

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Antimikrobiální účinek extraktů kůry vybraných
kambodžských rostlin tradičně používaných proti kažení
palmové šťávy**

Diplomová práce

Bc. Veronika Paňhová

Výživa a potraviny

Ing. Pavel Nový, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Antimikrobiální účinek extraktů kůry vybraných kambodžských rostlin tradičně používaných proti kažení palmové šťávy“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne datum odevzdání _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Pavlu Novému, PhD., za odborné vedení této diplomové práce, za významnou pomoc, všestranné rady a trpělivost při zpracování. Dále bych chtěla poděkovat odbornému týmu celé Katedry kvality zemědělských produktů za poskytnutí laboratorního vybavení k provedení analýz.

Antimikrobiální účinek extraktů kůry vybraných kambodžských rostlin tradičně používaných proti kažení palmové šťávy

Souhrn

Pro prodloužení údržnosti se do palmových šťáv tradičně přidává kůra některých druhů stromů. Cílem této diplomové práce bylo ověřit antimikrobiální aktivitu etanolových extraktů z kůry *Azadirachta indica* A. Juss., *Hopea odorata* Roxb., *Careya arborea* Roxb. a *Hopea pierrei* Hance proti mikroorganismům *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans* a dalším druhům izolovaným z různých druhů ovoce *Pantoea agglomerans*, *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*. Tyto izoláty byly před testováním identifikovány pomocí MALDI-TOF MS.

Antimikrobiální aktivita extraktů byla testována pomocí bujónové mikrodiluční metody a výsledky byly vyjádřeny jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC).

Všechny rostlinné extrakty vykazovaly určitou antimikrobiální aktivitu proti většině vybraných mikroorganismům (64–1024 µg/ml). Všechny extrakty byly účinné proti *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *H. uvarum* a alespoň jednomu ze dvou testovaných izolátů *P. agglomerans*. *C. arborea* byla nejúčinnější proti *C. albicans* a *H. uvarum* (64 µg/ml). *H. odorata* vykazovala nejvyšší aktivitu proti *S. aureus*, *P. aeruginosa* a *H. uvarum* (256 µg/ml), *A. indica* inhibovala nejvíce *H. uvarum* (128 µg/ml) a *H. pierrei* byl nejúčinnější proti *S. aureus* a *P. aeruginosa* (256 µg/ml). Žádný z extraktů nebyl účinný proti izolátům *M. pulcherrima*, žádný extrakt nepůsobil při testovaných koncentracích baktericidně proti žádnému z testovaných mikroorganismů.

Výsledky naznačují, že extrakty z kůry vybraných druhů mohou skutečně brzdit proces mikrobiálního kažení a prodloužit tak dobu údržnosti palmové šťávy. Dále by bylo vhodné například ověřit aktivitu proti dalším mikroorganismům či vliv extraktů na alkoholové kvašení v potravních modelech.

Klíčová slova: *Azadirachta indica*; *Careya arborea*; *Hopea odorata*; *Hopea pierrei*; palmová šťáva; antimikrobiální aktivita.

Antimicrobial activity of selected Cambodian barks traditionally used to prevent sugar palm juice spoilage

Summary

To prolong the shelf life of palm juice, traditionally, the bark of some tree species is added. The aim of this diploma thesis was to check the antimicrobial activity of ethanol extracts from barks of *Azadirachta indica* A. Juss., *Hopea odorata* Roxb., *Careya arborea* Roxb. and *Hopea pierrei* Hance against microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans* and other species, which were isolated from fruits, namely *Pantoea agglomerans*, *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*. These isolates were identified by MALDI-TOF MS.

The antimicrobial activity of extracts was determined by the broth microdilution tests. Application and results were recorded as minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC).

All plant extracts demonstrated certain antimicrobial activity against selected microorganisms (64–1024 µg/ml). All extracts were effective against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *H. uvarum* and at least one of the two isolates tested against *P. agglomerans*. *C. arborea* was the most effective against *C. albicans* and *H. uvarum* (64 µg/ml). *H. odorata* showed the highest activity against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *H. uvarum* (256 µg/ml), *A. indica* the most inhibited *H. uvarum* (128 µg/ml) and *H. pierrei* was the most effective against *S. aureus* and *P. aeruginosa* (256 µg/ml). None of the extracts were effective against *M. pulcherrima* and none of the extracts were bactericidal against microorganisms at the tested concentration.

The results suggest that extracts from bark of selected plant species can actually inhibit the process of microbial spoilage and prolong the shelf life of palm juice. In the future, it would be appropriate, for example, to verify the activity against other microorganisms or the effect of extracts on alcoholic fermentation in food models.

Keywords: *Azadirachta indica*; *Careya arborea*; *Hopea odorata*; *Hopea pierrei*; palm juice; antimicrobial activity.

Obsah

1 Úvod	10
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	11
3 Literární rešerše.....	12
3.1 Ovocné šťávy	12
3.1.1 Prodloužení trvanlivosti ovocných šťáv	12
3.1.2 Palmová šťáva.....	13
3.1.3 Palmy určené k produkci palmové šťávy.....	13
3.1.3.1 <i>Borassus flabellifer</i> L.....	13
3.1.3.2 <i>Phoenix sylvestris</i> Roxb.	14
3.1.3.3 <i>Cocos nucifera</i> L.....	15
3.1.3.4 <i>Raphia</i> spp.....	15
3.1.4 Produkty z palmové šťávy	15
3.1.4.1 Palmové víno.....	15
3.1.4.2 Palmový cukr	16
3.2 Alkoholové kvašení.....	17
3.2.1 Fermentace palmového vína	17
3.3 <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	18
3.3.1 Botanická charakteristika, rozšíření a typický biotop.....	18
3.3.2 Tradiční využití.....	18
3.3.3 Biologická aktivita	19
3.3.4 Bioaktivní složky	19
3.3.4.1 Azadirachtin	20
3.3.4.2 Salannin.....	20
3.3.4.3 Nimbolid	20
3.3.4.4 Gedunin.....	21
3.3.4.5 Alkaloidy.....	21
3.3.4.6 Taniny	22
3.3.4.7 Flavonoidy.....	22
3.4 <i>Careya arborea</i> Roxb.	23
3.4.1 Botanická charakteristika, rozšíření a typický biotop.....	23
3.4.2 Tradiční využití.....	23
3.4.3 Biologická aktivita	24
3.4.4 Bioaktivní složky	24
3.4.4.1 Steroly	25
3.4.4.2 Kumariny.....	25

3.4.4.3	Saponiny	26
3.4.4.4	Betulin, betulinová kyselina	26
3.5	<i>Hopea odorata</i> Roxb.	27
3.5.1	Botanická charakteristika, rozšíření a typický biotop.....	27
3.5.2	Tradiční využití.....	27
3.5.3	Biologická aktivita.....	28
3.5.4	Bioaktivní složky	28
3.5.4.1	Resveratrol - hopeafenol, vaticanol B.....	28
3.6	<i>Hopea pierrei</i> Hance	29
3.7	Antimikrobiální účinky fytochemikálií	32
3.7.1	Metody testování antimikrobiální aktivity <i>in-vitro</i>	32
3.7.2	Vyhodnocení a detekce antimikrobiální aktivity	33
3.8	Testované mikroorganismy	35
3.8.1	<i>Bacillus cereus</i>	35
3.8.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	36
3.8.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
3.8.4	<i>Escherichia coli</i>	37
3.8.5	<i>Pantoea agglomerans</i>	38
3.8.6	<i>Candida albicans</i>	38
3.8.7	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	39
3.8.8	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	39
3.9	MALDI-TOF MS	40
4	Metodika	42
4.1	Použité chemikálie	42
4.2	Použité přístroje	42
4.3	Testované mikroorganismy	43
4.3.1	Izolace mikroorganismů z ovoce	43
4.3.2	Identifikace izolátů pomocí MALDI-TOF MS Biotyper.....	43
4.3.2.1	Extrakce pomocí TFA.....	43
4.3.2.2	Extrakce pomocí etanolu a kyseliny mravenčí	44
4.4	Příprava rostlinných extraktů	44
4.5	Stanovení antimikrobiální aktivity	45
4.5.1	Příprava kultivačních médií	45
4.5.2	Příprava inokula	45
4.5.3	Příprava antibiotik a rostlinných vzorků.....	46
4.5.4	Mikrodiluční test.....	46
4.5.5	Minimální baktericidní koncentrace	46
5	Výsledky	48
5.1	MIC a MBC základních řad testovaných mikroorganismů	48

5.2	MIC a MBC izolovaných mikroorganismů z ovoce	48
6	Diskuze	51
7	Závěr	55
8	Literatura.....	56
9	Seznam použitých tabulek.....	69
10	Seznam použitých zkratek a symbolů	70

1 Úvod

Ovocné šťávy se v poslední době stávají součástí mnoha dietních procedur. Jsou bohatým zdrojem biologicky aktivních složek, které přispívají k dobrému zdraví a snižují riziko chronických onemocnění (Henning et al. 2017). Nicméně přírodní ovocné šťávy jsou velmi náchylné ke zhoršení své kvality, což zvyšuje nároky na způsoby konzervace při současném zachování původních složek a organoleptických vlastností.

K prodloužení trvanlivosti ovocných šťáv se používají různé postupy a techniky, včetně termálních a netermálních pasterizačních metod (Ephrem et al. 2018). Za další metody konzervace lze považovat přidávání přísad do šťáv. Tradičně se tak děje v Kambodži, kde domorodci přidávají kůru z rostlin do palmové šťávy k prodloužení její trvanlivosti, a to díky inhibici růstu mikroorganismů, které se ve šťávě přirozeně vyskytují (MSc. Rithy Chrun, osobní sdělení, 2017).

Palmová šťáva je velmi populární pro svůj obsah zdraví prospěšných nutrientů a je široce konzumována napříč celou jihovýchodní Asií (Lasekan & Abbas 2010). Palmová šťáva má velmi krátkou trvanlivost, kdy již po jednom dni začíná fermentovat (MSc. Rithy Chrun, osobní sdělení, 2017). Procentuální obsah alkoholu se u ní zvyšuje ze 4 % na 5-8 %, a ze šťávy se tak postupně stává palmové víno (Jha et al. 2019).

Azadirachta indica, *Careya arborea*, *Hopea odorata*, *Hopea pierrei* jsou typické rostliny, ze kterých se získává kůra do palmové šťávy (MSc. Rithy Chrun, osobní sdělení, 2017). Tyto rostliny mají dlouholeté léčebné užití v Kambodžském království. V odlehlých oblastech je tradiční medicína první linií lékařské péče. Různé části těchto rostlin (listy, plody, květy, kořeny) se užívají k léčbě průjmu, horeček, bolesti, malárii atd. (Keo et al. 2018).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cíle předkládané diplomové práce:

Teoretická část pojednává o ovocných šťávách s vyzdvižením palmové šťávy, způsobu jejího získávání a vlivu na lidské zdraví. Dále se zaměřuje na rostlinné druhy, které slouží k prodloužení trvanlivost této šťávy a způsoby testování antimikrobiální aktivity, včetně vyhodnocení.

Úkolem praktické části je otestovat antimikrobiální aktivitu extraktů kůry vybraných kambodžských rostlin, které se tradičně používají proti kažení palmové šťávy, proti vybraným druhům mikroorganismů *in-vitro*. A dále určení minimální inhibiční koncentrace a minimální baktericidní, popř. fungicidní koncentrace proti vybraným mikroorganismům.

Hypotéza: Na základě tradičního užití kůry kambodžských rostlin proti kažení palmové šťávy lze předpokládat, že tyto extrakty budou vykazovat antimikrobiální aktivitu proti některým kvasinkám a bakteriím.

3 Literární rešerše

3.1 Ovocné šťávy

Se zvyšujícím se povědomím o vztahu mezi stravou a zdravím získávají nealkoholické nápoje s vysokým obsahem ovocné složky stále vyšší popularitu. V ovoci a zelenině se vyskytují cukry, organické látky a minerální látky, které představují hlavní formu rozpustných pevných látek v zeleninových a ovocných nápojích. Tyto látky mohou být metabolizovány na jiné sloučeniny během fermentačního procesu pro obohacení kvality a zdraví. Ovocné nápoje se vyznačují nejen příjemnou vůní a chutí, ale vykazují dále mnoho zdraví prospěšných přínosů. Jsou aktivní při odstraňování volných radikálů a zlepšují gastrointestinální zdraví konzumenta (Yang et al. 2018). Přítomné mikroorganismy ve šťávách jsou zodpovědné za kvašení, nemoci přenášené potravinami a kažení potravin (Iqbal et al. 2016).

Kažení potravin je rostoucí problém ve všech zemích světa (Phinney et al. 2019). Odhady Organizace pro výživu a zemědělství vedou k závěru, že asi 1/3 jídla nikdy nedosáhne konečných spotřebitelů (FAO 2011). V zemích s nízkými příjmy se více než 40 % potravin kazí již během sklizně a ve fázi zpracování. Metody konzervování ovoce jsou energeticky náročné, drahé a vyžadují dobrou infrastrukturu, tudíž často nejsou k dispozici ve venkovských a odlehklých oblastech v zemi s nízkými příjmy obyvatel (Phinney et al. 2019).

3.1.1 Prodloužení trvanlivosti ovocných šťáv

Tradičně se trvanlivost ovocných šťáv prodlužuje tepelným zpracováním (Rupasinghe & Yu 2012). Pasterizace je metoda konzervace za užití převážně vysokých teplot. Tato metoda vede k dysfunkčním účinkům na výživu a energetickou hodnotu potravin. Jedná se kupříkladu o ztrátu vitamínů, nutriční chuti, neenzymatické hnědnutí a proteinové přeměny. Aby se snížily nepříznivé účinky metody tepelné pasterizace, lze použít i jiné metody schopné inaktivace mikroorganismů. Užívají se například netermální metody včetně pasterizace pomocí zpracování vysokým hydrostatickým tlakem, elektrických polí nebo ultrazvukových vln (Samani et al. 2015).

Další metodou může být použití konzervantů. Konzervanty jsou běžně známé přírodní nebo syntetické látky. Přidávají se do ovocných šťáv, aby se zvýšila jejich kvalita a skladovatelnost. Kromě výhod se mohou projevit i některé život ohrožující účinky umělých konzervantů (Iqbal et al. 2016). Mezi nejčastěji používané konzervanty patří sorbát draselný a benzoát sodný. Z přírodních antimikrobiálních látek to jsou bakteriociny, organické kyseliny, éterické oleje a fenolické sloučeniny (Rupasinghe & Yu 2012).

Separční techniky jsou vysoce selektivní metody s nízkou provozní teplotou. Membránové technologie umožňují makroskopické separace (např. koncentrace, vyčerpání, frakcionace) i specifické izolační a purifikační operace (regenerace aroma, regulace obsahu cukru, čištění bioaktivních sloučenin). Klíčovými kroky jsou operace čištění a koncentrace během zpracování ovocných šťáv, pro které se užívá mikrofiltrace (Rouquié et al. 2019).

Použití rostlin (zejména koření a bylin) jako konzervačních látek v potravinách se praktikuje od starověku, jejich antimikrobiální povaha se připisuje aromatickým molekulám, které se nacházejí v jejich éterických olejích. Tyto oleje mají široký rozsah antimikrobiální

aktivity proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím, kvasinkám a plísním. Příkladem může být jablečná šťáva, kdy po přidání skořicové kůry dojde k inhibici *Salmonella enterica* a *Escherichia coli* 0157:H7, přičemž hladiny inhibice se zvyšují s inkubační teplotou a časem (Muthuswamy et al. 2008).

3.1.2 Palmová šťáva

Palmová šťáva se získává z mízy různých druhů palm (Lasekan et al. 2007). Míza se shromažďuje klepnutím do neotevřené palice palmy. Do malého řezu v kůře, v délce asi 15 cm, od vrcholu kmene se vloží bambusová trubka pro sběr mízy a čistá nádoba je svázána kolem stromu, aby mízu zachytila (Lasekan et al. 2007; Chandrasekhar et al. 2012). Míza se shromažďuje každý den a měla by být spotřebována za 5-12 hodin od odběru. Čerstvá palmová šťáva je čirá a bezbarvá tekutina se sladkou chutí (Chandrasekhar et al. 2012).

Palmová šťáva je vysoce výživná a nápomocná při trávicích obtížích. Šťáva je průzračná, s obsahem cukru 100-144 g/kg, hodnotou pH 7,0-7,4 a obsahuje stopy etanolu. Z pohledu spotřebitele mezi nejatraktivnější rysy palmového džusu patří chuť a výživová hodnota. Šťáva obsahuje cukry, proteiny, lipidy, vitamín A, B-komplex, vitamín C a minerální látky. Má protizánětlivé a imunosupresivní účinky (Lasekan et al. 2007).

Za klíčové aromatické látky v palmové šťávě jsou považovány ethyllaktát, fenyletanol, 3-hydroxyl-2-pentanon, farnesol, 3-methyltetrahydrofuran a tetradekanon. Analýza těkavých sloučenin tepelně zpracované palmové šťávy poskytuje 30 zápachově účinných sloučenin. Tyto sloučeniny lze roztrždit do čtyř skupin, a to na N-heterocyklické sloučeniny, O-heterocyklické sloučeniny, aldehydy a ketony. Teploty nad 110 °C vedou k téměř exponenciálnímu zvýšení tvorby pyrazinových sloučenin a typickému aroma pražených ořechů palmového cukru (Lasekan & Abbas 2010).

3.1.3 Palmy určené k produkci palmové šťávy

Mezi palmy můžeme zahrnout vytrvalé liány, keře a stromy. Vyskytují se od 44° severní šířky do 44° jižní šířky. Téměř 2 600 druhů palm se nachází v tropických a teplých mírných pásmech. Mnoho běžných produktů a potravin pochází z palm, například tradiční čerstvé šťávy a fermentované nápoje, koncentrované sirupy (med, hnědý cukr) (Hebbar et al. 2018).

V jihovýchodní Asii je k dispozici několik druhů palm, které jsou rozsáhle využívány ke sklizni sladké šťávy: *Borassus flabellifer*, *Phoenix sylvestris*, *Cocos nucifera*, *Arenga saccharifera*, *Nypa fructicans* a *Corypha elata* (Chandrasekhar et al. 2012; Shetty et al. 2017).

3.1.3.1 *Borassus flabellifer* L.

Borassus (Palmyra) je rod šesti druhů vějířovitých palm, které jsou rozšířeny po celé Indii, Jižní Africe, Mexiku a dalších zemí. Tyto palmy jsou schopné dorůst do výšky 30 metrů. Listy jsou vějířovitého tvaru s délkou 2 až 3 metry (Chandrasekhar et al. 2012). Staré listy zůstávají připoutány ke stromu několik let a poté volně padají. Plody jsou černé až hnědé se sladkou vláknitou dužinou a každé semeno je uzavřené v dřevitém endokarpu (Decree 2005).

Tato palma je zdrojem příjmů v různých ročních obdobích (viz příloha II). Palma začíná produkovat květenství za 15-20 let od vysazení v závislosti na půdních podmínkách. Strom

vytváří šťávu i po 70 let svého života a lze ji sbírat tři měsíce v roce, pokud se jedná o samčí strom, a pět až šest měsíců v případě samičího stromu. Průměrný výnos palmy činí v průměru 5 kg šťávy denně z jednoho stromu. Stromy se vyskytují většinou na písčité půdě s pH okolo 5,5 (Borin 1996). V Kambodži je tento strom národní symbol flóry (Chandrasekhar et al. 2012).

Ovoce se může běžně konzumovat, má černou slupku a roste ve shlucích. Po dosažení plné zralosti jej lze použít jako dezert nebo k přípravě koláče. Dalším užitím palmy je palmová šťáva. Existují dva typy, kyselá a sladká palmová šťáva

- kyselá se používá jako alkohol
- sladká je používána pro vaření a prodej.

Listy se užívají k výrobě rohoží, čepic, doškových střech, košů, deštníků, pro náboženské obřady, balení potravin, jako psací materiály a suvenýry. Stonek listů lze odloupnout a použít jako provaz. Kmen se používá ke stavbě lodí, zdí, plotů. Černé dřevo je tvrdé, těžké a trvanlivé, a proto je vysoce ceněné ke stavebním účelům (Decree 2005).

Palma má stimulační, diuretické a antiflogistické vlastnosti (Ghosh et al. 2011). Ovocná dužina má mnoho léčivých využití, například při léčbě zánětlivých stavů kůže, nevolnosti, zvracení a napadení červy. Palmová dužina je bohatá na karotenoidy, flavonoidy a vitamíny, zejména na vitamíny skupiny B, dále A a C.

I přes uvedené zdravotní benefity palmová dužina a šťáva nejsou široce rozšířeny. Tento fakt může být způsoben obtížnou extrakcí dužiny a šťávy z důvodu vysoce komplexní vláknité struktury zralého ovoce. Jejich ruční i mechanická extrakce je neefektivní, a ne příliš populární (Mohanty et al. 2018).

3.1.3.2 *Phoenix sylvestris* Roxb.

Datlová palma je druh kvetoucí rostliny nacházející se převážně v jižním Pákistánu, Indii a Bangladéši. Typické pro její výskyt jsou rostoucí pláně a křoviny s nadmořskou výškou vyšší než 1 300 metrů (Chandrasekhar et al. 2012). Strom dosahuje výšky 7,5 až 15 metrů a jeho listy mohou být dlouhé až 4 metry. Květy jsou bílé, vonné a objevují se pouze od března do dubna (Hasan et al. 2010).

Palma je všestranná a vytrvalá odolávat negativním vlivům. Poskytuje zdroj obživy, materiál pro přístřeší a palivo, a to i v prostředí, kde je jen relativně málo rostlin schopno růstu. Nevyžaduje pro vzkvétání slunce a dobře prosperuje i ve stínu (Chowdhury et al. 2008).

Ovoce z této palmy se využívá k výrobě vína (Chandrasekhar et al. 2012). Plodům jsou přisuzovány regenerační účinky a slouží jako tonikum. Kořeny se užívají při bolestech zubů. Čerstvá nefermentovaná míza je osvěžující sladký nápoj a dobrý zdroj vitamínu skupiny B. Listy se užívají pro výrobu rohoží, košťat, rybářských sítí atd. (Hasan et al. 2010). Kmenové dřevo je dobrým zdrojem paliva (Hebbar et al. 2018).

Tento druh palmy produkuje mízu pouze sezónně. Míza se používá k výrobě tradičních sladidel a je oporou zejména bangladéšské kuchyně (Chowdhury et al. 2008). Výnos cukru činí 40 kg na jeden strom za rok (Hebbar et al. 2018).

Plody palmy jsou zdrojem aminokyselin (hlavně alaninu), dále vitamínů A, D, C a skupiny B, cukrů, taninů a flavonoidů (Shajib et al. 2015).

3.1.3.3 *Cocos nucifera* L.

Kokosová palma patří do rodu *Cocos*. Strom dorůstá do výšky 30 metrů, listy jsou zpeřené, 4 až 6 metrů dlouhé (Chandrasekhar et al. 2012). Palma pochází z Malajsie, Polynésie a jižní Asie, avšak v posledních deseti letech je plodná především v Jižní Americe, Indii a na tichomořských ostrovech (Zakaria et al. 2006).

Palmová šťáva je průhledný, sladký sirup obsahující 15 % sacharidů, hlavně ve formě sacharózy. Tento sladký sirup téměř okamžitě podléhá fermentaci skupinou heterogenních mikroorganismů. Fermentovaná šťáva je mléčně bílá tekutina obsahující 6-7 % alkoholu a obsahuje značné množství živých mikroorganismů (Atputharajah et al. 1986). Fermentovaný nápoj má značný potenciál pro použití jako biopalivo (Shetty et al. 2017).

Šťáva se v lidové medicíně používá na léčbu celé řady nemocí, například proti horečkám, žaludečním potížím, bolestem hlavy, průjmům či úplavici. Šťáva obsahuje přírodní minerální látky a vysoce kvalitní bílkoviny.

Vodný extrakt *C. nucifera* a metanolový extrakt mají antibakteriální vlastnosti proti *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* a *Salmonella* spp. (Zakaria et al. 2006).

3.1.3.4 *Raphia* spp.

Palma *Raphia* je tropická plodina, která pro svůj růst potřebuje dostatek dešťových srážek, vysokou teplotu, vysokou relativní vlhkost vzduchu atd.

Listy palmy se užívají ke krytí před Sluncem a kmen produkuje palmovou mízu, která se pije jako nápoj. Fermentovaná míza může být destilována na alkohol. Larvy brouků, které se získávají z infikovaných palem, jsou pochoutkou. Kmen stromu může posloužit jako palivové dřevo. Mezokarp ze zralého ovoce poskytuje jedlý olej (Obahiagbon & Osagie 2007).

Čerstvá šťáva se skládá z bílkovin, organických kyselin, vitamínu (kyselina askorbová, thiamin, riboflavin atd.) a minerálních prvků (Obahiagbon 2009). Dále obsahuje významné množství cukrů, jako jsou například sacharóza, glukóza, fruktóza, celobióza, maltóza, xylóza, arabinóza a kyselina galakturonová. Cukr přítomný v míze se fermentuje divokými kvasinkami na palmové víno (Morah & Robinson 2015).

Bylo prokázáno, že extrakt z kůry *Sacoglottis gabonensis* inhibuje růst mikroorganismů vyskytujících se v palmovém víně z *Raphia* spp. Palmové víno se obvykle konzumuje čerstvé, a je proto důležité zachování organoleptických vlastností a prodloužení trvanlivosti, která je přirozeně asi 24 hodin, pokud se do vína přidá výtažek z kmenové kůry *S. gabonensis* (Morah & Robinson 2015).

3.1.4 Produkty z palmové šťávy

3.1.4.1 Palmové víno

Palmové víno (neboli toddy) je obecný název pro skupinu alkoholických nápojů získávaných kvašením šťávy z palem (Morah & Robinson 2015). Víno je tradičním nápojem pro svatební a náboženské obřady nebo festivaly (Chandrasekhar et al. 2012). Toddy je považován za nápoj, který se v moderní medicíně nekonzumuje z důvodu obsahu kvasinek

a jiných atmosférických kontaminujících organismů, které obsahuje, avšak je konzumován osobami žijícími v nižších socioekonomických třídách zejména v Indii (Ghosh et al. 2011).

Jeden litr palmového vína obsahuje přibližně 300 kalorií, 0,5-2 g bílkovin a značné množství vitamínů A, C a K. Aroma vína ovlivňují sloučeniny, které vyvolávají typické alkoholické, slané, květinové, ovocné tóny vína. Bylo identifikováno 82 komponent, které toto aroma způsobují (Chandrasekhar et al. 2012).

Palmové víno je bělavá míza s pH okolo 3,6 a obsahem alkoholu 3,3-4,0 % v závislosti na stupni kvašení, při kterém se víno konzumuje, a druhu palmy. Víno obsahuje silné suspenze kvasinek a bakterií, které dodávají vínu mléčně bílý vzhled. Tyto mikroorganismy metabolizují cukry v čerstvém víně během 36-48 hodin a produkují různé organické kyseliny a alkoholy (Lasekan et al. 2007).

Sběrači si vybírají kvalitní květní pupen, který našťípnu speciálním nástrojem. O dva, nebo tři dny později odkrajují z vrcholu pupenu, aby získali mízu z palmy. Mízu sbírají jednou ráno mezi šestou až osmou hodinou a jednou večer mezi sedmnáctou až osmnáctou hodinou. V této době sbírají nádobu naplněnou mízou, nakrájejí na plátky horní část pupenu a na pupen vloží novou nádobu. Existují dva typy fermentačních procesů, a to fermentace mízy v nádobě, zatímco nádoba visí na stromech, anebo za užití tzv. „mae tek tnatrchu“. Domorodci kvasí mízu na stromech a vkládají několik rostlin, jako kakahs (*Sindora siamensis*), sangkae (*Combretum quadrangulare*) a angkraang (*Ziziphus cambodiana*) do nádoby. Mea tek tnatrchu je vyrobeno z kůry rostlin. Tyto rostliny se spálí, aby se vysušily, položí se do keramického hrnce a poté se nalije míza do hrnce (Yamamoto 2016).

Kvašení může být také provedeno pomocí vinných kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*), které katalyzují rychlou a účinnou přeměnu cukru na alkohol. Činnost kvasinek je ovlivněna teplotou a hodnotou pH prostředí. Teplota řídí metabolismus a rychlost růstu kvasinek. Využití zdroje uhlíku a dusíku závisí také na teplotě, která ovlivňuje výrobu etanolu. Účinky pH na kvasinky se liší v závislosti na specifčnosti kmene (Ghosh et al. 2011).

Mezi mikroorganismy nacházející se v palmovém víně patří jak kvasinky, tak bakterie. Z kvasinek jde hlavně o rody *Saccharomyces* a *Candida*. Minoritní zastoupení může mít i rod *Endomycopsis*. Mezi bakterie patří zejména rody *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Zymomonas*, *E. coli*, *Brevibacterium*, *Pediococcus*, *Corynebacterium*. Z patogenních mikroorganismů nacházejících se v palmovém víně jsou nejpočetnější skupinou rody *Serratia*, *Micrococcus* a *Klebsiella* (Chandrasekhar et al. 2012). Zdrojem těchto mikroorganismů může být voda pochybné kvality, kterou se palmové víno ředí (Morah & Robinson 2015). *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp. a *Saccharomyces* spp. jsou probiotické organismy, které pomáhají produkovat vitamíny, trávicí enzymy a stimulují imunitní systém (Chandrasekhar et al. 2012).

3.1.4.2 Palmový cukr

Z palmové šťávy lze vyrobit palmový cukr, což je pochoutka konzumovaná asijskou populací, která se získává vyvařením palmové šťávy v dřevěných formách do sirupu nebo krystalizací do palmového cukru zvaného jaggery (Lasekan & Abbas 2010; Ghosh et al. 2011).

Jaggery se vyrábí po celém světě pod různými jmény, *gur* (Indie), *Desi* (Pákistán), *Panela* (Mexiko a Jižní Amerika), *Hakuru* (Srí Lanka), *Htanyet* (Barma) atd. Konzumují se přímo nebo

se používají k přípravě sladkých cukrovinek a v tradiční medicíně (Rao et al. 2009). Palmové jaggery jsou téměř stejné jako jaggery, které jsou vyrobené z cukrové třtiny (Vengaiah et al 2013).

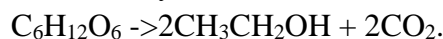
Palmové jaggery jsou vyráběny z mízy palem (*B. flabellifer*, *C. nucifera*, *P. sylvestris*, *Caryota urens*). Jejich produkce je sezónní (Rao et al. 2009).

Nejprve je míza, která se sbírá přímo z nařezaných květů, shromážděna v hliněném hrnci s hašeným vápnem. Vápno spolu s nečistotami je zapotřebí odstranit pomocí sedimentace a následné filtrace. Vyčištěná míza se zahřívá (za stálého míchání) a díky odpařování vody dochází k zakoncentrování roztoku a jeho zhoustnutí. Hustý sirup se poté slévá do nádob a skladuje se v nich, popřípadě se lije do forem a dále dosouší. Podle stupně vysušení sirupu se stanovuje trvanlivost a stupeň krystalizace (Vengaiah et al 2013).

Barva, textura, vůně a chuť jsou do značné míry závislé na sledování a kontrole různých fyzikálních a chemických změn, ke kterým dochází během výroby (Rao et al. 2009). Kvalitu jaggerů lze zlepšit vysrážením vápna plynným oxidem uhličitým, nebo kyselinou citronovou před vařením šťávy (Vengaiah et al 2013).

3.2 Alkoholové kvašení

Procesem alkoholového kvašení se rozumí anaerobní přeměna cukrů, zejména glukózy a fruktózy, na etanol a oxid uhličitý. Tento proces, který provádí kvasinky a také některé bakterie (kupř. *Zymomonas mobilis*), může být shrnut do celkové reakce:



Proces alkoholového kvašení je mnohem složitější. Současně s touto celkovou reakcí dochází k mnoha dalším biochemickým, chemickým a fyzikálně-chemickým procesům, které umožňují přeměnu šťávy na víno. V průběhu výroby, kromě etanolu, vzniká i několik dalších sloučenin, jako jsou vyšší alkoholy, estery, glycerol, kyselina jantarová, diacetyl, acetoin a 2,3-butandiol (Zamora 2009).

Spontánní fermentace je složitý proces, který je ovlivněn mnoha faktory (endogenní mikrobiální flórou, vegetací, klimatickými podmínkami apod.). Výsledek procesu kvašení může být obtížně předvídatelný a může se lišit (Díaz et al. 2013). Spontánního alkoholového kvašení se účastní různé druhy kvasinek. Obvykle se jedná o rody *Kloeckera*, *Hanseniaspora* a *Candida*, které převládají v ranných stádiích fermentace, *Pichia* spp. a *Metschnikowia* spp. pak převládají ve středních stádiích a během poslední fáze fermentace je převládající kvasinkou *S. cerevisiae*, protože má největší odolnost vůči vysoké koncentraci etanolu. Kvasinky rodu *Torulaspora*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* a *Brettanomyces* mohou být také přítomny během alkoholového kvašení, a dokonce i ve víně samotném, což může způsobit organoleptické defekty (Zamora 2009).

3.2.1 Fermentace palmového vína

Stejně jako mnoho jiných tradičních fermentovaných potravin je výroba palmového vína prastarou metodou ovlivnitelnou náhodou inokulace a nekontrolovaným kvašením. Proto se vykytují rozdíly ve kvalitě a stabilitě produktu.

S. cerevisiae je druh kvasinky, který se vyskytuje nejčastěji ve fermentovaných nápojích a potravinách. Při domácí fermentaci koexistuje tato kvasinka často s jinými mikroorganismy.

Také bakterie mléčného kvašení hrají důležitou roli při fermentaci a konzervaci potravin a krmiv a dále bakterie kyseliny octové, které se podílejí na vývoji octové chuti v palmovém víně. Bakterie mléčného kvašení a bakterie kyseliny octové se v palmovém víně vyskytují ve vysokých koncentracích. Druhy kvasinek, které se objevují v palmovém víně, jsou například *S. cerevisiae* a *Schizosaccharomyces*, *Kloeckera apiculata*, *Candida krusei*, a jiné rody *Candida* a *Pichia* (Stringini et al. 2009).

Aroma palmového vína je produktem kvašení. Kvasinky v palmovém víně, zejména *Saccharomyces* spp, jsou do značné míry zodpovědné za produkci těkavých metabolitů, jmenovitě esterů, alkoholů, terpenů a uhlovodíkových sloučenin, které dodávají palmovému vínu charakteristickou vůni. Dále se uvádí, že rozmanitost složení kvasinkové mikroflóry a povaha substrátu významně přispívá k sensorické kvalitě vína (Ezeronye 2004).

3.3 *Azadirachta indica* A. Juss.

3.3.1 Botanická charakteristika, rozšíření a typický biotop

A. indica známá především jako „neem“ patří do čeledi *Meliaceae*. Nejčastěji se vyskytuje v Indii, Bangladéši, Pákistánu a Nepálu. Je to rychle rostoucí strom s výškou 20-30 metrů, který má rovný kmen o průměru 4-5 stop. Plody jsou zelené peckovice, které v průběhu zrání (od června do srpna) změni svou barvu na zlatožlutou (Girish & Shankara 2008).

Strom roste v kamenitých a suchých půdách v různých klimatických podmínkách až do nadmořské výšky 700 metrů. Životnost může dosáhnout více než 200 let. Neemu se dobře daří v oblastech, kde srážky kolísají od 450 mm do 1 200 mm a teploty se pohybují v rozmezí od 0 °C do 49 °C (Saleem et al. 2018).

3.3.2 Tradiční využití

Neem je široce používán v ajurvédské medicíně indickou populací více než 2 000 let pro léčbu různých onemocnění (Faccin-Galhardi et al. 2019).

Na indickém subkontinentu bývá označován za jednu z nejvšestrannějších léčivých rostlin vykazujících široké spektrum biologických aktivit, např. antimalarický, antibakteriální, antivirový, antioxidační, protizánětlivý, antimutagenní a antikarcinogenní účinek. Tradičně se využívá k léčbě zánětů, infekcí, horeček, kožních chorob a zubních onemocnění (Ali et al. 2019).

Vodné extrakty z kůry se používají jako tonikum, stimulanty a léky proti kožním onemocněním. Kůra dále vykazuje protinádorové a interferon indukující aktivity (SaiRam et al. 2000). Kůry a větve se používají proti červům, anorexii, zvracení, stomatologickým problémům, bolestem žaludku a horečkám (Saleem et al. 2018)

Extrakty z listů rostliny mají protizánětlivé účinky (Alzohairy 2016), dále vykazují hypoglykemickou, hypolipidemickou, hepatoprotektivní a hypotenzní aktivity (Saleem et al. 2018). Vodný extrakt z listů vykazuje protiulcerózní a protizánětlivý účinek (Khare 2007) Listy se používají k léčbě očních problémů, revmatismu, anorexii, hojení ran a kožním infekcím.

Semena se využívají jako antihelmintika a antileprotická činidla.

Plody se tradičně používají k léčbě hemoroidů, močových infekcí, diabetes, lepry a hojení ran (Saleem et al. 2018).

Silice ze semen neemu se tradičně používá jako antikoncepční prostředek, k léčbě vaginální infekce a jako repelent (Khare 2007). Silice je zdrojem limonoidů, které zabraňují mutagenním účinkům (Alzohairy 2016). Silice dále vykazuje spermicidní antipyretický, antiarteritický, diuretický, antimalariální a hypoglykemické účinky (Saleem et al. 2018).

Plody, silice, listy, kůra a kořeny mají důležitou roli v prevenci chorob díky bohatému zdroji antioxidantů (Alzohairy 2016).

Guma, která se získává ze stonku, se nanáší na kůži, aby se uzdravily rány, svrab a vředy. Je považována za tonikum a stimulant (Saleem et al. 2018).

Další tradiční užití rozdělené podle typických států výskytu je uveden v tabulce 1 a potvrzení těchto účinků je uvedeno v příloze I.

3.3.3 Biologická aktivita

Antimikrobiální aktivitu vykazuje zejména kůra a listy.

U extraktu z listů byla prokázána aktivita proti *E. coli* a *Bacillus subtilis* (Lall et al. 2013), dále byla zjištěna významná fungicidní aktivita proti *Alternaria solani* (Saleem et al. 2018) a antibakteriální aktivita proti *S. aureus* (Alzohairy 2016). U tohoto extraktu byla prokázána účinnost i proti *E. faecalis* (Ghonmode et al. 2013). Při užití extraktu došlo k výraznému snížení růstu *Pleomorphomonas oryzae* a *Aspergillus* spp. (Saleem et al 2018).

U silice extrahované ze semen došlo k potlačení několika druhů patogenních bakterií, jako jsou *S. aureus* a *S. typhi* a všechny kmeny *Mycobacterium tuberculosis*. Silice je velmi účinná proti *P. aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, *Proteus* spp. a *Klebsiella* spp. (Dangana et al. 2016).

U extraktu z květů byl prokázán baktericidní potenciál proti *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* a *Salmonella infantis* (Saleem et al 2018).

U methanolového extraktu z kůry byla zjištěna antimalariální aktivita proti *Plasmodium falciparum* (Alzohairy 2016). Tento extrakt prokázal také antibakteriální aktivitu proti *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Proteus mirabilis* (Singaravelu et al. 2019) a také proti *Salmonella* spp. (Akeel et al. 2017). Při použití etanolového extraktu kůry došlo k inhibici *Salmonella* spp. (Akeel et al. 2017) a byla prokázána antihelmintická aktivita proti *Ascaridia galli* a *Eudrilus eugeniae* (Hogade et al. 2014). U etanolových výtažků byl prokázán inhibiční účinek proti *Streptococcus* spp. a *C. albicans* (Imran et al. 2020).

3.3.4 Bioaktivní složky

A. indica obsahuje více než 140 bioaktivních složek, jedním z nejvýznamnějších je azadirachtin. Přítomnost těchto různých bioaktivních složek, triterpenoidy, alkaloidy, taniny, flavonoidy, seskviterpenové laktony a fenolické sloučeniny, je převážně zodpovědná za antibakteriální vlastnosti (Ali et al. 2019). Za zmínku dále stojí salannin, nimbold, gedunin, nimbanal, nimbion, které působí jako insekticidy, fungicidy a baktericidy (Mendonça et al. 2019).

Ze semene se extrahuje nimbin, nimbolid, gedunin a azadirachtin (Biswas et al. 2002), z listů stigmasterol, nimbiol, flavonoidy, triterpenoidy, nimonol, alkaloidy, karbohydráty (Saleem et al 2018).

V kůře se nachází zejména kondenzované taniny, jako jsou kyselina gallová, galokatechin, epikatechin a katechin, které mají protizánětlivé a imunomodulační vlastnosti. Tři tricyklické diterpenoidy (margolon, margolonon a isomargolonon) izolované z kůry jsou aktivní proti druhům *Klebsiella*, *Staphylococcus* a *Serratia*. U polysacharidů extrahovaných z kůry bylo zjištěno, že jsou schopny inhibovat zánět u myši, který je vyvolán karageninem (Biswas et al. 2002). Dále je kůra významným zdrojem polyfenolů a flavonoidů (Akeel et al. 2017).

3.3.4.1 Azadirachtin

Azadirachtin je jeden z nejvýznamnějších metabolitů azadirachty a extrahuje se zejména ze semen. Semena jsou produkována pouze jednou ročně. Vzhledem k provozním a skladovacím potížím se jen malé množství semen používá pro extrakci azadirachtinu (Farjaminezhad & Garoosi 2019). Jedná se o botanický insekticid, který vykazuje účinky přímo na cílový hmyz a řadu jiných škůdců. Projevuje se také *in vitro* toxicita proti několika rostlinným patogenním mikroorganismům (Suciu et al. 2019). Azadirachtin není perzistentní v půdě ($DT_{50} = 4,8-19,8$ dnů pro izomer A), ale je velmi toxický pro ryby ($LC_{50} = 0,048$ mg/l) (EFSA 2011).

Sloučenina inhibuje syntézu a uvolňování ekdysteroidů z prorakické žlázy, což má za následek neúplnou ekdyzi v nezralý hmyz a sterilitu u dospělých samic. Tento insekticid je snadno odbouratelný a způsobuje minimální dopad na ekosystém. Azadirachtin ovlivňuje různé aspekty buněčné a humorální imunity hmyzu (Dorrah et al. 2019).

U této sloučeniny byly prokázány antimalariální vlastnosti, zejména inhibicí vývoje malarických parazitů (Biswas et al. 2002).

3.3.4.2 Salannin

Salannin je znám díky svým insekticidním a růstu inhibujícím vlastnostem zaměřující se na hmyz. Množství salanninu v rostlinných zdrojích je omezeno na čeleď *Maliaceae*, a to konkrétně v rodech *Azadirachta* a *Melia*. Modifikace v různých funkčních skupinách rozmístěných kolem kostry molekuly mohou vést k variabilitě účinnosti jako insekticidního prostředku. Například hydrogenace furanové skupiny C-17 vede ke zvýšené aktivitě proti broukům vyskytujícím se na bramborách (Haldar et al. 2014).

3.3.4.3 Nimbolid

Nimbolid je limonoidní fytoaktivní složka získaná z *A. indica* (Diddi et al. 2019). Sloučenina je izolována z listů a květů stromu (Wang et al. 2018). Vyvolává rozmanité biologické aktivity, včetně protizánětlivých, protirakovinných a antioxidačních účinků. Vzhledem k těmto vlastnostem existuje dostatečný prostor pro nimbolid, využívaný u různých akutních onemocněních (Diddi et al. 2019). Mezi další cenné terapeutické vlastnosti patří

antimalariální, antibakteriální, a antikoncepční účinky (Wang et al. 2018). Dále bylo zjištěno, že nimbolid je schopen reagovat s cysteiny.

V souvislosti s rakovinou bylo zjištěno, že nimbolid inhibuje tumorigenezi a metastázy, aniž by způsoboval jakoukoli toxicitu nebo nežádoucí vedlejší účinky u široké škály tumorů (Spradlin et al. 2019). Jeho protinádorové, chemoterapeutické a chemoprotektivní účinky dokazuje i to, že je silně indukující apoptózou v hepatocelulárním karcinomu a inhibuje invazi a migraci buněk rakoviny prsu (Wang et al. 2018).

3.3.4.4 Gedunin

Gedunin byl izolován v roce 1960 ze západoafrického dřeva *Entandrophragma angolense*. Tento přírodní tetratriterpenoid má antimalariální, protiplísňové a protirakovinné účinky, dále působí proti vyvolání alergické reakce a plní insekticidní činnosti (Pinkerton et al. 2017). Gedunin se izoluje z rostlinných druhů čeledi *Meliaceae*, o nichž je známo, že inhibují protein tepelného šoku (HsP) 90. Bylo prokázáno, že inhibitory HsP 90 snižují zánětlivé reakce včetně aterosklerózy a zánětu plic (Conte et al. 2015).

3.3.4.5 Alkaloidy

Alkaloid je jakákoli biologicky aktivní, heterocyklická chemická sloučenina, která obsahuje dusík a může mít určitou farmakologickou aktivitu a v mnoha případech i léčebné nebo ekologické použití. Alkaloidy můžeme klasifikovat podle jejich tvaru a původu:

- pravé alkaloidy,
- protoalkaloidy
- pseudoalkaloidy.

Pravé alkaloidy pocházejí z aminokyselin a sdílejí heterocyklický kruh s dusíkem. Tyto alkaloidy jsou vysoce reaktivní látky s biologickou aktivitou i při nízkých dávkách. Mívají hořkou chuť a vypadají jako bílé pevné látky, s výjimkou nikotinu, který vypadá jako hnědá kapalina. Pravé alkaloidy tvoří ve vodě rozpustné soli.

Protoalkaloidy jsou sloučeniny, ve kterých atom dusíku pochází z aminokyseliny a není součástí heterocyklu.

Pseudoalkaloidy jsou sloučeniny, jejichž základní uhlíkové kostry nejsou odvozené od aminokyselin. Jsou odvozené od prekurzorů, nebo postkurzorů aminokyselin. Mohou být také výsledkem aminačních a transaminačních reakcí (Aniszewski 2007).

Biologická aktivita alkaloidů zahrnuje celou řadu vlastností, patří mezi ně protinádorové, antiparazitické, protizánětlivé, antimikrobiální a insekticidní vlastnosti (Nebo et al. 2014).

Mnoho alkaloidů je pro cizí organismy toxických. Toxicita je sekundární funkce, protože jsou obecně netoxické pro produkující organismy. Biotoxicita alkaloidů je selektivní a závisí na různých organismech a chemické struktuře samotných alkaloidů.

Alkaloidy se využívají v různých oblastech hospodářství, průmyslu, obchodu a službách. Některé alkaloidy se stále používají v medicíně jako přírodní nebo modifikované sloučeniny (atropin, berberin, kodein atd.)

Každá skupina alkaloidů má své vlastní metody extrakce, izolace a krystalizace, stejně jako detekci struktury, molekuly a dynamiky. Využívají se atomové, molekulární a vibrační

spektroskopie a elektronová a jaderná spinová orientace v magnetických polích, hmotnostní spektroskopie a chromatografie (Aniszewski 2007).

3.3.4.6 Taniny

Taniny neboli třísloviny jsou klasifikovány jako adstringentní, polyfenolické molekuly, které se váží na vysrážené proteiny a jiné různé organické sloučeniny včetně aminokyselin a alkaloidů. Ve velkém množství se nachází v ovoci a zelenině. Zájem o taniny se výrazně zvýšil kvůli jejich podstatným zdravotním přínosům. Jsou to v tučích rozpustné mikrokomponenty lokalizované v organelách, které se nazývají chromoplasty. Mají důležité funkce, antioxidační vlastnosti a fyziologické účinky. Urychlují srážení krve, snižují krevní tlak, snižují hladinu lipidů v krevním séru, vyvolávají nekrózu jater a modulují imunosupresi.

Rostoucí zájem o taniny zvýšilo hledání nových přírodních zdrojů, včetně mnoha nevyužitých divokých druhů ovoce a zeleniny, které mohou sloužit jako biologické zdroje fotochemikálií s nutričními vlastnostmi.

Pro stanovení taninů se využívá především vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a viditelná spektrofotometrie. Nově byly zkoumány jiné vhodné analytické techniky. Mezi nimi je Ramanova spektroskopie, která reprezentuje rychlou, moderní analytickou technologii poskytující vícenásobné analýzy, chemické a strukturální molekulární informace s minimálními požadavky na přípravu vzorku (Khodabakhshian 2019).

Taninový extrakt je rozpustná frakce pocházející z procesu těžby dřeva a kůry. Obsahuje hlavně, ale ne výhradně, polyfenoly. Taninový extrakt obsahuje také značné množství nefenolové složky (20-30 %), převážně ze sacharidů (jednoduché cukry a hydrokoloidy). Polyfenolika v taninovém extraktu se liší v závislosti na frakci biologických zdrojů a použitých extrakčních podmínek. Obecně lze rozlišovat mezi hydrolyzovatelnými taniny (získatelnými například z dubu a kaštanu) a kondenzovanými taniny. Extrahované taniny se používají v koželužnách, pro ošetření vody, v lepidlech, jako prostředky na ochranu dřeva a pro výrobu aerogelů a pěn. Pokud se rostlinný extrakt používá pro chemicky pokročilé aplikace, jako jsou léčiva nebo zvýšená syntéza materiálu, je zapotřebí definovanější a čistší zdroj polyfenolů (Sepperer et al. 2019).

3.3.4.7 Flavonoidy

Flavonoidy jsou skupinou sloučenin široce se vyskytujících v rostlinách. Mají rozmanitou škálu biologické aktivity, za zmínku stojí alopatické, gastroprotektivní, protirakovinné, protizánětlivé a antimikrobiální vlastnosti. Flavonoidy se řadí mezi významné antioxidanty (Nebo et al. 2014).

Struktura flavonoidů se skládá ze dvou aromatických kruhů (kruh A aruh B) spojených třemi atomy uhlíku představující kruh C. Variace v heterocyklu (kruh C) definují různé podtřídy flavonoidů. Flavonoidy se v přírodě často vyskytují v glykosylové nebo esterifikované formě (Isoda et al. 2014).

Některé flavonoidy ovlivňují smyslové vlastnosti rostlinných potravin. Například antokyany jsou zodpovědné za barvu mnoha plodů, zatímco některé flavonoidy, jako je flavanon naringin, přispívají k chuti některých citrusových plodů. Kromě toho se flavonoidový derivát neohesperidin dihydrochalkon přidává do potravinářských produktů jako sladidlo nebo

zvýrazňovač chuti. V přírodě flavonoidy často obsahují cukernaté skupiny, které jsou vázány v různých polohách. Glykosylace významně ovlivňuje rozpustnost, stabilitu, biologickou dostupnost a antioxidační vlastnosti (Klingel et al. 2019).



Obrázek 1: *A. indica* (Nový 2017)

3.4 *Careya arborea* Roxb.

3.4.1 Botanická charakteristika, rozšíření a typický biotop

C. arborea patří do čeledi *Lecythidaceae* a je jedním z hlavních léčivých stromů Indického subkontinentu (Gupta et al. 2019). *C. arborea* je běžně známá jako „Wild Guava“ a „Kumbhi“ v ajurvédě (Gupta & Rao 2014). Většina částí se používá k tradičním léčebným účelům. Strom roste v listnatých lesích a na pastvinách po celém území Indie. Nachází se také na Srí Lance a Malajském poloostrově.

C. arborea je strom střední velikosti s výškou 9 až 18 metrů (viz Obrázek 2) (Gupta et al. 2019). Listy jsou střídavé, 15-30 cm dlouhé a 7,5-15 cm široké (Ambardar & Aeri 2013). Strom má hustou, tmavě šedou kůru s mělkými trhlinkami. Plody jsou velké, kulovité, zelené, lysé bobule (Prabhakaran et al. 2014). Tento listnatý strom se může vyskytovat až do nadmořské výšky 1 500 metrů. Sází se do zahrad nebo podél silnic zejména pro velké a nápadné listy s květy a plody (Ambardar & Aeri 2013).

3.4.2 Tradiční využití

Tato rostlina vykazuje mnoho farmakologických aktivit, jako jsou např. protizánětlivé, analgetické, hypoglykemické, antibakteriální, protiplísňové, hepatoprotektivní a cytotoxické účinky. Dále působí jako inhibitor α -glukosidázy, antioxidant a antikoagulační činidlo.

Kůra se využívá při léčbě nádorů, bronchitid, epileptických záchvatů a abscesů (Gupta & Rao 2014). Dále nachází uplatnění jako lék na úplavici s krvavou stolicí a při bolestech uší.

Vodný extrakt z čerstvé kůry používají domorodci jako rybí jed (Kumar et al. 2006). Odvar z kůry se používá proti průjmům, při kašli a nachlazení a kožních onemocněních. Prášková forma kůry se uplatňuje v případě hadího kousnutí. Kůra nachází své uplatnění také jako analgetikum a antipyretikum (Rahman et al. 2003).

Listy a květy se používají ve formě pasty k léčbě kožních chorob (Gupta & Rao 2014). Listová pasta se dále může využívat k léčbě vředové choroby (Rahman et al. 2003).

Semena se tradičně využívají k léčbě vředů, hojení ran a kožních chorob (Gupta et al. 2019). Kořen stromu se používá při léčbě tuberkulózy a kostních zlomenin převážně v ajurvédské medicíně (Ramadurga et al. 2019). Dužina se používá jako obklad k rychlému hojení ran a vředů (Gupta & Rao 2014). Plody slouží jako podpora trávení (Rahman et al. 2003).

Další tradiční užití rozdělené podle typických států výskytu je uveden v tabulce 1 a potvrzení těchto účinků je uvedeno v příloze I této práce.

3.4.3 Biologická aktivita

Antimikrobiální aktivita byla prokázána u plodů, listů a extraktu z kmenové kůry (Ramadurga et al. 2019).

U extraktu z listů byla prokázána aktivita proti grampozitivním bakteriím (*S. aureus*, *B. subtilis*) i proti gramnegativním bakteriím (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *Z. mobilis*). Vyšší citlivost byla zaznamenána u grampozitivních bakterií (Navya & Anitha 2018).

Čerstvé a sušené plody *C. arborea* prokázaly antibakteriální aktivitu proti *E. coli*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus* spp. (Prabhakaran et al. 2014).

Metanolový extrakt z kůry vykazuje široké spektrum aktivit proti gramnegativním bakteriím (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. typhi*, *Shigella dysenteriae*, *V. cholerae*) a grampozitivním bakteriím (*S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *M. luteus*, *Staphylococcus epidermidis*) v rozmezí koncentrací od 0,05 do 100 µg/ml metanolového extraktu za použití agarové difuzní metody. Dále byla prokázána aktivita proti různým houbám, např. *Candida albicans*, *Alternaria solani*, *A. niger* a *Alternaria flavus* (Kumar et al. 2006; Navya & Anitha 2018). Etanolový extrakt z kůry inhibuje bakteriální i houbový růst, a to zejména *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* a *C. albicans* (Navya & Anitha 2018)

3.4.4 Bioaktivní složky

Rostlina byla komplexně zkoumána a bylo zjištěno určité množství fytochemických složek z listů, kůry a semen – triterpenoidy, steroly, kumarin, saponiny a taniny (viz 3.3.4.3 na str. 26; viz 3.3.4.6 na str. 22) (Begum et al. 2017). Rozsáhlejší zkoumání rostliny odhalilo přítomnost kareaborinu-I, careyagenolidu, triterpenoidních sapogenolů, β-amyrinu, β-sitosterolu a taraxerolu (Gupta & Rao 2014). Dále byly izolovány steroidy, flavonoidy a alkaloidy (viz 3.3.4.7 na str. 22 a 3.3.4.5. na str. 21) (Ramadurga et al. 2019).

Listy jsou zdrojem triterpenoidů a steroidů (taraxerol, n-hexakosanol apod.).

Extrakt ze semen obsahuje proteiny, karbohydráty, škrob, steroidy, saponiny (Gupta et al. 2019). Ve květech byly nalezeny zejména steroidy, triterpenoidy, fenoly a taniny (Ambardar & Aeri 2013).

Kůra kmene obsahuje bioaktivní složky, například kyselinu betulinovou, betulin a lupeol, o kterých se mluví jako o potenciálních protizánětlivých látkách (Begum et al. 2017). Lupeol

má široké spektrum farmakologických aktivit proti různým chorobným stavům, jako jsou artritida, diabetes, kardiovaskulární onemocnění, mikrobiální infekce apod. Lupeol je netoxický a nezpůsobuje žádnou systémovou toxicitu. Působí jako účinné antibakteriální činidlo při testování grampozitivních a gramnegativních bakterií (Siddique & Saleem 2011). Metanolový extrakt ze sušené kůry ukázal přítomnost flavonoidů, sterolů, triterpenoidů a alkaloidů (Rahman et al. 2003).

3.4.4.1 Steroly

Rostlinné steroly jsou steroidní alkoholy, které se převážně vyskytují v ořechách a olejnatých rostlinách. Z chemického hlediska jsou podobny cholesterolu, obsahují drobné modifikace ve strukturách, včetně přidání dvojnásobné vazby, methylu (kampesterol) nebo ethylu (β -sitosterol) do postranního řetězce. β -sitosterol, kampesterol a stigmasterol jsou nejčastější typy více než 250 různých identifikovaných sterolů v rostlinách. Rostlinné steroly se vyskytují buď ve volné, nebo esterifikované formě (Farida Moazzami & Radjabian 2019).

Rostlinné steroly jsou rozhodující pro propustnost membrán, hrají důležitou roli v růstu rostlin a vývojových procesech, jako jsou dělení buněk, polarita a morfogeneze. Co se týče biologických aktivit těchto sterolů, jsou protizánětlivé, protirakovinné, antioxidační, neuroprotektivní a antidiabetické. Vykazují antibakteriální a antimykotickou aktivitu, způsobují změnu metabolismu testosteronu, indukci apoptózy v rakovinných buňkách, mají hypocholesterolemický účinek a snižují riziko srdečních chorob. Kampesterol, β -sitosterol, stigmasterol, sitostanol a kampestanol jsou rostlinné steroly, které se často vyskytují v lidské stravě. Po chemické modifikaci mohou být použity jako suroviny při výrobě steroidních léčiv v optickém průmyslu. Dále se mohou využívat v kosmetickém průmyslu jako emulgátory.

β -sitosterol je sloučenina, která byla nalezena v celé řadě rostlinných čeledí – *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Rosaceae*, *Rubiaceae* a *Fabaceae*. Tento sterol se využívá k léčbě rakoviny prostaty, dále jako neuroprotektivum, antidiabetikum a chemoprotektivní činidlo (Farida Moazzami & Radjabian 2019).

3.4.4.2 Kumariny

Kumariny neboli 2-H-benzopyran-2-ony jsou v přírodě rozšířené látky, které přitahují velkou pozornost kvůli své cenné biologické aktivitě. Jsou to významné antioxidanty, které vykazují antimikrobiální, protinádorovou, antituberkulózní a antivirovou aktivitu (Wang et al. 2020). Kumariny se vyznačují sladkým, aromatickým, krémovým, vanilkovým zápachem s ořechovými tóny. Používají se jako přísady do parfémů a kosmetiky, jako látky zvyšující aroma v tabákových výrobcích a některých alkoholických nápojů. Některé studie naznačují, že kumarin může být toxický. Toxický a netoxický účinek kumarinu závisí na jeho dávkování. Toxicita souvisí s hepatotoxicitou a karcinogenitou, která byla pozorována během dlouhodobých studií na myších a potkanech (Machyňáková & Hroboňová 2017).

Kumarin je také užitečným chromoforem, který je aplikován pro návrh nových sloučenin s potenciálním optickým zájmem, jako jsou fluorescenční sondy. Pokud je kumarinový kruh fúzován s jinými heterocykly, výsledné sloučeniny mohou vykazovat nebývalé vlastnosti. Mývají široké spektrum farmakologických, fotoelektronických a optických vlastností (Wang et al. 2020)

3.4.4.3 Saponiny

Saponinové glykosidy mají dvě specifické vlastnosti, vytvářejí pěnu ve vodném roztoku a způsobují hemolýzu červených krvinek. Saponiny jsou považovány za hemotoxické sloučeniny, dovolují hemolýzu erytrocytů a většina z nich se označuje jako „rybí jedy“. Mají hořkou a štiplavou chuť a způsobují podráždění sliznic. Bývají amorfni povahy, rozpustné v alkoholu a vodě, ale nerozpustné v nepolárních organických rozpouštědlech (Kar 2007).

Mezi rostlinnými látkami jsou saponiny považovány za potenciální antihelmintické přírodní sloučeniny. Biologické účinky saponinů jsou obvykle připisovány jejich specifické interakci s buněčnými membránami, což způsobuje změny v permeabilitě buněk. Po ovlivnění některé složky buněčné membrány, začnou saponiny indukovat tvorbu agregátů, které jsou podobné micelám a narušují funkčnost membrány. Saponiny se vyskytují v mnoha druzích rostlin, včetně jednoděložných a dvouděložných rostlin (Maestrini et al. 2019).

Sapogeniny jsou aglykony saponinových glykosidů. Na základě povahy aglykonového zbytku přítomného v saponinových glykosidech jsou zařazeny do dvou kategorií, tetracyklické triterpenoidní saponiny (nebo steroidní saponiny) a pentacyklické triterpenoidní saponiny. Steroidní saponiny zaujímají důležitou pozici zejména z komerčního hlediska, například se používají jako surovina pro syntézu vitamínu D, pohlavních hormonů (testosteron, progesteron, estradiol atd.), srdečních glykosidů (digoxin, digitoxin), kortikosteroidů, orálních antikoncepčních prostředků a diuretických steroidů (Kar 2007).

3.4.4.4 Betulin, betulinová kyselina

Betulin (1, 3-lup-20(29)-ene-3 β ,28-diol) a betulinová kyselina (2, (3 β)-3-hydroxy-lup-20(29)-en-28-oová kyselina) patří do skupiny přirozeně se vyskytujících pentacyklických triterpenoidů lupanového typu, které se izolují z kůry několika druhů stromů. Betulin a betulinová kyselina vykazují podobné účinky na živé organismy a mají široké spektrum biologických aktivit. Jsou prokázány protinádorové, antibakteriální, protizánětlivé, antiretrovirové, antimalariální, antiobezitní, hepatoprotektivní a imunomodulační vlastnosti. Jsou to antioxidanty snižující oxidační stres. Obě sloučeniny mají pozitivní účinek na léčbu atopické dermatitidy a urychlují hojení ran. Jejich nízká biologická dostupnost, špatná rozpustnost ve vodě a nedostatečná intracelulární akumulace omezuje jejich použití jako terapeutické látky (Grymel et al. 2019).



Obrázek 2: *C. arborea* (Nový 2017)

3.5 *Hopea odorata* Roxb.

3.5.1 Botanická charakteristika, rozšíření a typický biotop

H. odorata patří do čeledi *Dipterocarpaceae*, která je rozšířena v lesích s nízkou nadmořskou výškou ve Vietnamu, kde se jí přezdívá „Sao den“ a je původem z jihovýchodní Asie (Nguyen et al. 2017). V Bangladéši je známá jako „Telsur“ (Kabir et al. 2016). *H. odorata* je přirozeně distribuována v mnoha zemích jihovýchodní a jižní Asie.

Jedná se o stálezelený strom, který je středně velký s velkou korunou. Výška stromu může činit až 45 metrů, průměr do 4,5 metrů. Kůra stromu je šupinatá, šedá až tmavě hnědá (Orwa et al. 2009). Dřevo stromu se liší barvou od velmi bledě žluté/bílé až hnědé, při prvním řezu a charakteristicky tmavne na nahnědlou nebo nažloutlou barvu po delší expozici na vzduchu. Dřevo je oceňováno díky své trvanlivosti, odolnosti vůči hmyzu a možnosti použití pro nosnou konstrukci (Dong et al. 2014). Květy jsou malé, sladce voňavé, nažloutlé barvy (viz obrázek 3) (Orwa et al. 2009).

H. odorata se obvykle vyskytuje na bohatých půdách, nejčastěji podél břehů potoků až do nadmořské výšky 600 metrů. Nachází se především ve vlhkých tropických stálezelených lesích. Nejvýhodnější pro růst jsou oblasti, kde se průměrná roční teplota pohybuje od 25 °C do 27 °C a průměrné roční srážky od 1 500 mm do 3 000 mm (Orwa et al. 2009).

Dammarová guma se získává z čeledi *Dipterocarpaceae*, zejména z rodů *Shorea*, *Balanocarpus* a *Hopea*. Tato pryskyřice se obvykle shromažďuje po poškození stromu pomocí malých řezů (Sharma et al. 2018).

V současné době je strom hodnocen jako zranitelný a je uveden na Červeném seznamu ohrožených druhů IUCN. Ve Vietnamu je veden jako prioritní druh vyžadující okamžitou ochranu (Dong et al. 2014).

3.5.2 Tradiční využití

Kmenová kůra se tradičně používá k léčbě bolesti krku, zejména na Andamanských ostrovech (Kabir et al. 2016). Ve Vietnamu se extrakt z kůry používá jako lék na zánět dásní

a léčbu průjmu (Nguyen et al. 2017). V Indo-Číně se kůra používá jako žvýkací látka (Orwa et al. 2009).

Kůra a listy se využívají k léčbě ochrnutí, hemoroidů, průjmů, zánětů dásní a močové inkontinence (Kabir et al. 2016).

Pryskyřice z kmene se používá na rány, záněty a k zastavení krvácení. Studie prokázaly, že methanolový extrakt z *H. odorata* silně inhibuje genovou expresi proti zánětlivých cytokinů a chemokinů, jako je interferon-beta, interleukin-12 a monocytový chemotaktický protein-1. (Nguyen et al. 2017).

Dammar tohoto stromu se pro své léčivé vlastnosti používá při léčbě ran. Hlavním využitím bývá výroba papíru, laků a barev. Spotřeba v posledních letech nevyhnutelně poklesla zejména z důvodu rozšířeného používání syntetických materiálů (Sharma et al. 2018). Dřevo, které je velmi tvrdé a těžké, se využívá hlavně pro stavbu lodí, vyhloubené kánoe a ke konstrukčním účelům (Orwa et al. 2009).

Další tradiční užití rozdělené podle typických států výskytu je uveden v tabulce 1 a potvrzení těchto účinků je uvedeno v příloze I.

3.5.3 Biologická aktivita

U extraktu z listů byla prokázána nejvyšší aktivita proti *S aureus*, *Bacillus spp.*, *Salmonella spp.* a *E. coli* (Kabir et al. 2015) a antihelmintická aktivita proti růstu *Tubifex tubifex* (máloštětináček) (Hossain et al. 2015).

U extraktu z mízy stromu byla zjištěna účinnost proti nárůstu *Gloeophyllum trabeum* a *Pycnoporus sanguineus* (Kawamura et al. 2010).

Metanolový extrakt z kůry byl schopen inhibovat růst *Pycnoporus sanguineus* (Kawamura et al. 2010).

3.5.4 Bioaktivní složky

Rostlina obsahuje různé deriváty resveratrolu včetně hopeafenolu, vaticanolu B, hemsleyanolu B, stemonoporalu A, e-viniferinu a laevifonol (Kabir et al. 2016).

Kvercetin, kaempferol, apigenin byly izolovány ze vzorku listů (Satiraphan 2012).

Fytochemické studie uvádějí, že jádrové dřevo *H. odorata* obsahuje fenolické sloučeniny. (Kabir et al. 2016). Listy a kůra obsahují významné množství taninů (viz 3.3.4.6. na str. 22) (Orwa et al. 2009). V kůře *H. odorata* bylo nalezeno několik známých derivátů resveratrolu (balanokarpol, vaticanol G, vaticanol B, hopeafenol atd.).

3.5.4.1 Resveratrol - hopeafenol, vaticanol B

První biologická aktivita resveratrolu byla publikována v roce 1992 a od té doby bylo prokázáno, že má protirakovinné, protiplísňové, protizánětlivé a antimikrobiální vlastnosti (Zetterström et al. 2013). Polyfenoly, které tvoří oligomery resveratrolu v rozmezí od dimerů po oktamery, se vyskytují v rostlinách, které patří zejména do čeledí *Vitaceae*, *Dipterocarpaceae*, *Leguminosae* a *Cyperaceae*. Tyto přirozeně se vyskytující polyfenoly jsou běžné stavební kameny velkého množství komplexních přírodních produktů z hlediska

struktury a stereochemie. Biologické vlastnosti dělají z resveratrolu potenciálního kandidáta na léčivo (Sasikumar et al. 2016).

Hopeafenol je sloučenina, která se řadí do skupin tetramerů resveratrolu. Jedná se o trans-stilben obsahující dva hydroxylové fenoly spojené pomocí dvou uhlíkového methylenového můstku (Zetterström et al. 2013).

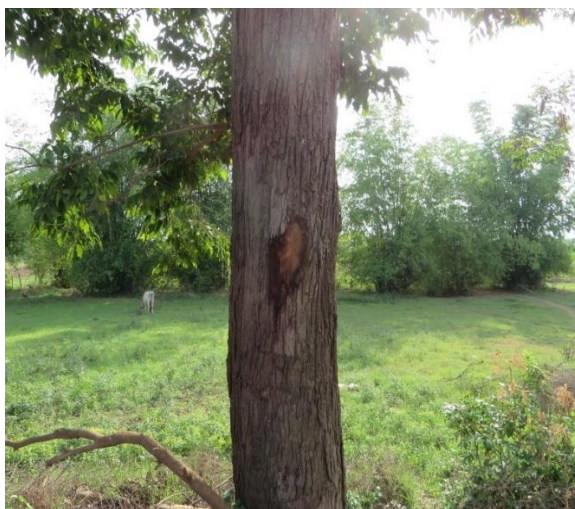
Vaticanol B je také tetramer resveratrolu. Jeho hlavním příznivým účinkem je, že chrání buňky proti buněčné smrti vyvolané stresem. Vaticanol má také silnou protizánětlivou aktivitu, pokud jsou buňky vystaveny lipopolysacharidu. Mezi další priority této sloučeniny patří regulace exprese základního genu a udržování integrity membrán endoplazmatického retikula (Tabata et al. 2007).



Obrázek 3: *H. odorata* (Nový 2017)

3.6 *Hopea pierrei* Hance

H. pierrei je strom vysoký 30-35 m (viz obrázek 4), vyskytuje se v hustých lesích Kambodži, Laosu, Vietnamu a Thajska. Dřevo stromu je po těžbě nažloutlé, v suchém období zešedne. Je velmi odolné vůči termitům a nepříznivému počasí, tudíž se hojně využívá pro konstrukce a sochařství. Dřevo se používá relativně mladé, protože starší exempláře mají dutý kmen. Průmysl se používá k výrobě laků (DyPhon 2000).



Obrázek 4: *H. pierrei* (Nový 2017)

Tabulka 1: Tradiční využití vybraných rostlin ve státech jižní a jihovýchodní Asie (vlastní tvorba)

Rostlinný druh	Stát	Lokální název	Rostlinná část				Citace
			kůra	list	kořen	kmen	
<i>A. indica</i>	Kambodža	Sdau, Salien	průjem, malárie, horečky	otoky, malárie, záněty	N/A	průjem	Duong 1993; Hout et al. 2006; Keo et al. 2018
	Laos	Kwinin, Mak tong, Phak ka dao	N/A	N/A	N/A	malárie	Duong 1993; Handa et al. 2006;
	Indie	Kai bevu, Bena rooku, Vepa, Vembu, Nimbamu	horečky, malárie, barvivo, vředy	insekticid	N/A	N/A	Petelot 1952; Duong 1993; Puri 2005
	Barma	Tama, Tamaga, Margosa	tonikum, horečky, bolesti kloubů, insekticid	kožní onemocnění, tonikum, insekticid	N/A	N/A	DeFilipps & Krupnick 2018
<i>H. odorata</i>	Kambodža	Kokii	zánět dásní	N/A	flatulence	N/A	Duong 1993; Keo et al. 2018
	Vietnam	Sao den	zánět dásní, průjmy	N/A	N/A	ošetření ran, záněty, zastavení krvácení	Nguyen et al. 2017
	Thajsko	Sakkhian	bolest zubů, hemoroidy, průjmy, močová inkontinence	hemoroidy, průjmy, záněty dásní a močové inkontinence	N/A	N/A	Yang et al. 2013; Khuankaew et al. 2014
<i>C. arborea</i>	Kambodža	Teuk	průjem, hemoroidy, svědění	vředy	bolest břicha	N/A	Chassagne et al. 2016
	Indie	N/A	hadí uštknutí, antipyretikum, plané neštovice	N/A	N/A	N/A	DeFilipps & Krupnick 2018

N/A – data nenalezena; *Hopea pierrei* – využívána pouze pro stavební konstrukce (Duong 1993)

3.7 Antimikrobiální účinky fytochemikálií

Použití rostlinných výtažků a fotochemikálií s antimikrobiálními vlastnostmi může mít velký význam v terapeutické léčbě (Nascimento et al. 2000).

Mnoho přirozeně se vyskytujících sloučenin v rostlinách, bylinách a kořeni má antimikrobiální účinky fungující a sloužící jako zdroj antimikrobiálních látek proti potravinářským patogenům. Poptávka spotřebitelů po menším použití syntetických konzervačních látek vedla k výzkumu a použití přirozeně odvozených antimikrobiálních látek. Některé rostliny a jejich výtažky mají antimikrobiální látky nabízející potenciální alternativu k syntetickým konzervantům. V moderním potravinářském průmyslu pro získání bezpečných produktů se používají mírné procesy, které mají přirozený nebo „zelený“ obraz. Za těchto podmínek, antimikrobiálních účinků rostlinných extraktů, lze snížit proliferaci potravinových patogenů (Kotzekidou et al. 2008).

Další důvod pro výzkum účinků fotochemikálií jsou antibiotika. Ta zachránila život milionů lidí a přispěla k delší průměrné délce života za poslední století. Nicméně klinická účinnost mnoha existujících antibiotik je v ohrožení vlivem vzniku rezistentních patogenů. Infekční choroby způsobené rezistentními mikroorganismy jsou spjaty s dlouhodobými hospitalizacemi a větším rizikem nemocnosti a úmrtnosti. Rezistence je velký problém pro lidi s narušeným imunitním systémem, např. trpící HIV, pro pacienti s rakovinou či pacienti s transplantovanými orgány. Promiskuitní užívání antibiotik dramaticky přispívá k rostoucímu výskytu rezistence na množství hlavních lidských patogenů. Problémy s rezistencí vyžadují, aby se obnovilo úsilí k testování léčivých rostlin na jejich potenciální antimikrobiální vlastnosti. Nejdůležitější bioaktivní sloučeniny rostlin jsou alkaloidy, flavonoidy, taniny, fenolové sloučeniny, steroidy, pryskyřice, mastné kyseliny a gumy, které jsou schopné vyvolat určitý fyziologický účinek na lidské tělo (Dahiya & Purkayastha 2012).

Dalším hnacím faktorem pro hledání nových rostlinných druhů s antimikrobiální aktivitou je rychlé vymírání rostlinných druhů. Na léčivé rostliny spoléhá 80 % světové populace, např. Indie má bohatou tradici v užívání bylinných léčiv k léčbě různých infekčních chorob, zánětů, zranění a jiných onemocnění. Mnoho rostlinných materiálů využívaných v tradiční medicíně je obecně považováno za účinnější a relativně levnější než moderní medicína. Navíc pro určitá onemocnění jde současně o zmírnění mnoha vedlejších účinků, které jsou často spojovány se syntetickými látkami (Dahiya & Purkayastha 2012).

Rostlinné extrakty mohou vykazovat různé způsoby působení proti bakteriálním kmenům, jako je interference s fosfolipidovou dvojrůstvou buněčné membrány, což má za následek zvýšení propustnosti a ztrátu buněčných složek, dále poškození enzymů zapojených do produkce buněk, syntézu strukturních složek a destrukci nebo inaktivaci genetického materiálu. Obecně je za mechanismus účinku považováno narušení cytoplazmatické membrány, narušení protonové hnací síly, tok elektronů, aktivní transport a koagulace buněčného obsahu (Kotzekidou et al. 2008).

3.7.1 Metody testování antimikrobiální aktivity *in-vitro*

Metody testování citlivosti mikroorganismů můžeme rozdělit do dvou kategorií:

- difúzní metody,

- diluční metody (Hoelzer et al. 2011).

Disková difuzní metoda je jeden z nejstarších přístupů k testování antimikrobiální aktivity a zůstává jedním z nejpoužívanějších testů citlivosti na antimikrobiální látky v rutinních klinických laboratořích. Metoda je vhodná pro testování většiny bakteriálních patogenů a pomocí ní lze testovat řadu antimikrobiálních látek bez speciálního zařízení. Společně s několika dalšími technikami diskové difuze (EUCAST 2020). Ve stručnosti, suspenze testovaného organismu se nanese na bakteriální kultivační destičky, papírové disky obsahující testované léčivo se nanesou na inokulovanou destičku a destičky se inkubují. Destičky se poté zkontrolují z hlediska bakteriálního růstu a změří se zóna inhibice růstu obklopující papírový disk. Na jedné destičce lze testovat několik léků. Výsledky pak ale nemusí být přímo interpretovatelné, pokud jde o koncentraci inhibičního léčiva. Metody založené na diskové difúzi mohou být ovlivněny řadou vnějších proměnných, včetně hodnoty pH a hloubky agaru, nerovnoměrných inokulačních objemech nebo nekonzistentních inkubačních časech a teplot (Hoelzer et al. 2011).

Diluční metody se používají ke stanovení minimálních inhibičních koncentrací antimikrobiálních látek a jako referenční metody pro testování antimikrobiální citlivosti, proti kterým jsou kalibrovány další metody, například disková difúze (EUCAST 2000). Metody ředění slouží převážně pro stanovení aktivity nových mikroorganismů, dále aby se potvrdila citlivost organismů, které vykazují nejednoznačné výsledky v jiných metodách testování (komerční testy) a určení náchylnosti organismů (Arendrup et al. 2017). Metody diluční umožňují vysokou průchodnost vzorku a kvantitativní vyhodnocení, pokud jde o minimální inhibiční koncentraci (MIC) potřebnou k růstu bakterií *in vitro*, metoda je však spojena s vyššími náklady (Hoelzer et al. 2011). V těchto metodách se mikroorganismy testují na svou schopnost produkovat viditelný růst na řadě agarových destiček nebo v mikrotitračních jamkách obsahující antimikrobiální činidlo, které inhibuje viditelný růst mikroorganismu (MIC) (EUCAST 2000). Jamky obsahující naředěné testované léčivo se naočkují testovaným organismem a inkubují se. Poté se stanoví MIC, která inhibuje bakteriální růst *in vitro*. Testovaná léčiva se nejčastěji ředí ve dvojnásobném ředění, což může vést k širokému rozmezí koncentrací, které je shrnuto jednou hodnotou MIC. Tato metoda může být ovlivněna zejména odchylkami v pH a očkovacích časech (Hoelzer et al. 2011).

3.7.2 Vyhodnocení a detekce antimikrobiální aktivity

Vyhodnocení růstu je při práci s mikroorganismy důležité. Mikrobiální růst lze měřit více způsoby:

- přímé mikroskopické počty,
- suchá hmotnost,
- měření zákalu,
- absorbance,
- bioluminiscence atd.

Pokud je třeba změřit několik kmenů paralelně, je praktické kultivovat a kvantifikovat pomocí 96 jamkových mikrotitračních destičkách. Mikrobiální růst v mikrotitračních destičkách se často měří jako zvýšení, a to buď absorbance nebo v bioluminiscenci.

Měření bioluminiscence i absorbance má své výhody i nevýhody. Bioluminiscenční měření jsou citlivá, ale požadují relativně drahé vybavení a rozsáhlou laboratorní práci před každou zkouškou. Měření absorbance se provádějí snáze, ale jsou méně citlivá a omezují se na interval koncentrace (Gabrielson et al. 2002).

Mezi další metody používané pro hodnocení životaschopnosti buněk založená na různých buněčných funkcích patří enzymatická aktivita, permeabilita buněčné membrány, přilnavost buněk, produkce ATP, produkce koenzymů a aktivita absorpce nukleotidů (Bahuguna et al. 2017).

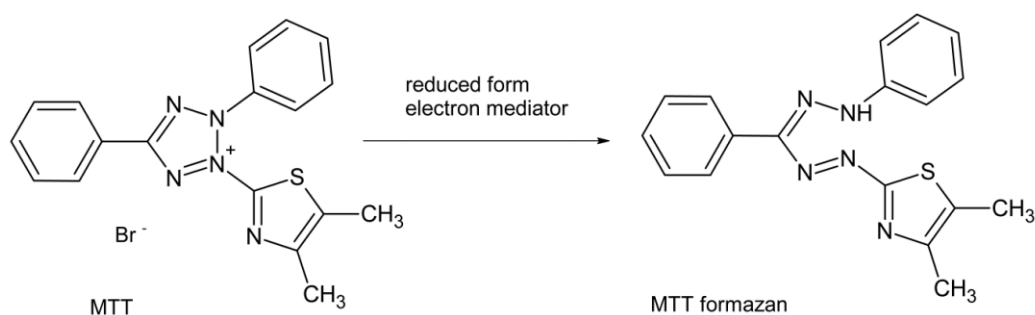
Pro usnadnění měření se může přidat růstový indikátor, jako je tetrazoliová sůl nebo resazurin. Indikátor je užitečný, když mají buňky tendence přilnout k sobě, nebo tam, kde se vyskytují jiné přísady ovlivňující barvu růstového média. Tradičně se ke kvantifikaci používá měření absorbance ve spektrofotometru. Tetrazoliové soli a resazurin se používají jako ukazatelé růstu od 40. let 20. století. Detekují oxidační enzymové systémy tím, že působí jako akceptory elektronů (Gabrielson et al. 2002).

Tetrazoliové soli jsou rozpuštěné, bezbarvé, pokud jsou ve své původní formě, ale také ve formě nevodné, rozpustné, barevné soli, když jsou redukovány (Gabrielson et al. 2002). Tato metoda používá kolorimetr ke stanovení životaschopnosti buněk. Činidlo MTT poskytuje nízké hodnoty absorbance pozadí v nepřítomnosti buněk. V testu MTT je stanoven lineární vztah mezi metabolicky aktivními buňkami a produkovanou barvou, což umožňuje přesnou kvantifikaci změn v rychlosti buněčné smrti nebo proliferace. Test MTT je založen na redukci MTT (žluté zbarvení) a dalších tetrazoliových barviv a závisí na buněčných metabolických aktivitách způsobených enzymy buněčné oxidoreduktázy NAD(P) H. Zdravé a rychle rostoucí buňky vykazují vysokou míru redukce MTT na formazan (viz obrázek 5), zatímco mrtvé nebo neaktivní buňky tak neučiní. Konečným produktem redukce MTT je purpurově barevný formazan. Vysoká intenzita fialové barvy označuje vyšší životaschopnost buněk, zatímco snížení intenzity fialové barvy znamená snížený počet buněk (Bahuguna et al. 2017).

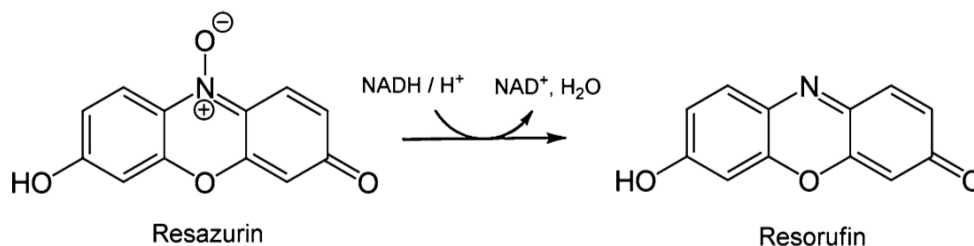
Resazurin je barevná směs, která mění barvu, ale nesráží se po redukci (Gabrielson et al. 2002). Test založený na resazurinu byl poprvé použit k vyšetření hygienického stavu mléka, později se aplikoval ve studiích metabolismu rostlin, pro hodnocení kvality spermatu a testování antimykotické citlivosti. Kvůli mnoha výhodám se tento test stal užitečným nástrojem pro vyšetřování toxických látek. Díky své jednoduchosti, bezpečnosti, homogenní povaze a citlivosti získala tato zkouška dominantní postavení nad ostatními testy používanými pro odhad životaschopnosti buněk a proliferace. Resazurin je modré, slabě fluoreskující indikátorové barvivo, které se změní na vysoce fluorescenční růžový resorufin v reakci na ireverzibilní chemickou redukci (viz obrázek 6). Červený resorufin se vylučuje mimo buňky do média, které má za následek viditelnou změnu barvy z modré na růžovou. Míru redukce na základě změny barvy lze kvantifikovat kolorimetricky nebo fluorometricky (Czekanska 2011).

Vztah mezi množstvím sraženiny soli/změnou barvy a bakteriální koncentrací je dobře stanovitelná. Nejběžnější zařízení pro měření změny barvy je spektrofotometr. Je to drahé zařízení, zejména pokud je potřeba čtečka mikrodestiček. Alternativou k deskovému spektrofotometru by mohl být plochý skener. Plochý skener nabízí výhody jako je nízká cena, snadné propojení k počítači a přizpůsobivost pro jiné přístroje v laboratoři (Gabrielson et al. 2002).

Při kvantifikaci inhibice růstu musí být splněna kritéria pro vlastnosti vybraného ukazatele. Ty se mohou lišit od kritérií, když se měří absolutní růst. V závislosti na kinetice může být stejný indikátor vhodný pro různé podmínky. Pokud se jedná o okamžité stanovení počtu bakterií v roztoku je třeba zvolit rychle reagující indikátor. Alternativně, pokud jsou studovány účinky chemické látky na bakteriích je vhodnější použít pomaleji reagující indikátor, aby bakterie měly dostatek času interagovat s chemikálií. Navíc se tím otevírá možnost kinetického studia v průběhu růstu. Volba indikátoru také závisí na tom, které bakterie se využívají pro testování, protože ne všechny indikátory jsou schopny zpracovat všechny bakterie, a proto nereagují na růst těchto bakterií (Gabrielson et al. 2002).



Obrázek 5: Konverze MTT na formazan (Twaruzek et al. 2018)



Obrázek 6: Mechanismus redukce resazurinu na resorufin (Czekanska 2011)

3.8 Testované mikroorganismy

Výběr testovaných organismů závisí na konkrétním účelu testování. Při primárním screeningu se běžně užívají referenční kmeny, které zastupují běžné patogenní druhy. Panel testovaných mikroorganismů by se měl skládat alespoň z grampozitivní a gramnegativní bakterie. Grampozitivní bakterie jsou mnohem citlivější na působení léčiv než gramnegativní bakterie (Cos et al. 2006).

3.8.1 *Bacillus cereus*

B. cereus je grampozitivní, pohyblivá, sporotvorná, tyčinkovitá bakterie, která je citlivá na gentamicin, chloramfenikol, vankomycin a ciprofloxacin a vysoce odolná vůči penicilinu (Yusuf et al. 2018).

B. cereus je důležitý patogen způsobující otravy z jídla (Jessberger et al. 2019). Tato bakterie je běžnou příčinou kažení mléka, smetany a vařené rýže. Po konzumaci potravin kontaminovaných *B. cereus* se objevují příznaky nevolnosti, zvracení a průjmy (Diao et al. 2018). Průběh nemoci bývá mírný a omezující, ale jsou případy závažné a dokonce smrtelné. Jsou známy dva typy gastrointestinálních chorob, emetický a průjmový syndrom. Emetická forma se projevuje zvracením a nevolností a je způsobena tepelně stabilním cyklickým dodekadepsi-peptidem cereulidem. Cereulid se tvoří v kontaminovaných potravinách, a proto se krátce po požití projeví intoxikace potravinami. Diagnostika emetického *B. cereus* byla vylepšena vývojem metod PCR pro detekci emetických kmenů a hmotnostní spektrometrií pro kvantifikaci cereulidu v potravinách. Nedávno byla popsána identifikace cereulidu pomocí MALDI-TOF. Tyto metody přispívají ke snadnějšímu a spolehlivějšímu výběru nebezpečných a neškodných potravinových vzorků. Na rozdíl od emetického toxinu jsou enterotoxiny zodpovědné za průjmové formy onemocnění, jsou labilní vůči teplu, proteázám a kyselinám (Jessberger et al. 2019).

Ze statistického hlediska je otrava způsobená *B. cereus* na druhém místě v počtu případů kontaminovaných osob. V tomto ohledu je bakterie důležitým problémem, kterému čelí potravinářský průmysl a spotřebitelé. K prevenci růstu patogenů se už po mnoho let používají chemicky syntetizované konzervační prostředky. Na druhé straně používání těchto chemických prostředků může být považováno za karcinogenní a teratogenní a souvisejícím problémem může být i zbytková toxicita (Diao et al. 2018).

3.8.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus je fakultativně anaerobní, grampozitivní, nesporulující bakterie, která je všudypřítomná v prostředí. Bakterie má kulatý tvar o velikosti asi 1 μm a roste ve velkých žlutých koloniích. Přirozeně se vyskytuje v lidské kůži, sliznici a nose. V prostředí je velmi rozšířena a je schopna přežít v suchých a horkých podmínkách, ale může se ji dařit i ve slaném prostředí (Rubab et al. 2018).

S. aureus je potravinový patogen a je považován za jednu z nejčastějších příčin gastroenteritid na světě. Často se nachází v závodech na zpracování potravin, byl izolován z mléčných výrobků, vajec, mořských plodů a masa (Rúa et al. 2019). Příznaky infekce se mohou objevit během 1-6 hodin po konzumaci kontaminované potraviny a symptomy se objevují nejčastěji během 24-48 hodin. *S. aureus* má schopnost produkovat celou řadu toxinů uvnitř i vně buňky a způsobit poškození biologických membrán přímou interakcí s hostitelem, což vede k buněčné smrti organismu. Mezi tyto toxiny patří stafylokokové enterotoxiny, toxin-1 syndromu toxického šoku a leukocidiny. Tyto látky jsou obecně definovány jako infekční nebo jedovaté toxiny s vysokou odolností vůči teplu a jsou schopny přežít, i když je bakterie usmrcena tepelným zpracováním (Rubab et al. 2018). Tento mikroorganismus je hlavním bakteriálním původcem mastitidy u dojníc skotu po celém světě. Ekonomické ztráty způsobené mastitidou se ve Spojených státech amerických ročně odhadují na přibližně 1 miliardu amerických dolarů. Prevalence mastitidy a její vliv na veřejné zdraví se liší v různých lokalitách kvůli prostorové variabilitě příčinných patogenů anebo jejich toxinů, které se mohou dostat do potravinového řetězce a způsobit onemocnění. Bakterie je známá pro svou jedinečnou schopnost

vyvinout antimikrobiální rezistenci. Antimikrobiální rezistentní kmeny *S. aureus* byly izolovány z řady živých zvířat a potravin živočišného původu (Abdi & Dego 2019).

Pro detekci *S. aureus* se často využívá konvenční kultivační metody, avšak nevýhodou této metody je poměrně dlouhá doba k dosažení výsledků. Proto se v posledních letech rozvinul techniky rychlé detekce jako je PCR, ELISA a metody molekulové biologie založené na nukleových kyselinách (Rubab et al. 2018).

3.8.3 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa je všudypřítomná gramnegativní bakterie, která je jednou z hlavních příčin infekcí v nemocničním prostředí. Vhodným médiem pro růst této bakterie je dostatek živiny a vlhké prostředí (Emami et al. 2019). Bakterie je považována za jednu z hlavních příčin chronických a akutních onemocnění a odolává širokému spektru antimikrobiálních látek a antiseptik (Abbasloo et al. 2018). Jedná se o tyčinkovitou, asporogenní, jednobíčíkatou bakterie. Má perleťový vzhled a dobře roste při teplotách 25 až 37 °C, ale je schopná růstu i při 42 °C. Většina kmenů této bakterie produkuje jeden, nebo více pigmentů – pyocyaninu (modrozelený), pyoverdin (žlutozelený a fluorescenční) a pyorubin (červenohnědý) (Wu et al. 2015).

Rody *Pseudomonas* mohou kontaminovat nemocniční oddělení, potraviny, nádoby, toalety, dokonce i dezinfekční prostředky. *P. aeruginosa* je nejčastějším druhem, který způsobuje komplikované klinické problémy. V posledním desetiletí je tato bakterie považována za významný oportunistický nozokomiální patogen, který je zodpovědný za 11-23 % infekcí tohoto typu u pacientů s cystickou fibrózou, popálených pacientů nebo u pacientů s oslabeným imunitním systémem. Vzhledem k rostoucímu počtu bakterií rezistentních na antibiotika, zejména *P. aeruginosa* v posledních letech, se tradiční antibiotika stala méně účinná při léčbě infekcí (Estaji et al. 2019). Výběr ideálního empirického antibiotika nebo nahrazení antibiotika se stává výzvou, protože bakterie má složité mechanismy rezistence. Karbapenemy patří mezi významná antibiotika používaná v experimentální léčbě při infekcích způsobených rodem *Pseudomonas*, zatímco velká rezistence byla pozorována na meropenem a imipenem (Abbasloo et al. 2018). Navíc rozmanitost genotypů a molekulárních charakteristik bakteriálních kmenů zvětšila bariéry před terapeutickými strategiemi (Estaji et al. 2019). Protože bakterie pocházejí z různých zdrojů, mají různé aspekty a funkční vlastnosti, které souvisí hlavně s jejich genomy.

Dnes existují molekulární techniky používané pro genetickou detekci mikroorganismů, které jsou ve srovnání s faktory prostředí méně ovlivněny fenotypem. Tyto techniky hrají klíčovou roli ve sledování tras patogenů. Další technikou je náhodná amplifikace polymorfni DNA (RAPD) jedná se o nízkonákladovou techniku, která má vysokou diskriminační sílu a reprodukovatelnost. RAPD je polymerázová řetězová reakce (PCR) s určitými rozdíly. Pro tento druh PCR se používají krátké (8-12merové) jednoduché primery, které jsou náhodně připojeny k několika sekvencím DNA v bakteriálním genomu (Emami et al. 2019).

3.8.4 *Escherichia coli*

E. coli je gramnegativní bakterie vyskytující se v potravinách a životním prostředí. Většina těchto bakterií je neškodná, ale některé způsobují nemoci, jako jsou průjem, či respirační pneumonie (Ma et al. 2019).

E. coli je producentem Shiga toxinu, který je důležitým patogenem způsobujícím kontaminaci vody a potravin. U lidí se kontaminace projevuje průjmem, hemoragickou kolitidou a hemolyticko-uremickým syndromem. Přenos *E. coli* nastává fekálně-orální cestou po konzumaci kontaminovaných, nedostatečně vařených tekutin a potravin. Alternativně může být bakterie přenášena z člověka na člověka fekálním vylučováním. Představuje 11 % všech infekcí. *E. coli* se stala hlavním celosvětovým patogenem přenášeným potravinami, o kterém je známo, že má za následek život ohrožující stavy. Epidemiologické zkoumání identifikovalo skot jako hlavní rezervoár bakterie. Patogeneze *E. coli* je výsledkem produkce Shiga toxinu, který poškozují střevo odlupováním buněk střevní sliznice, což vede k hemoragickým průjmům. Shiga toxin má systémové účinky na vaskulární endoteliální buňky, tudíž se může projevit vaskulitida a hemolytický uremický syndrom či bolest břicha (Grossman et al. 2019).

Tradiční metody kultivace a počítání kolonií pro detekci *E. coli* jsou značně nepohodlné, protože vyžadují čas a vysoce vyškolený personál. Další metody detekce, jako jsou polymerázová řetězová reakce (PCR), kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) a ELISA, jsou méně časově náročné, ale vyžadují drahé vybavení, složité postupy a relativně prodloužené časy analýz, čímž se omezuje jejich použití při lokální detekci *E. coli*. Imunochromatografické testy (ICT) jsou užitečnými nástroji pro svou jednoduchost, rychlost a nízké náklady (Wang et al. 2020).

3.8.5 *Pantoea agglomerans*

P. agglomerans (synonymum: *Erwinia herbicola*) je fakultativně anaerobní, gramnegativní tyčinka patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. *P. agglomerans* je uváděna jako oportunistický patogen pro pacienty se sníženou imunitou, ale je možné ji izolovat z rostlin, vody a půdy (Kadhun et al. 2019). Bakterie je díky svým metabolickým funkcím schopna produkovat antibiotika, např. fenazinová, pantocinová, herbicolinová a dapdiamidová antibiotika. S touto aktivitou se vyskytuje několik kmenů této bakterie, které se komerčně prodávají za účelem kontroly patogenní bakterie *Erwinia amylovora*, která způsobuje bakteriální spálu na jabloních (Lim et al. 2014).

3.8.6 *Candida albicans*

C. albicans je oportunní houbový patogen, který kolonizuje lidský gastrointestinální trakt. Infekce způsobné touto kvasinkou se vyskytují zejména u imunokompromitovaných jedinců (Mao et al. 2020). Jde zejména o hematogenní šíření kvasinek, což vede k životu ohrožujícím infekcím (Wahyuningsih et al. 2000). Střevní imunomodulační reakce a funkce mukózní bariéry mají důležitou roli v prevenci proti infekcím způsobených *C. albicans*. Vrozené imunologické reakce ve střevním epitelu, zahrnující hlavně antimikrobiální peptidy a prozánětlivé cytokiny, jsou rozhodující pro ochranu hostitele před patogenní infekcí. Mechanismus této kvasinky se střevními epitelovými buňkami nejsou zcela známy (Mao et al. 2020).

Kandidóza je primární kvasinkové onemocnění s úmrtností okolo 30-50 %. Tento klinický, sociální a ekonomický problém je způsoben antifungální rezistencí vůči druhu *Candida*, který je spojen s bezmyšlenkovitým používáním tradičních antimykotik. Patogenita *C. albicans* je podporována řadou virulenčních faktorů, její schopnost přecházet z kvasinky

na vláknitou formu je přísně regulovaný proces sítí genů známý jako dimorfní přepínání. Tento faktor virulence vyžaduje, aby *C. albicans* reagovala na hostitelské prostředí. EFG1 je jedním z nejdůležitějších a dobře prostudovaných regulačních genů zapojený do filamentace *C. albicans* (Araújo et al. 2019). Tato kvasinka je schopna reverzibilního přepínání mezi dvěma viditelně odlišnými typy buněk, bílými a neprůhlednými. K tomuto přepínání dochází relativně zřídka a potomstvo buněk obvykle zdědí stav svých rodičů. Buňky bílé fáze se jeví jako kulaté, vytvářejí bílé kopulovité kolonie na pevném agaru. Neprůhledné buňky jsou větší a protáhlejší a jejich kolonie jsou tmavší (Miller & Johnson 2002).

V důsledku stoupající rezistence této kvasinky vůči tradiční antimykotické léčbě se vyvíjejí nové alternativní terapie s novými mechanismy účinku, zvýšeným terapeutickým potenciálem, zlepšenou farmakokinetikou a menší toxicitou (Araújo et al. 2019).

Diagnóza je poměrně obtížná, protože jediným příznakem infekce je dlouhodobá horečka, která je odolná proti antibakteriální léčbě. Laboratorní testy pro detekci cirkulujících antigenů *Candidy* byly vyvinuty pro rychlou diagnostiku diseminované kandidózy. Detekce cirkulujících antigenů postrádá citlivost a do určité míry i specifitost, a tudíž diagnóza může být zpožděna. Produkce antilátek u imunokompromitovaných jedinců může být variabilní, komplikující diagnózu. Vývoj metod detekce *C. albicans* založených na DNA poskytuje alternativní a potenciálně citlivější prostředky pro diagnostiku diseminované kandidózy. Pro diagnostiku se také používá PCR metoda (Wahyuningsih et al. 2000). Metody PCR umožňují amplifikaci a kvantifikaci široké škály fungálních patogenů přímo ze vzorků a čisté kultury. Pro detekci *C. albicans* se využívá LightCycler systém. Test se aplikuje pro kvantifikaci DNA této kvasinky v krvi a přidává se množství blastokonidií (Maaroufi et al. 2003).

3.8.7 *Hanseniaspora uvarum*

H. uvarum neboli *Kloeckera apiculata* je druh kvasinky, která se často vyskytuje na zralých plodech, zejména na hroznech, kde se účastní první fáze alkoholové fermentace. *H. uvarum* je také často izolována z ostatních fermentovaných nápojů – jablečný mošt, palmové víno, tequila, aguardente z cukrové třtiny atd. Dále je součástí mnoha fermentovaných potravin včetně kávy, kakaa, ale i piva, jogurtu či pomerančového džusu. Kvasinka vykazuje průmyslově významné antagonistické vlastnosti proti vývoji plísní, které jsou zodpovědné za znehodnocení ovoce. Kvasinka se tudíž používá jako biokontrolní činidlo proti *Botrytis cinerea* (šedá plíseň) na hroznech a jahodách, *Penicillium* spp. (ovocná hniloba) na citrusech atd. (Albertin et al 2016).

Díky obnovenému zájmu o nekonvenční kvasinky ve vinařském průmyslu byla tato kvasinka přehodnocena a stala se vhodnou a prospěšnou pro vinařské účely (Albertin et al. 2016).

3.8.8 *Metschnikowia pulcherrima*

Ekologická distribuce *M. pulcherrima* je široká, zahrnuje květiny, ovoce a jiné rostliny. Byla izolována i z různých druhů hmyzu, který opiluje tyto rostliny, a jedná se tudíž o přirozený vektor pro šíření tohoto druhu kvasinky. Díky své schopnosti kolonizovat povrchy různých druhů ovoce se začala kvasinka užívat jako přírodní biokontrolní prostředek proti posklizňové

jablečné hnilobě, způsobené např. *Botrytis cinerea*, *Penicillium* spp., *Monilia* spp., *Alternaria* spp.

Z různých druhů ovoce představuje povrch hroznové bobule optimální a na živiny bohaté prostředí pro *M. pulcherrima*. Navíc *M. pulcherrima* je obvykle přítomna v první fázi fermentace hroznové šťávy. Kvasinka se využívá jako fermentativní druh díky uvolňování aromatických těkavých sloučenin a tím zvyšuje celkový obsah aromatického profilu vín (Oro et al. 2014).

Další část práce pojednává o použité technice k identifikaci mikroorganismů z ovoce.

3.9 MALDI-TOF MS

MALDI-TOF neboli ionizace laserem za přítomnosti matrice v kombinaci s detektorem doby letu slouží k rychlé charakterizaci a identifikaci mikrobiální buňky. Spolu s ionizací elektrosprejem (ESI) patří k měkkým ionizačním technikám (Vaidyanathan et al. 2002).

MALDI TOF MS přispělo k diagnóze nádorů, revmatoidní artritidě, Alzheimerově chorobě a alergiím prostřednictvím identifikace specifických biochemických markerů (Wieser et al. 2012). Tuto technologii lze dále využít ke studiu odolnosti bakterií vůči antibiotikům nebo antimikrobiálním látkám vylučovanými jinými bakteriálními druhy (Marvin et al. 2003). MALDI-TOF MS je založena na analýze fenotypových znaků, které se liší v závislosti na kultivačním médiu a době inkubace (Carbonnelle et al. 2011).

První pokusy identifikovat mikroorganismy pomocí hmotnostní spektrometrie byly prováděny v roce 1975. Avšak tyto experimenty neměly příliš reprodukovatelné výsledky, zejména kvůli růstovým podmínkám a kultivačním médiím. S objevem MALDI-TOF MS v 80. letech byla možná analýza relativně velkých biomolekul, včetně větších ribozomálních proteinů (Wieser et al. 2012).

Použitím hmotnostní spektrometrie pro identifikaci bakterií v kombinaci MALDI-TOF MS se softwarem, který obsahuje databázi proteinových profilů a srovnávací algoritmy, je umožněna identifikace mikroorganismů na úrovni druhů (Ribeiro et al. 2020). MALDI-TOF MS umožňuje získat profily biomarkerů přímo z nefrakcionovaných mikroorganismů (viry, bakterie, plísňe, spory). Tento přístup umožňuje detekovat, charakterizovat a identifikovat peptidy a proteiny z neporušených mikroorganismů. Lze toho využít v buněčné biologii, biotechnologii a farmaceutickém výzkumu (Marvin et al. 2003).

Vlastností hmotnostní spektrometrie je určit hmotnost ku náboji (m/z) bioanalytu a poskytovat spektra během několika minut. Metoda se používá k profilování bakteriálních proteinů z buněčných extraktů. Tento postup poskytuje jedinečný spektrální otisk mikroorganismu. Metoda vyžaduje, aby biopolymerní molekuly přítomné v kondenzované fázi byly přeměněny na neporušené izolované ionizované molekuly v plynné fázi. Poté se tyto ionty separují podle své molekulové hmotnosti. Každá detekovaná molekula je charakterizována molekulovou hmotností (m), nábojem (z), poměrem m/z a relativní intenzitou signálu (Carbonnelle et al. 2011).

MALDI-TOF umožňuje detekci komplexních směsí makromolekul bez předchozího čištění vzorků (Carbonnelle et al. 2011). Protože se jedná o velmi citlivou techniku, postačuje pro analýzu malé množství mikrobiální biomasy (pro bakterie 10^4 až 10^6 CFU) (Wieser et al. 2012). Prvním krokem je tvorba krystalu mezi vzorkem a organickou matricí. Vzorek se nanese na MALDI destičku, přidá se vhodná matrice a vše se nechá uschnout při pokojové teplotě

(Carbonnelle et al. 2011). Typická MALDI destička pojme 16 až 384 vzorků (Wieser et al. 2012). Poté je destička vložena do MS, sušená směs matrice a vzorku je ozářena laserem, vytvoří se oblaka plynné fáze, která jsou poté pulzována do letové trubice (Carbonnelle et al. 2011). V analyzátoru doby letu (TOF) jsou ionty separovány a detekovány podle molekulové hmotnosti a náboje. Výsledným výstupem je hmotnostní spektrální profil určující molekulovou hmotnost iontů v původním oblaku (Keys et al. 2004). Obecně se produkují pouze jednotlivé ionizované druhy, které mají jediný náboj. Zájmové druhy jsou identifikovány podle poměru m/z , kde hodnota m/z je získána z těžiště píku (Carbonnelle et al. 2011).

Identifikace je založena na následujících podmínkách: (i) spektrální otisky, které se liší mezi mikroorganismy, (ii) mezi sloučeninami detekovanými ve spektru, některé píky jsou specifické pro rod, druh i poddruh, (iii) získaná spektra jsou reprodukovatelná, pokud jsou mikroorganismy kultivovány za stejných podmínek. Stejný druh může poskytnout různá hmotnostní spektra, pokud jsou zvoleny různé podmínky pro růst nebo různé metody chemické extrakce (Carbonnelle et al. 2011). Pro identifikaci na úrovni druhů je rozsah velikostí molekul používán v rozmezí 2 až 20 kDa, V tomto rozmezí jsou velmi stabilní výsledky a silný poměr signálu a šumu (Wieser et al. 2012).

Počítačový software automaticky porovnává spektra s referenční databankou, která obsahuje širokou škálu izolátů. Software, který porovnává spektra, generuje číselnou hodnotu (skóre) na základě podobnosti mezi pozorovanými a uloženými daty. Tato hodnota skóre poskytuje informace o věrohodnosti identifikace. Hodnota skóre nad 2,0 je považována za platnou identifikaci na úrovni druhu. Hodnoty mezi 2,0 a 1,7 představují spolehlivou identifikaci rodu (Wieser et al. 2012).

4 Metodika

Pro vlastní analýzu byly použity kůry z rostlin (*A. indica*, *C. arborea*, *H. odorata*, *H. pierrei*), které byly sesbírány v červenci 2017 Ing. Pavlem Novým, PhD., v Kambodži. Identifikace byla potvrzena expertem na kambodžskou floru panem Chhang Phourin (Forest and Wildlife Research Institute, Phnom Penh, Kambodža). Kůry z rostlin byly až do provedení analýzy skladovány v suchu ve lněných uzavíratelném sáčcích. Celkem byly provedeny tři opakující se analýzy a v rámci těchto analýz tři jednotlivá opakování.

4.1 Použité chemikálie

K izolaci mikroorganismů byly použity Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Oxoid; Basingstoke, Velká Británie) a glycerol (Penta; Praha, Česká republika). K jejich identifikaci se využilo následujících roztoků: kyselina trifluoroctová (TFA) (Sigma-Aldrich; Praha, Česká republika), acetonitril (Sigma-Aldrich; Praha, Česká republika), kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich; Praha, Česká republika) a HCCA (α -kyano-4-hydroxy-skořicová kyselina) (Bruker Daltonik GmbH, Lipsko, Německo). Rostlinné extrakty byly odpařeny pomocí etanolu (Penta; Praha, Česká republika) a jako rozpouštědlo byl použit dimethylsulfoxid (DMSO) (VWR; Stříbrná Skalice, Česká republika). Pro testování antimikrobiální aktivity byla vybrána kultivační media Mueller-Hinton Broth (MHB) (Oxoid; Basingstoke, Velká Británie), Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid; Basingstoke, Velká Británie) a RPMI 1640 médium (Sigma-Aldrich; Praha, Česká republika), použité pufrující látky pro výrobu médií byly chlorid sodný (Dorapis; Praha, Česká republika), TrisBase (tris(hydroxymethyl)aminomethan) (Roth; Karlsruhe, Německo), chlorid draselný (Penta; Praha, Česká republika) a MOPS (VWR; Stříbrná Skalice, Česká republika). Na úpravu pH kultivačních médií byly využity kyselina chlorovodíková (Lach-Ner; Neratovice, Česká republika) a hydroxid sodný (Lach-Ner; Neratovice, Česká republika). Jako referenční antibiotika byly zvoleny tioconazol (Sigma-Aldrich; Praha, Česká republika) a tetracyklin (Sigma-Aldrich; Praha, Česká republika). K vyhodnocení antimikrobiální aktivity bylo použito MTT barvivo (Sigma-Aldrich; Praha, Česká republika).

4.2 Použité přístroje

Laboratorní mlýnek (IKA A11 basic), analytické váhy (FR 200 Mark II), předvážky (Kern EmB 600-2), laboratorní třepačka (GFL 3006), vakuová odparka (Heidolph), vortex (Chromservis), sonikátor (Logicultrasonic PE cleaner), hořák (Fuego – basic, WLD-TEC), magnetické míchadlo (Variomag), flow box (Teistar 16152), densi-La-Meter II (Lachema), autokláv (Tuttnauer 3850EL), pH metr (XS), mechanické pipety (Eppendorf Research Plus), inkubátor (KBC 100/250), mrazák a chladnička (Bosch), multiscan Ascent Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific), centrifuga (Hettich), MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik GmbH, Lipsko, Německo), MALDI destička (Bruker Daltonik GmbH, Lipsko, Německo).

4.3 Testované mikroorganismy

Pro testování byly zvoleny tyto sbírkové kmeny: *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231 (Oxoid; Basingstoke, Velká Británie).

Dále byly užity mikroorganismy, které byly izolovány z různých druhů ovoce, jmenovitě: *Pantoea agglomerans* (izolováno ze švestek a jablek), *Hanseniaspora uvarum* (izolováno ze švestek a třešní), *Metschnikowia pulcherrima* (izolováno z višně, jablek).

4.3.1 Izolace mikroorganismů z ovoce

Ovoce se nejprve vložilo do Ehrlenmayerovy baňky a nechalo se třepat 10 minut na třepačce spolu se sterilním fyziologickým roztokem. Poté se provedlo ředění v poměru 1:10. Pomocí mikropipety se odebralo 300 μ l roztoku a přeneslo se na Petriho misku s SDA médiem. Takto zaočkovaná miska se nechala inkubovat při 25 °C v inkubátoru. Následně se dle potřeby provedlo pasážování až do získání dobře vyvinutých a jednotlivých kolonií. V případě výskytu kolonií s odlišnou morfologií se kolonie nechaly ještě jednou překultivovat, a to pomocí zvláštní plotny pro získání čisté kultury.

Poté byly dobře vyvinuté kolonie z čerstvé kultury převedeny pomocí sterilní kličky do mikrozkuřavky s 1 ml roztoku (kvasinky: 50% roztok glycerolu v destilované vodě, bakterie: 25% roztok glycerolu v destilované vodě). Takto připravený roztok se nechal zvertexovat a zmrazit na -80 °C až do dalšího použití. Izolované druhy mikroorganismů jsou shrnuty v tabulce 2.

4.3.2 Identifikace izolátů pomocí MALDI-TOF MS Biotyper

Bakterie a kvasinky byly identifikovány na základě analýzy ribozomálních proteinů na MALDI-TOF MS s automatickým pohybem matrice. Vše bylo provedeno podle pokynů výrobce. Spektra byla měřena automaticky pomocí softwaru FlexControl verze 3.4. Pro identifikaci mikroorganismů byla data získaná z každého izolátu importována do software BioTyper verze 2.0 (Bruker Daltonik GmbH, Lipsko, Německo) a analyzována. Měření každého kmene bylo prováděno dvakrát.

Nejprve byl připraven HCCA matricový roztok. Do Eppendorf tubičky bylo napipetováno 500 μ l 100% acetonitrilu, 475 μ l destilované vody, 25 μ l 100% TFA a 0,01 mg α -kyano-4-hydroxy-skořicové kyseliny. Takto vzniklé organické rozpouštědlo bylo důkladně promícháno, aby došlo k rozpuštění všech krystalů matrice.

4.3.2.1 Extrakce pomocí TFA

Do čisté Eppendorf trubičky (1,5 ml) byl bakteriologickou kličkou přenesen biologický materiál (1 kolonie). Poté bylo přidáno 80 μ l 80% TFA, který byl připraven promícháním 200 μ l destilované vody a 800 μ l 100% TFA. Roztok s biologickým materiálem byl následně promíchán pomocí pipety až do vytvoření suspenze a úplného rozpuštění materiálu. Po dobu cca 30 minut byl vzorek inkubován při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubační doby se ke vzorku přidalo 240 μ l destilované vody a 320 μ l acetonitrilu a vše se promíchalo vortexováním. Vzorek se dal zcentrifugovat na dobu dvou minut při maximálních otáčkách (9 000 RPM). Poté

se 1-2 µl supernatantu přeneslo mikropipetou na MALDI destičku (MTP 384 ocelová) a nechalo uschnout při laboratorní teplotě. Po pár minutách došlo k zaschnutí a supernatant se překryl 2 µl roztoku MALDI matrice. Takto připravená MALDI destička se po uschnutí za laboratorní teploty vložila do přístroje k identifikaci.

4.3.2.2 Extrakce pomocí etanolu a kyseliny mravenčí

Do čisté Eppendorf trubičky (1,5 ml) bylo napipetováno 300 µl destilované vody. Z kultivačních misek byl odebrán biologický materiál do mikrozkušavky s vodou a roztok byl promíchán pipetováním i vortexováním. Dále se přidalo 900 µl etanolu a vše se opět promíchalo. Poté byl roztok zcentrifugován při maximálních otáčkách po dobu dvou minut a byl slit supernatant, opět došlo k centrifugaci vzorku, při které došlo k uvolnění etanolu ze stěny na dno mikrozkušavky. Zbývající etanol byl pipetováním odstraněn. Zbylé pelety se nechat několik minut schnout při laboratorní teplotě. K peletu se přidalo 40 µl 70% kyseliny mravenčí (připravena z 300 µl destilované a 700 µl 100% kyseliny mravenčí) a vzniklý roztok byl promíchán pipetováním a následně vortexováním. Poté se k roztoku napipetovalo 40 µl 100% acetonitrilu a opět se vše promíchalo. Takto připravený vzorek se nechal zcentrifugovat (9 000 RPM, dvě minuty) a 1 µl supernatantu se nakapal na MALDI destičku. Po zaschnutí supernatantu se přidala 1 µl roztoku MALDI matrice. Po jejím zaschnutí byla MALDI destička připravena ke klasifikaci.

Tabulka 2: Seznam izolovaných mikroorganismů z ovoce (vlastní tvorba)

Ovoce	Značení	Izolované kvasinky	Izolované bakterie
Švestky	S1-b	-	<i>P. agglomerans</i>
	T1	<i>H. uvarum</i>	-
Třešně	T5	<i>Hanseniaspora spp.</i>	-
	T9	<i>Metschnikowia spp.</i>	-
Višně	V2	<i>M. pulcherrima</i>	-
Jablka	J1	-	<i>P. agglomerans</i>

Stupeň podobnosti s referenčním spektrem je reprezentován hodnotou skóre. Výsledky identifikace s hodnotami skóre nad 2 se považují za výsledky správné pro určení příslušného druhu (viz příloha III).

4.4 Příprava rostlinných extraktů

Kůra z rostlin byla zhomogenizovaná pomocí laboratorního mlýnku. Do Erlenmayerových baněk bylo pro každý vzorek naváženo stejné množství rostlinného materiálu (7,5 g rostlinné kůry) a přidáno 225 ml 70% etanolu. Baňky byly přikryty alobalem a ponechány třepat se na třepačce po dobu 24 hodin. Takto připravené vzorky byly přefiltrovány přes filtrační papír a nakonec i pomocí vakuové filtrace (membránový filtr - průměr 0,45 µm) pro úplné odstranění zbytků kůry a sterilaci extraktů.

Filtrát byl převeden do předem zvážených varných baněk. Varné baňky se vzorky byly odpařovány na vakuové odparce při teplotě 40 °C. Po odpaření byly vzorky umístěny do exsikátoru a poté byly varné baňky opět zváženy a bylo zjištěno množství vytěženého extraktu (viz tabulka 3). Vysušené extrakty byly pomocí nerezové lžičky převedeny do

skleněných vialek a byly rozpuštěny roztokem DMSO na zásobní koncentraci 204,8 mg/ml. Takto rozpuštěný extrakt byl zmrazen na teplotu -20 °C až do dalšího použití.

Tabulka 3: Výtěžnost rostlinných extraktů (vlastní tvorba)

Vzorek	Výtěžnost (%)
<i>A. indica</i>	14,93
<i>C. arborea</i>	4,27
<i>H. odorata</i>	13,20
<i>H. pierrei</i>	9,33

4.5 Stanovení antimikrobiální aktivity

4.5.1 Příprava kultivačních médií

K provedení pokusu byla zapotřebí různá kultivační média. První MHB ke stanovení bakterií a druhé RPMI pro testování kvasinek.

MHB bylo připraveno dle návodu, tj. 21 g média v 1 litru destilované vody. Takto připravený roztok byl promíchán na magnetickém míchadle. Druhá várka MHB byla připravena v poměru 21 g média na 1 litr pufru. Pufr byl připraven z 8 g NaCl, 6,1 g TrisBase, 0,2 g KCl na 1 litr destilované vody. Po rozmíchání na magnetickém míchadle bylo pH upraveno pomocí HCl na hodnotu 7,6.

Ke stanovení kvasinek bylo potřeba připravit RPMI médium. Na analytických vahách bylo naváženo 10,4 g RPMI a 34,53 g MOPS a byl přidán 1 litr destilované vody. U rozmíchaného roztoku bylo pH upraveno pomocí NaOH na hodnotu 7,0. Takto připravený roztok byl zfiltrován přes membránový filtr (0,45 µm) pomocí předem sterilovaného vakuového filtračního zařízení.

Dále bylo potřeba přichystat MH agar (38 g MHA/1 l destilované vody) pro stanovení minimální baktericidní koncentrace (MBC) bakterií a SD agar (65 g SDA/1 l destilované vody) pro stanovení MBC kvasinek. Po vysterilování se agary rozlily do Petriho misek o průměru 90 mm. Po ztuhnutí agaru se misky uložily do chladničky dnem vzhůru až do jejich užití.

Všechna připravená média s výjimkou RPMI byla sterilována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

4.5.2 Příprava inokula

Pro kultivaci bakterií bylo použito MHB bez pufru a pro kultivaci kvasinek RPMI médium. Do sterilních plastových zkumavek bylo injekční stříkačkou přeneseno 5 ml příslušného média a bylo přidáno pár kapek roztoku ze zásobního média s namnoženými mikroorganismy. Obsahy zkumavek byly promíchány a uloženy přes noc do inkubátoru při teplotě 35±2°C.

Pro přípravu námi použitého inokula bylo odebráno do nové sterilní zkumavky 10 ml média, opět pro bakterie MHB bez pufru a pro kvasinky RPMI, a kultury s narostlými mikroorganismy do nich byly přeneseny. Tato suspenze byla upravena na 0,5 McFarlanda pomocí spektrofotometrického zařízení pro standardizaci inokula. Takto bylo dosaženo cílené

koncentrace mikroorganismů vhodné pro zaočkování. Tyto úkony byly provedeny bezprostředně před použitím inokula. Tato suspenze byla přímo použita pro zaočkování mikrotitračních destiček za užití inokulátoru, tudíž finální koncentrace v mikrotitračních destičkách byla cca 5×10^5 CFU/ml pro bakterie a 2×10^3 CFU/ml pro kvasinky.

4.5.3 Příprava antibiotik a rostlinných vzorků

Pro stanovení bakterií bylo jako antibiotikum zvolen tetracyklin, který se nechal rozpustit v 96,5% etanolu. Pro kvasinky byl vybrán tioconazol, který se rozpustil v DMSO. Navážky antibiotik byly upraveny podle čistoty daného antibiotika, které byly udány výrobcem. Antibiotika byla rozpuštěna v příslušných rozpouštědlech ve $100\times$ vyšší koncentraci, než byla nejvyšší testovaná koncentrace. Poté byly zásobní roztoky rozředěny v kultivačním médiu 1:100 (MHB bez pufu pro bakterie, RPMI pro kvasinky) na požadovanou koncentraci.

Rostlinné extrakty rozpuštěné v DMSO byly vyjmuty z mrazáku. Tyto zásobní roztoky byly rozředěny v příslušném médiu (MHB bez pufu, RPMI) na počáteční koncentraci 2 048 $\mu\text{g/ml}$. Tyto nové zásobní roztoky byly využity pro vlastní analýzu.

4.5.4 Mikrodiluční test

Ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) testovaných antimikrobiálních látek byly použity sterilní 96jamkové mikrotitrační destičky z průhledného polypropylenu s kulatým dnem. První sloupec mikrotitrační destičky sloužil jako pozitivní kontrola růstu a poslední sloupec destičky jako kontrola čistoty pro námi použitý bujón. Pro bakterie i kvasinku byla připravena ředící řada. Do všech jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 100 μl bujónu (MHB s pufrem pro bakterie, RPMI pro kvasinky) s výjimkou jamek, kam patřilo antibiotikum. Do druhého sloupce bylo pipetováno 100 μl rostlinného extraktu (zředění počáteční koncentrace na 1 024 $\mu\text{g/ml}$) a 200 μl referenčního antibiotika (tetracyklin pro bakterie, tioconazol pro kvasinky). Poté bylo ze sloupce, který obsahoval naředěný rostlinný extrakt nebo antibiotikum (2. sloupec), odpipetováno 100 μl do dalšího sloupce, po smísení roztoků v tomto sloupci bylo opět odpipetováno 100 μl do dalšího sloupce. Takto se pokračovalo až do konce mikrotitrační destičky (viz příloha IV). Takto připravené destičky byly zaočkovány pomocí inokulátoru – kovového ježku (viz příloha V) připraveným inokulem a vloženy do inkubátoru: bakterie o teplotě 35 ± 2 °C na dobu jednoho dne a kvasinky o teplotě 25 ± 2 °C na dobu dvou dnů. Po uplynutí zvolené doby byly destičky vyjmuty z inkubátoru a mikrobiální růst byl spektrofotometricky změřen jako zákal pomocí Multiscan Ascent Fotometru při 405 nm. Byla vyhodnocena minimální inhibiční koncentrace, a to jako nejnižší koncentrace, která inhibuje viditelný mikrobiální růst. Po spektrofotometrickém vyhodnocení bylo použito barvivo MTT, a to zejména kvůli vysoké tvorbě zákalu a sedimentů v průběhu inkubace (viz příloha VI). Díky barvivo byla MIC vizuálně pozorovatelná (přechod ze žluté barvy barviva na fialovou). Všechny testy byly provedeny trojnásobně ve třech nezávislých experimentech a pro výpočet MIC byly použity střední hodnoty.

4.5.5 Minimální baktericidní koncentrace

Po vyhodnocení MIC se z jamek mikrotitrační destičky, ve kterých nebyl zaznamenán mikrobiální růst, pipetou odebralo 20 μl suspenze do Petriho misek s připravenými agary. Tyto

misky byly vloženy opět do inkubátoru o teplotě 35 ± 2 °C (bakterie) a 25 ± 2 °C (kvasinky). Po 24 hodinách u bakterií a 48 hodinách u kvasinek bylo vizuálně zkontrolováno, zda došlo k mikrobiálnímu nárůstu kolonií (viz příloha VII). Byla stanovena minimální baktericidní koncentrace (MBC). Tento úkon byl proveden ve dvojnásobném opakování. MBC byla vyhodnocena jako inhibice $\geq 99,99$ % CFU.

5 Výsledky

Výsledky *in vitro* růstového inhibičního účinku etanolového extraktu z kůry kambodžských rostlin proti bakteriím a kvasinkám pomocí mikrodiluční metody jsou shrnuty v tabulkách 3 a 4. Všechny testované látky vyvolaly určitý stupeň antimikrobiální aktivity, avšak jejich účinnosti značně kolísaly.

5.1 MIC a MBC základních řad testovaných mikroorganismů

Základní řada testovaných mikroorganismů zahrnovala dvě grampozitivní bakterie (*B. cereus*, *S. aureus*), dvě gramnegativní bakterie (*P. aeruginosa*, *E. coli*) a jednu kvasinku (*C. albicans*).

Z testovaných bakterií a kvasinek byly nejnižší hodnoty MIC pozorovány pro *C. arborea* proti *C. albicans* (64 µg/ml), následované *P. aeruginosa* (128 µg/ml). Střední antimikrobiální aktivita byla prokázána *H. pierrei*, *H. odorata* s MIC v rozmezí od 256 do 512 µg/ml. *A. indica* vykazovala pouze slabý inhibiční účinek (512-1024 µg/ml). Nebyly zjištěny žádné významné rozdíly mezi hodnotami pozitivní kontroly růstu a pozitivní kontroly MIC antibiotik. Hodnoty tetracyklinu a tioconazolu se pohybovaly v rozmezí 0,25-2 µg/ml.

MBC nebyla zachycena v nejvyšší testované koncentraci (1024 µg/ml) proti žádnému mikroorganismu (viz tabulka 4).

5.2 MIC a MBC izolovaných mikroorganismů z ovoce

C. arborea vykazovala nejvyšší inhibiční aktivitu proti *H. uvarum* (64 µg/ml). Jedná se o nejvyšší dosaženou antimikrobiální aktivitu v celé práci, společně s inhibicí *C. albicans* (64 µg/ml). Naproti tomu *H. pierrei* měla nejnižší aktivitu ze všech testovaných extraktů. Nejlepší výsledky tohoto extraktu byly zaznamenány proti inhibici růstu *H. uvarum* (512 µg/ml).

A. indica a *H. odorata* prokázaly střední antimikrobiální aktivitu. Extrakt z *H. odorata* byl nejúčinnější proti *H. uvarum* (256 µg/ml) a extrakt z *A. indica* opět proti *H. uvarum* (128 µg/ml). Žádný z extraktů nebyl účinný proti *M. pulcherrima* a *P. agglomerans* (>1024 µg/ml). Hodnoty MIC tetracyklinu proti bakterii *P. agglomerans* byly v rozmezí 0,25 až 0,5 µg/ml. Výsledky MIC tioconazolu, užívaného při testování kvasinek, byly značně variabilní a prokázaly vysokou inhibiční aktivitu (0,008-0,125 µg/ml).

MBC nebyla určena proti žádné bakterii a kvasince ani při nejvyšší testované koncentraci (1 024 µg/ml) (viz tabulka 5).

Tabulka 4: Antimikrobiální aktivita extraktů kůry kambodžských rostlin testovaná základní řadou mikroorganismů

Mikroorganismus	<i>C. arborea</i>		<i>H. odorata</i>		<i>A. indica</i>		<i>H. pierrei</i>		Tetracyklin	Tioconazol
	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>B. cereus</i>	512	-	>1 024	-	1 024	-	512	-	0,25	n.t.
<i>S. aureus</i>	512	-	256	-	512	-	256	-	0,25	n.t.
<i>E. coli</i>	512	-	1 024	-	>1 024	-	1 024	-	1	n.t.
<i>P. aeruginosa</i>	128	-	256	-	512	-	256	-	2	n.t.
<i>C. albicans</i>	64	-	1 024	-	512	-	512	-	n.t.	0,5

MIC – minimální inhibiční koncentrace; MBC – minimální baktericidní koncentrace (v případě *C. albicans* – minimální fungicidní koncentrace); n.t. – nebylo stanoveno; hodnota MBC nebyla zachycena v nejvyšší testované koncentraci (>1 024 $\mu\text{g/ml}$)

Tabulka 5: Antimikrobiální aktivita extraktů kůry kambodžských rostlin testovaná izolovanými mikroorganismy z ovoce

Mikroorganismus		<i>C. arborea</i>		<i>H. odorata</i>		<i>A. indica</i>		<i>H. pierrei</i>		Tetracyklin	Tioconazol
		MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>P. agglomerans</i>	S1-b	256	-	512	-	512	-	1 024	-	0,50	n.t.
<i>P. agglomerans</i>	J1	>1 024	-	1 024	-	1 024	-	>1 024	-	0,25	n.t.
<i>H. uvarum</i>	T1	64	-	512	-	256	-	512	-	n.t.	0,009
<i>H. uvarum</i>	T5	128	-	256	-	128	-	512	-	n.t.	0,031
<i>M. pulcherrima</i>	T9	>1 024	-	>1 024	-	>1 024	-	>1 024	-	n.t.	0,016
<i>M. pulcherrima</i>	V2	>1 024	-	>1 024	-	>1 024	-	>1 024	-	n.t.	0,125

MIC – minimální inhibiční koncentrace; MBC – minimální baktericidní koncentrace (popř. minimální fungicidní koncentrace); n.t. – nebylo stanoveno; hodnota MBC nebyla zachycena v nejvyšší testované koncentraci (>1 024 $\mu\text{g/ml}$)

6 Diskuze

V této práci byly etanolové extrakty z kůry kambodžských rostlin podrobeny testování antimikrobiální aktivity pomocí mikrodiluční metody. Při klasifikaci antibakteriální aktivity se očekává, že grampozitivní bakterie budou aktivnější než ty gramnegativní. Tento předpoklad je dán zejména rozdíly ve složení buněčné stěny (Joshi et al. 2010). V této práci se zjistilo, že rostlinné extrakty jsou do jisté míry aktivní jak proti grampozitivním, tak gramnegativním bakteriím.

Extrakt z kůry *H. pierrei* byl vůbec poprvé podroben testování antimikrobiální aktivity a byla u něho prokázána schopnost inhibovat všechny mikroorganismy, které jsme testovali s výjimkou *M. pulcherrima*. Poměrně dobrá MIC byla stanovena u testování extraktu zejména proti *S. aureus* a *P. aeruginosa* (MIC 256 µg/ml).

Extrakty, které byly testovány proti mikroorganismům izolovaným z ovoce (*P. agglomerans*, *H. uvarum* a *M. pulcherrima*) byly také poprvé testovány na antimikrobiální aktivitu. *C. arborea* vykazovala nejlepší antimikrobiální aktivitu včetně nejlepší hodnoty MIC proti *H. uvarum* (64 µg/ml).

A. indica

V rámci jednotlivých opakování nedocházelo k velkým výkyvům MIC. Tento rostlinný extrakt neprokázal příliš velkou aktivitu proti testovaným mikroorganismům. Největší inhibice byla zjištěna u *S. aureus*, *P. aeruginosa* a *C. albicans* (u všech MIC 512 µg/ml). Antibakteriální aktivita extraktů proti *E. coli* v rámci námi testovaných koncentrací nebyla prokázána.

Maleki et al. (2018) prováděl testování antimikrobiální aktivity s metanolovým a etanolovým extraktem z listů *A. indica*. Metanolové extrakty vykazovaly nejsilnější inhibici proti kmenu *P. aeruginosa*. Etanolové extrakty měly největší inhibiční účinek proti kmenům *S. aureus*. Avšak žádný z extraktů nevykazoval antibakteriální aktivitu proti *E. coli*. Podle Chea et al. (2007) metanolový extrakt z kůry *A. indica* nevykazoval antimikrobiální aktivitu proti *E. coli* a *P. aeruginosa*. Podobně silice ze semen neemu dle SaiRam et al. (2000) nevykazovala antimikrobiální aktivitu proti *E. coli*. Mistry et al. (2014) ve své studii uvedli MIC metanolového extraktu z listů *A. indica* proti *S. aureus* 250 µg/ml a MBC 500 µg/ml. Tyto výsledky MIC se přibližují našim hodnotám (MIC 512 µg/ml), ale MBC v našem případě nebyla zachycena. Joshi et al. (2010) uvedli antimikrobiální aktivitu *A. indica* proti *S. aureus* a *P. aeruginosa*, a naopak nepotvrdili aktivitu tohoto etanolového extraktu kůry proti *E. coli*. Obdobně naše výsledky potvrzují slabou aktivitu extraktu proti *S. aureus* (512 µg/ml) a *P. aeruginosa* (512 µg/ml) a neaktivitu proti *E. coli* (>1 024 µg/ml). Dále například El-Hawary et al. (2013) testovali antibakteriální aktivitu éterických olejů z květů a listů rostliny. Výsledky ukázaly inhibiční aktivitu proti *S. aureus* a *E. coli*, avšak *P. aeruginosa* zůstala odolná vůči inhibičnímu účinku jak u květů, tak u listů. Antifungální aktivita těchto éterických olejů z listů a květů se potvrdila i proti *C. albicans*. Nejnížší aktivita byla pozorována u silic z květů proti *E. coli* (stejně jako v našem případě). V tomto případě to bylo způsobeno pravděpodobně vyšším obsahem kyslíku v silici z květů.

Neem obsahuje různé fytoaktivní složky, jako jsou alkaloidy, glykosidy, terpenoidy, steroidy a taniny, které mohou být zodpovědné za biologické vlastnosti rostliny (Mistry et al. 2014). Terapeutická role je dále připisována antioxidantům, na které je rostlina bohatá. Přesto

molekulární mechanismus v prevenci patogeneze nebyl prozatím zcela pochopen. Části rostlin vykazují antimikrobiální aktivitu prostřednictvím inhibičního účinku na mikrobiální růst nebo rozkladem buněčné stěny. Azadirachtin, tetraterpenoidní limonoid přítomný zejména v semenech, je klíčovou složkou odpovědnou za toxické účinky proti hmyzu (Alzohairy 2016).

H. odorata

U tohoto rostlinného extraktu došlo k významnější mikrobiální inhibici. Nejvyšší aktivita byla zaznamenána proti *S. aureus* a *P. aeruginosa* (256 µg/ml) a naopak žádnou aktivitu neprokázal extrakt proti *B. cereus* (>1 024 µg/ml).

Chusri et al. (2012) ve své studii uvedl, že etanolové extrakty z *H. odorata* mají slabou anti-stafylokovou aktivitu. Dále Kabir et al. (2015) se zabýval antibakteriální aktivitou různých druhů extraktů (metanolový, etanolový, vodný) z listů *H. odorata* proti *S. aureus*, *E. coli* a *B. subtilis*. Metanolový extrakt vykazoval největší aktivitu proti *S. aureus* a *B. subtilis* a etanolový extrakt proti *E. coli*. Obecně lze říci, že metanolový extrakt vykazuje vyšší antibakteriální aktivitu ve srovnání s etanolovým a vodným extraktem, které vykazují nízkou aktivitu. Avšak etanolový extrakt prokázal nejvyšší inhibici proti *E. coli*. V porovnání s našimi výsledky, etanolový extrakt z kůry *H. odorata* byl nejvíce účinný proti *S. aureus* (MIC 256 µg/ml). Naopak inhibice proti *E. coli* byla velmi slabá (MIC 1024 µg/ml). Dále *Bacillus* spp. udává odlišně výsledky. V metanolovém extraktu vykazoval dle Kabir et al. (2015) velkou aktivitu, ale v naší analýze, kde byl použit etanolový extrakt, byl zcela neaktivní (>1 024 µg/ml). Wipasinee (2007) stanovil MIC etanolového extraktu z kůry *H. odorata* proti *S. aureus* v rozmezí 62,5 – 125 µg/ml. V tomto případě byla i v naší práci zaznamenána inhibice extraktu proti *S. aureus*, která ale nebyla takto účinná (256 µg/ml).

Obsahy flavonoidů v rostlinných extraktech mohou být jednou z fyto složek, které jsou odpovědné za antibakteriální aktivitu. Je uvedeno, že extrakty, které obsahují nevíce flavonoidů mají nejvyšší antibakteriální účinek a naopak (Kabir et al. 2015). Také taniny, které jsou rovněž přítomny v rostlinných extraktech, mohou inhibovat mikrobiální růst *in vitro*. Tyto sloučeniny se mohou vázat na proteiny a způsobovat jejich koagulaci (Wipasinee 2007).

C. arborea

Rostlinný extrakt *C. arborea* způsobil v rámci této práce největší antimikrobiální aktivitu, a to zejména proti *C. albicans* (64 µg/ml) a *P. aeruginosa* (128 µg/ml). Proti ostatním testovaným bakteriím byla shodná MIC 512 µg/ml.

Kumar et al. (2006) stanovili nejvyšší antimikrobiální aktivitu metanolového extraktu z kůry *C. arborea* proti *P. aeruginosa*. Jejich výsledek se shoduje s naší analýzou. Dále prokázali určitou inhibici proti *E. coli*, následovanou *S. aureus* a *C. albicans*. Mali & Wadje (2015) srovnávali antimikrobiální aktivitu různých extraktů z listů rostliny. Jako nejcitlivější mikroorganismus uvedli *B. subtilis*, a to ve všem typech extraktů. Obecně uvádějí, že etylacetátový extrakt prokazuje nejvýznamnější antibakteriální aktivity, zatímco etanolový a chloroformový extrakt indikuje nízké hodnoty MIC proti testovaným mikroorganismům. Tento výsledek naznačuje určité bakteriostatické či fungistatické účinky extraktů. Rozdíl v analýze je patrný zejména u MIC *C. albicans*, kde etanolový extrakt v naší analýze ukázal větší inhibici. Navya & Anitha (2018) stanovili pomocí metanolového extraktu z kůry nejvyšší

inhibiční aktivitu proti *E. coli* a z kvasinek proti *C. albicans*. Obdobně naše výsledky potvrzují silnou aktivitu extraktu pro *C. albicans*.

Za antimikrobiální aktivitu extraktů *C. arborea* jsou z velké pravděpodobnosti zodpovědné fytochemikálie, jako jsou polyfenoly, flavonoidy a triterpenoidy. Tyto biologicky aktivní sloučeniny mohou být dále odpovědné za antioxidační a volné radikálové aktivity rostliny (Kumar et al. 2006).

Palmová šťáva

Potřeba zvýšit trvanlivost šťávy a odvrátit negativní vlivy mikrobů zvyšují nároky na konzervaci. Syntetická antimikrobiální činidla a chemicky syntetizované látky používané ke konzervaci potravin se používají už od starověku. Avšak v dnešní době spotřebitelé ustupují od chemických konzervantů a roste zájem o některé přírodní antimikrobiální látky, které lze získat z rostlinných extraktů (Adeogun et al. 2017).

V Kambodži se tradičně užívají kůry z *A. indica*, *H. odorata*, *C. arborea* k inhibici růstu mikroorganismů, které se přirozeně vyskytují v palmovém víně. Palmovou šťávu je obvykle nutné zkonzumovat během prvních 24 hodin, aby nedošlo ke znehodnocení organoleptických vlastností. Kůra z těchto rostlin - prostřednictvím inhibice mikroorganismů – zpomaluje proces kvašení a prodlužuje tak trvanlivost palmové šťávy o několik hodin (Morah & Robinson 2015; Rithy Chrun, osobní sdělení 2017).

Kyselost palmové šťávy se s narůstajícím časem zvyšuje. Tento jev je způsoben zejména aktivitou rodu *Acetobacter*, který je přítomen v palmové šťávě a přeměňuje etanol na kyselinu octovou. Zároveň s přibývajícím obsahem etanolu se snižuje obsah cukrů. Po přidání kmenové kůry se snižuje rychlost zvyšování kyselosti. Tento snižující účinek je způsoben tím, že extrakty inhibují růst mikroorganismů zodpovědných za přeměnu etanolu na kyselinu octovou, čímž dochází ke konzervačnímu účinku. Podobným způsobem fungují i běžné konzervační látky (disiřičitan sodný) přidávané například do vín (Morah & Robinson 2015).

Kapilan (2015) užíval ve své studii šťávu z palmy *Caryota urens*, do které přidával kůru z *C. arborea* a listy z *A. indica*. Došel k závěru, že po přidání kůry a listů se ve šťávě vyskytuje velmi malé množství kvasinek. Přestože byly kvasinkové buňky přítomny ve všech ošetřeních, nedošlo k jejich exponenciálnímu růstu. Mezi šťávou a materiálem, který způsobí inhibici fermentace, pravděpodobně nastávají biochemické reakce, které vedou k produkci nebo aktivaci některých antibiotických látek ve šťávě. Autor ale nedoporučuje používat kůru z *C. arborea* a listy z *A. indica* jako inhibitory kvůli jejich neschopnosti inhibovat alkoholové kvašení a udržování vyššího obsahu cukru ve šťávě.

Morah & Robinson (2015) ve své práci k prodloužení trvanlivosti používají extrakt z kůry *S. gabonensis*. Doporučují extrakt zejména jako náhradu disiřičitanu sodného a benzoátů, které se užívají jako konzervační látky na nigerijském trhu s palmovým vínem. Na trhu existuje nepatrné množství lahvového palmového vína, které se konzervuje pomocí těchto dovážených konvenčních konzervačních látek. Náhrada těchto látek za extrakt z kůry *S. gabonensis* by byla pro místní lid levnější, přírodní a ekologická alternativa. Faparusi & Bassir (1972) se zabývají tríslovinami a jejich deriváty. Považují trísloviny za sloučeniny, které zvyšují odolnost šťávy vůči bakteriálnímu kažení. Všechny typy kůr z kambodžských rostlin, které se vhazují do palmové šťávy, jsou bohatými zdroji tríslovin. Tyto sloučeniny by mohly být také jedním z faktorů zodpovědných za hořkou chuť jak kůry, a tak i palmové šťávy.

Adeogun et al. (2017) zkoumali životnost pomerančové šťávy po přidání rostlinných extraktů z listů *Canna indica*, *Megaphrynium macrostachyum* a *Thaumatococcus danielli*. Jejich výsledky opět naznačily, že etanolové extrakty zpomalují růst mikroorganismů.

7 Závěr

Výsledky práce ukázaly, že extrakty z kmenové kůry *A. indica*, *C. arborea*, *H. odorata* a *H. pierrei* jsou schopny inhibovat většinu z testovaných mikroorganismů. Extrakt z *H. pierrei* byl vůbec poprvé námi testován na antimikrobiální aktivitu.

Antimikrobiální aktivita námi zvolených rostlinných extraktů byla také poprvé testována proti *P. agglomerans*, *H. uvarum* a *M. pulcherrima*. Kůra těchto rostlinných extraktů vykazovala mírnou antimikrobiální aktivitu i proti ostatním druhům testovaných mikroorganismů (*E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* a *C. albicans*) a byla tak potvrzena hypotéza práce. Za nejúčinnější extrakt v této práci dle nejnižších hodnot MIC můžeme považovat extrakt z *C. arborea*.

Na základě dosažených výsledků lze usoudit, že extrakty výše zmíněných rostlinných druhů mohou skutečně zpomalovat proces mikrobiálního kažení a prodloužit tak dobu údržnosti palmové šťávy. Bylo by dále vhodné ověřit antimikrobiální aktivitu proti širšímu spektru mikroorganismů a otestovat také schopnost extraktů brzdit alkoholové kvašení při subinhibičních koncentracích v potravních modelech. V neposlední řadě by bylo zajímavé identifikovat hlavní složky extraktů zodpovědné za antimikrobiální aktivitu.

8 Literatura

- Abbasloo F, Khosravani SA, Ghaedi M, Dashtian K, Hosseini E, Manzouri L, Khorramrooz SS, Sharifin A, Jannesar R, Sadri F. 2018. Sonochemical-solvothermal synthesis of guanine embedded copper based metal-organic framework (MOF) and its effect on oprD gene expression in clinical and standard strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Ultrasonics – Sonochemistry* **42**: 237-243.
- Abdi RD, Dego OK. 2019. Antimicrobial activity of *Persicaria pensylvanica* extract against *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Integrative Medicine* 29 (e 100921) DOI: 10.1016/j.eujim.2019.05.007.
- Adeogun OO, Adekunle AA, Adongbede EM. 2017. Effects of Leaf Extracts of Selected Plants on Quality of Stored *Citrus sinensis* (Sweet Orange) Juice. *Notulae Scientia Biologicae* **9**: 256-262.
- Akeel RA, Mateen A, Janardhan K, Gupta VC. 2017. Analysis of anti-bacterial and anti oxidative activity of *Azadirachta indica* bark using various solvents extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences* **24**: 11-14.
- Albertin, et al. 2016. *Hanseniaspora uvarum* from Winemaking Environments Show Spatial and Temporal Genetic Clustering. *Frontiers in Microbiology* **6**: 1569.
- Ali A, Shahid MA, Hossain MD, Islam MN. 2019. Antibacterial bi-layered polyvinyl alcohol (PVA)- chitosan blend nanofibrous mat loaded with *Azadirachta indica* (neem) extract. *International Journal of Biological Macromolecules* **138**: 13-20.
- Alzohairy MA. 2016. Therapeutics role of *Azadirachta indica* (Neem) and their active constituents in diseases prevention and treatment. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* (e7382506) DOI: 10.1155/2016/7382506.
- Ambardar N, Aeri V. 2013. A better understanding of traditional uses of *Careya arborea* Roxb.: Phytochemical and pharmacological review. *TANG Humanitas medicine* **3**: 281-287.
- Aniszewski T. 2007. *Alkaloids – Secrets of Life. Alkaloids Chemistry, Biological Significance Application and Ecological Role*. Elsevier, Amsterdam.
- Araújo D, Azevedo NM, Barbosa A, Almeida C, Rodrigues ME, Henriques M, Silva S. 2019. Application of 2'-OMethylRNA' Antisense Oligomer to Control *Candida albicans* EFG1 Virulence Determinant. *Molecular Therapy – Nucleic Acids*: **18**: 508-517.
- Arendrup MC, Meletiadiis J, Mouton JW, Lagrou K, Hamal P, Guinea, EUCAST-AFST. 2017. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeast. EUCAST. Available from https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_7_3_1_Yeast_testing_definitive.pdf (accessed březen 2020).
- Atputharajah JD, Widanapathirana S, Samarajeewa U. 1986. Microbiology and biochemistry of natural fermentation of coconut palm sap. *Food mikrobiology* **3**: 273-280.
- Bahuguna A, Khan I, Bajpai VK, Kang SC. 2017. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journals of Pharmacol* **12**: 115-118.

- Bedri S, Khalil EA, Khalid SA, Alzohairy MA, Mohieldein A, Aldebasi YH, Etet PFS, Farahna M. 2013. *Azadirachta indica* ethanolic extract protects neurons from apoptosis and mitigates brain swelling in experimental cerebral malaria. *Malaria Journal* **12**.
- Begum R, Sheliya MA, Mir SR, Singh E, Sharma M. 2017. Inhibition of proinflammatory mediators by coumaroyl lupendioic acid, a new lupane-type triterpene from *Careya arborea*, on inflammation-induced animal mode. *Journal of Ethnopharmacology* **206**: 376-392.
- Biswas K, Chattopadhyay I, Banerjee RK, Bandyopadhyay U. 2002 Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Science* **82**: 1336-1345.
- Borin K. 1996. The Sugar Palm Tree As the Basic of Integrated Farming Systems in Cambodia. The Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Kambodža. Available from <http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/conf96.htm/khieu.htm> (accessed březen 2020).
- Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti JL, Ferroni A, Gutmann L, Nassif X. 2011. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry* **44**: 104-109.
- Chandrasekhar K, Sreevani S, Seshapani P, Pramodhakumari J. 2012. A Review on palm wine. *International Journal of Research in Biological Sciences* **2**: 33-38.
- Chassagne F, Hul S, Deharo E, Bourdy G. 2016. Natural remedies used by Bunong people in Mondulhiri province (Northeast Cambodia) with special reference to the treatment of 11 most common ailments. *Journal of Ethnopharmacology* **191**: 41-70.
- Chea A, Jonville MC, Bun SS, Laget M, Elias R, Duménil G, Balansard G. 2007. *In vitro* antimicrobial activity of plants used in Cambodian traditional medicine. *The American Journal of Chinese Medicine* **35**: 867-873.
- Chowdhury MSH, Halim MA, Muhammed N, Haque F, Koike M. 2008. Traditional utilization of wild date palm (*Phoenix sylvestris*) in rural Bangladesh: an approach to sustainable biodiversity management. *Journal of Forestry Research* **19**: 245-251.
- Chusri S, Chaicoch N, Thongza-ard W, Limsuwan S, Voravuthikunchai SP. 2012. *In vitro* antibacterial activity of ethanol extracts of nine herbal formulas and its plant components used for skin infections in Southern Thailand. *Journal of Medicinal Plants Research* **6**: 5616-5623.
- CLSI. 2013. M100-S23 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. USA.
- Conte FP, Ferraris FK, Costa TEMM., Pacheco P, Seito LN, Verri WA, Cunha FQ, Penido C, Henriques MG. 2015. Effect of Gedunin on Acute Articular Inflammation and Hypernociception in Mice. *Molecules* **20**: 2636-2657.
- Cos P, Vlietnick AJ, Vanden Berghe D, Maes L. 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology* **106**: 290-302.

- Czekanska EM. 2011. Assessment of Cell Proliferation with Resazurin-Based Fluorescent Dye. Pages 27-32 in Stoddart MJ, editor. Mammalian Cell Viability. Humana Press, USA.
- Dahiya P, Purkayastha S. 2012. Phytochemical screening and antimicrobial activity of some medicinal plants against multi-drug resistant bacteria from clinical isolates. Indian Journal of Pharmaceutical Science **74**: 443-450.
- Dangana A, Nasir AI, Egenti BN. 2016. Preliminary evaluation of antibacterial potential of four common Nigerian plants against isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. New York Science Journal **9**: 66–71.
- Decree R. 2005. Palm tree (*Borassus flabellifer*): The National Tree of Cambodia. InfoCamodia. Available from: <https://www.intocambodia.com/cambodias/palm-tree-borassus-flabellifer-national-tree-cambodia> (accessed duben 2019).
- DeFilipps RA, Krupnick A. 2018. The medicinal plants of Myanmar. PhytoKeys **102**: 1-341.
- Diao M, Qi D, Xu M, Lu Z, Fengxia L, Bie X, Zhang C, Zhao H. 2018. Antibacterial activity and mechanism of monolauryl-galactosylglycerol against *Bacillus cereus*. Food Control **85**: 339-344.
- Díaz C, Molina AM, Nähring J, Fischer R. 2013. Characterization and Dynamic Behavior of Wild Yeast during Spontaneous Wine Fermentation in Steel Tanks and Amphorae. BioMed Research International (e540465) DOI: 10.1155/2013/540465.
- Diddi S, Bale S, Pulivendala G, Godugu C. 2019. Nimbolide ameliorates fibrosis and inflammation in experimental murine model of bleomycin-induced scleroderma. Inflammopharmacology **27**: 139-149.
- Dong TL, Beadle CL, Doyle R, Worledge D. 2014. Site conditions for regeneration of *Hopea odorata* in natural evergreen dipterocarp forest in southern Vietnam. Journal of Tropical Forest Science **26**: 532-542.
- Dorrah MA, Mohamed AA, Shaurub EH. 2019. Immunosuppressive effects of the limonoid azadirachtin, insights on a nongenotoxic stress botanical, in flesh flies. Pesticide Biochemistry and Physiology **153**: 55-66.
- Duong NV. 1993. Medicinal Plants of Vietnam, Cambodia and Laos. Nguyen Van Duong.
- Dy Phon P. 2000. Dictionary of Plants used in Cambodia. Imprimerie Olympic, Phnom Penh.
- EFSA. 2011. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance azadirachtin. European Food Safety Authority, Parma.
- El-Hawary SS, El-Tantawy ME, Rabeh MA, Badr WK. 2013. Chemical composition and biological activities of essential oils of *Azadirachta indica* A. Juss. International Journal of Applied Research in Natural Products **6**: 33-42.
- Elkamali HH, Mahjoob SE. 2015. Evaluation of Antibacterial Activity of Some Medicinal Plants Used in Sudanese Folk Medicine for Treatment of Gastrointestinal Tract Infections. American Journal of Life Sciences **3**: 230-237.

- Emami A, Keshavarzi A, Pirbonyeh N, Behbahani MR. 2019. Identification of different faces of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in burn patients by genetic fingerprinting. *Gene Reports* 15 (e100377) DOI: 10.1016/j.genrep.2019.100377.
- Ephrem E, Najjar A, Charcosset C, Greige-Georges H. 2018. Encapsulation of natural active compounds, enzymes, and probiotics for fruit juice fortification, preservation, and processing: An overview. *Journal of Functional Foods*. **48**: 65-84.
- Estaji M, Tabasi M, Heravi FS, Khezerloo JK, Radmanesh A, Raheb J, Ghadirzadeh MR, Tabatabaei A. 2019. Genotypic identification of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with urinary tract infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **65**: 23-28.
- EUCAST. 2000. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1469-0691.2000.00142.x> (accessed leden 2020).
- EUCAST. 2020. Antimicrobial susceptibility testing, EUCAST disk diffusion method. EUCAST. Available from https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2020_manuals/Manual_v_8.0_EUCAST_Disk_Test_2020.pdf (accessed leden 2020).
- Ezeronye OU. 2004. Nutrient utilization profile of *Saccharomyces cerevisiae* from palm wine in tropical fruit fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* **86**: 235-240.
- Faccin-Galhardi LC, Ray S, Lopes N, Ali I, Espada SF, Santos JP, Ray B, Linhares REC, Nozawa C. 2019. Assesment of antiherpetic activity of nonsulfated and sulfated polysaccharides from *Azadirachta indica*. *International Journal of Biological Macromolecules* **137**: 54-61.
- FAO. 2011. Global Food Losses and Food Waste - Extent, Causes and Prevention. The Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome. Available from: <http://www.fao.org/3/a-i2697e.pdf> (accessed únor 2020).
- Faparusi SI, Bassir O. 1972. Effect of extracts of the bark of *Sacoglottis gabonensis* on the microflora of palm-wine. *Applied Microbiology* **24**: 253-256.
- Farida Moazzami SH, Radjabian T. 2019. Phytosterols in *Salvia* Seeds: Content and Composition and Correlation with Environmental Parameters. *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science* **43**: 2129-2140.
- Farjaminezhad R, Garoosi G. 2019. New biological trends on cell and callus growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica*. *3 Biotech* **9**: 309.
- Gabrielson J, Hart M, Jarelöv A, Kühn I, McKenzie D, Mölby R. 2002. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *Journal of Microbiological Methods* **50**: 63-73.

- Ghonmode WN, Balsaraf OD, Tambe VH, Saujanya KP, Patil AK, Kakde. 2013. Comparison of the antibacterial efficiency of neem leaf extracts, grape seed extracts and 3% sodium hypochlorite against *E. feacalis* – An in vitro study. *Journal of International Oral Health* **5**:61-66
- Ghosh S, Chakraborty R, Raychaudhuri U. 2011. Optimizing process conditions for palm (*Borassus flabellifer*) wine fermentation using Response Surface Methodology. *International Food Research Journal* **19**: 1633-1639.
- Girish K, Shankara Bhat S. 2008. Neem – A Green Treasure. *Electronic Journal of Biology* **4**: 102-111.
- Grossman W, Wasey A, Salen P. 2019. *Escherichia Coli* (E Coli 0157 H7). StatPearls Publishing, USA.
- Grymel M, Zawojak M, Adamek J. 2019. Triphenylphosphonium Analogues of Betulin and Betulinic Acid with Biological Activity: A Comprehensive Review. *Journal of Natural Products* **82**: 1719-1730.
- Gupta P, Patil D, Patil A. 2019. Quality evaluation and high performance thin layer chromatography fingerprint profile of *Careya arborea* Roxb. seeds. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **8**: 1730-1735.
- Gupta PC, Rao CV. 2014. Gastroprotective effect of standardized leaf extract from *Careya arborea* on experimental gastric ulcers in rats. *Pharmaceutical Biology* **52**: 1003-1008.
- Haldar S, Kolet SP, Dandekar DS, Kale BS, Gonnade RG, Thulasiram HV. 2014. Biocatalyst mediated functionalization of salannin an insecticidal limonoid. *RSC Advances* **4**: 27661-27664.
- Handa SS, Rakesh DD, Vasisht K. 2006. *Compendium of Medical and Aromatic Plants*. ICS-UNIDO, Itálie.
- Hasan MM, Ahmes SW, Azhar I, Bano H. 2010. Phytoconstituents isolated from *Phoenix sylvestris* Roxb. *Journal of Basic and Applied Sciences* **6**: 17-22.
- Hebbar KB, Pandiselvam R, Manikantan MR, Arivalagan M, Beegum S, Chowdappa P. 2018. Palm Sap – Quality Profiles, Fermentation Chemistry, and Preservation Methods. *Sugar Tech* **20**: 621-634.
- Henning SM, et al. 2017. Health benefit of vegetable/ fruit juice-based diet: Role of microbiome. *Scientific Reports* **7**: 2167.
- Hoelzer K, Cummings KJ, Warnick LD, Schukken YH, Siler JD, Grohn YT, Davis MA, Beser TE, Wiedmann M. 2011. Agar Disk Diffusion and Automated Microbroth Dilution Produce Similar Antimicrobial Susceptibility Testing Results for *Salmonella* Serotypes Newport, Typhimurium, and 4,5,12:i-, But Differ Economic Cost. *Foodborne Pathogens and Disease* **12**: 1281-1288.
- Hogade MG, Jalalpure SS, Bhinge SD, Kuthar S, Kosgi SS. 2014. *In vitro* Anthelmintic Activity of Bark of *Azadirachta indica* against *Ascardi galli* and *Eudrilus eugeniae*. *Journal of Natural Remedies* **14**: 48-51.

- Hossain MM, Kabir MSH, Chowdhury TA, Hasanat A, Chakrabarty N. 2015. Anthelmintic Effects of Different Extracts of *Hopea odorata* Leaves on *Tubifex tubifex* Worm Using In vitro Method and their Condensed Tannin Content. *British Journal of Pharmaceutical Research* **8**: 1-7.
- Hout S, Chea A, Bun SS, Elias R, Gasquet M, Timon-David P, Balansard G, Azas N. 2006. Screening of selected indigenous plants of Cambodia for antiplasmodial activity. *Journal of Ethnopharmacology* **107**: 12-18.
- Imran H, Sohail T, Atiq-ur-Rahman, Iqbal W, Fatima N, Shakir M. 2020. A comparative study of four indigenous medicinal plants of Pakistan against some oral pathogens. *Bangladesh Journal of Medical Science* **19**:284-290.
- Iqbal MN, et al. 2016. Microbiological Risk Assessment of Packed Fruit Juices and Antibacterial Activity of Preservatives Against Bacterial Isolates. *Pakistan Journal of zoology* **48**: 1695-1703.
- Isoda H, Motojima H, Onaga S, Samet I, Villareal MO, Han J. 2014. Analysis of the erythroid differentiation effect of flavonoid apigenin on K562 human chronic leukemia cells. *Chemico-Biological Interaction* **220**: 269-277.
- Jessberger N, Kranzler M, Riol C, Schwenk V, Buchacher T, Dietrich R, Ehling-Schulz M, Märklbauer E. 2019. Assessing the toxic potential of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Food Microbiology* **84** (e103276) DOI: 10.1016/j.fm.2019.103276.
- Jha, K, Jha A, Chaudhary M, Kumar S, Prakash V, Mohan Dayal V. 2019. The relation of toddy (palm wine) intake to amoebic liver abscess in a predominantly toddy-drinking population: a cross-sectional study. *Tropical Doctor* **49**: 197-200.
- Joshi B, Sah GP, Basnet BB, Bhatt MR, Sharma D, Subedi K, Pandey J, Malla R. 2010. Phytochemical extraction and antimicrobial properties of different medicinal plants: *Ocimum sanctum* (Tulsi), *Eugenia caryophyllata* (Clove), *Achyranthes bidentata* (Datiwan) and *Azadirachta indica* (Neem). *Journal of Microbiology and Antimicrobials* **3**: 1-7.
- Kabir MSH, Hossain MM, Abir MI, Ahmad S, Chakrabarty N, Rahman MA, Rahman MM. 2016. Antioxidant, antidiarrheal, hypoglycemic and thrombolytic activities of organic and aqueous extracts of *Hopea odorata* leaves and in silico PASS prediction of its isolated compounds. 2016. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **16**: 474.
- Kabir MSH, Noman MAA, Rahman MM, Ara J, Hossain MM, Hasanat A, Zaheed F. 2015. Antibacterial Activity of Organic and Aqueous Extracts of *Hopea odorata* Roxb. Leaves and their Total Flavonoid Content. *British Microbiology Research Journal* **9**: 1-7.
- Kadhun DA, Mohammed SA, Abbas MK. 2019. The inhibitor effect of silver and zinc oxide Nanoparticles on *Pantoea agglomerans* isolated from patients with Hemodialysis. *Research Journal of Pharmacy and Technology* **12**: 5167-5170.
- Kapilan R. 2015. Determination of Efficient Fermentation Inhibitor of the tapped Inflorescence Sap of *Caryota urens* in Sri Lanka. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **4**: 487-496.

- Kar A. 2007. Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology. New Age International (P) Ltd., Publishers, Nové Dilli.
- Kawamura F, Mahamud A, Sulaiman O, Hashim R. 2010. Antifungal activity of extracts from heartwood, sapwood and bark of 11 Malaysian timbers against *Gloeophyllum trabeum* and *Pycnoporus sanguineus*. *Journal of Tropical Forest Science* **22**: 170-174.
- Keo S, et al. 2018. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by traditional healers in Kampong Speu province, Cambodia. *Asian Journal of Pharmacognosy* **2**: 21-32.
- Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T, McDowall M, Shah HN. 2004. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infection, Genetics and Evolution* **4**: 221–242
- Khare CP. 2007. Indian Medicinal Plants. Springer, New York.
- Khodabakhshian R. 2019. Feasibility of using Raman spectroscopy for detection of tannin changes in pomegranate fruits during maturity. *Scientia Horticulturae* 257 (e102670) DOI: 10.1016/j.scienta.2019.108670.
- Khuankaew S, Srithi K, Tiansawat P, Jampeetong A, Inta A, Wangpakapattanawong P. 2014. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Tai Yai in Northern Thailand. *Journal of Ethnopharmacology* **151**: 829-838.
- Klingel T, Hadamjetz M, Fischer A, Wefers D, 2019. Glucosylation of flavonoids and flavonoid glycosides by mutant dextransucrase from *Lactobacillus reuteri* TMW 1.106. *Carbohydrate Research* 483 (e107741) DOI: 10.1016/j.carres.2019.107741.
- Kotzekidou P, Giannakidis P, Boulamatsis A. 2008. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens *in vitro* and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. *LWT – Food Science and Technology* **41**: 119-127.
- Kumar K, Mruthunjaya K, Kumar S, Mythreyi R. 2013. Anti ulcer activity of ethanol extract of the stem bark of *Careya arborea* Roxb. *International Current Pharmaceutical Journal* **2**: 78-82
- Kumar RS, Sivakumar T, Sundaram RS, Sivakumar P, Nethaji R, Gupta M, Mazumdar UK. 2006. Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Careya arborea* Roxb. Stem Bark. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics* **5**: 35-41.
- Lall WS, Charan AA, Bind A. 2013. Antimicrobial activity of methanolic and acetonetic extracts of *Azadirachta indica*, *Saraca asoca* and *Curcuma longa*. *International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences* **3**: 79-86.
- Lasekan O, Abbas KA. 2010. Flavour chemistry of palm toddy and palm juice: a review. *Trends in Food Science & Technology* **21**: 494-501.
- Lasekan O, Buettner A, Christlbauer M. 2007. Investigation of important odorants of palm wine (*Elaeis guineensis*). *Food Chemistry* **105**:15-23.

- Lim JA, Lee DH, Kim BY, Heu S. 2014. Draft genome sequence of *Pantoea agglomerans* R190, a producer of antibiotics against phytopathogens and foodborne pathogens. *Journal of Biotechnology* **188**: 7-8.
- Lucantoni L, Yerbanga RS, Lupidi G, Pasqualini L, Esposito F. 2010. Transmission blocking activity of a standardized neem (*Azadirachta indica*) seed extract on the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* in its vector *Anopheles stephensi*. *Malaria Journal* **9**: 66.
- Ma Y, Ding S, Fei Y, Liu G, Jang H, Fang J. 2019. Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Food Control* 106 (e1006713) DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.106712.
- Maaroufi Y, Heymans C, Bruyne JM, Duchateau V, Rodriguez-Villalobos H, Aoun M, Crokaert F. 2003. Rapid Detection of *Candida albicans* in Clinical Blood Samples by Using a TaqMan-Based PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 3293-3298.
- Maestrini M, Tava A, Mancini S, Salari F, Perrucci S. 2019. *In Vitro* Anthelmintic Activity of Saponins Derived from Medicago spp. *Plants against Donkey Gastrointestinal Nematodes. Veterinary Sciences* **6**.
- Machyňáková A, Hroboňová K. 2017. Preparation and application of magnetic molecularly imprinted polymers for selective extraction of coumarins from food and plant samples. *Analytical Methods* **9**: 2168-2176.
- Maleki L, Sadeghian-Rizi T, Ghannadian M, Sanati MH, Shafizadegan S, Sadeghi-Aliabadi H. 2018. Antibacterial Activity of *Azadirachta indica* Leaf Extracts Against Some Pathogenic Standards and Clinical Bacterial Isolates. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection* 5 (e12987) DOI: 10.5812/ajcmi.12987.
- Mali MR, Wadje SD. 2015. *In vitro* Antimicrobial Activity of Extracts from *Careya arborea* Roxb. Leaves. *Microbiology Journal* **5**: 17-20.
- Mao X, Qui X, Jiao C, Lu M, Zhao X, Li X, Li J, Ma J, Zhang H. 2020. *Candida albicans* SC5314 inhibits NLRP3/NLRP6 inflammasome expression and dampens human intestinal barrier activity in Caco-2 cell monolayer model. *Cytokine* 126 (e154882) DOI: 10.1016/j.cyto.2019.154882.
- Marvin LF, Roberts MA, Fay LB. 2003. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta* **337**: 11-21.
- Mendonça FMR, Polloni AE, Junges A, Silva RS, Rubira AF, Borges GR, Dariva C, Franceschi E. 2019. Encapsule of neem (*Azadirachta indica*) seed oil in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by SFEE technique. *The Journal of Supercritical Fluids* 152 (e104556) DOI: 10.1016/j.supflu.2019.104556.
- Miller MG, Johnson AD. 2002. White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* **110**: 293-302.
- Mistri KS, Sanghvi Z, Parmar G, Shah S. 2014. The antimicrobial activity of *Azadirachta indica*, *Mimusops elengi*, *Tinospora cardifolia*, *Ocimum sanctum* and 2% chlorhexidine

- gluconate on common endodontic pathogens: An in vitro study. *European Journal of Dentistry* **8**: 172-178.
- Mohanty S, Mishra S, Pradhan RC. 2018. Optimisation of enzymatic extraction and characterization of palm (*Borassus flabellifer*) juice. *Journal of Food Measurement and Characterization* **12**: 2644-2656.
- Morah FNI, Robinson IG. 2015. *Sacoglottis gabonensis* as a Potential Preservative for Palm-Wine. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences* **13**: 97-101.
- Murugan K, et al. 2016. *In vivo* and *in vitro* effectiveness of *Azadirachta indica*-synthesized silver nanocrystals against *Plasmodium berghei* and *Plasmodium falciparum*, and their potential against malaria mosquitoes. *Research in Veterinary Science* **106**: 14-22.
- Muthuswamy S, Rupasinghe HPV, Stratton GW. 2008. Antimicrobial effect of cinnamon bark extract on *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria innocua* and fresh-cut apple slices. *Journal of Food Safety* **28**: 534-549.
- Najk MR, Bhattacharva A, Behera R, Agrawal D, Dehudy S, Kumar S. 2014. Study of anti-inflammatory effect of neem seed oil (*Azadirachta indica*) on infected albino rats. *Journal of Health Research and Reviews* **1**: 66-69.
- Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* **31**: 247-256.
- Navya AS, Anitha S. 2018. Comparative studies on phytochemical and antimicrobial activity on aerial parts of *Careya arborea*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **7**: 1384-1390.
- Nebo L, Varela RM, Molinillo JMG, Sampaio OM, Severino VGP, Casal CM, Fernandes MFG, Fernandes JB, Macías FA. 2014. Phytotoxicity of alkaloids, coumarins and flavonoids isolated from 11 species belonging to the *Rutaceae* and *Meliaceae* families. *Phytochemistry Letters* **8**: 226-232.
- Nguyen ST, Huynh KL, Nguyen HL, Thanh MNT, Trung NN, Xuan HN, Ngoc KP, Dinh KT, Pham PV. 2017. *Hopea odorata* extract inhibits hepatocellular carcinoma via induction of caspase-dependent apoptosis. *OncoTargets and Therapy* **10**: 5765-5774.
- Noman MAA, Zaheed G, Hasanat A, Arman MSI, Afroze S, Hossain S, Tuly FA, Hossain M, Uddin N, Kabir MSH. 2016. In vitro antiinflammatory activity of methanol extract of *Hopea odorata* (Roxb.) leaves. *Worlds Journal of Pharmaceutical Research* **5**: 153-159.
- Obahiagbon FI. 2009. A review of the origin, morphology, cultivation, economic products, health and physiological implications of raphia palm. *African Journal of Food Science*: **3**: 447-453.
- Obahiagbon FI, Osagie AU. 2007. Sugar and macrominerals composition of sap produced by *Raphia hookeri* palms. *African Journal of Biotechnology* **6**: 744-750.

- Okpanyi SN, Ezeukwu GC. 1981. Anti-Inflammatory and Antipyretic Activities of *Azadirachta indica*. Journal of Medicinal Plant Research **41**: 34-39.
- Oro L, Ciani M, Comitini F. 2014. Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. Journal of Applied Microbiology **116**: 1209-1217.
- Orwa C, Mutua A, Kindt R, Jamnadass R, Anthony S. 2009. *Hopea odorata*, Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0 Available from http://old.worldagroforestry.org/treedb/AFTPDFS/Hopea_odorata.PDF (accessed únor 2020).
- Petelot A. 1952. Les plantes médicinales du Cambodge, du Laos et du Viêtname. Centre de Recherches scientifique et techniques, France.
- Phinney R, Sjöholm I, Östbring K, Rayner M. 2019. Method to assess the drying performance of water vapour-permeable membrane pouches for fruit juice preservation. Chemical Engineering Research and Design **152**: 433-446.
- Pinkerton DM, Bernhardt PV, Savage GP, Williams CM. 2017. Towards the Total Synthesis of Gedunin: Construction of the Fully Elaborated ABC Ring System. Asian Journal of Organic Chemistry **6**: 583-597.
- Prabhakaran M, Reejo B, Kumar DS. 2014. Antibacterial activity of the fruits of *Careya arborea* Roxb. (Lecythidaceae). Journal for drugs and medicines **6**: 20-24.
- Puri HS. 2005. Neem – The Divine Tree *Azadirachta indica*. Harwood academic publishers, Amsterdam.
- Rahman MT, Khan OF, Alimuzzaman M. 2003. Antidiarrhoeal activity of the bark extract of *Careya arborea* Roxb. Fitoterapia **74**:116-118.
- Ramadurga B, Jat RK, Badami S. 2019. Pharmacognostic Evaluation and Antimicrobial Activity of Root of *Careya arborea*. Pharmacognosy Journal **11**: 608-612.
- Rao J, Das PVK, Das SK. 2009. Changes in physical and thermo-physical properties of sugarcane, palmyra-palm and date-palm juices at different concentration of sugar. Journal of Food Engineering **90**: 559-566.
- Ribeiro DG, Garmo LST, Santos IR, Almeida RF, Silva LP, Oliveira-Neto OB, Scherwinski-Perreira JE, Mehta A. 2020. MALDI TOF MS-profiling: Applications for bacterial and plant sample differentiation and biological variability assessment. Journal of Proteomic **213** (e103619) DOI: 10.1016/j.jprot.2019.103619.
- Rithy Chrun. 2017. osobní sdělení. Royal University of Agriculture, Phnom Penh, Cambodia
- Rouquié C, Dahdouh L, Delalonde M, Wisniewski C. 2019. New prospects for immersed hollow-fiber membranes in fruit juices microfiltration: Case of grapefruit juice. Journal of Food Engineering **246**: 75-85.
- Rubab M, Shahbaz HM, Olaimat AN, Oh DH. 2018. Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food. Biosensors and Bioelectronics **105**: 49-57.

- Rupasinghe HPV, Yu LJ. 2012. Emerging Preservation Methods for Fruit Juices and Beverages. Food additives. Pages 65-82 in El-Samragy Y, editor. Food additive. InTech, Rijeka.
- Rúa J, Valle P, Arriaga D, Fernández-Álvarez L, García-Armesto MR. 2019. Combination of Carvacrol and Thymol: Microbial Activity Against *Staphylococcus aureus* and Antioxidant Activity. *Foodborne Pathogens and Disease* **16**: 622-629.
- SaiRam M, Ilavazhagan G, Sharma SK, Dhanraj SA, Suresh B, Parida MM, Jana AM, Devendra K, Selwamurthy W. 2000. Anti-microbial activity of a new vaginal contraceptive NIM-76 from neem oil (*Azadirachta indica*). *Journal of Ethnopharmacology* **71**: 377-382.
- Saleem S, Muhammad G, Hussain MA, Bukhari SNA. 2018. A comprehensive review of phytochemical profile, bioactives for pharmaceuticals, and pharmacological attributes of *Azadirachta indica*. *Phytotherapy Research* **32**: 1241-1272.
- Samani HB, Khoshtaghaza MH, Minaei S, Zareifouros H, Eshtiaghi MN, Rostami S. 2015. Design, development and evaluation of an automatic fruit-juice pasteurization system using microwave – ultrasonic waves. *Journal of Food Science and Technology* **53**: 88-103.
- Sasikumar P, et al. 2016. Comparison of antidiabetic potential of (+) and (-)-hopeaphenol, a pair of enantiomers isolated from: *Ampelocissus indica* (L.) and *Vateria indica* Linn., with respect to inhibition of digestive enzymes and induction of glucose uptake in L6 myotubes. *RSC Advances* **6**: 77075-77082.
- Satiraphan M. 2012. Phytochemical screening of two Thai tropical rainforest Dipterocarps: *Hopea odorata* Roxb. and *Dipterocarpus costatus* Gaertn.f. [DSc. Thesis]. Université René Descartes, Paris.
- Sepperer T, Hernandez-Ramos F, Labidi J, Oostingh GJ, Bogner B, Petutschnigg A, Tondi G. 2019. Purification of industrial tannin extract through simple solid-liquid extractions. *Industrial Crops and Products* 139 (e111502) DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.111502.
- Shajib MS, Akter S, Ahmed T, Imam MZ. 2015. Antinociceptive and neuropharmacological activities of methanol extract of *Phoenix sylvestris* fruit pulp. *Frontiers in Pharmacology* **6**.
- Sharma P, Jindal R, Maiti M. 2018. Studies on gum *Dammar* based composite ion exchanger and their characterization. *Polymer Bulletin* **74**: 1365-1385.
- Shetty P, D'Souza A, Poojari S, Narayana J, Rajeeva P. 2017. Study of Fermentation Kinetics of Palm Sap from *Cocos nucifera*. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology* **5**: 375-381.
- Siddique HR, Saleem M. 2011. Beneficial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies. *Life Science* **88**: 285-293.
- Singaravelu S, Sankarapillai J, Chandrakumari AS, Sinha P. 2019. Effect of *Azadirachta indica* crude bark extracts concentrations against gram-positive and gram-negative bacterial pathogens. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* **11**: 38-42.

- Spradlin JN, et al. 2019. Harnessing the anti-cancer natural product nimbolide for targeted protein degradation. *Nature Chemical Biology* **15**: 747-755.
- Stringini M, Comitini F, Taccari M, Ciani M. 2009. Yeast diversity during tapping and fermentation of palm wine from Cameroon. *Food Microbiology* **26**: 415-420.
- Suciu N, et al. 2019. Azadirachtin and trifloxystrobin had no inhibitory effects on key soil microbial functions even at high dose rates. *Applied Soil Ecology* **137**: 29-38.
- Tabata Y, Takano K, Ito T, Inuma M, Yoshimono T, Miura H, Kitao Y, Ogawa S, Hori O. 2007. Vaticanol B, a resveratrol tetramer, regulates endoplasmic reticulum stress and inflammation. *American Journal of Physiology Cell Physiology* **293**: 411-418.
- Tesso H, Nisha AK, Kumsa K. 2015. Antibacterial activity and phytochemical screening of some important medicinal plants against human diarrheal pathogens in Adama city, Ethiopia. *International Journal of Microbiology and Immunology Research* **3**: 29-35.
- Thakurta P, Bhowmik P, Mukherjee S, Hajra TK, Patra A, Bag PK. 2007. Antibacterial, antisecretory and antihemorrhagic activity of *Azadirachta indica* used to treat cholera and diarrhea in India. *Journal of Ethnopharmacology* **111**: 607-612.
- Twaruzek M, Zastempowska E, Soszczyńska E, Altn I. 2018. The use of *in vitro* assays for the assessment of cytotoxicity on the example of MTT test. *Folia Biologica et Oecologica* **14**: 23-32.
- Vaidyanathan S, Winder CL, Wade SC, Kell DB, Goodacre R. 2002. Sample preparation in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of whole bacterial cells and the detection of high mass (>20kDa) proteins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **16**: 1276-1286.
- Vengaiyah PC, Ravindrababu D, Murthy GN, Prasad KR. 2013. Jaggery from Palmyrah palm (*Borassus flabellifer* L.)- Present status and scope. *Indian Journal of Traditional Knowledge* **12**: 714-717.
- Wahyuningsih R, Freisleben FJ, Sonntag HG., Schnitzler P. 2000. Simple and Rapid Detection of *Candida albicans* DNA in Serum by PCR for Diagnosis of Invasive Candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology* **8**: 3016-3021.
- Wang G, Liu Y, Zhang L, An L, Chen R, Lie Y, Luo Q, Li Y, Wang H, Xue Y. 2020. Computational study on the antioxidant property of coumarin-fused coumarins. *Food Chemistry* 304 (e125446) DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125446.
- Wang L, et al. 2018. A Sensitive Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Nimbolide in Mouse Serum: Application to a Preclinical Pharmacokinetics Study. *Pharmaceutics* **10**: 123.
- Wang Q, Long M, Lv C, Xin S, Han X, Jiang W. 2020. Lanthanide-labeled fluorescent-nanoparticle immunochromatographic strips enable rapid and quantitative detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food samples. *Food Control* 109 (e106894) DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.106894.

- Wieser A, Schneider L, Jung J. 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**: 965-974.
- Wipasinee W. 2007. Effects of *Hopea odorata* Roxb. Alcoholic extraction on mecA positive methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. [MSc. thesis]. Chulalongkorn University, Bangkok.
- Wu W, Jin Y, Bai F, Jin S. 2015. *Pseudomonas aeruginosa*. Pages 753-767 in Tang YW, Liu D, Schwartzman J, Sussman M, Poxton I, editors. *Molecular Medical Microbiology*. Academic Press, Florida.
- Yamamoto S. 2016. Ethnic Fermented Foods and Beverages of Cambodia. Pages 237-262 in Tamanf JP, editor. *Ethnic Fermented Foods and Alcoholic Beverages of Asia*. Springer, Indie.
- Yang X, Zhou J, Fan L, Qin Z, Chen Q, Zhao L. 2018. Antioxidant properties of a vegetable-fruit beverage fermented with two *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Science and Biotechnology* **27**: 1719-1726.
- Yang Y, et al. 2013. Methanol extract of *Hopea odorata* suppresses inflammatory responses via the direct inhibition of multiple kinases. *Journal of Ethnopharmacology* **145**: 598-607.
- Yusuf U, Kotwal SK, Gupta S, Ahmed T. 2018. Identification and antibiogram pattern of *Bacillus cereus* from the milk and milk products in and around Jammu region. *Veterinary world* **11**: 186-191.
- Zakaria ZA, Reezal AM, Jais AMM, Somchit MN, Sulaiman MR, Marmin AHI, Sidek H, Husin SH, Rahim MHA, Rahman LA. 2006. The Anti-inflammatory, Anti-pyretic and Wound Healing Activities of *Cocos nucifera* (MATAG Types) Fresh Juice and Kernel Extract in Experimental Animals. *Journal of Pharmacology and Toxicology* **1**: 516-526.
- Zamora F. 2009. Chemical and Biochemical Aspects of Winemaking. Pages 3-26 in Moreno-Arribas MV, Polo MC, editors. *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer, New York.
- Zetterström CE, Hasselgren J, Salin O, Davis RA, Quinn RJ, Sundin C, Elofsson M. 2013. The resveratrol tetramer (-)-hopeaphenol inhibits type III secretion in the gram-negative pathogens *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Plos ONE* **8** (e81969) DOI: 10.1371/journal.pone.0081969.

9 Seznam použitých tabulek

Tabulka 1: Tradiční využití vybraných rostlin ve státech jižní a jihovýchodní Asie

Tabulka 2: Seznam izolovaných mikroorganismů z ovoce

Tabulka 3: Výtěžnost rostlinných extraktů

Tabulka 4: Antimikrobiální aktivita extraktů kůry kambodžských rostlin testovaná základní řadou mikroorganismů

Tabulka 5: Antimikrobiální aktivita extraktů kůry kambodžských rostlin testovaná izolovanými mikroorganismy z ovoce

10 Seznam použitých zkratek a symbolů

ATB – antibiotikum

ATCC – the American Type Culture Collection – Americké sbírkové kmeny

CFU – kolonie tvořící jednotku

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

DT₅₀ – čas potřebný pro rozptyl 50 % původně aplikovaného pesticidu

IUCN – Mezinárodní svaz ochrany přírody

kDa – kilodalton

LC₅₀ – koncentrace, při níž uhynie 50 % sledovaných organismů

MBC – minimální baktericidní koncentrace

MHA – Mueller-Hinton Agar

MHB – Mueller-Hinton Broth

MIC – minimální inhibiční koncentrace

RPM – otáčky za minutu

SDA – Sabouraud Dextrose Agar

TFA – kyselina trifluoroctová

WHO – World Health Organization – Světová zdravotnická organizace

11 Samostatné přílohy

Příloha I: Potvrzení účinků tradičního užití rostlin (vlastní tvorba)

Rostlinný druh	Nemoc	Rostlinná část	Význam	Možnosti použití	Způsob testování	Citace
<i>A.indica</i>	Malárie	Jádra	Blokace vývoje <i>Plasmodium berghei</i> u komárů <i>Anopheles stephens</i>	Možnost potenciálního užití	<i>In vivo</i> (myši)	Lucantoni et al. 2010; Murugan et al. 2016
		Listy	Neuroprotektivní efekt, zmenšení otoků mozku, ochrana neuronů před apoptózou, oddálení doby smrti	Možnost potenciálního užití	<i>In vivo</i> (myši)	Bedri et al. 2013
	Průjem	Celá rostlina	Antibakteriální aktivita proti <i>Salmonella</i> a <i>Shigella</i> sp.	Možnost potenciálního užití	<i>In vitro</i>	Tesso et al. 2015
		Listy	Antibakteriální aktivita proti <i>Vibrio cholerae</i>	Potenciální zdroj pro vývoj nových antimikrobiálních sloučenin a antisekrecčních léčiv užitečných k léčbě cholery a průjmu	<i>In vivo</i> (myši)	Thakurta et al. 2007
	Horečka, záněty	Listy, kůra	Silné protizánětlivé aktivity, dobrý antipyretický účinek	Použití v oblastech, kde není dostupné léčivo	<i>In vivo</i> (myši)	Okpanyi & Ezeukwu 1981
	Záněty	Silice ze semen	Významný protizánětlivý účinek	Možnost potenciálního užití	<i>In vivo</i> (myši)	Najk et al. 2014

Rostlinný druh	Nemoc	Rostlinná část	Význam	Možnost použití	Testovaný organismus	Citace
	Motilita střev	Listy	Významná pozitivní změna v motilitě střev; oproti standardnímu léku Loperamidu slabší účinek	N/A	<i>In vivo</i> (myši)	Kabir et al. 2016
<i>H. odorata</i>	Průjem	Listy	Extrakty účinné proti průjmům vyvolaným ricinovým olejem	Potenciální zdroj léků proti průjmu	<i>In vivo</i> (myši)	Kabir et al. 2016
	Záněty	Listy	Protizánětlivá aktivita byla potvrzena, přičítáno přítomnosti fotochemikálií	N/A	<i>In-vitro</i>	Noman et al. 2016
	Průjem	Kůra	Extrakty účinné proti průjmům vyvolaným ricinovým olejem	N/A	<i>In vivo</i> (myši)	Rahman et al. 2003
<i>C. arborea</i>	Vředy	Kůra	Významný účinek proti vředům	N/A	<i>In vivo</i> (myši)	Kumar et al. 2013
		Listy	Ochrana žaludeční sliznice, inhibice sekrece žaludečních kyselin	N/A	<i>In vivo</i> (myši)	Gupta & Rao 2014

Příloha II: Prodavačka palmové šťávy (Nový 2017)

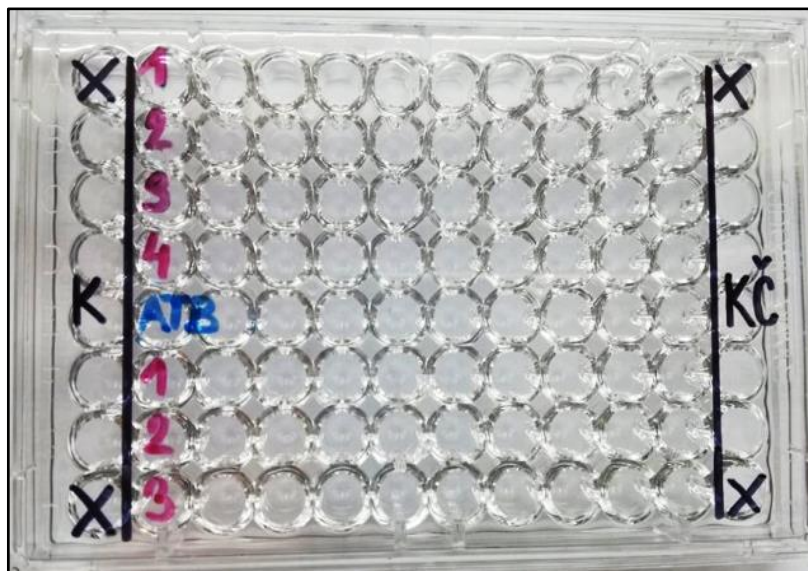


Příloha III: Ukázka počítačového zobrazení výsledků identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS.; Stupeň podobnosti s referenčním spektrem je reprezentován hodnotou skóre. Výsledky identifikace s hodnotami skóre nad 2 se považují za výsledky správné pro určení příslušného druhu.

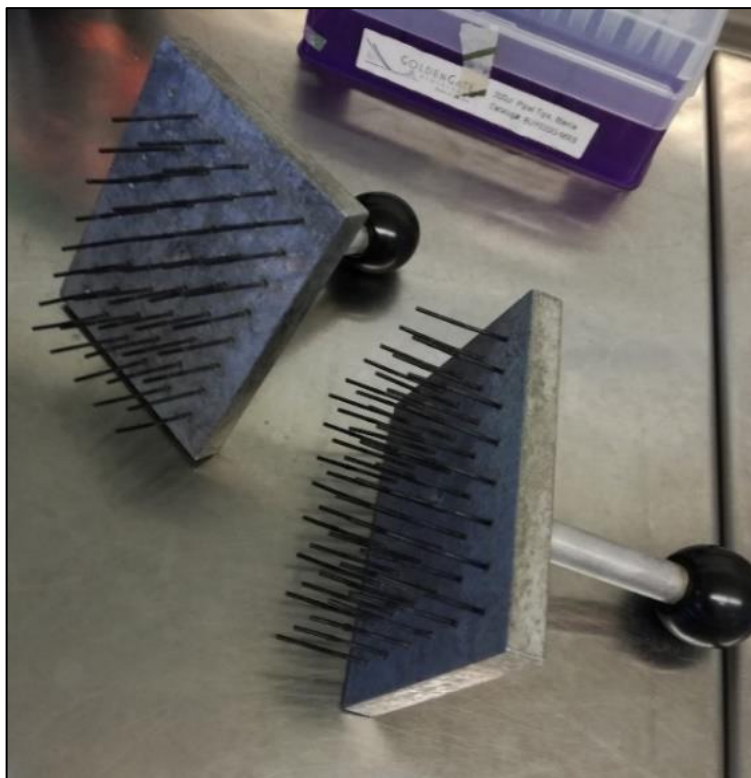
Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
N9 (++) (A)	t5	Hanseniaspora uvarum	2.038	Hanseniaspora uvarum	1.97
N10 (+) (B)	t5	Hanseniaspora uvarum	1.968	Hanseniaspora uvarum	1.854
N11 (++) (A)	t1-1	Hanseniaspora uvarum	2.014	Hanseniaspora uvarum	1.993
N12 (++) (A)	t1-1	Hanseniaspora uvarum	2.114	Hanseniaspora uvarum	1.999
O5 (+) (B)	t9	Metschnikowia pulcherrima	1.811	Metschnikowia pulcherrima	1.748
O6 (++) (A)	t9	Metschnikowia pulcherrima	2.129	Metschnikowia pulcherrima	2.098
N14 (++) (A)	s1b	Pantoea agglomerans	2.298	Pantoea agglomerans	2.27
O14 (++) (A)	s1b	Pantoea agglomerans	2.209	Pantoea agglomerans	1.98

Příloha IV: Model mikrotitrační destičky

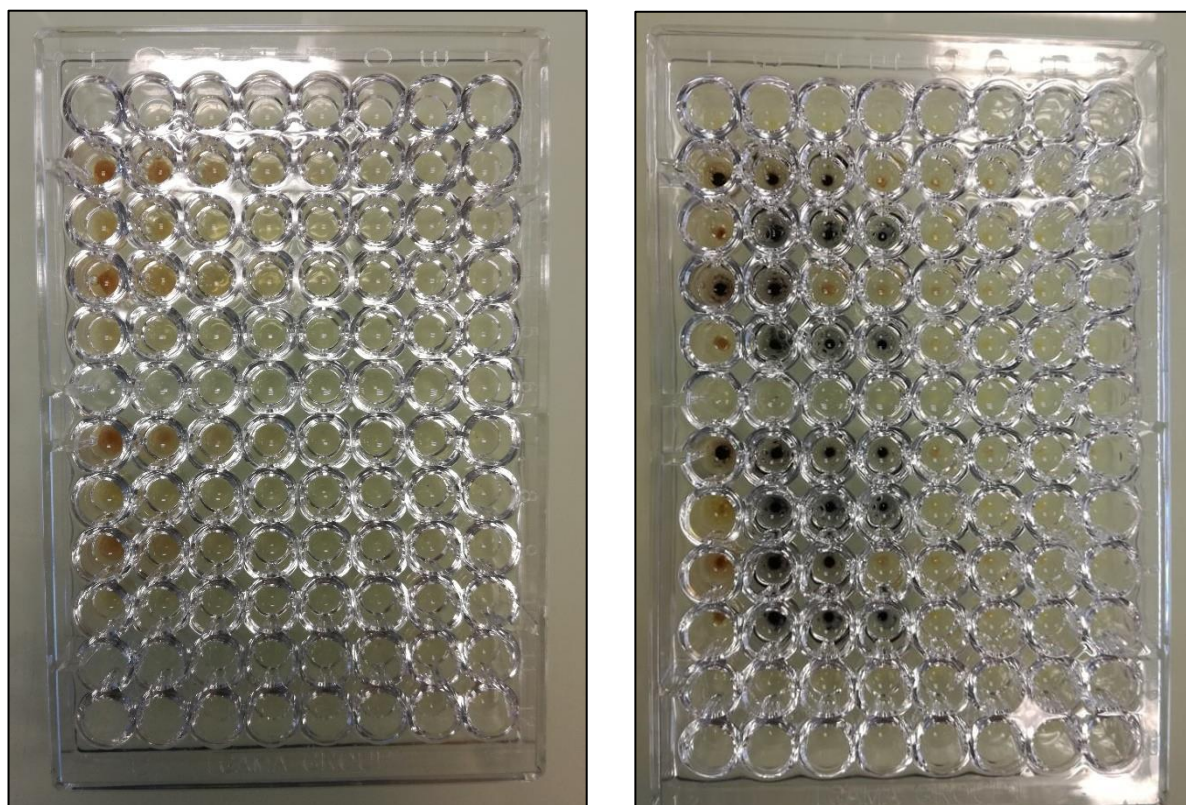
K – pozitivní kontrola; KČ – kontrola čistoty; 1 – rostlinný extrakt *Careya arborea*; 2 – rostlinný extrakt *Hopea odorata*; 3 – rostlinný extrakt *Azadirachta indica*; 4 – rostlinný extrakt *Hopea pierrei*; ATB – tetracyklin pro bakterie, tioconazol pro kvasinky (Pařhová 2020)



Příloha V: Sada kovových ježků sloužící k zaočkování inokula (Pařhová 2020)



Příloha VI: Rozdíl výsledků před a po užití MTT barviva (Pařhová 2020)



Příloha VII: Výsledky nárůstu *H. uvarum* na Petriho miskách (Pařhová 2020)

