ako PSE. Pri metóde namáčania testovanej makrely do extraktu bola predĺžená jej trvanlivosť a tak odporúčajú GSE ako náhradu syntetických konzervačných látok (Sofi et al., 2016).

Zaujímavým spôsobom využitia zdraviu prospešných látok prítomných vo viniči je spracovanie semien na múku. Týmto produktom sa zaoberali vedci z Turecka, ktorí testovali výhody použitia múky a senzorické vlastnosti párkov z nej vyrobených. Škrob a kazeinát sodný prítomné v klasickej receptúre boli nahradené múkou v rôznych koncentráciách (0–5 %). Oxidácia výrobku bola pri použití múky nižšia. Do koncentrácie 2 % múčky boli párky nadpriemerne hodnotené, prijateľnosť ale bola nižšia už pri viac ako 0,5 %. Aj v tak nízkej koncentrácii párky obsahovali viac vlákniny, proteínov a vyššiu schopnosť zadržiavať vodu (Özvural a Vural, 2011).

Turecký výskum zaoberajúci sa predĺžením trvanlivosti jahôd behom skladovania využil kombináciu chitosanu s účinnými látkami (GSE, extrakt z granátového jablka, nisín a natamycín) na tvorbu aktívnych obalových vrstiev. Plody boli ponorené do roztoku (chitosan 1,5 % + GSE 1 %) na 1 min. Všetky varianty pôsobili antimikrobiálne a predĺžili životnosť jahôd v porovnaní s neošetreným ovocím (Duran et al., 2016). Kombinácia 2 % GSE a 2 % oleja zo *Ziziphora clinopodioides* Lam. (bohaté najmä na karvakrol, thymol a cymen) v chitosan-želatínovom filme je taktiež pokladaná za vhodnú formu aktívneho obalového materiálu vďaka výsledkom experimentu z roku 2016. Účinky proti *L. monocytogenes* (ATCC 19118) *Pseudomonas* spp., *Shewanella putrefaciens*, baktériám mliečneho kvasenia a *Enterobacteriaceae* v mletom mäse pstruha dúhového (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) boli vyhodnotené po 11 dňoch skladovania pri teplote 4 °C. Mikrobiálny pokles bol zaznamenaný o 1 log CFU/g a znížená bola aj oxidácia lipidov, čo prináša dlhšiu skladovateľnosť rybích polotovarov pri nízkych teplotách (Kakaei a Shahbazi, 2016).

### 3.2.2 Extrakty v medicíne

Látky podporujúce ľudské zdravie sa nachádzajú v rôznych častiach viniča. V roku 2013 potvrdili vedci z Chorvátska antimikrobiálne vlastnosti fenolov nachádzajúcich sa v listoch *Vitis vinifera* L. Pri skúmaní extraktov zo šiestich odrôd došli k záveru, že najvyšší podiel fenolických látok je v listoch v septembri, no najvyšší antimikrobiálny účinok mal extrakt vyrobený z májového materiálu. Najlepšia účinnosť bola zaznamenaná proti G<sup>+</sup> *Campylobacter jejuni* a *B. cereus*, no medzi účinkami na G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> mikroorganizmy nebol výrazný rozdiel (Katalinić et al., 2013).

Experimenty s GSE aktivitou proti patogénom nekončia u bežných mikroorganizmov prítomných v jedle. V Kuvajte kolektív vedcov dokázal, že 3 mg/ml proantocyanidínového GSE (toto množstvo zodpovedá 20,7 µg/ml flavonoidov) môže byť použitý na inhibíciu MRSA (Al-Habib et al., 2010).

Výraznú inhibíciu rastu *Streptococcus mutans* a tvorbu biofilmu na zubnej sklovine spozorovali vedci pri použití GSE v roku 2014. Preto je možné odporučiť použitie GSE ako prevencie proti zubným kazom (Zhao et al., 2014).

Polyfenoly a ich metabolity majú taktiež pozitívny efekt na črevnú mikrobiálnu skladbu, kde podporujú prospešné baktérie a potláčajú tie patogénne (Cardona et al., 2013).

Extrakt z hroznových šupiek a semien kultivaru 'Arinto' bol použitý na testovanie proti vírusom. Z výsledkov týchto testov vyplýva, že extrakt nevratne inhibuje replikáciu adenovírusu typu 5 a tak pôsobí ako antivirotikum (Matias et al., 2010). Vedci z USA považujú použitie GSE s dodatočným použitím iných antivirotik za efektívnu prekážkovú stratégiu proti ľudským norovírusom a hepatitíde A, ktorých prítomnosť sledovali v kultúre šalátu a čili papričiek (Joshi et al., 2013). Proti hepatitíde typu B ale účinky neboli dokázané (Ignea et al., 2013). Pri novších testoch GSE boli výsledky Joshi et al. potvrdené. Novinkou bolo testovanie účinnosti GSE pri použití v rôznych potravinách. Pri použití GSE v mlieku boli jeho antivirotické účinky značne potlačené. Zvýšenie dávky a času pôsobenia ale vždy viedlo vyššej účinnosti (Joshi et al., 2015).

Sahpazidou et al. (2014) skúmali schopnosť extraktu z hroznových stoniek spomaliť rast rakovinových buniek. Po 72 h pôsobení extraktu boli namerané výsledky vyhodnotené pomocou SRB assay. Extrakt bol uznaný ako účinný proti rakovine hrubého čreva, prs, obličiek a štítnej žľazy. Prokyanidinový GSE bol použitý v testoch proti proliferácii rakovinových buniek močového mechúra (BIU87 bunky). Svojim

pôsobením extrakt zastavil bunkový cyklus v G1 fáze a indukoval apoptózu týchto buniek (Liu et al., 2016). Nedávna štúdia taktiež potvrdila tento pozitívny efekt. Oxidatívny stres, spôsobený GSE, vyvolal programovanú bunkovú smrť u T24 a HTB9.A rakovinových buniek (Raina et al., 2013). GSE bol overený aj ako prostriedok proti rakovine prostaty v pokusoch z roku 2016, kedy účinkoval cytotoxicky na PC3 a HepG2 2.2.15 bunky (Ignea et al., 2013). Dosah liečebných účinkov GSE siaha až po rakovinu hrubého čreva typu HT29 (Leifert a Abeywardena, 2008).

Novšia štúdia na laboratórnych myšiach prezentuje použitie GSE ako pomocnej látky pri liečbe chemoterapiou, konkrétne doxorubicínom zo skupiny antracyklínov. GSE úspešne ochránila pečeň pred toxicitou doxorubicínu vďaka svojim antioxidantným komponentom (Mokni et al., 2015).

Kolektív vedcov uskutočnil pokus na myšiach pod vplyvom otravy kadmíom. Príznakmi tejto otravy sú agresivita a depresia spôsobené nedostatkom dopamínu, ktorého účinok bol neutralizovaný použitím GSE, čím dokázali jeho neuroprotektívny efekt (El-Tarras Ael et al., 2016). Rovnaký efekt pozorovali aj Abdou a Wahby (2016), ktorí GSE testovali proti negatívnym účinkom tritonu WR-1339, a Mezni et al. (2016) v pokuse s lítiom. Ďalší pozitívny protektívny efekt GSE podložili Alkhedaide et al. (2016) v testoch proti škodlivým účinkom CdCl<sub>2</sub> na semenníky myši.

Liečba autoimunitných ochorení môže byť zefektívnená využitím GSE vďaka jeho vysokému obsahu resveratrolu. Tento jav popisuje nedávna štúdia z roku 2016 a definuje inhibičný efekt resveratrolu na molekuly vyvolávajúce zápal v organizme. Taktiež vyvoláva apoptózu aktivovaných T-lymfocytov a predchádza autizmu vyvolanému bisfenolom A (Dias et al., 2015).

V šesť týždňovej štúdií bol monitorovaný efekt komerčného extraktu z celého hrozna na 24 pre-hypertenzívnych a/alebo pre-diabetických ľudí a ľudí s nadváhou pomocou sledovania antioxidantných biomarkerov v krvi a moči. Pri porovnaní s placebo variantom mali subjekty užívajúce extrakt zníženú hladinu superoxid dismutázy a zlepšil pomer celkového cholesterolu ku HDL-C (spôsobený nárastom koncentrácie HDL-C) (Evans et al., 2014). Podobne zacielený experiment prebiehal v Maďarsku s použitím 10 mg resveratrolu denne tri mesiace. Sledovaní pacienti trpeli ischemickou chorobou srdca a na účely pozorovania boli rozdelení na dve skupiny: resveratrol a placebo. V skupine berúcej resveratrol došlo ku poklesu LDL, ľavá ventrikulárna diastolická funkcia a funkcia endotelu bola zlepšená. Resveratrol taktiež znížil nežiaduce hemoreologické zmeny (Magyar et al., 2012). Pri pokuse na potkanoch

s vyvolaným nedostatočným okysličením a zvýšeným tlakom v pľúcach spôsobeným zúžením ciev bol taktiež potvrdený pozitívny antioxidačný a antiproliferačný efekt (Jin et al., 2016).

Moreno et al. (2003) vypožoroval, že má GSE inhibičný efekt na pankreatickú lipázu a lipoproteín lipázu. Tento účinok vedie k obmedzeniu absorpcie tuku a jeho akumuláciu v živočíšnych tkanivách, čím poskytuje možnosť riešenia problémov súvisiacich s nadváhou.

Po ročnom bádani dokázal kolektív vedcov zo Španielska, že doplnok stravy bohatý na resveratrol (v dávke 8mg/deň) pôsobil protizápalovo a fibrinolyticky u 75 ľudí s predispozíciou na kardiovaskulárne ochorenia. Behom testovania neboli pozorované žiadne negatívne vedľajšie účinky extraktu, čo naznačuje jeho bezpečnosť a výhodu oproti konvenčným liečivám, ktoré v prevencii proti srdcovocievny problémom vhodne dopĺňa (Tomé-Carneiro et al., 2012).

Pacienti s metabolickým syndrómom (v celkovom počte 27) boli testovaní na zmeny krvného tlaku po požití GSE a z výsledkov vyplýva, že extrakt (v množstve 150/300 mg denne) vyvolal zníženie systolického aj diastolického tlaku po 4 týždňoch. Pri pozorovaní neboli zaznamenané výrazné zmeny v krvnej glukóze ani lipidoch (Sivaprakasapillai et al., 2009). Novšie sledovanie pacientov s predpokladmi vysokého tlaku a so zvýšením tlaku prvého stupňa nepotvrdilo antihypertenzívny účinok GSE. U sledovaných subjektov došlo k miernemu, nie však výraznému zníženiu tlaku po 8 týždňovom pozorovaní (Ras et al., 2013).

U potkanov kŕmených stravou veľmi bohatou na tuky bol testovaný efekt extraktu zo semien a šupiek, extraktu v kombinácii s komerčným prípravkom Xenical a samotného Xenicalu. Stravou indukovaná obezita a mozgová lipotoxicita u potkanov vyvolala oxidatívny stres a poškodila normálnu funkciu enzýmov glutamín syntetázy a calpainu. Po troch mesiacoch bol experiment vyhodnotený. Použitie samostatného Xenicalu bolo účinné v liečbe obezity prvé dva mesiace, potom jeho efekt zanikol. Extrakt bol taktiež účinný, no najúspešnejším variantom bola kombinácia Xenicalu a extraktu. Extrakt dopĺňal činnosť Xenicalu svojimi antioxidačnými vlastnosťami a tak jeho účinok podporil (Mahmoudi et al., 2016). Zníženie príjmu cholesterolu a inhibícia zápalového účinku 5-lipoxigenázy bolo preukázané aj v testoch Leifert a Abeywardena (2008). Tieto skutočnosti predkladajú dôkaz o prospešnej činnosti viničného extraktu v lipidovom profile a pre ľudské zdravie.



U ľudí s *angina pectoris* sa dá taktiež pozorovať zlepšenie aspektov života týkajúcich sa ochorenia. Testované boli tri varianty: resveratrol, resveratrol v kombinácii s kalcium fruktoborátom a kalcium fruktoborát samostatne. Spomínaná kombinácia účinných látok priniesla najlepšie výsledky. Behom 60 dní došlo k zníženiu C-reaktívneho proteínu (sprevádza akútnu fázu ochorení) a N-terminálneho prohormónu (vylučovaný pri preťažení srdca), takže môže byť zmes odporúčaná pre pacientov trpiacich týmto ochorením (Militaru et al., 2013).

Tieto štúdie predkladajú dôkaz o rozsiahlom spektre využitia GSE v medicíne.

### 3.2.3 Ostatné využitia extraktu

Pôsobenie proti rozšírenej hube *Botrytis cinerea*, spôsobujúcej šedú hnilobu hrozna, skúmali vedci z Čile. Pri porovnaní extraktov z výliskov odrôd 'Cabernet Sauvignon', 'Syrah' a 'Carménèr' zistili, že 'Cabernet Sauvignon' vykazoval najvyššie fungicídne účinky. Jeho pôsobenie bolo ale ovplyvnené polohou vinice, z ktorej odroda pochádzala. Každá odroda bola testovaná v dvoch variantoch pôvodu - vinica Miguel Torres a Misiones de Rengo. Extrakty z vinice Misiones de Rengo mali väčší inhibičný účinok na rast mycélia huby (Mendoza et al., 2013).

Slovinskí vedci skúmali vlastnosti extraktu vyrobeného z lyofilizovaných šupiek a semien troch bielych a troch modrých odrôd. Extrakt z 'Pinot Noir' v 50% etanole bol pridaný do inokula *L. monocytogenes* a *C. jejuni* a testovaný na príľnavosť k nehrdzavejúcej oceli rôznej drsnosti. Bolo dokázané, že baktérie boli schopné príľnúť intenzívnejšie k povrchom s väčšou hrubosťou povrchu a že extrakt úspešne znížil počet buniek prítomných na nerezovom disku u oboch baktérií. Táto vlastnosť môže byť prínosná pre farmaceutický, kozmetický aj potravinársky priemysel (Trošt et al., 2016).

Hodvábny fibroín produkovaný priadkou moruškovou (*Bombyx mori* L.) je známy svojou biokompatibilitou a preto kolektív vedcov skúmal jeho zlúčiteľnosť s antioxidantnými účinkami GSE. Lin et al. (2016) vyrobili z polyetylénoxidu, fibroínu a GSE nanovlákná, čím potlačili účinky oxidatívneho stresu (vyvolaného TBHP) a výrazne podporili obnovu fibroblastov kože. Autori odporúčajú tieto vlákna na využitie v kozmetike a medicíne.

Zaujímavé je aj použitie GSE ako redukčného činidla v produkcii redukovaného oxidu grafenu. Pripravený materiál mal v experimente z roku 2016 výborné baktericídne (bunky hynuli už pri koncentrácii 3–4 µg/ml RGO) a antikarcinogénne vlastnosti (Yaragalla et al., 2016).

### **3.3 Štúdium antimikrobiálneho efektu**

#### **3.3.1 Štúdium pomocou rastovej krivky**

Táto metóda je používaná v mnohých vedeckých disciplínach, najmä v oblasti prírodných vied. Analýza rastovej krivky spočíva v procese určenia a testovania hypotézy, a vyhodnotenia vedeckých súvislostí rastu a vzorca zmien v rozsiahlom spektre času príbuzných fenoménov. Jej použitie zahŕňa vyhodnocovanie rastu a veľkosti rastlín, zvierat alebo ľudí, učebných výsledkov jedincov, zmeny ich psychologických charakteristík alebo dĺžku života (McArdle, 2001).

Väčšina organizmov podlieha trom základným fázam života: lag, rastová a asymptotická fáza. Podobne je to aj u baktérií a kvasiniek. Prvou je lag fáza, nasleduje exponenciálna rastová fáza a asymptotická fáza by sa dala rozdeliť na stacionárnu fázu a fázu odumierania (Zwietering et al., 1990).

Pri tejto metóde sa využíva tvorba prediktívnych modelov, ktoré v prípade rastovej krivky mikroorganizmov zaznamenávajú zmeny relatívnej veľkosti populácie v čase pri pôsobení rozličných fyzikálnych, biochemických a chemických činiteľov (pH, teplota, aktivita vody, smrteľná dávka antibiotík). V praxi je vhodná na určenie mikrobiálnej bezpečnosti potravín a určenie shelf-life produktov, v širšom zmysle na zlepšenie plánovania produkcie a distribúcie týchto produktov (McArdle, 2001).

#### **3.3.2 Štúdium priamym počítaním buniek**

Tento súbor metód je pomerne jednoduchým nástrojom na určenie účinku antimikrobiálnych agens na živé bunky testovaného mikroorganizmu. Využitie nájde v priemysle farmaceutickom, potravinárskom aj kozmetickom ako jedna zo základných požiadaviek na overenie čistoty produktu. Taktiež je využívaná na kontrolu čistoty vody pri výrobe elektroniky (Kawakami et al., 1994).

Má niekoľko obmien podľa špecifických požiadaviek daného experimentu, všetky ale vychádzajú zo štandardnej agarovej metódy na počítanie vytvorených kolónií. Jedná sa o využitie bioluminescencie, filtrovania a obmeny extrakčných činidiel v nich použitých (Kawakami et al., 1994). Princípom je kultivácia inokula životaschopných buniek vybraného organizmu s prídavkom riedenej suspenzie s predpokladaným antimikrobiálnym účinkom na agarovom médiu pri optimálnej teplote pre jeho rast (Toda et al., 1989 in Arora a Kaur, 1999). Počítanie kolónií nasleduje po 24–72 h, čo je značná nevýhoda oproti upraveným verziám tejto metódy (Kawakami et al., 1994). Počet kolónií v rôznych koncentráciách antibiotika je porovnávaný s kontrolou

(variantom so sterilnou vodou) namiesto antibiotika. Výsledok je vyjadrený ako percentuálny podiel životaschopných buniek kontroly (Toda et al., 1989 in Arora a Kaur, 1999).

Ďalšou možnosťou je počítanie buniek v komôrke - napríklad pomocou Bürkerovej komôrky, ktorá predstavuje sklíčko s dvoma špeciálne vybrúsenými poľami s hĺbkou 0,1 mm. Tieto polia majú v sebe vyobrazenú sieťovitú štruktúru, ktorú tvorí 9 väčších štvorcov s plochou 1 mm<sup>2</sup>. Každý veľký štvorec je rozdelený dvojitými čiarami (vo vzdialenosti 0,05 mm od seba) na 16 malých štvorcov so šírkou strany 0,2 mm. V malých štvorcoch sú potom jednotlivé bunky spočítané (www.brand.de).

Na rozlíšenie živých buniek je v komôrkach býva použité farbenie trypanovou modrou. Základným parametrom farbenia je priepustnosť bunkovej membrány. U mŕtvych buniek sa predpokladá, že je ich membrána narušená a bunka je schopná prijať farbivo. Po farbení zostávajú životaschopné bunky nesfarbené a mŕtve bunky zafarbené namodro (Zeigler, 2006).

### **3.3.2 Štúdium meraním inhibičných zón**

Táto kvalitatívna metóda vznikla v 40. rokoch minulého storočia pri testovaní účinkov penicilínu a dnes už je považovaná za bežnú v testovaní antimikrobiálnej vnímavosti (Heatley, 1944 in Balouiri et al., 2016).

V tejto metóde sú využívané agarové médiá v Petriho miskách so štandardizovaným inokulom obsahujúcim  $1-2 \times 10^8$  CFU/ml študovaného mikroorganizmu (Jorgensen a Ferraro, 2009). Na agar sa vloží papierový disk napustený testovanou látkou, nasleduje inkubácia vo vhodných podmienkach pre rast mikroorganizmu. Princípom tejto diskovej metódy je difúzia antimikrobiálnej zložky do agaru a inhibícia germinácie a rastu testovaného mikroorganizmu v okolí papierových diskov (Balouiri et al., 2016). Priemery týchto inhibičných zón sú merané s presnosťou na milimetre a vyhodnocované. Podľa citlivosti na antibiotikum sú mikroorganizmy rezistentné, priemerne citlivé alebo náchylné (Jorgensen a Ferraro, 2009).

Na niekoľko druhov baktérií a kvasníc boli inštitútom CLSI vydané štandardizované testy zahŕňajúce vhodné kultivačné médium, inkubačné podmienky a vyhodnocovacie kritéria inhibičných zón (Balouiri et al., 2016).

Keďže medzi jej výhody môžeme zaradiť nízku cenu a efektívnosť v testovaní veľkého množstva vzoriek za krátky čas, využíva sa často v teste na rezistenciu mikroorganizmov k antibiotikám (Balouiri et al., 2016).

Nevýhodou je nemožnosť rozlíšenia smrti a inhibície rastu baktérii, teda rozlíšenie baktericídnych a bakteriostatických účinkov. Ďalším nedostatkom metódy je, že nie je možné ju mechanizovať alebo dokonca automatizovať. Toto je ale vyvážené jej jednoduchosťou na inštrumentálne vybavenie a zaškolenie pracovníkov (Jorgensen a Ferraro, 2009).

### 3.4 Študované mikroorganizmy

#### 3.4.1 *Bacillus cereus* Frankland and Frankland 1887

Ríša: *Bacteria*

Kmeň: *Firmicutes*

Trieda: *Bacilli*

Rad: *Bacillales*

Čeľaď: *Baccilaceae*

Rod: *Bacillus*

Vedecké synonymá: *Bacillus medusa*, *Bacillus endorhythmos*

([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

Tento druh  $G^+$ , pohyblivej, sporujúcej baktérie tyčinkovitého tvaru žije v aeróbných alebo fakultatívne anaeróbných podmienkach prostredia. Taxonomicky je zaradený do skupiny *Bacillus cereus* spolu s ďalšími 6 druhmi (*B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* a *B. anthracis*). Fratamico et al. (2005) považuje všetkých päť druhov s výnimkou *B. anthracis* za úzko príbuzné. Štúdie nórskeho vedcov ale poukazujú na fakt, že na základe výsledkov z MLEE a sekvenčnej analýzy deviatich chromozomálnych génov by mal byť *B. cereus* považovaný za predchodcu *B. anthracis*, čím potvrdzujú ich blízku príbuznosť (Helgason et al. 2000). S výsledkami Helgasona et al. (2000) súhlasili aj Kotiranta et al. (2000) keď zaznamenali viac ako 99% podobnosť sekvencií primárnych štruktúr 16S rRNA u všetkých 6 druhov.

Bežne sa tento druh vyskytuje v pôde ako saprofyt, no často je ho možné izolovať aj z potravín, napr. rastlinného pôvodu, mlieka, mäsa alebo vajec, kde pôsobí ako oportunistický patogén (Kramer a Gilbert 1989 in Granum a Lund, 1997). Jeho rast je značný najmä po tepelnej úprave a následnom ochladení potravín pri teplotách do 48 °C a neprítomnosti konkurenčnej flóry (Granum a Lund, 1997). Vegetatívne formy rastú pri teplote 10–50 °C (Claus a Berkley, 1986 in Fratamico et al., 2005). Niektoré kmene

môžu byť psychrotolerantné a rásť už pri 4–7 °C, čo ich robí predmetom skúmania najmä v mliekarenskom priemysle (Rowan a Anderson, 1998; Te Giffel et al., 1997).

Kritickou koncentráciou solí pre jeho rast je 7 %, rozmedzie pH 4,5–9,5. Aktivita vody mu postačuje v hodnote 0,92 (Granum a Baird-Parker, 2000 in Fratamico et al., 2005).

Otrava potravinami spôsobená *B. cereus* sa vyskytuje po celom svete. Zaznamenané bolo aj prepuknutie ochorenia v roku 1989, ktorému podľahlo až 100 ľudí (Kramer a Gilbert 1989 in Kotiranta et al., 2000). Tento druh otravy je spôsobený toxínmi, ktoré uvoľňuje do potravín. Jej prejavy môžu byť rozdelené na dve skupiny. Prvou je zvracanie a celková nevoľnosť (spôsobené prevažne flagelárnym serotypom H-1, H-3 a H-5) z dôvodu prítomnosti emetického toxínu, druhou je hnačka (spôsobená serotypmi H-2, H-6, H-8, H-9 a H-10) vyvolaná dvoma druhmi enterotoxínov (Taylor a Gilbert, 1975). Emetický toxín je cyklický peptid tvorený v potravinách vegetatívnym štádiom (spórami) bacila. Trvanie symptómov je menej ako 24 hodín a infekčná dávka je  $10^5$ – $10^8$  buniek.g<sup>-1</sup>. Enterotoxíny sú proteíny tvorené priamo v tenkom čreve hostiteľa. Symptómy pretrvávajú obvykle 12–24 hodín a infekčná dávka je  $10^5$ – $10^7$  buniek.g<sup>-1</sup>. Ďalšími látkami spôsobujúcimi zdravotné problémy u človeka sú štyri hemolyzíny a tri rôzne typy fosfolipázy C (Granum a Lund, 1997).

Okrem gastro-intestinálnych ochorení môže spôsobovať aj systémové alebo lokálne infekcie s najčastejším výskytom u novorodencov, vnútrožilových užívateľov drog, pacientov po úraze, operácii alebo so zavedeným katétrom. Očné, kožné infekcie a infekcie centrálného nervového systému alebo náhle sepse sú taktiež rizikami infekcie týmto bacilom (Bottone, 2010). Z dýchacích ochorení bolo popísané antraxu podobné zlyhanie dýchacieho ústrojenstva vyvolané kmeňom *B. cereus* G9241 (Hoffmaster et al., 2004).

### **3.4.2 *Candida tropicalis* (Castell.) Berkhout, 1923**

Ríša: *Fungi*

Kmeň: *Ascomycota*

Trieda: *Saccharomycetes*

Rad: *Saccharomycetales*

Čeľaď: *Enterobacteriaceae*

Rod: *Candida*

Vedecké synonymá: *Procandida tropicalis*, *Oidium tropicale*, *Mycotorula tropicalis*, *Myceloblastanion tropicale*, *Monilia tropicalis*, *Endomyces tropicalis*, *Castellania tropicalis*, *Candida albicans* var. *tropicalis*, *Atelosaccharomyces tropicalis*

(www.ncbi.nlm.nih.gov)

Táto kvasnica patrí do skupiny schopnej tvoriť hýfy aj pseudohýfy, podobne ako známejší druh *C. albicans*. Jej veľkosť je 4–8×5–11 μm (Silva et al. 2012). *C. tropicalis* bola donedávna považovaná za bezpohlavný druh kvasnice, zo štúdie Pormana et al. (2011) však vyplýva, že je schopná pohlavného množenia. Procesu párenia predchádza obdobie premeny buniek, ktoré je podmienené transkripčným regulátorom Wor1, na rozdiel od iných druhov húb, u ktorých zohráva túto úlohu teplota. Problémom je skutočnosť, že tento druh kvasnice je schopný sa takto množiť pri teplote 25 °C aj 37 °C, čo mu umožňuje pohlavné rozmnožovanie aj v tele hostiteľa.

V minulosti bolo jedným z najčastejších ochorení kandidóza vyvolaná *C. albicans*, ktorá sa prejavila u pacientov s poruchami imunity aj u zdravých jedincov. Neskôr sa ale svetovo rozširovala kandidóza spôsobená *C. tropicalis*, čo ju pomohlo zaradiť medzi patogénne druhy kvasníc. V Brazílii bolo dokázané, že 20–24 % ochorení spôsobených rodom *Candida* mala na svedomí *C. tropicalis*, čo ju umiestňuje na druhé miesto vo frekvencii vyvolávania ochorení (Nucci a Colombo, 2007). Ochorenia spôsobené touto kvasnicou sa vyznačujú vysokou mortalitou, Chen (2014) uvádza hodnotu 40–70 %.

Nákazu pacientov po vykonaní bypassu mala v roku 1989 na svedomí sestra infikovaná kandidózou. Toto ochorenie postihlo nie len mäkké tkanivo, ale aj hrudnú kosť (Isenberg et al., 1989). *C. tropicalis* sa v porovnaní s *C. albicans* vyskytuje častejšie u pacientov trpiacich leukémiou a dlhšie trvajúcou neutropéniou (Kontoyiannis et al., 2001). *Candida* môže spôsobovať aj ochorenia ústnej dutiny. Ako prevencia môže pôsobiť obmedzenie konzumácie sacharózy, glukózy, maltózy a fruktózy, alebo ich náhrada xylitolom alebo sorbitolom. Tieto dva sacharidy obmedzujú príľnavosť *Candidy* k povrchom, čím komplikujú kolonizáciu a predchádzajú následnej infekcii (Pizzo et al., 2000). Často býva u žien zodpovedná aj za mykotickú vulvovaginitídu vyvolanú non-albicans druhmi (Ferrer, 2000).

*C. tropicalis* vykazuje rezistenciu na flukonazol, amfotericín B, kaspofungín a itrakonazol, ktorého antifungálny efekt na kvasnicu závisí od použitého množstva

(Kothavade et al. 2010; Yang et al. 2004; Garcia-Effron et al. 2008; da Costa et al., 2008).

*C. tropicalis* pôsobí aj ako užitková kvasnica. Vedci po celom svete uvádzajú niekoľko príkladov jej využitia v rôznych odvetviach priemyslu. V roku 1992 bol publikovaný prvý článok o priemyselnom využití *Candidy* na produkciu dikarboxylových kyselín s reťazcami dlhými 12–20 uhlíkov (Picataggio et al., 1992). Skúmané bolo aj použitie *Candidy* na viazanie a akumuláciu textilných farbív, ktoré môžu po vypustení do odpadných vôd spôsobovať zníženie fotosyntetickej aktivity rias a dokonca byť toxické pre vodné organizmy. Testy Dönmeza (2002) potvrdili význam *C. tropicalis* v možnom čistiacom cykle. Najvyššia bioakumulačná kapacita *Candidy* bola 111.9 mg/g u Remazol Blue, 101.9 mg/g u Reactive Black a 79.3 mg/g u Reactive Red z počiatočného množstva 700 mg/l farbiva. Vyššie koncentrácie spôsobili predĺženie lag-fázy a zastavenie rastu kvasnice.

Jednou zo zaujímavých vlastností *C. tropicalis* je schopnosť degradovať fenoly. Imobilizovaná *C. tropicalis* v géle polyakrylamidových guľôčok bola schopná degradovať až 5000 mg fenolov za menej ako 10 dní (Chen et al., 2002). Dáta z iného výskumu zase uvádzajú, že je schopná rozložiť fenoly do koncentrácie 1700 mg/l pri teplote 30°C na médiu z minerálnymi soľami (Yan et al., 2005).

Na báze tejto kvasnice bol vytvorený amperometrický mikrobiálny biosenzor, ktorý slúži na citlivé stanovovanie etanolu. Množstvo etanolu je vyhodnotené na základe rozdielu v respiračnej aktivite buniek zaznamenananej na oxygenometri za prítomnosti a absencie etanolu (Akyilmaz a Dinçkaya, 2005).

### **3.4.3 *Enterococcus faecalis* (Andrewes and Horder 1906) Schleifer and Kilpper-Balz 1984**

Ríša: *Bacteria*

Kmeň: *Firmicutes*

Trieda: *Bacilli*

Rad: *Lactobacillales*

Čeľaď: *Enterococcaceae*

Rod: *Enterococcus*

Vedecké synonymá: *Streptococcus liquefaciens*, *Streptococcus glycerinaceus*,  
*Streptococcus faecalis*, *Micrococcus zymogenes*, *Micrococcus*

*ovalis*, *Enterococcus proteiformis*, *Enterocoque*  
(www.ncbi.nlm.nih.gov)

*Enterococcus faecalis* sa taxonomicky zaraďuje medzi G<sup>+</sup> a kataláza negatívne nesporulujúce baktérie, ktoré spoločne s *Enterococcus haemoperoxidus* a *Enterococcus moraviensis* patria do skupiny *E. faecalis* (Klein et al., 1998). V roku 2003 obsahoval rod *Enterococcus* celkom 26 druhov (Klein, 2003).

Tento rod rastie pri teplotách 5–50 °C, *E. faecalis* ale prežije 30 minútový záhrev na teplotu 60 °C (Foulquié Moreno et al., 2006). Vyžadujú pH hodnôt 4,6–9,9, obsah NaCl znesú do 6,5 % (Fisher a Phillips, 2009). *E. faecalis* je schopný tvorby biofilmu jedine za prítomnosti Esp kódujúceho génu (Toledo-Arana et al., 2001). Taktiež je schopný produkcie skupiny bakteriocínov, konkrétne enterocínov EJ97, AS-48 a SE-K4 (Abriouel et al. 2003; Eguchi et al. 2001; García et al. 2004).

Prirodzene sa vyskytuje v tráviacom trakte ľudí a dobytká (Fisher a Phillips, 2009). Jeho zdrojom bývajú preto často potraviny živočíšneho pôvodu, napríklad syry, klobásy, hovädzie a bravčové mäso, ryby alebo hydina (Klein, 2003).

Napriek tomu, že je *E. faecalis* iba oportunistický patogén, spôsobuje širokú škálu ochorení. Jednými z menej závažných sú endodontálne ochorenia, napríklad infekcia koreňového kanálika a chronická apikálna periodontitída (Kayaoglu a Ørstavik, 2004). Ďalej sa podieľa na infekciách močového ústrojenstva, ktoré sú považované za najčastejšie ochorenie spôsobené enterokokmi, a pooperačných rán (Barros et al., 2009; Giacometti et al., 2000). Zo závažnejších ochorení sú časté infekcie krvného obehu (najmä u nozokomiálnych pacientov) a infekčná endokarditída (Billington et al. 2014; Nallapareddy et al., 2006). Zriedkavo sa u ľudí vyskytuje bakteriálna meningitída spôsobená *E. faecalis*, výskyt Bretón (2002) vyčísluje na 0,3–4 % zaznamenaných prípadov.

Rezistenciu voči antibiotikám (v tomto prípade voči vankomycínu) bol zatiaľ *E. faecalis* schopný preniesť na *Listeria* a *Staphylococcus aureus* iba v *in vitro* podmienkach (Biavasco et al., 1996 in Klein 2003). Rezistenciu vykazuje aj na erythromycín, tetracyklín a ampicilín (Klein 2003; Wang et al. 2013).

#### **3.4.4 *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919**

Ríša: *Bacteria*

Kmeň: *Proteobacteria*

Trieda: *Gammaproteobacteria*



Rad: *Enterobacteriales*

Čeľaď: *Enterobacteriaceae*

Rod: *Escherichia*

Vedecké synonymá: *Enterococcus coli*, *Bacterium coli commune*, *Bacterium coli*,  
*Bacillus coli*

(www.ncbi.nlm.nih.gov)

Jedným z najprispôsobivejších druhov baktérií je *Escherichia coli*. Napriek tomu, že väčšina jej kmeňov sa bežne vyskytuje v črevnej flóre človeka a neškodí, niektoré patotypy vyvolávajú množstvo ochorení, ktoré môžu končiť smrťou (Poolman, 2017). Wirth et al. (2006) tvrdí, že sú tieto patogénne kmene *E. coli* príčinou až jedného miliónu smrtí ročne na celom svete.

Kaper et al. (2004) popisuje sedem rozdielnych patogénnych typov *E. coli*. Prvým je enterohemoragický typ (sérotypy produkujúce jeden alebo viac Shiga toxínov) vyvolávajúci krvavú a nekrvavú hnačku a hemolyticko-uremický syndróm (Gomes et al., 2016). Druhým je enteroaggregatívna *E. coli*, vyskytujúca sa v rozvojových aj vyspelých krajinách a spôsobujúca typickú pretrvávajúcu hnačku. Enteropatogénny patotyp *E. coli* bol prvý historicky popísaný patotyp *E. coli* a je charakteristický hnačkami, ktorých riziko so stúpajúcim vekom klesá (Nataro a Kaper, 1998 in Gomes et al., 2016). Podobne aj difúzne-adherentný typ spôsobuje hnačku prevažne u detí. Enteroinvazívny typ vyvoláva črevnú úplavicu podobnú príznakom infekcie *Shigella* spp. Infekciu enterotoxigénnym typom charakterizuje vodnatá hnačka, zatiaľ čo uropatogénny typ vyvoláva zápal močového mechúra a akútnu pyelonefritídu. S meningitídou a sepsou spájaný typ je najčastejším pôvodcom často smrteľnej, G<sup>-</sup>, neonatálnej meningitídy (Kaper et al., 2004; Wirth et al., 2006).

Genetickú informáciu umožňujúcu *E. coli* spôsobovať hnačkové ochorenia prijala počas evolúcie pomocou horizontálneho prenosu génov od iných druhov organizmov (Gomes et al., 2016).

Z antibiotík je *E. coli* odolná voči chinolónom (so širokospektrálnym účinkom), beta-laktámovým penicilínovým (ampicilín a piperacilín) a cefalosporínovým (cefalotín a cefuroxim-axetil) antibiotikám (Paterson, 2006; Reinthaler et al., 2003). Rezistencia na antibiotiká má stúpajúcu tendenciu (Poolman, 2017). V Indii, Pakistane a Veľkej Británii bola v malom množstve testovaných vzoriek zistená aj rezistencia na karbapenémy (Kumarasamy et al., 2010).

Vďaka množstvu poznatkov o tejto baktérii bola využívaná na heterologickú biosyntézu malých molekúl a expresiu rekombinantných proteínov. Medzi prospešné vlastnosti *E. coli* určite patrí produkcia proteínov v rozpustnej, bioaktívnej forme. Známa je najmä produkcia inzulínu a hovädzieho rastového hormónu (Swartz, 2001). Leonard et al. (2010) pomocou metabolického inžinierstva vytvoril kmeň *E. coli* schopný biosyntézy rastlinných flavonoidov z kyseliny fenylpropanovej a flavanolov ako prekurzorov.

### **3.4.5 *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900**

Ríša: *Bacteria*

Kmeň: *Proteobacteria*

Trieda: *Gammaproteobacteria*

Rad: *Pseudomonadales*

Čeľaď: *Pseudomonadaceae*

Rod: *Pseudomonas*

Vedecké synonymá: *Pseudomonas pyocyanea*, *Pseudomonas polycolor*, *Micrococcus pyocyaneus*, *Bacterium pyocyaneum*, *Bacterium aeruginosum*, *Bacillus pyocyaneus*, *Bacillus aeruginosus*

([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

*Pseudomonas aeruginosa* je všadeprítomná, G<sup>-</sup>, aeróbná baktéria pôsobiaca ako oportunistický patogén napadajúci prevažne jedincov s oslabenou imunitou. Je tyčinkovitého tvaru a vyznačuje sa niekoľkými virulentnými faktormi, napríklad tvorbou quorum-sensing molekúl, flagelou či pili (D'Agata, 2014).

Prvý krát ho z infekcie v roku 1882 izoloval Gessard, pridelil mu ale meno *Bacillus pyocyaneus* podľa pigmentu pyocyanínu, ktorý produkuje (Lyczak et al., 2000).

Tento druh je najčastejšie izolovaným patogénom u nozomiálnych pacientov a pacientov s popáleninami. Navyše je zodpovedný za 8,5 % nozokomiálnych infekcií (Morrison a Wenzel, 1984). Infekcie môžu byť prítomné v rôznych častiach organizmu, napríklad zápalové ochorenie ucha - *otitis externa* (D'Agata, 2014).

Tento druh je najčastejším virulentným patogénom dýchacích ciest u pacientov s cystickou fibrózou. Je dokázané, že prítomnosť jeho mukoidnej formy zhoršuje funkciu pľúc a prechod nemukoidnej do mukoidnej formy podporuje ich degeneráciu

(Li et al., 2005). Chronické bakteriálne infekcie v pľúcach sú hlavnou príčinou mortality u jedincov trpiacich cystickou fibrózou (Lyczak et al., 2000).

Ďalším ochorením, ktorého je *P. aeruginosa* hlavným pôvodcom, je ulceratívna keratitída rohovky (Barnes et al., 2014). Z kožných ochorení je pôvodcom lézií zvaných *ecthyma gangrenosum*, folikulitídy a palmoplantárnej erytrodysestézie (môže byť aj dôsledkom vedľajších účinkov chemoterapie) (D'Agata, 2014; Podlekareva Farr a Safwat, 2011).

*Pseudomonas* je rezistentný voči širokému spektru antibiotík (napr. ciprofloxacínu) a jeho rezistencia voči beta-laktámovým antibiotikám vzrastá (Peng et al., 2017; Poole, 2011 in Frank, 2012). Jeho odolnosť je spôsobená faktom, že ako druh disponuje prakticky všetkými známymi druhmi antimikrobiálnej rezistencie (Strateva a Yordanov, 2009). Biofilm dokonca nechráni tento druh iba voči antibiotikám, ale aj vysokej hladine ťažkých kovov. Sledované boli meď, olovo a zinok (Teitzel a Parsek, 2003).

Pokusy na nehrdzavejúcej oceli (Duplex) ukázali, že kultúra *P. aeruginosa* žijúca vo forme biofilmu znižuje jej antikoročné vlastnosti. Tvorbou CrN a CrO<sub>3</sub> v prítomnosti *P. aeruginosa* sa urýchlil rozklad a hrdzavenie oceli (Xu et al., 2017).

## 4. MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Získanie a úprava hroznových semien

Základným materiálom na tvorbu extraktu boli semená *Vitis vinifera* L. Tie boli poskytnuté Ústavom vinohradníctví a vinařství MENDELU. Použitá bola zmes semien interšpecifických muštových odrôd 'Cerason', 'Marlen' (modré odrody) a 'Erilon' (biela odroda). Čerstvo nazbierané matolíny (odpadný produkt vznikajúci po filtrácii hroznového rmutu pri výrobe vína) boli uložené v nádobách a ponechané 2–3 dni pri teplote 18 °C v suchom prostredí.

Po čiastočnom vysušení bolo možné použitie rovinných vibračných sít (poskytol Ústav posklizňové technologie zahradnických produktů) na odseparovanie jednotlivých frakcií a získanie žiadaných hroznových semien vysokej čistoty. Princípom tejto separácie je posun materiálu v sitách pomocou vibrácií (kmitavý pohyb je poháňaný elektromotorom) a prepád rôzne veľkých frakcií cez sitá s otvormi kalibrovanej veľkosti. Použitý separátor sa skladal z troch sít (najväčšie otvory malo vrchné sito, najmenší priemer otvorov malo spodné sito) s náklonom 5–10 ° pre zlepšenie posunu materiálu po rovine sita. Najväčšiu časť nečistôt tvorili šupky, ktoré sa zachytávali vo vrchnom site, v strednom site sa zhromaždili semená a najmenšie častice (úlomky semien) prepadli do najnižšieho sita. Každé sito malo v zadnej časti kruhový otvor, ktorý umožňoval vyprázdnenie jednotlivých frakcií do oddelených zberných nádob. Výťažnosť takýchto čistých semien je cca 23 %.

Keďže predpokladaný antimikrobiálny účinok nemajú tzv. „vyslepené“ semená, bolo nutné ich vytriediť na základne hustoty v nádobách s vodou. Vyslepené semená s nízkou hustotou po krátkom čase vyplávali na povrch a oddelili sa od zdravých semien, ktoré sa usadili na dne nádoby.

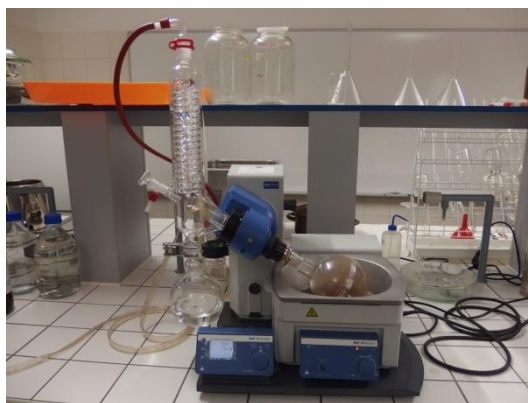
Ďalším krokom v príprave semien na tvorbu extraktu bolo mletie. Vysoká vlhkosť mletie značne komplikuje, preto boli semená vopred vysušené v sušičke pri teplote 60 °C (trvanie 24 hodín) na konečnú vlhkosť 8 %. Nasledovalo posledné triedenie na základe hmotnosti - ľahšie úlomky boli odfúknuté fénom ako odpad a ťažšie semená boli pripravené na mletie. Využitý bol mlynček na kávu nastavený na jemnú zrnitosť.

### 4.2 Tvorba extraktu

Namleté semená boli využité na extrakciu žiadaných obsahových látok metanolom v sklenených nádobách. Do nádob sa navážilo 100 g hroznového prášku

a pridal sa 1 l 75% metanolu (použitý bol 99,6% metanol riedený destilovanou vodou). Extrakcia prebiehala 168 hodín pri teplote 21 °C v tme, pričom bola zmes v nádobách pravidelne premiešavaná.

Na experiment boli použité dva varianty extraktu: metanolvý a bezmetanolvý. Metanolvý extrakt bol pripravený odstredením zliateho extraktu z nádob. Príprava bezmetanolového extraktu spočívala vo využití vákuovej odparky (výrobca IKA, Nemecko), v ktorej sa metanolvý extrakt postupne zahrieval na teplotu 70 °C pri neustálom miešaní (70 otáčok za minútu). Pri 55 °C sa metanol začal odparovať a postupne vznikol vodný extrakt (Obrázok 1). Kvôli zabráneniu oxidácii a dlhšej uchovateľnosti bol vodný extrakt zmrazený do momentu použitia (Obrázok 2).



Obrázok 1: Príprava bezmetanolového extraktu vo vákuovej odparke

### 4.3 Stanovenie celkových polyfenolických zlúčenín

Stanovenie polyfenolických zlúčenín bolo robené pomocou Folin-Ciocaltelovej metódy. Princípom použitej metódy je spektrofotometrické vyhodnotenie reakcie hydroxilových skupín a fenolických zlúčenín s použitým Folin-Ciocaltelovým činidlom. Fosfotungsten-fosfomolybdátový komplex je v tejto reakcii redukovaný fenolmi na modré produkty. Vzorky extraktov boli merané trikrát, výsledná hodnota bola získaná ako priemer týchto meraní.

Do kyvety (s objemom 3 ml) bolo napipetovaných 40  $\mu$ l vzorky a následne bola vzorka zriedená 1960  $\mu$ l destilovanej vody. Do kyvety bolo pridaných 50  $\mu$ l Folin-Ciocaltelového činidla a zmes bola dôkladne zhomogenizovaná. Po 3 minútach bolo pridaných 300  $\mu$ l roztoku dekahydrátu  $\text{NaCO}_3$  (s koncentráciou 20 %). Po opätovnej homogenizácii prebehla inkubácia pri 22 °C v dĺžke 120 minút. Nasledovalo meranie absorbancie pri  $\lambda=750$  nm proti slepej vzorke. Výsledok je vyjadrený ako ekvivalent kyseliny gallovej v mg/l.

#### 4.4 Stanovenie antioxidačnej aktivity pomocou DPPH metódy

Táto metóda slúži na kvantifikáciu radikálového obsahu vo vzorke. Je jednoduchá a je možné ju použiť aj u vzoriek s nízkou koncentráciou aktívnych látok. Princípom je neutralizácia radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu antioxidantmi poskytujúcimi vodík. DPPH v metanolovom prostredí tvorí fialové sfarbenie. Vykazuje silnú absorbanciu v UV-VIS spektre. Vzorky majú mať neutrálne pH a musia byť sledované v rovnakom čase - reakcia sa totiž v závislosti na pH a čase mení.

Navážených 9,35 mg radikálu DPPH bolo prevedených do 250 ml odmernej banky a následne doplnené metanolom. Na spektrometrickú analýzu boli do kyvety s objemom 3 ml napipetované 2 ml roztoku DPPH a následne bolo pridaných 40  $\mu$ l vzorky (GSE). Zmes bola inkubovaná pri teplote 21 °C presne 25 minút. Potom bola zmeraná absorbanca pri  $\lambda=505$  nm. Antioxidačná aktivita bola vypočítaná z kalibračnej krivky za použitia kyseliny gallovej ako štandardu (10–200 mg/l). Výsledok je vyjadrený ako ekvivalent kyseliny gallovej v mg/l.

#### 4.5 Modelové mikroorganizmy

Na experiment využívajúci diskovú difúziu metódu bolo využitých päť druhov mikroorganizmov: *Bacillus cereus* (CCM2010), *Candida tropicalis* (CCM8223), *Escherichia coli* (CCM7229), *Enterococcus faecalis* (CCM4224) a *Pseudomonas aeruginosa* (CCM1960). Na namnoženie kultúr bolo potrebné rozpustenie želatínového disku obsahujúceho daný mikroorganizmus v banke s tekutým sterilným médiom (TSB od výrobcu Biokar Diagnostics, Francúzsko). Médium bolo pripravené rozpustením 30 g dehydratovaného média v 1 l destilovanej vody. Zmes bola miešaná až do úplného rozpustenia prášku, potom bolo rozliate do nádob a sterilizované v autokláve pri teplote 121 °C 15 minút.



Obrázok 2: Kultivácia inokula v trepačke

Banky s *E. faecalis* a *E. coli* boli umiestnené v temperovanej trepačke s teplotou 37 °C. *C. tropicalis*, *B. cereus* a *P. aeruginosa* boli kultivované v orbitálnej trepačke pri laboratórnej teplote 23–25 °C (Obrázok 2). Obe trepačky (výrobca Biosan, Lotyšsko) boli nastavené na rýchlosť 200 otáčok za minútu. Kultivácia trvala 19 hodín.

## 4.6 Stanovenie antimikrobiálneho efektu

### 4.6.1 Laboratórne pomôcky a prístroje

Na antimikrobiálny experiment boli využité skúmavky, pinzeta, sklenené a plastové tyčinky na rozotieranie a plastové Petriho misky. S výnimkou plastových, boli všetky nástroje a pomôcky vopred sterilizované v teplovzdušnom sterilizátore v teplote 165 °C 60 minút. Plastové misky a tyčinky boli určené iba na jedno použitie. Pri prechádzaní medzi organizmami bola v priebehu experimentu pinzeta dezinfikovaná nad liehovým kahanom, z dôvodu predchádzania novej kontaminácii.

Na dávkovanie boli využité automatické mikropipety a jednorazové, sterilné, plastové špičky. Na dosiahnutie rovnakej koncentrácie mikroorganizmov v Petriho miskách bolo inokulum merané densitometrom (Biosan, Lotyšsko) a následne riedené destilovanou vodou v prípade potreby (Obrázok 3).



Obrázok 3: Meranie inokula densitometrom

### 4.6.2 Zloženie a príprava média

**Chloramphenicol agar (CHL):** kvasničný extrakt 5 g/l, glukóza 20 g/l, chloramfenikol 0,1 g/l, bakteriologický agar 15 g/l

Výrobca: Biokar Diagnostics, Francúzsko.

Postup prípravy: 40,1 g média bolo rozpustené v 1 l destilovanej vody. Bolo nutné upraviť pH na hodnotu 6,6 (+/- 0,2) pri teplote 25 °C. Za stáleho miešania bola zmes privedená k varu. Po úplnom rozpustení bola nadávkovaná do nádob

a sterilizovaná v autokláve pri 121 °C 15 minút. Toto médium bolo využité v miskách s *C. tropicalis* na potlačenie rastu ostatných mikroorganizmov.

**Plate count agar (PCA):** tryptón 5 g/l, kvasničný extrakt 2,5 g/l, glukóza 1 g/l, bakteriologický agar 12 g/l

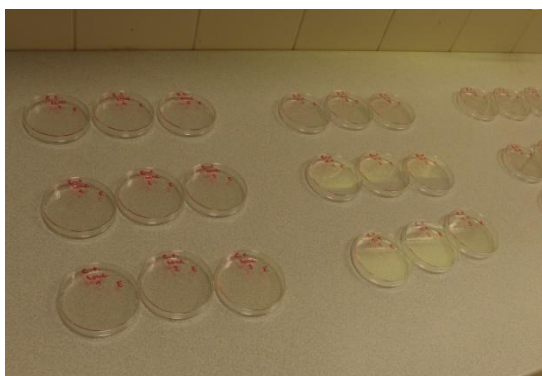
Výrobca: Biokar Diagnostics, Francúzsko.

Postup prípravy: 20,5 g média bolo rozpustené v 1 l destilovanej vody. Bolo nutné upraviť pH na hodnotu 7,0 (+/- 0,2) pri teplote 25 °C. Za stáleho miešania bola zmes privedená k varu. Po úplnom rozpustení bola nadávkovaná do nádob a sterilizovaná v autokláve pri 121 °C 15 minút. Toto médium bolo využité v miskách s *B. cereus*, *E. faecalis*, *E. coli* a *P. aeruginosa*.

#### 4.6.3 Disková difúzna metóda

Táto metóda bola vybraná na testovanie antimikrobiálneho efektu extraktu z hroznových semien na vybraných mikroorganizmoch. Princípom tejto metódy je použitie papierových diskov napustených látkou s očakávaným účinkom a ich aplikácia do kultúry mikroorganizmov. Po žiadanom čase sa merajú inhibičné zóny v okolí diskov a vyhodnocuje sa účinnosť látky.

V experimente boli použité dve varianty extraktu: metanolový extrakt a bezmetanolový (vodný) extrakt podrobený 72 hodinovej oxidácii. Testované boli vždy v troch koncentráciách: 100 % (čistý extrakt), 50 % (riedenie 1:1 s destilovanou vodou) a 10 % (riedenie 1:9 s destilovanou vodou). Okrem testovaných misiek boli pripravené aj misky s kontrolným variantom: čistá kultúra bez diskov a kultúra s diskom napusteným metanolom (u porovnania s metanolovým extraktom) alebo destilovanou vodou (u bezmetanolového variantu). Z každej testovanej varianty boli pripravené tri misky, v každej miske boli aplikované tri disky.



Obrázok 4: Príprava Petriho misiek na inokulum



Prvým krokom tejto metódy bola príprava potrebných nástrojov a živných pôd. Do pripravených a popísaných Petriho misiek bolo naliata príslušná živná pôda s teplotou cca 45 °C a krúživým pohybom bolo zabezpečené rovnomerné rozliatie po dne (Obrázok 4). Použité bolo CHL médium pre *C. tropicalis* a PCA pre ostatné mikroorganizmy. Misky bolo nutné nechať 15 minút chladiť a tuhnúť, aby nedošlo k usmrteniu inokula vysokou teplotou média. Pomocou densitometra boli zatiaľ pripravené skúmavky s rovnakou koncentráciou mikroorganizmov v TSB médiu. Na každú misku bolo pomocou mikropipety aplikovaných 0,1 g inokula a okamžite bolo rozotreté tyčinkou rovnomerne po povrchu média. Inokulum sa nechalo 10–15 minút vsiaknuť.

Do skúmaviek sa pripravili jednotlivé riedenia extraktu a prichystali sa papierové disky s priemerom 9 mm (výrobca Fisher Scientific, Česká republika). Na každý disk bolo mikropipetou aplikovaných 30 µl príslušnej koncentrácie extraktu a pinzetou boli umiestnené na povrch média v miskách.

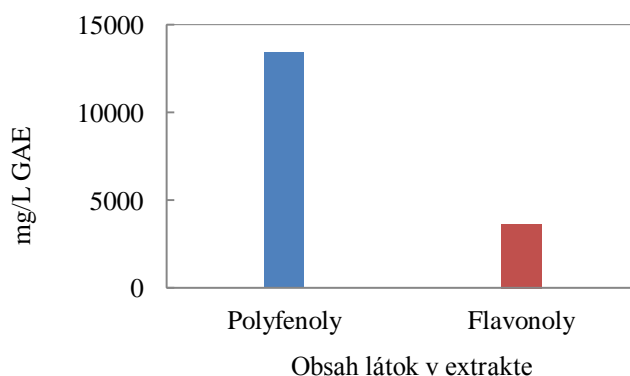
Petriho misky boli umiestnené v termostatoch: *C. tropicalis*, *B. cereus* a *P. aeruginosa* pri teplote 25 °C, *E. coli* a *E. faecalis* pri teplote 37 °C. Po 24 a 48 hodinách boli zmerané inhibičné zóny a výsledky boli vyhodnotené. Všetky hodnoty uvedené vo vyhodnotení a grafoch vznikli ako priemer meraní jednotlivých misiek v danej koncentrácii, takže hodnota 9 mm (priemer disku) a nižšia znamená, že sa inhibičný účinok nedostavil v žiadanej miere. Výsledky boli následne štatisticky spracované.

## 5. VYHODNOTENIE A VÝSLEDKY

### 5.1 Stanovenie celkových polyfenolických zlúčenín a flavonolov

Meranie Folin- Ciocalteovou metódou prebehlo 23. 2. 2016. Hodnotil sa celkový obsah fenolických zlúčenín a obsah flavonolov vo vzorke extraktu podrobeného 72 h oxidácii. Výsledkom bol celkový obsah polyfenolov v množstve 13462 mg/l GAE. Flavonoly boli vo vzorke zastúpené hodnotou 3615 mg/l GAE.

Graf 1: Obsah celkových polyfenolických zlúčenín a flavonolov v extrakte

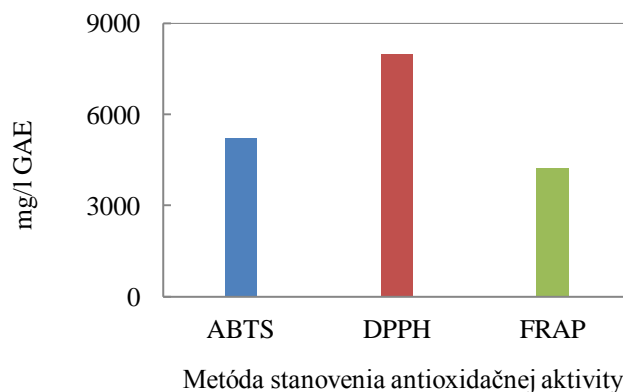


Na Grafe 1 je vyznačené množstvo celkových polyfenolov (modrou farbou) a flavonolov (červenou) obsiahnutých vo vodnom GSE.

### 5.2 Stanovenie antioxidačnej aktivity pomocou DPPH metódy

Stanovenie antioxidačnej aktivity bolo robené 23. 2. 2016. Použitou vzorkou v DPPH metóde bol extrakt vystavený 72 h oxidácii. Vo vzorke bolo nameraných 7978 mg/l GAE. Zaznamenaná hodnota bola porovnaná z predchádzajúcimi meraniami antioxidačnej aktivity vzorky metódami ABTS a FRAP na Ústave vinohradníctví a vinařství.

Graf 2: Porovnanie výsledkov merania antioxidačnej aktivity tromi metódami



Na Grafe 2 je modrou farbou naznačená metóda ABTS, červenou DPPH a zelenou FRAP. Najvyššie hodnoty antioxidačnej aktivity boli namerané pomocou metódy DPPH (7978 mg/l GAE). Metóda ABTS dosiahla hodnotu 5218 mg/l GAE, najnižšiu hodnotu zaznamenala FRAP (4216 mg/l GAE). Výrazné rozdiely v hodnotách sú spôsobené rôznym princípom merania aktivity vzorky.

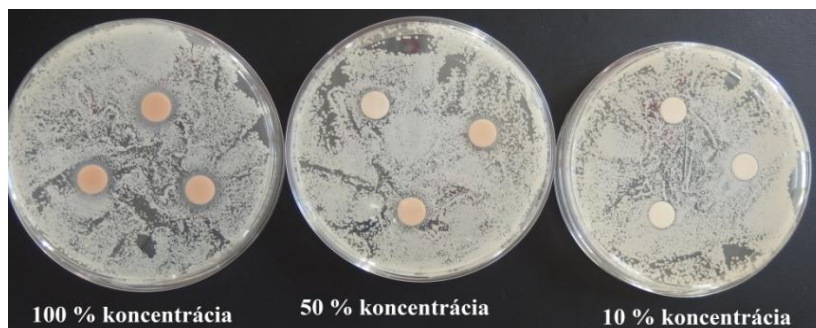
### 5.3 Stanovenie antimikrobiálneho efektu

#### 5.3.1 Vodný extrakt podrobený oxidácii

Pokus bol založený 23. 2. 2016 a boli v ňom skúmané účinky extraktu na tri modelové organizmy: *C. tropicalis*, *E. faecalis* a *E. coli*.

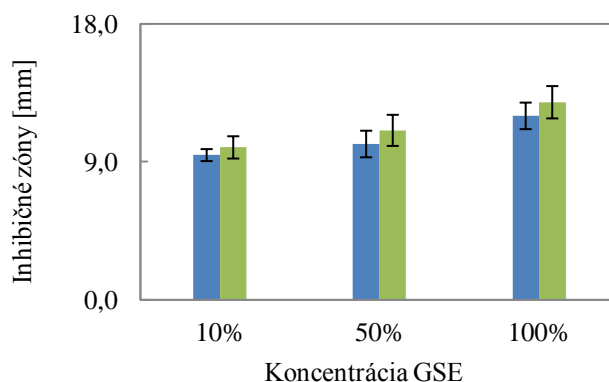
##### *Candida tropicalis*

Kladné výsledky boli dosiahnuté u *C. tropicalis*. Po 24 hodinách pôsobenia extraktu na kultúru boli inhibičné zóny v priemere 12 mm u koncentrovaného 100% extraktu, 10,2 mm u 50% a 9,4 mm u koncentracie 10 %. Inhibičné zóny neboli ostro ohraničené, čo naznačuje oslabenie rastu nie jeho úplné zastavenie. V čase druhého merania (po 48 hodinách) veľkosti zón ešte stúpili. V 100% extrakte bol priemer zóny 12,9 mm, v 50% variante dokonca 11,1 mm a v 10% variante 9,9 mm.



Obrázok 5: Inhibičné zóny okolo diskov v kultúre *C. tropicalis* po 24 h

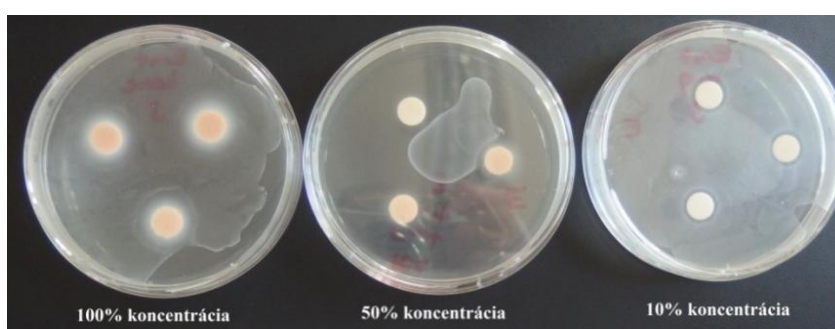
Graf 3: Grafické znázornenie priemerov inhibičných zón v závislosti na koncentrácii GSE a doby jeho pôsobenia na *C. tropicalis*



Na Grafe 3 môžeme vidieť porovnanie dĺžky pôsobenia extraktu na *Candidu*. Modrou farbou je znázornené pôsobenie 24 h, zelenou pôsobenie 48 h. Je možné teda zhodnotiť, že so stúpajúcou koncentráciou a časom pôsobenia stúpa aj inhibičný efekt extraktu. Obrázok 5 ukazuje reálne pôsobenie a inhibičné zóny vyvolané GSE v kultúrach.

### *Enterococcus faecalis*

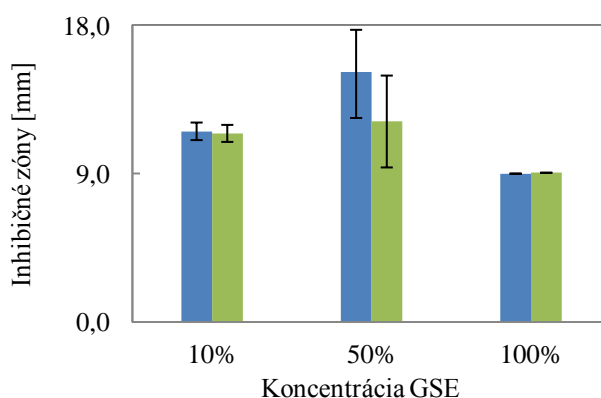
Pokus s *E. faecalis* priniesol najlepšie výsledky. Koncentrácia 100 % síce nevykazovala žiadny účinok po 24 hodinách ani 48 hodinách pôsobenia, no nižšie koncentrácie tvorili väčšie inhibičné zóny (Obrázok 6).



Obrázok 6: Inhibičné zóny okolo diskov v kultúre *E. faecalis* po 24 h

Po 24 hodinách účinkovania 50% extraktu vznikli zóny s priemerom až 15,2 mm, u 10% extraktu 11,6 mm. Po 48 hodinách pôsobenia sa zóny zmenšili na 9,2 mm u 10% extraktu a 11,4 mm u 10% extraktu.

Graf 4: Grafické znázornenie priemerov inhibičných zón v závislosti na koncentrácii GSE a doby jeho pôsobenia na *E. faecalis*

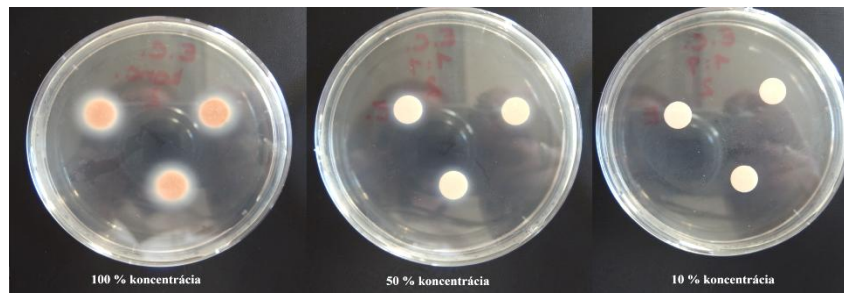


Na Grafe 4 môžeme vidieť porovnanie dĺžky pôsobenia extraktu na *E. coli*. Modrou farbou je znázornené pôsobenie 24 h, zelenou pôsobenie 48 h. Napriek najvyššej priemernej hodnote inhibičnej zóny vo variante 50 % ho nie je možné nechať

pôsobiť dlhšie ako 24 h, inak dochádza k veľmi nevyrovnaným a štatisticky nepreukázateľným výsledkom. Ďalšou vhodnou alternatívou je využitie 10% extraktu. Na základe týchto výsledkov je možné považovať varianty s nižšou koncentráciou extraktu za najvýhodnejšie formy použitia proti *E. faecalis*.

### ***Escherichia coli***

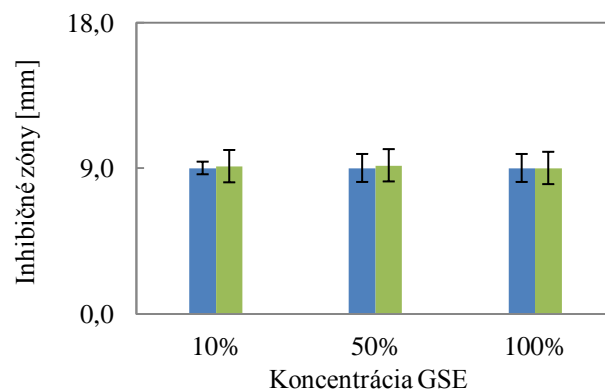
U *E. coli* boli inhibičné účinky zanedbateľné. Po 24 hodinách nebol pozorovaný žiadny inhibičný účinok, naopak u koncentrovanej varianty extraktu bolo možné vidieť podporenie rastu baktérie v bezprostrednom okolí papierového disku (Obrázok 7).



Obrázok 7: Inhibičné zóny okolo diskov v kultúre *E. coli* po 24 h

S klesajúcou koncentráciou extraktu sa podpora rastu znižovala a v koncentrácii 1:9 sa neprejavil žiadny efekt. Po 48 hodinách podpora rastu už nebola viditeľná. V okolí terčikov ale nie je možné hovoriť o inhibičných zónach, pretože bol pozorovateľný iba oslabený rast v prieme 9,2 mm (u 50 % koncentrácie) a 9,1 mm (u 10 %).

Graf 5: Grafické znázornenie priemerov inhibičných zón v závislosti na koncentrácii GSE a doby jeho pôsobenia na *E. coli*



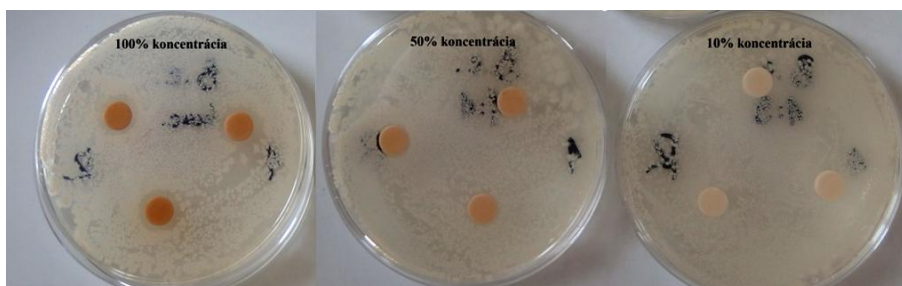
Na Grafe 5 môžeme vidieť porovnanie dĺžky pôsobenia extraktu na *E. coli*. Modrou farbou je znázornené pôsobenie 24 h, zelenou pôsobenie 48 h. Z hodnôt uvedených v grafe je viditeľné, že inhibičný efekt extraktu bol zanedbateľný.

### 5.3.2 Metanolvý extrakt

Experiment robený s metanolvým extraktom bol postupne testovaný 16. 3. 2016 a 17. 5. 2016 na piatich modelových organizmoch: *B. cereus*, *C. tropicalis*, *E. faecalis*, *E. coli* a *P. aeruginosa*. Meranie bolo porovnávané s kontrolnými miskami (použitý disk napustený 75% metanolom). Výsledky sa značne líšili v závislosti na druhu mikroorganizmu.

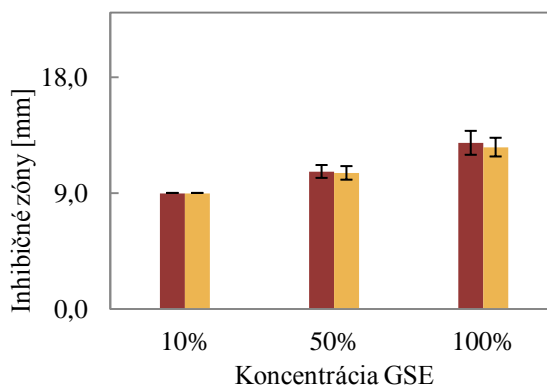
#### *Bacillus cereus*

Pri vyhodnocovaní merania s *B. cereus* boli zaznamenané kladné hodnoty. Po 24 h pôsobenia boli vytvorené zóny oslabenia rastu s priemerom 12,9 mm pri použití 100% extraktu a 10,7 mm pri použití 50% extraktu. Pri 48 hodinovom pôsobení zostali hodnoty takmer nezmenené, 12,6 mm u 100% extraktu a 10,6 mm u 50% extraktu. Inhibičné zóny ako také ale neboli vytvorené, šlo prevažne o oslabenie rastu v okolí diskov. Pri riedení 1:9 (10% extrakte) nebola viditeľná žiadna inhibícia bacila po jednom ani dvoch dňoch pôsobenia.



Obrázok 8: Inhibičné zóny metanolvého GSE okolo diskov v kultúre *B. cereus* po 24 h

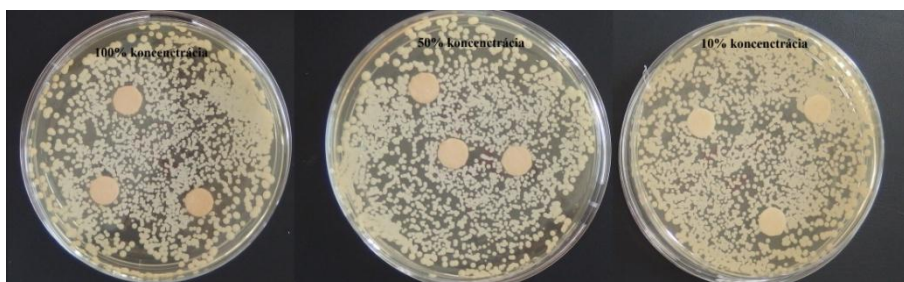
Graf 6: Grafické znázornenie priemerov inhibičných zón v závislosti na koncentrácii metanolvého GSE a doby jeho pôsobenia na *B. cereus*



Na Grafe 6 môžeme vidieť porovnanie dĺžky pôsobenia extraktu na *Bacillus*. Červenou farbou je znázornené pôsobenie 24 h, žltou pôsobenie 48 h. So stúpajúcou koncentráciou a časom pôsobenia stúpa aj inhibičný efekt extraktu, pričom 10% GSE nevyvolal žiadnu inhibíciu.

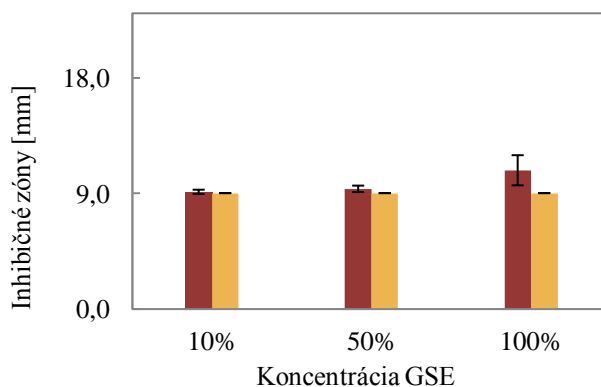
### *Candida tropicalis*

U *C. tropicalis* boli robené taktiež dve merania a v jednom z nich boli výsledky nepreukázateľné, keďže kvasnica nevytvorila súvislý povlak na médiu. Vďaka použitiu CHL média boli eliminované ostatné mikroorganizmy, ktoré by mohli spôsobiť kontamináciu alebo oslabený rast *Candidy*, no kvôli zníženiu koncentrácie kvasnice v inokule nedošlo ku dostatočnému namnoženiu v Petriho miskách, takže nebolo možné s presnosťou odčítať priemery inhibičných zón. Druhé meranie vykázalo iba malú antimikrobiálnu aktivitu. Po 24 hodinách mal väčší efekt iba 100% extrakt, ktorý vytvoril 10,8 mm široké inhibičné zóny. U 50% koncentrácie šlo o veľmi malý priemer zón (9,3 mm). U 10% boli výsledky podobné, iba 9,1 mm. Po 48 hodinách nebolo možné pozorovať žiadny efekt.



Obrázok 9: Inhibičné zóny metanolového GSE okolo diskov v kultúre *C. tropicalis* po 24 h

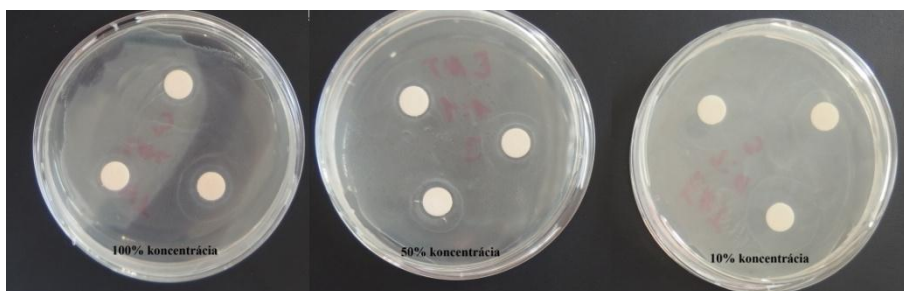
Graf 7: Grafické znázornenie priemerov inhibičných zón v závislosti na koncentrácii metanolového GSE a doby jeho pôsobenia na *C. tropicalis*



Na Grafe 7 môžeme vidieť porovnanie dĺžky pôsobenia extraktu na *Candidu*. Červenou farbou je znázornené pôsobenie 24 h, žltou pôsobenie 48 h. Jediné znateľné pôsobenie extraktu na *Candidu* je viditeľné u 100% GSE po 24 h.

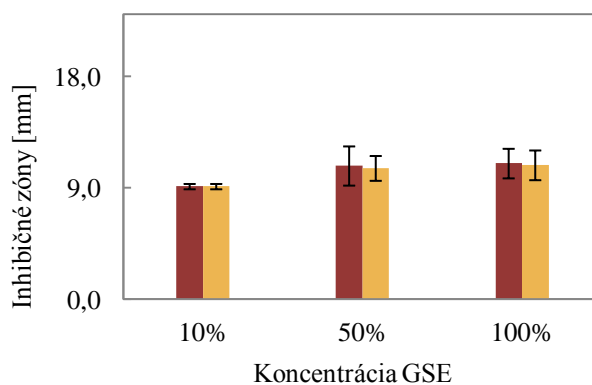
### ***Enterococcus faecalis***

Testovanie vplyvu GSE na *E. faecalis* bolo vykonané dvakrát, preto sú hodnoty uvedené nižšie priemerom oboch meraní. Ukázalo sa, že po 24 h bol v 100% koncentrácii inhibičný účinok pomerne výrazný (s hodnotou 11 mm), podobne aj v koncentrácii 50 % bol priemer zón 10,8 mm. Inhibičné pôsobenie mierne pokleslo u koncentracie 100 % na 10,8 mm v meraní na druhý deň. U 50% extraktu bol účinok rovnako nižší, zóna mala v priemere 10,6 mm. V prípade koncentrácie 10 % bol priemer zón iba 9,1 mm v meraniach po 24 h aj 48 h, čo sa dá považovať za zanedbateľný antimikrobiálny účinok.



Obrázok 10: Inhibičné zóny metanolového GSE okolo diskov v kultúre *E. faecalis* po 24 h

Graf 8: Grafické znázornenie priemerov inhibičných zón v závislosti na koncentrácii metanolového GSE a doby jeho pôsobenia na *E. faecalis*



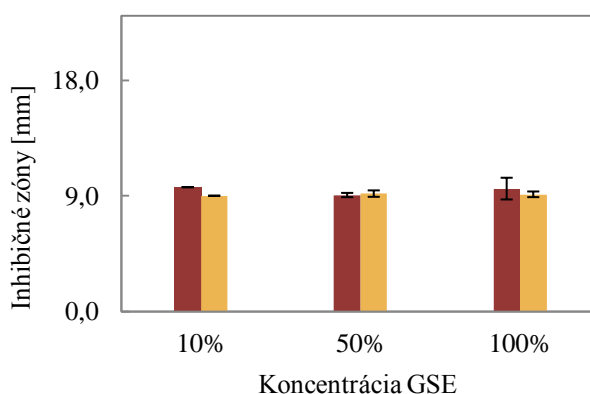
Na Grafe 8 môžeme vidieť porovnanie dĺžky pôsobenia extraktu na *E. faecalis*. Červenou farbou je znázornené pôsobenie 24 h, žltou pôsobenie 48 h. Preukázateľná inhibícia bola iba vo variante 100 % a 50 % po 24 h, variant s 10% extraktom neposkytol pozitívne výsledky.



## *Escherichia coli*

V prípade *E. coli* šlo o dve merania s veľmi podobnými výsledkami ako u *Candidy*. V prvom meraní došlo k inhibícii u 100% koncentrácie extraktu (priemer zóny bol 9,6 mm) a 10% koncentrácie GSE (priemer zóny 9,7 mm) pri pôsobení 24 hodín. Po 48 hodinách boli účinky všetkých koncentrácií GSE zanedbateľné, najväčší účinok mala 50% koncentrácia, ktorá vyvolala reakciu iba v podobe 9,2 mm zóny (o 1 mm väčší priemer ako u 24 hodinového pôsobenia). V druhom meraní nedošlo k žiadnemu zreteľnému účinku na kultúru.

Graf 9: Grafické znázornenie priemerov inhibičných zón v závislosti na koncentrácii metanolového GSE a doby jeho pôsobenia na *E. coli*



Na Grafě 9 môžeme vidieť porovnanie dĺžky pôsobenia extraktu na *E. coli*. Červenou farbou je znázornené pôsobenie 24 h, žltou pôsobenie 48 h. Antimikrobiálne účinky na *Escherichiu* boli zanedbateľné.

## *Pseudomonas aeruginosa*

Experiment s *P. aeruginosa* tiež nepriniesol pozitívne výsledky. Extrakt nevykázal účinky ani v jednej zo skúmaných koncentrácií. Kultúra v sledovaných miskách sa zhodovala s kontrolnou vzorkou.

### 5.3.3 Štatistické vyhodnotenie

Merania boli vyhodnotené pomocou programu STATISTICA (spoločnosť StatSoft ČR s.r.o, 2012). Zo štatistického vyhodnotenia boli vyňaté merania *P. aeruginosa*, keďže nedošlo k žiadnemu očividnému účinku GSE na mikroorganizmus behom experimentu.

V Tabuľke 1-3 sú zaznamenané základné štatistické úkony zahŕňajúce prehľad jednotlivých variantov a ich kombinácií, počet opakovaní, priemernú nameranú hodnotu

z diskovej difúznej metódy, smerodajné odchýlky a variačné koeficienty. Posledný riadok obsahuje vyhodnotenie všetkých skupín po stĺpcoch (priemerná veľkosť zón, celkový počet vzoriek, smerodajnú odchýlku aj variačný koeficient).

Tabuľka 1: Rozkladová tabuľka popisných štatistík u varianty 10% GSE

Druh mikroorganizmu	Pôsobenie extraktu [h]	Varianta extraktu	10%			
			Priemer	N	Smerodajná odchýlka	Variačný koeficient
<i>Candida tropicalis</i>	24	voda	9,4444	9	0,3909	4,1386
	48	voda	9,9444	9	0,7265	7,3054
	24	metanol	9,0556	9	0,1667	1,8405
	48	metanol	9,0000	9	0,0000	0,0000
<i>Escherichia coli</i>	24	voda	9,0000	9	0,0000	0,0000
	48	voda	9,1111	9	0,2205	2,4199
	24	metanol	9,6667	9	1,0000	10,3448
	48	metanol	9,0000	9	0,0000	0,0000
<i>Enterococcus faecalis</i>	24	voda	11,5000	6	0,5477	4,7628
	48	voda	11,3333	6	0,5164	4,5565
	24	metanol	9,1111	18	0,2139	2,3476
	48	metanol	9,1111	18	0,2139	2,3476
<i>Bacillus cereus</i>	24	metanol	9,0000	9	0,0000	0,0000
	48	metanol	9,0000	9	0,0000	0,0000
<b>Všetky skupiny</b>			9,3841	138	0,7767	8,2767

Tabuľka 2: Rozkladová tabuľka popisných štatistík u varianty 50% GSE

Druh mikroorganizmu	Pôsobenie extraktu [h]	Varianta extraktu	50%			
			Priemer	N	Smerodajná odchýlka	Variačný koeficient
<i>Candida tropicalis</i>	24	voda	10,1667	9	0,8660	8,5183
	48	voda	11,0556	9	1,0138	9,1700
	24	metanol	9,3333	9	0,2500	2,6786
	48	metanol	9,0000	9	0,0000	0,0000
<i>Escherichia coli</i>	24	voda	9,0000	9	0,0000	0,0000
	48	voda	9,1667	9	0,2500	2,7273
	24	metanol	9,0556	9	0,1667	1,8405
	48	metanol	9,1667	9	0,2500	2,7273
<i>Enterococcus faecalis</i>	24	voda	15,1667	6	2,5626	16,8959
	48	voda	12,1667	6	2,7869	22,9058
	24	metanol	10,7778	18	1,5832	14,6895
	48	metanol	10,5833	18	1,0037	9,4835
<i>Bacillus cereus</i>	24	metanol	10,6667	9	0,5000	4,6875
	48	metanol	10,5556	9	0,5270	4,9931
<b>Všetky skupiny</b>			10,3116	138	1,7153	16,6349

Tabuľka 3: Rozkladová tabuľka popisných štatistík u varianty 100% GSE

Druh mikroorganizmu	Pôsobenie extraktu [h]	Varianta extraktu	100%			
			Priemer	N	Smerodajná odchýlka	Variačný koeficient
<i>Candida tropicalis</i>	24	voda	12,0000	9	0,8660	7,2169
	48	voda	12,8889	9	1,0541	8,1783
	24	metanol	10,7778	9	1,1756	10,9073
	48	metanol	9,0000	9	0,0000	0,0000
<i>Escherichia coli</i>	24	voda	9,0000	9	0,0000	0,0000
	48	voda	9,0000	9	0,0000	0,0000
	24	metanol	9,5556	9	0,8457	8,8508
	48	metanol	9,1111	9	0,2205	2,4199
<i>Enterococcus faecalis</i>	24	voda	9,0000	6	0,0000	0,0000
	48	voda	9,0000	6	0,0000	0,0000
	24	metanol	10,9722	18	1,1940	10,8821
	48	metanol	10,8333	18	1,2005	11,0814
<i>Bacillus cereus</i>	24	metanol	12,8889	9	0,9280	7,1997
	48	metanol	12,5556	9	0,7265	5,7861
<b>Všetky skupiny</b>			10,5906	138	1,6470	15,5514

Legenda: Tabuľkové hodnoty zvýraznené červenou farbou udávajú nulovú účinnosť danej varianty extraktu. N predstavuje počet meraní. Priemer predstavuje priemernú veľkosť inhibičnej zóny v mm.

Variačný koeficient sa výrazne menil u jednotlivých koncentrácií, časov pôsobenia extraktu aj použitého variantu extraktu. Najvyšší bol zaznamenaný u 50% vodného extraktu použitého na *E. faecalis* (22,9), nižší bol potom u 100% a 50% metanolového GSE. Najnižšia miera variačného koeficientu bola zaznamenaná u variantov s nulovou účinnosťou (Tabuľka 1-3). Vysoká miera súhrnného variačného koeficientu v 50% GSE poukazuje na nestálosť výsledkov meraní (Tabuľka 2).

Najvyššia priemerná účinnosť naprieč testovanými organizmami bola očakávané u najviac koncentrovaného 100% GSE (10,6 mm), najnižšia u 10 %.

Ďalej bola v rámci štatistického rozboru použitá ANOVA (analýza rozptylu). Pri kontrole Hartley a Bartlettovým testom bolo zistené, že je vo všetkých koncentráciách rozptyl homogénny.

Tabuľka 4: Jednorozmerné výsledky pre vybrané závislé premenné

Premenná	Stupne voľnosti	Koncentrácia extraktu		
		100%	50%	10%
Mikroorganizmus	1	0,000156	0,000063	0,000000
Mikroorganizmus x Čas	1	0,000000	0,714515	0,546163
Mikroorganizmus x Druh	1	0,000000	0,000184	0,000000
Mikroorganizmus x Čas x Druh	1	0,192847	0,126586	0,003145
Opakovanie x Mikroorganizmus x Čas x Druh	3	0,000070	0,012271	0,518368

Boli dokázané vysoko preukázateľné rozdiely medzi mikroorganizmom a druhom extraktu (vodným alebo metanolovým GSE) vo všetkých sledovaných koncentráciách.

Rovnako boli dokázané vysoko preukázateľné rozdiely medzi testovanými druhmi mikroorganizmov (Tabuľka 4).

Vykonaný bol aj Tukeyov HSD test. Na hladine významnosti  $\alpha=0,05$  boli zistené významné rozdiely v priemeroch inhibičných zón pri použití 100% vodného extraktu na *E. coli* a *E. faecalis* v oboch časových variantách. Podobne boli zistené rozdiely aj u *C. tropicalis* a *E. coli* pri pôsobení metanolového extraktu. Ďalej boli zistené rozdiely v 24 h pôsobení metanolového extraktu medzi *C. tropicalis* a *E. faecalis*.

Jedinou skupinou, v rámci ktorej boli Tukeyovým testom zistené rozdiely v účinoch 50% vodného extraktu boli *Candida* a *Enterococcus* po 24 h. V prípade 50% metanolového extraktu boli zaznamenané rozdiely medzi *C. tropicalis* a *E. coli* pri oboch časoch pôsobenia. Ďalšiu takúto homogénnu skupinu tvorí *B. cereus* a *E. faecalis* v prípade oboch časov pôsobenia metanolového extraktu.

Napriek veľmi podobnému priemeru zón u *B. cereus*, *C. tropicalis* a *E. coli* boli týmto testom zistené rozdiely v 24 h aj 48 h pôsobení 10% metanolového extraktu.

Aj týmto testom bol potvrdený preukázateľný vplyv času a druhu extraktu na výslednú mieru inhibície organizmu. Vo väčšine prípadov tvorili homogénnu skupinu extrakty pôsobiace na rovnaký organizmus v rozličných časoch, líšili sa aj prítomnosťou metanolu.

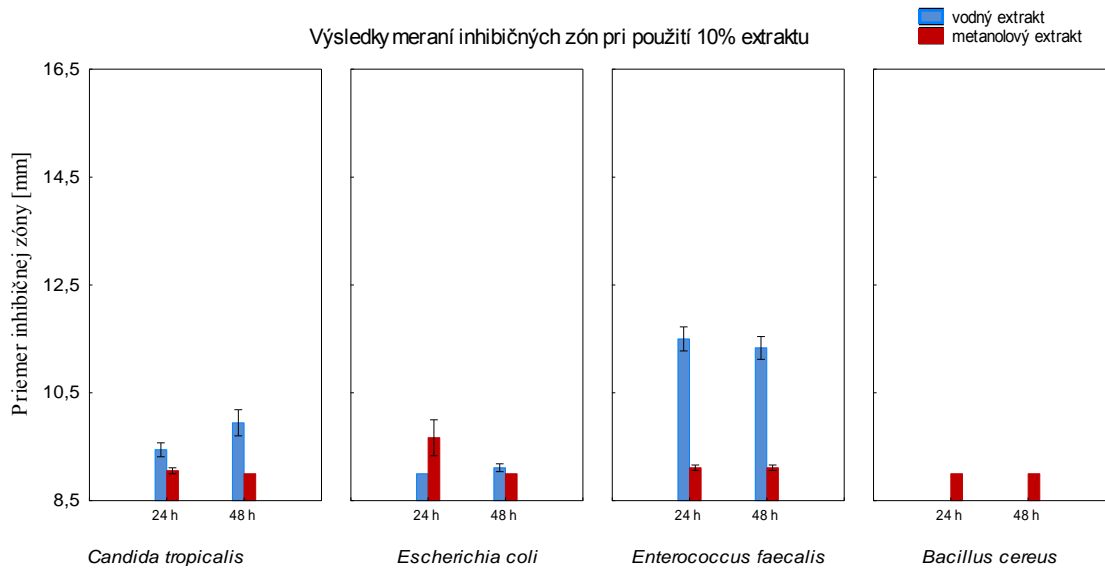
Tabuľka 5: Výsledky Tukeyovho HSD testu podľa použitých koncentrácií GSE

Druh mikroorganizmu	Pôsobenie extraktu [h]	Varianta extraktu	10%	50%	100%
<i>Candida tropicalis</i>	24	voda	<b>b</b>	<b>a b c</b>	<b>d e</b>
	48	voda	<b>c</b>	<b>c d</b>	<b>e</b>
	24	metanol	<b>a</b>	<b>a b</b>	<b>b c d</b>
	48	metanol	<b>a</b>	<b>a</b>	<b>a</b>
<i>Escherichia coli</i>	24	voda	<b>a</b>	<b>a</b>	<b>a</b>
	48	voda	<b>a</b>	<b>a</b>	<b>a</b>
	24	metanol	<b>b c</b>	<b>a</b>	<b>a b</b>
	48	metanol	<b>a</b>	<b>a</b>	<b>a</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	24	voda	<b>d</b>	<b>e</b>	<b>a</b>
	48	voda	<b>d</b>	<b>d</b>	<b>a</b>
	24	metanol	<b>a</b>	<b>c</b>	<b>c d</b>
	48	metanol	<b>a</b>	<b>c</b>	<b>c</b>
<i>Bacillus cereus</i>	24	metanol	<b>a</b>	<b>c</b>	<b>e</b>
	48	metanol	<b>a</b>	<b>b c</b>	<b>e</b>

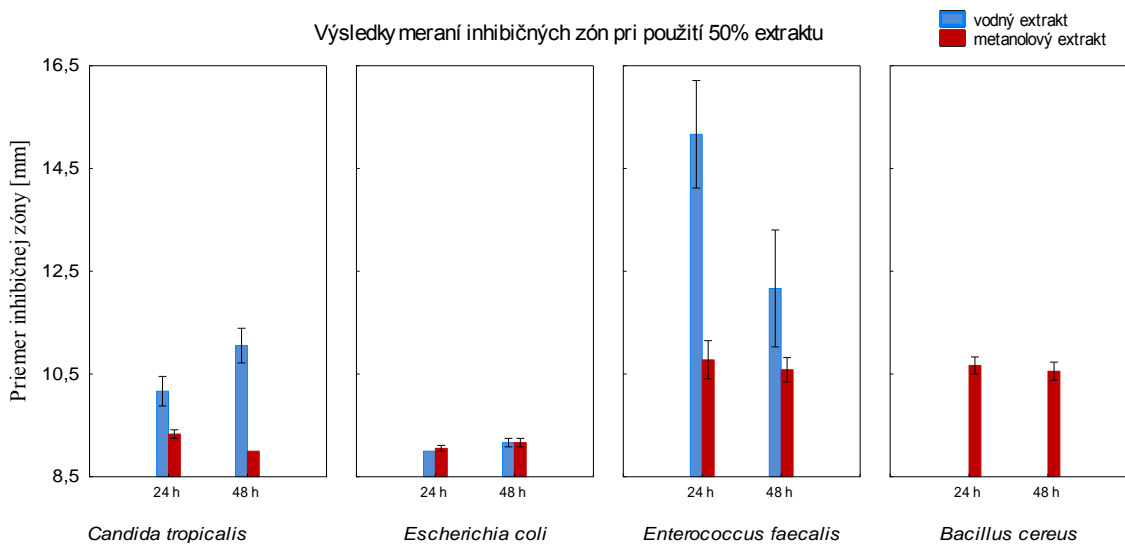
Legenda: V tabuľke sú farebne a písmenami rozlíšené jednotlivé homogénne skupiny. Použitá bola oranžová farba pre a, červená pre b, modrá pre c, zelená pre d a fialová pre e. Varianty s rovnakou farbou (písmenom) predstavujú homogénnu skupinu, ktorá značí štatisticky významné rozdiely. Použitá bola  $\alpha=0,05$ .

Závěrečná část podkapitoly je venovaná súhrnným grafom účinkov jednotlivých druhov a koncentrácií extraktu na všetky sledované druhy mikroorganizmov, s výnimkou *P. aeruginosa*.

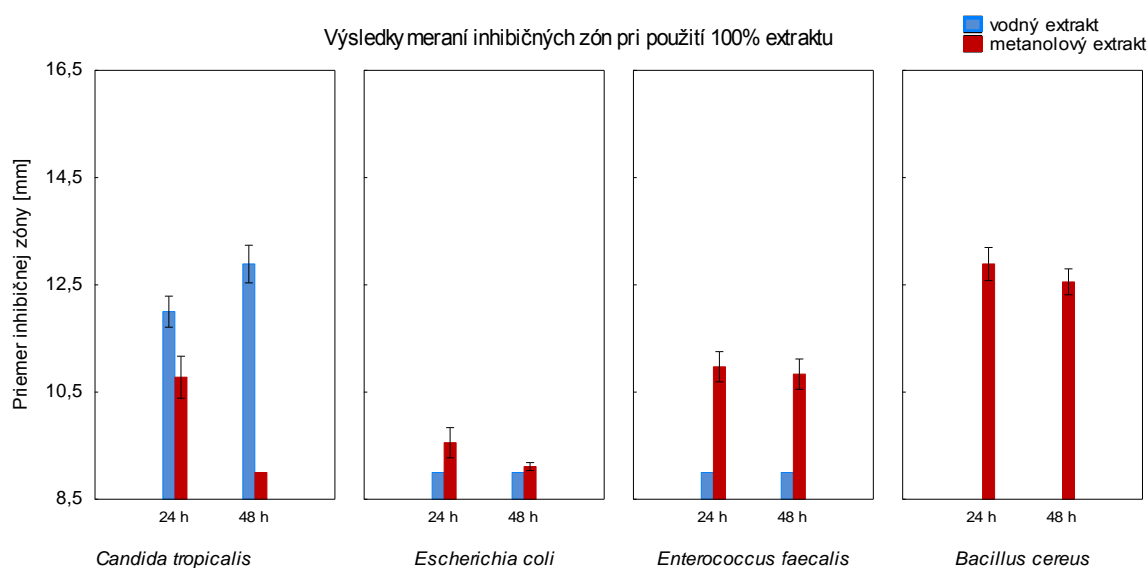
Graf 10: Súhrn meraní inhibičných zón pri použití 10% extraktu



Graf 11: Súhrn meraní inhibičných zón pri použití 50% extraktu



Graf 12: Súhrn meraní inhibičných zón pri použití 100% extraktu



Legenda: Vertikálne stĺpce označujú kladnú/zápornú smerodajnú odchýlku. Modré stĺpce vyznačujú vodný extrakt, červené metanolový extrakt. Wilksovo  $\lambda=0,88178$ .  $F(3, 96)=4,2902$ . Použité bolo  $p=0,00692$ .

10% variant vodného GSE bol výrazne účinný iba u *E. faecalis*, slabší účinok sa prejavil aj u *C. tropicalis*, nutné bolo dlhodobejšie pôsobenie. Metanolový extrakt v takto nízkej koncentrácii nemal znateľné účinky (Graf 10).

U riedenia extraktu na 50 % boli výsledky s vysokou smerodajnou odchýlkou, čo značí o nevyrovnanosti jednotlivých meraní. Najlepším a spoľahlivým výsledkom bol účinok metanolového GSE na *B. cereus*, prípadne vodného extraktu s na *C. tropicalis* v meraní po 48 h (Graf 11).

V 100% koncentrácii je možné sledovať najvýraznejší účinok vodného extraktu na *Candidu*, metanolový extrakt pôsobil najmä na *Bacillus* (Graf 12).

## 6. DISKUSIA

Dietetická hodnota semien *Vitis vinifera* L. určite nie je zanedbateľná. Množstvo vlákniny, oleja a ostatných bioaktívnych látok je dobrým predpokladom na jeho uplatnenie vo farmaceutickom priemysle ako doplnku stravy. Lepšiu vstrebateľnosť orálne podávaného GSE v črevnom epitele potom zabezpečia polykatiónové deriváty chitosanu (Felice et al., 2012).

Rešeršná časť práce poukazuje na všestrannosť použitia extraktov z hroznových semien. Teší sa popularite vo farmaceutickom priemysle v podpore liečby srdcových ochorení, obezity a hypertenzie. Jeho neuroprotektívny efekt je taktiež značný. Postupne sa z testovania na zvieratách prechádza aj do klinických testov na skutočných pacientoch. Výskum sa ale neobmedzuje iba na ľudský zdravotný stav, potenciál vykazuje GSE aj v najnovších technológiách pri tvorbe nanomateriálov či ako alternatívny prostriedok proti hubovým ochoreniam vo vinohradoch. Je nutné podrobné sledovanie jeho účinku a najmä integrácia do povedomia širokej verejnosti.

Problémom pri porovnávaní hodnôt antioxidantnej aktivity a obsahu fenolických látok nameraných rôznymi autormi je používanie rôznych jednotiek (mg GAE/l extraktu, mg GAE/100 g bobule, ekvivalent katechínu/100 g extraktu, atď.). Existuje množstvo spôsobov vyjadrenia týchto výsledkov a preto nie je možné jednoducho porovnať a uceliť informácie do jednotnej formy.

Dôkaz o antimikrobiálnom účinku fenolov na *E. coli* bol poskytnutý pri testovaní argentínskych vín. Zistili, že na rozdiel od čírených vín zbavených fenolických látok, ktoré nevykazovali žiadnu aktivitu, vyvolala nečírená, modrá odroda 'Merlot' (s najvyšším obsahom fenolov z testovaných vzoriek) vysokú citlivosť u baktérie *E. coli* (Rodríguez Vaquero a Manca de Nadra, 2008). Proti proliferácii rakovinových buniek taktiež výraznejšie pôsobili extrakty z modrých ako z bielych odrôd vďaka rozličnému množstvu zdraviu prospešných látok (Ignea et al., 2013). Podobný záver urobili aj v Chorvátsku, kde pri sledovaní extraktov zo šupiek siedmych modrých a siedmych bielych odrôd namerali vyššiu antioxidantnú aktivitu u modrých, ako u bielych odrôd, všeobecne však obsah závisel jednoznačne na odrode, nie na sfarbení jej šupky (Katalinić et al., 2010). Je teda diskutabilné či je možné považovať extrakt zo semien modrých odrôd za prospešnejší pre ľudské zdravie.

Kim et al. (2006) testovali vplyv teploty na antioxidantnú aktivitu a celkový obsah fenolických látok v hroznových semenách. Zistili, že pri zahriatí prášku z mletých

semien na 100 °C (10 minút) sa podiel fenolov a RSA zvýšili. Pri variante celých semien najvyššie hodnoty dosiahli pri 40 minútovom zahriatí na 150 °C. Rozdiely boli viditeľné aj v skladbe fenolov obsiahnutých v semenách - pri variante 150 °C (40 min) sa vytvorila dosiaľ neprítomná dihydroxibenzoová, azelaová a o-škoricová kyselina. Po tepelnej úprave sa zvýšil obsah gallokatechín galátu a kofeínu. Z výsledkov vyplýva, že by v ideálnom prípade mali byť semená pred začiatkom prípravy extraktu rozdelené na niekoľko variantov vystavených rôznym teplotám, čím by sa rozšírilo spektrum jeho účinnosti a zvýšila sa jeho konečná kvalita.

Žiadané vlastnosti extraktu môžu byť v budúcnosti vylepšené aj použitím rôznych druhov rozpúšťadiel pri jeho príprave. Vyšší podiel fenolických látok môže byť zaobstaraný použitím etylacetát-vodného rozpúšťadla (Jayaprakasha et al., 2001). Technológia výroby extraktu musí byť zdokonalená, aby sa dosiahla cenová aj lokálna dostupnosť výrobku na trhu.

Zaznamenané hodnoty v tejto práci dokazujú, že GSE má skutočne antimikrobiálne účinky voči niekoľkým druhom mikroorganizmov. Výraznejšie boli proti  $G^+$  baktériám a kvasinke ako proti  $G^-$ . Existuje niekoľko štúdií poskytujúcich podobné výsledky. GSE použitý v Španielsku bol taktiež účinnejší proti  $G^+$  (Delgado Adámez et al., 2012). Pokusy s GSE pripraveným z odtučneného prášku rozpusteného vo vode určili minimálnu účinnú koncentráciu nutnú na inhibíciu baktérií a tak aj celkový antibakteriálny efekt. Nižšiu koncentráciu (850–1000 ppm) vyžadovali na potlačenie  $G^+$  baktérie, proti *E. coli* museli použiť až 1250–1500 ppm (Jayaprakasha et al., 2003). Podobne extrakt testovali v Brazílii a zistili vyšší inhibičný účinok u *Staphylococcus aureus* a *B. cereus* ako u *E. coli*, *P. aeruginosa* a *C. albicans* (Oliveira et al., 2013).

Dôležitou vlastnosťou *C. tropicalis*, *B. cereus* a *E. faecalis*, ktorú je nutné zohľadniť pri snahe o inhibíciu ich rastu v praxi, je tvorba biofilmu. Ako vyplýva zo štúdie Bizerra (2008), pohyblivá forma kvasnice, žijúca ako planktón, je citlivá na látky s antimikrobiálnym účinkom (na testovanie boli použité antibiotiká flukonazol a amfotericín B), zatiaľ čo bunky žijúce v kolónii biofilmu neboli týmito látkami potlačené. Je teda možné predpokladať, že by sa účinky GSE pri experimente na biofilme líšili od výsledkov pokusu v tejto práci.

Štúdia Kim et al. (2008) popisovala vysokú inhibičnú schopnosť GSE proti *E. coli*. Ich výsledky sa značne líšili od meraní v tejto práci. Tento rozdiel môže byť



spôsobený rozdielnymi kmeňmi baktérie alebo množstvom látok s antibakteriálnym účinkom v semenách použitých na výrobu extraktu.

Napriek použitiu antimikrobiálne aktívnych látok, ktoré sa v GSE nenachádzajú, je zaujímavý výsledok pozorovania Palaniappan a Holley (2010). Dokázali, že prítomnosť prírodných látok s antimikrobiálnym účinkom (thymol a karvakrol) samostatne potlačila baktérie ako *E. coli*, *S. Typhimurium* a *Streptococcus pyogenes*, ktoré ku bežným antibiotikám (testované boli ampicilín, tetracyklín, penicilín, bacitracín, erythromycín a novobiocín) vykazovali rezistenciu. Dôležitým zistením ale bolo, že nielen že došlo ku potlačeniu rezistencie, naviac ešte pri použití kombinácie thymol a karvakrolu a komerčných antibiotík efektívne znížili minimálnu koncentráciu antibiotík nutnú na inhibíciu mikroorganizmov. Podobné úspechy dosiahli Yap et al. (2013) s levanduľovou, mätovou a škoricovou silicou a Taylor et al. (2005) s katechínmi *Camellia sinensis* (L.) Kuntze. Tieto výsledky poskytujú námet na úspešné začlenenie prírodných extraktov do farmaceutickej praxe, kedy znížia celkové náklady na antibiotiká aj spotrebované množstvo extraktov a uľahčia liečbu ochorení spôsobených rezistentnými druhmi.

## 7. ZÁVER

V tejto práci bolo zhrnuté množstvo informácií o hroznových semenách. Dôraz bol kladený na látky s antimikrobiálnym účinkom. Pôsobenie extraktu zo semien *Vitis vinifera* L. bolo skúmané v praktickej časti diplomovej práce a výsledky boli zhrnuté v tabuľkách a grafoch.

Na výrobu extraktov je možné odporučiť ako modré, tak aj biele odrody *Vitis vinifera* L. vzhľadom na informácie v tejto práci. Vďaka značnému podielu fenolických látok majú extrakty zo semien výrazný vplyv na ľudský organizmus.

Sledovaný naoxidovaný extrakt, vyrobený zo semien interšpecifických odrôd 'Cerason', 'Erilon' a 'Marlen', dosiahol vysoké hodnoty antioxidačnej aktivity - pri meraní DPPH metódou 7978 mg/l GAE. Vyznačoval sa množstvom až 13462 mg/l GAE polyfenolov a 3615 mg/l GAE flavonolov.

Experiment na piatich modelových mikroorganizmoch využívajúci diskovú difúziu metódu bol jednoduchým a rýchlym testom antimikrobiálneho účinku extraktu. Predpokladom bola najvyššia účinnosť u 100% koncentrácie, čo sa potvrdilo štatistickým vyhodnotením. V prípade 50% koncentrácie výsledky často kolísali. Vo väčšine meraní bol patogén výraznejšie potlačený extraktom pôsobiacim 24 hodín.

Najlepšie inhibičné účinky proti *C. tropicalis* vykázal variant 50 % bezmetanolového extraktu s dĺžkou pôsobenia 48 hodín, prípadne 10% vodný extrakt s pôsobením 48 hodín. Napriek väčším priemerom inhibičných zón u 100% vodného extraktu sú zriedené varianty lepšou voľbou, pretože bolo nutné použiť menšie množstvo extraktu v účinnom roztoku. Metanolové varianty nedosiahli požadovanú účinnosť. Variant s 50% extraktom u *E. faecalis* je najekonomickejší, keďže sa využíva zriedená forma, ktorá po 48 hodinách poskytuje rovnakú účinnosť ako 100% GSE. Výhodné je aj použitie 10% extraktu, pretože aj napriek nižšej účinnosti bol antimikrobiálny efekt značný a stabilný v čase. Na inhibíciu *B. cereus* je možné efektívne využiť 100% metanolový GSE pôsobiaci ako 24 h, tak aj 48 h. Extrakt z hroznových semien nie je možné na základe vykonaného experimentu odporučiť na použitie proti rastu *P. aeruginosa* a *E. coli*.

GSE a podobné produkty z viniča budú pravdepodobne veľmi významnými činiteľmi v technologickom spracovaní potravín a medicíne. Vzhľadom na rastúci trend zdravej výživy a dopytu po „čistých“ alebo *bio* potravinách je potenciál výrobkov z odpadných produktov vinárstva veľmi vysoký.

## 8. SÚHRN A RESUMÉ

**Názov práce:** Štúdium antimikrobiálneho efektu hroznových semien

Táto práca sa zaoberala štúdiom informácií o využití extraktov z *Vitis vinifera* L., predovšetkým extraktu z hroznových semien (GSE), výrobe extraktu v dvoch variantách (vodný alebo metanolový GSE) a popise jeho vlastností a účinkov. Vyrobený extrakt bol bohatý na polyfenoly (13462 mg/l GAE), ktoré boli spektrofotometricky stanovené Folin-Ciocalteľovou metódou a stanovené boli aj flavonoly (3615 mg/l GAE). Preukázaná bola vysokou antioxidačnou aktivitou (7978 mg/l GAE) meraná pomocou metódy DPPH. Na stanovenie antimikrobiálnej aktivity bola využitá disková difúzna metóda aplikovaná na piatich modelových mikroorganizmoch. Z výsledkov experimentu vyplýva, že GSE významne inhibuje rast *Bacillus cereus*, *Candida tropicalis* a *Enterococcus faecalis*, neúčinný bol voči *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*.

**Kľúčové slová:** extrakt z hroznových semien, antioxidačná aktivita, polyfenoly, disková difúzna metóda

**Title:** Study of Grape Seeds' Antimicrobial Effect

This paper is dedicated to gathering information about utilization of *Vitis vinifera* L. extracts, mainly grape seed extract (GSE), production of GSE in two variants (aqueous or methanol GSE) and description of its characteristics. Extract was rich in polyphenols (13462 mg/l GAE), measured by Folin-Ciocalteľ method. Also 3615 mg/l GAE of flavonols was present in GSE. Antioxidant activity measured by DPPH method was high, 7978 mg/l GAE. Disc diffusion method was used for antimicrobial activity analysis. GSE's effect was tested on five common microorganisms. Results of the experiment show that GSE strongly inhibits growth of *Bacillus cereus*, *Candida tropicalis* and *Enterococcus faecalis*. However it was not effective against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

**Key words:** grape seed extract, antioxidant activity, polyphenols, disc diffusion method

## 9. POUŽITÁ LITERATÚRA

### Webové stránky

Counting Chambers. 2016. Wertheim, 253-256. Dostupné z:  
[http://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/Zaehlkammern/GK900\\_05\\_Clinical\\_Lab\\_Zaehlkammern\\_e.pdf](http://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/Zaehlkammern/GK900_05_Clinical_Lab_Zaehlkammern_e.pdf)

Taxonomy browser (*Bacillus cereus*). 2016. National Center for Biotechnology Information [online]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine [cit. 2017-01-02]. Dostupné z:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1396&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

Taxonomy browser (*Candida tropicalis*). 2016. National Center for Biotechnology Information [online]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine [cit. 2017-01-02]. Dostupné z:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5482&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

Taxonomy browser (*Enterococcus faecalis*). 2016. National Center for Biotechnology Information [online]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine [cit. 2017-01-02]. Dostupné z:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1351&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

Taxonomy browser (*Escherichia coli*). 2016. National Center for Biotechnology Information [online]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine [cit. 2017-01-02]. Dostupné z:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=562&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

Taxonomy browser (*Pseudomonas aeruginosa*). 2016. National Center for Biotechnology Information [online]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine [cit. 2017-01-02]. Dostupné z:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=287&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

## Elektronické literárne zdroje

ABDOU, H. M. a M. M. WAHBY. Neuroprotection of Grape Seed Extract and Pyridoxine against Triton-Induced Neurotoxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2016, 2016, 8. [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/8679506/cta/>

ABRIOUEL, H., E. VALDIVIA, M. MARTINEZ-BUENO, et al. A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2003, 55(3), s. 599–605 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701203002021>

AHN, J., I. U. GRUN a A. MUSTAPHA. Antimicrobial and antioxidant activities of natural extracts in vitro and in ground beef. *J Food Prot* [online]. 2004, 67(1), 148–155 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14717365>

AKYILMAZ, E. a E. DINÇKAYA. An amperometric microbial biosensor development based on *Candida tropicalis* yeast cells for sensitive determination of ethanol. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2005, 20(7), 1263–1269 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566304001988>

AL-HABIB, A., E. AL-SALEH, A.-M. SAFER a M. AFZAL. Bactericidal effect of grape seed extract on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *The Journal of Toxicological Sciences* [online]. 2010, 35(3), 357–364 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20519844>

ALKHEDAIDE, A., Z. S. ALSHEHRI, A. SABRY, T. ABDEL-GHAFFAR, et al. Protective effect of grape seed extract against cadmium-induced testicular dysfunction. *Mol Med Rep* [online]. 2016, 13(4), 3101–3109 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26935153>

AMAROWICZ, R. a S. WEIDNER. Biological Activity of Grapevine Phenolic Compounds. *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology* [online]. 2009, 389–405 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: [http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-90-481-2305-6\\_14](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-90-481-2305-6_14)

BALOUIRI, M., M. SADIKI a S. K. IBNSOUDA. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2016, 6(2), 71–79 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: [http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-90-481-2305-6\\_14](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-90-481-2305-6_14)

BARNES, S. D., J. HALLAK, D. PAVAN-LANGSTON a D. T. AZAR. 115 - Microbial Keratitis. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)* [online]. 2015, 1402–1414 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455748013001156>

BARROS, M., R. MARTINELLI a H. ROCHA. Enterococcal urinary tract infections in a university hospital: Clinical studies. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* [online]. 2009, 13(4), 294–296 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20231994>

BILLINGTON, E. O., S. H. PHANG, D. B. GREGSON, J. D. D. PITOUT, et al. Incidence, Risk Factors, and Outcomes for *Enterococcus* spp. Blood Stream Infections: A Population-Based Study. *International Journal of Infectious Diseases* [online]. 2014, 26, 76–82 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971214014490>

BIZERRA, F. C., C. V. NAKAMURA, C. DE POERSCH, T. I. ESTIVALET SVIDZINSKI, et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Research* [online]. 2008, 8(3), 442–450 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://femsyr.oxfordjournals.org/content/8/3/442.full>

BOTTONE, E. J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin Microbiol Rev* [online]. 2010, 23(2), 382–398 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/content/23/2/382.long>

BRETÓN, J. R., V. PESET, F. MORCILLO, J. CANO, et al. Neonatal meningitis due to *Enterococcus* spp.: Presentation of four cases. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [online]. 2002, 20(9), 443–447 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12425878>

CARDONA, F., C. ANDRÉS-LACUEVA, S. TULIPANI, F. J. TINAHONES, et al. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The*

*Journal of Nutritional Biochemistry* [online]. 2013, 24(8), 1415–1422 [cit. 2017-01-01].  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286313000946>

DA COSTA, K. R. C., J. C. FERREIRA, M. C. KOMESU a R. C. CANDIDO. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in Oral Candidosis: Quantitative Analysis, Exoenzyme Activity, and Antifungal Drug Sensitivity. *Mycopathologia* [online]. 2008, 167(2), 73–79 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11046-008-9154-8#enumeration>

D'AGATA, E. 221 - *Pseudomonas aeruginosa* and Other *Pseudomonas* Species. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)* [online]. 2015, 2518–2531 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455748013002216>

DELGADO ADÁMEZ, J., E. GAMERO SAMINO, E. VALDÉS SÁNCHEZ a D. GONZÁLEZ-GÓMEZ. *In vitro* estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera* L.). *Food Control* [online]. 2012, 24(1–2), 136–141 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511003719>

DIAS, C., R. DOMINGUEZ-PERLES, A. AIRES, A. TEIXEIRA, et al. Phytochemistry and activity against digestive pathogens of grape (*Vitis vinifera* L.) stem's (poly)phenolic extracts. *Lwt-Food Science and Technology* [online]. 2015, 61(1), 25–32 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643814007361>

DÖNMEZ, G. Bioaccumulation of the reactive textile dyes by *Candida tropicalis* growing in molasses medium. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2002, 30(3), 363–366 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022901005117>

DURAN, M., M. S. ADAY, N. N. D. ZORBA, R. TEMIZKAN, et al. Potential of antimicrobial active packaging ‘containing natamycin, nisin, pomegranate and grape seed extract in chitosan coating’ to extend shelf life of fresh strawberry. *Food and Bioproducts Processing* [online]. 2016, 98, 354–363 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308516000195>

EGUCHI, T., K. KAMINAKA, J. SHIMA, S. KAWAMOTO, et al. Isolation and Characterization of Enterocin SE-K4 Produced by Thermophilic *Enterococci*, *Enterococcus faecalis* K-4. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. 2001, 65(2), 247–253 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1271/bbb.65.247>

EL-TARRAS AEL, S., H. F. ATTIA, M. M. SOLIMAN, M. A. EL AWADY, et al. Neuroprotective effect of grape seed extract against cadmium toxicity in male albino rats. *Int J Immunopathol Pharmacol* [online]. 2016, 29(3), 398–407 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27271977>

EVANS, M., D. WILSON a N. GUTHRIE. A randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot study to evaluate the effect of whole grape extract on antioxidant status and lipid profile. *Journal of Functional Foods* [online]. 2014, 7, 680–691 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464613003113>

FARR, K. P. a A. SAFWAT. Palmar-Plantar Erythrodysesthesia Associated with Chemotherapy and Its Treatment. *Case Reports in Oncology* [online]. 2011, 4(1), 229–235 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3085037/>

FELICE, F., Y. ZAMBITO, G. DI COLO, C. D'ONOFRIO, et al. Red grape skin and seeds polyphenols: Evidence of their protective effects on endothelial progenitor cells and improvement of their intestinal absorption. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2012, 80(1), 176–184 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641111002475>

FERRER, J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* [online]. 2000, 71(1), 21–27 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020729200003507>

FISHER, K. a C. PHILLIPS. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* [online]. 2009, 155(6), 1749–1757 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.026385-0#R36>



FOULQUIÉ MORENO, M. R., P. SARANTINOPOULOS, E. TSAKALIDOU a L. DE VUYST. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2006, 106(1), 1–24 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816050500406X>

FRANK, D. W. *Pseudomonas Aeruginosa, Biology, Genetics, and Host-pathogen Interactions* [online]. Milwaukee: Frontiers Media SA, 2012 [cit. 2017-01-01]. ISBN 9782889190164.

Dostupné z: [https://books.google.cz/books?id=yUZQglj4epoC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.cz/books?id=yUZQglj4epoC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

FRATAMICO, P. M., A. K. BHUNIA a J. L. SMITH. *Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology* [online]. Norfolk: Caister Academic Press, 2005 [cit. 2017-01-01]. ISBN 9781904455004.

Dostupné z: [https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=-HNavPPs-JoC&oi=fnd&pg=PA409&dq=bacillus+cereus&ots=\\_GK4gaZMsA&sig=9GdswS-ocarIKa9puZ0jl-SAYrg&redir\\_esc=y#v=onepage&q=bacillus%20cereus&f=false](https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=-HNavPPs-JoC&oi=fnd&pg=PA409&dq=bacillus+cereus&ots=_GK4gaZMsA&sig=9GdswS-ocarIKa9puZ0jl-SAYrg&redir_esc=y#v=onepage&q=bacillus%20cereus&f=false)

GARCÍA, M. T., M. MARTÍNEZ CAÑAMERO, R. LUCAS, N. B. OMAR, R. B. PULIDO a A. GÁLVEZ. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin EJ97 produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2004, 90(2), 161–170 [cit. 2017-01-01].

Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503000515>

GARCIA-EFFRON, G., D. P. KONTOYIANNIS, R. E. LEWIS a D. S. PERLIN. Caspofungin-resistant *Candida tropicalis* strains causing breakthrough fungemia in patients at high risk for hematologic malignancies. *Antimicrob Agents Chemother* [online]. 2008, 52(11), 4181–4183 [cit. 2017-01-01].

Dostupné z: <http://aac.asm.org/content/52/11/4181.full>

GAZZOLA, D., S. VINCENZI, L. GASTALDON, S. TOLIN, et al. The proteins of the grape (*Vitis vinifera* L.) seed endosperm: Fractionation and identification of the major components. *Food Chemistry* [online]. 2014, 155, 132–139 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614000533>

GIACOMETTI, A., O. CIRIONI, A. M. SCHIMIZZI, M. S. DEL PRETE, et al. Epidemiology and microbiology of surgical wound infections. *Journal of Clinical*

*Microbiology* [online]. 2000, 38(2), 918–922 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/38/2/918.full>

GOMES, T. A. T., W. P. ELIAS, I. C. A. SCALETSKY, B. E. C. GUTH, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. 2016, 47(1), 3–30 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838216310917>

GRANUM, P. E. a T. LUND. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 1997, 157(2), 223–228 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://femsle.oxfordjournals.org/content/femsle/157/2/223.full.pdf>

HELGASON, E., O. A. OKSTAD, D. A. CAUGANT, H. A. JOHANSEN, et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*--one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol* [online]. 2000, 66(6), 2627–2630 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/66/6/2627.abstract>

HOFFMASTER, A. R., J. RAVEL, D. A. RASKO, G. D. CHAPMAN, et al. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2004, 101(22), 8449–8454 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.pnas.org/content/101/22/8449.full>

CHEN, K.-C., Y.-H. LIN, W.-H. CHEN a Y.-C. LIU. Degradation of phenol by PAA-immobilized *Candida tropicalis*. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2002, 31(4), 490–497 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022902001485>

CHEN, Y. L., S. J. YU, H. Y. HUANG, Y. L. CHANG, et al. Calcineurin controls hyphal growth, virulence, and drug tolerance of *Candida tropicalis*. *Eukaryot Cell* [online]. 2014, 13(7), 844–854 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://ec.asm.org/content/13/7/844.full>

IGNEA, C., C. DOROBANALU, C. MINTOFF, N. BRANZA-NICHITA, et al. Modulation of the antioxidant/pro-oxidant balance, cytotoxicity and antiviral actions of grape seed extracts. *Food Chemistry* [online]. 2013, 141(4), 3967–3976 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613008716>

ISENBERG, H. D., V. TUCCI, F. CINTRON, C. SINGER, et al. Single-source outbreak of *Candida tropicalis* complicating coronary bypass surgery. *J Clin Microbiol* [online]. 1989, 27(11), 2426–2428 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/27/11/2426.short>

JAYAPRAKASHA, G. K., T. SELVI a K. K. SAKARIAH. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International* [online]. 2003, 36(2), 117–122 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996902001163>

JAYAPRAKASHA, G. K., R. P. SINGH a K. K. SAKARIAH. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chemistry* [online]. 2001, 73(3), 285–290 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814600002983>

JIN, H., M. LIU, X. ZHANG, J. PAN, et al. Grape seed procyanidin extract attenuates hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting oxidative stress and pulmonary arterial smooth muscle cells proliferation. *The Journal of Nutritional Biochemistry* [online]. 2016, 36, 81–88 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286316303175>

JOSHI, S. S., X. SU a D. H. D'SOUZA. Antiviral effects of grape seed extract against feline calicivirus, murine norovirus, and hepatitis A virus in model food systems and under gastric conditions. *Food Microbiology* [online]. 2015, 52, 1–10 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002015001057>

KAKAEI, S. a Y. SHAHBAZI. Effect of chitosan-gelatin film incorporated with ethanolic red grape seed extract and *Ziziphora clinopodioides* essential oil on survival of *Listeria monocytogenes* and chemical, microbial and sensory properties of minced trout fillet. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2016, 72, 432–438 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643816302791>

KAPER, J. B., J. P. NATARO a H. L. T. MOBLEY. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology* [online]. 2004, 2(2), 123–140 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/224638508?accountid=28016>

KATALINIĆ, V., S. S. MOŽINA, I. GENERALIĆ, D. SKROZA, et al. Phenolic Profile, Antioxidant Capacity, and Antimicrobial Activity of Leaf Extracts from Six *Vitis vinifera* L. Varieties. *International Journal of Food Properties* [online]. 2013, 16(1), 45–60 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10942912.2010.526274>

KATALINIĆ, V., S. S. MOŽINA, D. SKROZA, I. GENERALIĆ, et al. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry* [online]. 2010, 119(2), 715–723 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609008942>

KAYAOGLU, G. a D. ØRSTAVIK. Virulence Factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to Endodontic Disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* [online]. 2004, 15(5), 308–320 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/154411130401500506>

KIM, S.-Y., S.-M. JEONG, W.-P. PARK, K. C. NAM, et al. Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extracts. *Food Chemistry* [online]. 2006, 97(3), 472–479 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605004024>

KIM, T. J., W. L. WENG, J. STOJANOVIC, Y. LU, et al. Antimicrobial effect of water-soluble muscadine seed extracts on *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot* [online]. 2008, 71(7), 1465–1468 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/2008/00000071/00000007/art00021>

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2003, 88(2–3), 123–131 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503001752>

KLEIN, G., A. PACK, C. BONAPARTE a G. REUTER. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1998, 41(2), 103–125 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816059800049X>

KONTOYIANNIS, D. P., I. VAZIRI, H. A. HANNA, M. BOKTOUR, et al. Risk Factors for *Candida tropicalis* Fungemia in Patients with Cancer. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2001 2001, 33(10), 1676–1681 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://cid.oxfordjournals.org/content/33/10/1676.short>

KOTHAVADE, R. J., M. M. KURA, A. G. VALAND a M. H. PANTHAKI. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2010, 59(8), 873–880 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.013227-0>

KOTIRANTA, A., K. LOUNATMAA a M. HAAPASALO. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection* [online]. 2000, 2(2), 189–198 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457900002690>

KULKARNI, S., F. A. DESANTOS, S. KATTAMURI, S. J. ROSSI, et al. Effect of grape seed extract on oxidative, color and sensory stability of a pre-cooked, frozen, re-heated beef sausage model system. *Meat Science* [online]. 2011, 88(1), 139–144 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21193269>

KUMARASAMY, K. K., M. A. TOLEMAN, T. R. WALSH, J. BAGARIA, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases* [online]. 2010, 10(9), 597–602 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309910701432>

LEIFERT, W. R. a M. Y. ABEYWARDENA. Grape seed and red wine polyphenol extracts inhibit cellular cholesterol uptake, cell proliferation, and 5-lipoxygenase activity. *Nutrition Research* [online]. 2008, 28(12), 842–850 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0271531708001930>

LEONARD, E., Y. YAN, Z. L. FOWLER, Z. LI, et al. Strain Improvement of Recombinant *Escherichia coli* for Efficient Production of Plant Flavonoids. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2008, 5(2), 257–265 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: [pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/mp7001472](http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/mp7001472)

LI, Z., M. R. KOSOROK, P. M. FARRELL et al. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA* [online]. 2005, 293(5), 581–588 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/200290>

LIN, S., M. CHEN, H. JIANG, L. FAN, et al. Green electrospun grape seed extract-loaded silk fibroin nanofibrous mats with excellent cytocompatibility and antioxidant effect. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2016, 139, 156–163 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776515303490>

LIU, J., W. Y. ZHANG, Z. H. KONG a D. G. DING. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by grape seed procyanidin extract in human bladder cancer BIU87 cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* [online]. 2016, 20(15), 3282–3291 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27467005#>

LYCZAK, J. B., C. L. CANNON a G. B. PIER. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection* [online]. 2000, 2(9), 1051–1060 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457900012594>

MAGYAR, K., R. HALMOSI, A. PALFI, G. FEHER, et al. Cardioprotection by resveratrol: A human clinical trial in patients with stable coronary artery disease. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* [online]. 2012, 50(3), 179–187 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22240353>

MAHMOUDI, M., K. CHARRADI, F. LIMAM a E. AOUANI. Grape seed and skin extract as an adjunct to xenical therapy reduces obesity, brain lipotoxicity and oxidative stress in high fat diet fed rats. *Obesity Research and Clinical Practice* [online]. 2016 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27161420>

MATIAS, A. A., A. T. SERRA, A. C. SILVA, R. PERDIGAO, et al. Portuguese winemaking residues as a potential source of natural anti-adenoviral agents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* [online]. 2010, 61(4), 357–368 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20109126>

MCARDLE, J. J. Growth Curve Analysis. *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences* [online]. 2001, p. 6439–6445 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0080430767007476>

MEZNI, A., A. KHAZRI, O. KHAZRI, F. LIMAM, et al. Neuroprotective Activity of Grape Seed and Skin Extract Against Lithium Exposure Using Proteomic Research. *Molecular Neurobiology* [online]. 2016, 1–11 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12035-016-9853-y>

MILITARU, C., I. DONOIU, A. CRACIUN, I. D. SCOREI, et al. Oral resveratrol and calcium fructoborate supplementation in subjects with stable angina pectoris: Effects on lipid profiles, inflammation markers, and quality of life. *Nutrition* [online]. 2013, 29(1), 178–183 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089990071200278X>

MOKNI, M., S. HAMPLAOUI, S. KADRI, F. LIMAM, et al. Efficacy of grape seed and skin extract against doxorubicin-induced oxidative stress in rat liver. *Pak J Pharm Sci* [online]. 2015, 28(6), 1971–1978 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26639474>

MORENO, D. A., N. ILIC, A. POULEV, D. L. BRASAEMLE, et al. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition* [online]. 2003, 19(10), 876–879 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900703001679>

MORRISON, A. J. a R. P. WENZEL. Epidemiology of Infections Due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 1984, 6(3), 627–642 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: [http://cid.oxfordjournals.org/content/6/Supplement\\_3/S627.abstract](http://cid.oxfordjournals.org/content/6/Supplement_3/S627.abstract)

MURGA, R., R. RUIZ, S. BELTRÁN a J. L. CABEZAS. Extraction of Natural Complex Phenols and Tannins from Grape Seeds by Using Supercritical Mixtures of Carbon Dioxide and Alcohol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2000, 48(8), 3408–3412 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf9912506>

NALLAPAREDDY, S. R., K. V. SINGH, SILLANP, XE, et al. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *The Journal of Clinical Investigation*

[online]. 2006, 116(10), 2799–2807 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/29021>

NARDUZZI, L., J. STANSTRUP a F. MATTIVI. Comparing Wild American Grapes with *Vitis vinifera*: A Metabolomics Study of Grape Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2015, 63(30), 6823–6834 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.5b01999>

NAWAZ, H., J. SHI, G. S. MITTAL a Y. KAKUDA. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology* [online]. 2006, 48(2), 176–181 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586605002169>

NUCCI, M. a A. L. COLOMBO. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [online]. 2007, 58(1), 77–82 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889306004640>

OZCAN, M. M., A. UNVER a D. ARSLAN. A research on evaluation of some fruit kernels and/ or seeds as a raw material of vegetable oil industry. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* [online]. 2015, 7(2), 187–191 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.wageningenacademic.com/doi/abs/10.3920/QAS2013.0319?trendmd-shared=0&>

ÖZVURAL, E. B. a H. VURAL. Grape seed flour is a viable ingredient to improve the nutritional profile and reduce lipid oxidation of frankfurters. *Meat Science* [online]. 2011, 88(1), 179–183 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174010004523>

PALANIAPPAN, K. a R. A. HOLLEY. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2010, 140(2–3), 164–168 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20457472>

PANTELIC, M. M., D. C. D. ZAGORAC, S. M. DAVIDOVIC, S. R. TODIC, et al. Identification and quantification of phenolic compounds in berry skin, pulp, and seeds



in 13 grapevine varieties grown in Serbia. *Food Chemistry* [online]. 2016, 211, 243–252 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616307324>

PATEIRO, M., R. BERMUDEZ, J. M. LORENZO a D. FRANCO. Effect of Addition of Natural Antioxidants on the Shelf-Life of "Chorizo", a Spanish Dry-Cured Sausage. *Antioxidants (Basel)* [online]. 2015, 4(1), 42–67 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26785337>

PATERSON, D. L. Resistance in Gram-Negative Bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American Journal of Medicine* [online]. 2006, 119(6), 20–28 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735147>

PAVLOUŠEK, P. *Pěstování révy vinné: moderní vinohradnictví*. Praha: Grada, 2011, 333. ISBN 9788024733142.

PENG, J., J. CAO, F. M. NG a J. HILL. Pseudomonas aeruginosa develops Ciprofloxacin resistance from low to high level with distinctive proteome changes. *Journal of Proteomics* [online]. 2017, 152, 75–87 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391916304432>

PICATAGGIO, S., T. ROHRER, K. DEANDA, D. LANNING, et al. Metabolic Engineering of *Candida Tropicalis* for the Production of Long-Chain Dicarboxylic Acids. *Nat Biotech* [online]. 1992, 10(8), 894–898 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.nature.com/nbt/journal/v10/n8/abs/nbt0892-894.html>

PIZZO, G., G. GIULIANA, M. E. MILICI a R. GIANGRECO. Effect of dietary carbohydrates on the *in vitro* epithelial adhesion of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei*. *The new microbiologica* [online]. 2000, 23(1), 63–71 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10946407>

POOLMAN, J. T. *Escherichia coli*. *International Encyclopedia of Public Health (Second Edition)* [online]. 2017, 585–593 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012803678500504X>

PORMAN, A. M., K. ALBY, M. P. HIRAKAWA a R. J. BENNETT. Discovery of a phenotypic switch regulating sexual mating in the opportunistic fungal pathogen *Candida tropicalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2011

2011, 108(52), 21158–21163 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.pnas.org/content/108/52/21158.short>

RAINA, K., A. TYAGI, D. KUMAR, R. AGARWAL, et al. Role of oxidative stress in cytotoxicity of grape seed extract in human bladder cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2013, 61, 187–195 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23831192>

RAS, R. T., P. L. ZOCK, Y. E. M. P. ZEBREGS, N. R. JOHNSTON, et al. Effect of polyphenol-rich grape seed extract on ambulatory blood pressure in subjects with pre- and stage I hypertension. *British Journal of Nutrition* [online]. 2013, 110(12), 2234–2241 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23702253>

REDDY, G. V. B., A. R. SEN, P. N. NAIR, K. S. REDDY, et al. Effects of grape seed extract on the oxidative and microbial stability of restructured mutton slices. *Meat Science* [online]. 2013, 95(2), 288–294 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174013001368>

REINTHALER, F. F., J. POSCH, G. FEIERL, G. WÜST, et al. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Research* [online]. 2003, 37(8), 1685–1690 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135402005699>

JORGENSEN, J. H. a M. J. FERRARO. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2009, 49(11), 1749–1755 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://cid.oxfordjournals.org/content/49/11/1749.full>

RODRÍGUEZ VAQUERO, M. J. a M. C. MANCA DE NADRA. Growth Parameter and Viability Modifications of *Escherichia coli* by Phenolic Compounds and Argentine Wine Extracts. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. 2008, 151(2), 342–352 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12010-008-8197-0>

ROMEYER, F. M., J.-J. MACHEIX a J.-C. SAPIE. Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seeds. *Phytochemistry* [online].

1985, 25(1), 219–221 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200945321>

ROWAN, N. J. a J. G. ANDERSON. Diarrhoeal enterotoxin production by psychrotrophic *Bacillus cereus* present in reconstituted milk-based infant formulae (MIF). *Letters in Applied Microbiology* [online]. 1998, 26(2), 161–165 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1472-765X.1998.00301.x/pdf>

SAHPAZIDOU, D., G. D. GEROMICHALOS, D. STAGOS, A. APOSTOLOU, et al. Anticarcinogenic activity of polyphenolic extracts from grape stems against breast, colon, renal and thyroid cancer cells. *Toxicology Letters* [online]. 2014, 230(2), 218–224 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427414000629>

SHI, J., J. YU, J. E. POHORLY a Y. KAKUDA. Polyphenolics in Grape Seeds- Biochemistry and Functionality. *Journal of Medicinal Food* [online]. 2003, 6(4), 291–299 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/109662003772519831>

SILVA, S., M. NEGRI, M. HENRIQUES, R. OLIVEIRA, et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2012, 36(2), 288–305 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://femsre.oxfordjournals.org/content/36/2/288.full>

SIVAPRAKASAPILLAI, B., I. EDIRISINGHE, J. RANDOLPH, F. STEINBERG, et al. Effect of grape seed extract on blood pressure in subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism* [online]. 2009, 58(12), 1743–1746 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026049509002455>

SOFI, F. R., C. V. RAJU, I. P. LAKSHMISHA a R. R. SINGH. Antioxidant and antimicrobial properties of grape and papaya seed extracts and their application on the preservation of Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) during ice storage. *J Food Sci Technol* [online]. 2016, 53(1), 104–117 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26787935>

- STRATEVA, T. a D. YORDANOV. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2009, 58(9), 1133–1148 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.009142-0#tab2>
- SU, X. a D. H. D'SOUZA. Grape seed extract for foodborne virus reduction on produce. *Food Microbiol* [online]. 2013, 34(1), 1–6 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002012002304>
- SWARTZ, J. R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2001, 12(2), 195–201 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166900001993>
- TAYLOR, A. J. a R. J. GILBERT. *Bacillus cereus* food poisoning: a provisional serotyping scheme. *J Med Microbiol* [online]. 1975, 8(4), 543–550 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/813000>
- TAYLOR, P. W., J. M. T. HAMILTON-MILLER a P. D. STAPLETON. Antimicrobial properties of green tea catechins. *Food science and technology bulletin* [online]. 2005, 2, 71–81 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2763290/>
- TE GIFFEL, M. C., R. R. BEUMER, P. E. GRANUM a F. M. ROMBOUTS. Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in the Netherlands. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1997, 34(3), 307–318 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160596012044>
- TEITZEL, G. M. a M. R. PARSEK. Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2003, 69(4), 2313–2320 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/69/4/2313.full>
- TOLEDO-ARANA, A., J. VALLE, C. SOLANO, M. A. J. ARRIZUBIETA, et al. The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm

Formation. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2001, 67(10), 4538–4545 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/67/10/4538.short>

TOMÉ-CARNEIRO, J., M. GONZÁLVEZ, M. LARROSA, M. J. YÁÑEZ-GASCÓN, et al. One-year consumption of a grape nutraceutical containing resveratrol improves the inflammatory and fibrinolytic status of patients in primary prevention of cardiovascular disease. *American Journal of Cardiology* [online]. 2012, 110(3), 356–363 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002914912010466>

TROŠT, K., A. KLANČNIK, B. MOZETIČ VODOPIVEC, M. STERNAD LEMUT, et al. Polyphenol, antioxidant and antimicrobial potential of six different white and red wine grape processing leftovers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2016, 96, 4809–4820 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.7981/pdf>

WANG, J.-T., S.-C. CHANG, H.-Y. WANG, P.-C. CHEN, et al. High rates of multidrug resistance in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* isolated from inpatients and outpatients in Taiwan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [online]. 2013, 75(4), 406–411 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889313000096>

WIRTH, T., D. FALUSH, R. LAN, F. COLLES, et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology* [online]. 2006, 60(5), 1136–1151 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x/full>

XU, D., J. XIA, E. ZHOU, D. ZHANG, et al. Accelerated corrosion of 2205 duplex stainless steel caused by marine aerobic *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Bioelectrochemistry* [online]. 2017, 113, 1–8 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539416300925>

YAN, J., W. JIANPING, L. HONGMEI, Y. SULIANG, et al. The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast *Candida tropicalis*. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2005, 24(3), 243–247 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X05000677>

YANG, Y.-L., Y.-A. HO, H.-H. CHENG, M. HO, et al. Susceptibilities of Candida Species to Amphotericin B and Fluconazole: The Emergence of Fluconazole Resistance in Candida tropicalis. *Infection Control & Hospital Epidemiology* [online]. 2004, 25(1), 60–64 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.cambridge.org/core/journals/infection-control-and-hospital-epidemiology/article/susceptibilities-of-candida-species-to-amphotericin-b-and-fluconazole-the-emergence-of-fluconazole-resistance-in-candida-tropicalis/916FEBB347EC25EE81398FDA25A14F09>

YAP, P. S. X., S. H. E. LIM, C. P. HU a B. C. YIAP. Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria. *Phytomedicine* [online]. 2013, 20(8–9), 710–713 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711313000858>

YARAGALLA, S., R. RAJENDRAN, J. JOSE, M. A. ALMAADEED, et al. Preparation and characterization of green graphene using grape seed extract for bioapplications. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2016, 65, 345–353 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493116303484>

ZHAO, W., Q. XIE, A. K. BEDRAN-RUSSO, S. PAN, et al. The preventive effect of grape seed extract on artificial enamel caries progression in a microbial biofilm-induced caries model. *J Dent* [online]. 2014, 42(8), 1010–1018 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24863939>

ZWIETERING, M. H., I. JONGENBURGER, F. M. ROMBOUTS a K. VAN 'T RIET. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* [online]. 1990, 56(6), 1875–1881 [cit. 2017-01-01]. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/56/6/1875.short>