



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

RAKYTNÍK ŘEŠETLÁKOVÝ – ZDROJ PŘÍRODNÍCH LÁTEK

SEA BUCKTHORN – THE SOURCE OF NATURAL COMPOUNDS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Daniela Blašková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1090/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Daniela Blašková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **RNDr. Mária Veselá, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Rakytník řešetlakový – zdroj přírodních látek

Zadání bakalářské práce zadání:

1. Vypracujte literární rešerši na téma biologicky aktivní látky obsažené v rakytníku.
2. Připravte extrakty z rakytníku a ověřte jejich účinky na vybrané druhy mikroorganismů.
3. Vyhodnoťte a zpracujte experimentální výsledky.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Daniela Blašková
student(ka)

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Hlavným cieľom bakalárskej práce bolo skúmanie rakytníka rešetliakového, často označovaného ako „rastlina budúcnosti.“ Botanická charakteristika daného kra, overenie biologicky aktívnych látok a účinkov extraktov o rôznych koncentráciách na vybrané druhy mikroorganizmov.

V teoretickej časti je vypracovaná literárna rešerš, ktorá pojednáva o charakterizácii skúmanej rastliny. Praktická časť sa zaoberá aplikáciou vybraných metód pre skúmanie akými sú: spektrofotometrické stanovenie biologicky aktívnych látok a mikrobiologické overenie antimikrobiálnej aktivity na mikroorganizmy akými sú *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus*.

Z výsledkov práce vyplýva, že dané extrakty nevykazujú príliš veľkú mikrobiálnu aktivitu. Na druhej strane obsahujú v niektorých prípadoch veľké množstvo stanovovaných aktívnych látok.

ABSTRACT

The main aim of the bachelor thesis was a research of common sea buckthorn, often denoted as "a plant of future". Botanic characteristics of the given bush, verification of biologically active substances and various concentration extract effects on selected kinds of microorganisms.

In the theoretical part, the literature search is done, which discusses the characterization of the researched plant. The practical part deals with the application of selected methods of research, as follows: spectrophotometric determination of biologically active substances and microbiological verification of microbial activity on microorganisms, such as *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* and *Micrococcus luteus*.

Considering the thesis results, it ensues that the given extracts do not show too great bacterial activity. Ex adverso, the extracts contain too big amount of determined active substances, in some cases.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Hippophae rhamnoides, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus*
rastlinné extrakty, antioxidačná aktivita, antimikrobiálna aktivita, biologicky aktívne látky

KEYWORDS

Hippophae rhamnoides, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus*, plant extracts, antioxidant activity, biologically active compound

BLAŠKOVÁ, D. *Rakytník řešetlákový – zdroj přírodních látek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 35 s. Vedúca bakalárskej práce RNDr. Mária Veselá, Ph.D.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho Bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

Pod'akovanie:

Veľmi pekne sa chcem poďakovať mojej vedúcej práce pani doktorke RNDr. Márii Veselej, Ph.D. za odborné vedenie mojej práce a za veľkú dávku trpezlivosti a času, ktorý mi venovala počas riešenia danej problematiky.

OBSAH

1.	ÚVOD.....	7
2.	Teoretická časť.....	8
2.1	História a pôvod.....	8
2.2	Botanická charakteristika	9
2.2.1	Hippophae rhamnoides L. – Rakytník rešetliakový.....	10
2.3	Chemické zloženie plodov – biologicky aktívne látky.....	10
2.3.1	Sacharidy	11
2.3.2	Aminokyseliny	11
2.3.3	Mastné kyseliny	11
2.3.4	Flavonoidy	12
2.3.5	Steroly	12
2.3.6	Karotenoidy	13
2.3.7	Minerálne látky	13
2.3.8	Vitamíny rozpustné vo vode	13
2.3.8.1	Vitamín C.....	13
2.3.9	Vitamíny rozpustné v tukoch.....	13
2.3.10	Antioxidanty	14
2.4	Účinky rakytníka rešetliakového	14
2.5	Využitie rakytníka rešetliakového v praxi.....	15
2.6	Spektrálne metódy	15
2.6.1	Molekulová spektrometria	15
2.6.2	UV/VIS spektrometria	15
2.6.2.1	UV/VIS spektrofotometria.....	16
2.7	Biochemické stanovenie aktívnych látok	16
2.7.1	Stanovenie celkových polyfenolov	16
2.7.2	Stanovenie celkového obsahu flavonoidov.....	16

2.7.3	Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity	16
2.8	Mikrobiologické metódy stanovenia aktívnych látok	17
2.8.1	Difúzne stanovenie antimikrobiálnej aktivity	17
3.	Experimentálna časť	18
3.1	Použité prístroje a pomôcky	18
3.2	Použité chemikálie.....	18
3.3	Použité programy.....	18
3.4	Analyzovaný materiál	19
3.5	Kultivačné médium.....	20
3.5.1	Príprava živného média	20
3.6	Použité mikroorganizmy.....	20
3.7	Príprava extraktov.....	20
3.8	Stanovenie celkových polyfenolov	21
3.9	Stanovenie celkových flavonoidov	22
3.10	Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity (metóda ABTS)	23
3.11	Mikrobiálny rozbor vzoriek	23
3.12	Meranie inhibičných zón	23
4.	Výsledky a diskusia.....	24
4.1	Stanovenie antioxidačnej aktivity.....	24
4.2	Stanovenie celkových polyfenolov	25
4.3	Stanovenie celkových flavonoidov	27
4.4	Inhibičný účinok extraktov	28
5.	Záver	33
6.	Použitá literatúra	34

1. ÚVOD

Rakytník rešetliakový je v dnešnej dobe v centre pozornosti najmä kvôli pozitívnym účinkom na zdravie ľudí ale aj zvierat. Celá rastlina, ale najmä plody sú zdrojom veľmi veľkého množstva bioaktívnych zlúčenín. Najväčšia pozornosť však bola venovaná vysokému obsahu vitamínov, minerálov, prírodných antioxidantov, mastných kyselín či proteínov. Vyznačuje sa svojimi kardioprotektívnymi, antidiabetickými, antikarcinogénnymi, imunomodulačnými a antioxidantnými účinkami [1].

Plody rakytníka majú taktiež široké využitie v potravinárskom a farmaceutickom priemysle. Tieto liečivé látky sa dajú získať jednoduchšie než synteticky a praktické aplikácie dokazujú, že takto izolované látky dosahujú vyššiu účinnosť než syntetizované [2].

U nás je rakytník rešetliakový ešte stále na okraji záujmu ako pestovateľov, tak aj spracovateľov. Jedným z dôvodov môže byť skutočnosť, že zber plodov je veľmi problematická. O to viac je však rakytník rešetliakový vhodný pre malopestovateľov, ktorí sú schopní bez väčších problémov ich plody spracovať [3].

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 História a pôvod

Za pôvodnú vlasť rakytníka rešetliakového môžeme celkom určite označiť Áziu a veľmi široký eurázijský areál. Od nepamäti sa využíval v tibetskej, mongolskej a indickej medicíne, kde mal svoje nezastupiteľné miesto. Písomnými zmienkami je dokázané, že vojaci Alexandra Veľkého pred viac než 2 300 rokov používali k obnoveniu síl svojich ale aj síl koní odvary z rôznych častí tejto rastliny. U zvierat sa po požití srst' výrazne leskla, z čoho plynie aj latinský názov „hippos“ = kôň a „phaes“ = lesk. V čínskej tradičnej medicíne sa prvé písomné zmienky o liečivých účinkoch tejto rastliny datujú začiatkom nášho letopočtu [3].

Rakytník sa najviac rozšíril na eurázijskom kontinente po posledné dobe ľadovej. Po ústupe ľadovca v strednej Európe a neskôr prevládajúce husté porasty ihličnanov spôsobili, že rakytník bol postupne vytlačený na okolité miesta. V západnej Európe dnes nachádzame zvyšky pôvodných porastov rakytníka na brehoch riek, horských riek a pobreží morí v Taliansku, Švajčiarsku, Rakúsku, ale aj vo Francúzsku, Poľsku, Nemecku, Anglicku, Holandsku a Fínsku. Najsevernejšie porasty rakytníka boli nájdené v severozápadnom Nórsku, Švédsku, ale hlavne v Botnickom zálive. Z celosvetovej rozlohy pôvodných divokých porastov, ktoré činia 1,5 milióna hektárov, je 90% pôvodných porastov na čínskom území. V Čechách a na Slovensku pôvodné porasty nie sú známe [2].

Rakytník je rastlinou svetlomilnou, a obsadzoval tak miesta, kde veľké stromy boli ničené záplavami (brehy riek, riečne ostrovy, pobrežia morí). Vďaka svojim rozrasteným koreňom sa dokáže tiež udržať na erodovaných brehoch riek. Rakytník je veľmi plastická rastlina z pohľadu genetiky. Vyskytuje sa v mnohých ekotypoch a je veľmi vhodná ovocná drevina pre šľachtenie a kultivovanie [3].

Začiatkom 20.storočia pútal rakytník v Rusku veľkú pozornosť. Ako jediný ovocný druh pretrvával a poskytoval ovocie v nepriaznivých klimatických podmienkach. V sibírskej oblasti vďaka svojej chuti a vôni plodov bol nazývaný aj ako „sibírsky ananás.“ Na základe stanovenia množstva vitamínov, minerálnych a iných dôležitých látok, predurčilo rakytník na ďalšie výskumy, šľachtenia odrôd a neskôr aj k výsadbám pre priemyselné spracovanie. Rusí šľachtitelia sa najviac zaslúžili o zavedenie nových odrôd. Počas druhej svetovej vojny sa produkty z rakytníku v Červenej armáde používali k liečbe širokej škály zranení. V roku 1949 bol v ruskom meste Bijsk vybudovaný prvý závod na výrobu oleja a ďalších vitamínových výrobkov. Rakytník sa tiež stal významnou zložkou potravy kozmonautov [2].

Po druhej svetovej vojne mala o túto zázračnú rastlinu veľký záujem Čína, kde ju ministerstvo zdravotníctva zaradilo do oficiálneho liekopisu. V tomto období malo pestovanie a šľachtenie rakytníku v Rusku silnú vládnu podporu. Hlavnou príčinou jej vnímanie ako dôležitej liečivej rastliny, s regeneračnými účinkami, ako aj strategický zdroj liečivých látok pre obyvateľstvo zasiahnuté radiáciou pri možnej atómovej vojne. Veľký záujem štátov o rakytník ako Čína, Nemecko či Rusko, dal podnet v roku 1988 pre vznik medzinárodnej organizácie ICRTS – Medzinárodné centrum pre výskum a pestovanie rakytníku. Následne však v roku 1999 bola organizácia premenovaná na ISA – Medzinárodná spoločnosť pre rakytník, ktorá zoskupuje štáty ako Fínsko, Nemecko, Švédsko, Rusko, Čína, India, Nórsko, Francúzsko, Taliansko, Dánsko, Kanada, Bolívia, Chile, USA [2].

2.2 Botanická charakteristika

Rakytník patrí do čeľade Hložinovité (*Elaeagnaceae*). Táto čeľaď má tri rody, ktoré sú si vzájomne blízke. Ide o rod *Shepherdia* rastúci iba v severnej Amerike, rod hložinovitých–*Elaeagnus*, ktorého zástupcovia sa vyskytujú v južnej Európe, Ázii a severnej Amerike. Posledný rod rakytníkovitých, vyskytujúci sa v pôvodných porastoch výlučne v Ázii a Európe. Uvedený druh sa vyznačuje veľmi bohatou premenlivosťou, množstvom regionálnych ekotypov, poddruhov, najviac vyskytujúcich sa euroazijskom areále. Výsledkom šľachtenia a pestovania je objavovanie sa nových druhov a rôznych geografických rás. Botanici v súčasnosti užívajú rozdelenie rodu do 4 základných druhov:

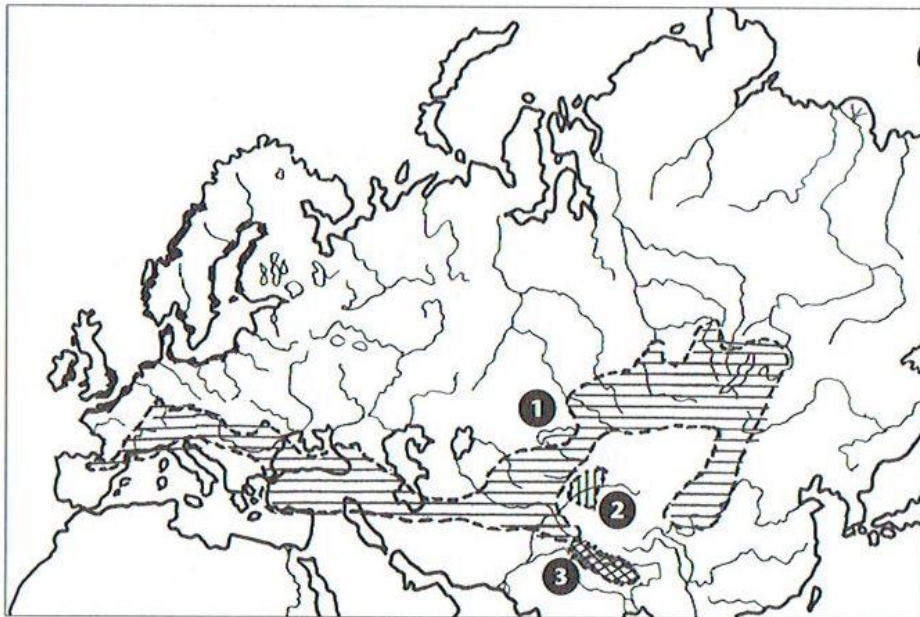
Hippophae rhamnoides L. – Rakytník rešetliakový

Hippophae salicifolia D.Don – Rakytník vrbolistý

Hippophae tibetana Schlecht – Rakytník tibetský

Hippophae neurocarpa S.W.Liu, T.N.He. – Rakytník rebrovitý

Pôvodné miesta rastu rakytníka sú morské pobrežia, delty riek, ale aj miesta položené v horách do 5000 m nad morom. Preto rastliny z rôznych miest sú premenlivé a ich druhové určenie je predmetom sporov medzi taxonómami [2].



Obr. 1 Rozšíření druhů rodu *Hippophae*, rakytník

1 – *H. rhamnoides*, r. rešetliakový

2 – *H. tibetana*, r. tibetský

3 – *H. salicifolia*, r. vrbolistý

Obrázok 1 : Výskyt vybraných druhov rakytníka v Európe [3]

2.2.1 *Hippophae rhamnoides* L. – Rakytník rešetliakový

Jedná sa o ker s veľmi bohatou premenlivosťou, veľkým množstvom regionálnych ekotypov, poddruhov a je najrozšírenejší v euroázijskom areáli. Jeho prispôsobivosť a kvalita plodov ho predurčila ku kultivácii a hospodárskemu využitiu.

Rastlina rakytníka rešetliakového je dvojdovou rastlinou, čo znamená že má samčie i samičie kvety. Samčie kvety produkujú peľ, ktorý sa uvoľní pri atmosférickom tlaku a pri teplote v rozmedzí od 6–10 °C. Obsahujú tiež štyri tyčinky a sú bez okvetných lístkov. Samičie rastliny produkujú ovocie a semená. Ich kvety nemajú okvetné lístky a obsahujú jeden vaječník alebo jedno vajíčko [4].



Obrázok 2 : Rakytník rešetliakový [5]

2.3 Chemické zloženie plodov – biologicky aktívne látky

Bobule rakytníka majú unikátne zloženie, a to kombináciu zložiek zvyčajne vyskytujúcich sa samostatne. Bioaktivita jednotlivých komponent sa líši podľa zrelosti plodu, veľkosti, druhu, geografickej lokalizácie, klímy a metód extrakcie.

Sú bohatým zdrojom bielkovín rôznych esenciálnych aminokyselín. Tiež sú zdrojom minerálnych prvkov ako Ca, P, Fe a špeciálne K, ktorého obsah je najvyšší. Rovnako tak je vysoký obsah vitamínov, najmä vitamínu C (obsah porovnateľný s množstvom v citrónoch alebo pomarančoch), karotenoidov, a tokoferolov. Zo skupiny sacharidov obsahujú hlavne glukózu a fruktózu, z organických kyselín sú známe obsahy kyseliny jablčnej, chinovej, rovnako tak kyseliny citrónovej a vínnej.

Okrem toho, rakytníkové bobule obsahujú vysoké množstvo prírodných antioxidantov, a tieto antioxidantné účinky sú najvyššie medzi všetkými liečivými rastlinami. Hlavným antioxidantom je kyselina askorbová, rovnako tak sem zaradzujeme karotenoidy a flavonoidy.

Ďalšími látkami s vysokým obsahom sú nenasýtené mastné kyseliny, ako kyselina olejová, linolová. Rovnako tak bobule obsahujú fytoosteroly ako sú beta-sitosterol, ergosterol a amyryns [6].

2.3.1 Sacharidy

Obsah glukózy a fruktózy predstavuje asi 90% z celkového obsahu cukru pre čínske a ruské odrody, ale len 60 % obsahu pre odrody fínske. Okrem iného sú prítomné cukrové alkoholy ako manitol, sorbitol a xylitol, ktorých obsah je pomerne malý. Najvyšší obsah sacharidov môžeme pozorovať u odrôd z Číny, poprípade z Ruska. Najnižší obsah týchto látok bol pozorovaný u odrôd z Fínska [7].

Tabuľka 1: Obsah sacharidov v plodoch rakytníka rešetliakového [7]

Sacharid	Obsah [%]	Priemerne [%]
Glukóza	49,5–62,1	54,2
Fruktóza	37,3–50,4	45,4
Xylóza	0,1–0,7	0,42
	Obsah [mg/g]	Priemerne [mg/g]
Manitol	17	17
Sorbitol	13–640	314
Xylitol	15–91	39,2

2.3.2 Aminokyseliny

Plody rakytníka sú bohaté na obsah voľných aminokyselín, z toho osem sú nevyhnuté pre ľudský organizmus. Sú to treonín, valín, metionín, leucín, lyzín, tryptophan, izoleucín a fenylalanín. Podľa Chena (1988) bolo detekovaných 18 druhov voľných aminokyselín v šťave čínskeho rakytníka s celkovým obsahom 51,57 mg/100 g. Podľa Zhanga (1989) je obsah celkových aminokyselín podstatne vyšší, až 766,2 mg/100 g [7].

2.3.3 Mastné kyseliny

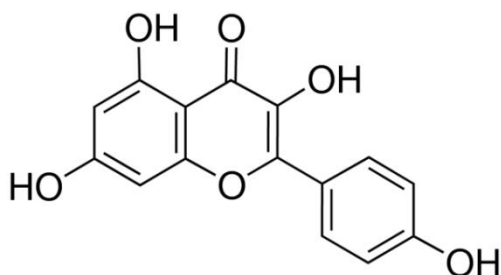
Semeno bobule rakytníka sa skladá približne z 8 až 10 % oleja, ktorý obsahuje veľké množstvo esenciálnych nenasýtených mastných kyselín. Predstavujú 80% z celkového obsahu mastných kyselín a patrí sem kyselina olejová, linolová a linolenová. Kyselina olejová ťažko podlieha oxidácií a môže znížiť hladinu cholesterolu a triglyceridov v krvi. Linolová linolenová nemôžu byť syntetizované v ľudskom tele a musia byť teda dodávané stravou. Deficit týchto mastných kyselín môže spôsobovať únavu, zníženú imunitu či dokonca rakovinu. Z tohto dôvodu je obsah mastných kyselín dôležitým faktorom pre spotrebiteľov a potravinársky priemysel [8].

Tabuľka 2 : Obsah mastných kyselín v plodoch rakytníka [9]

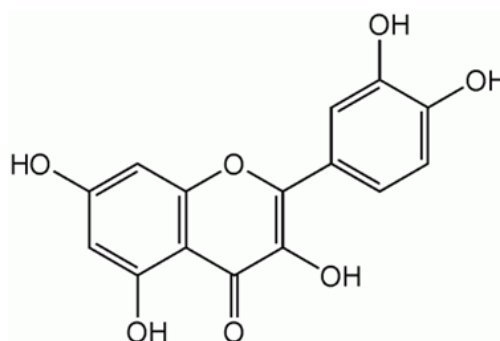
Mastná kyselina	Olej zo semien [%]	Olej z dužiny [%]
kyselina palmitová	6–10	15–40
kyselina palmitolejová	<0,5	15–50
kyselina olejová	15–20	10–20
kyselina linolová	35–40	5–15
kyselina a-linolová	20–35	5–10

2.3.4 Flavonoidy

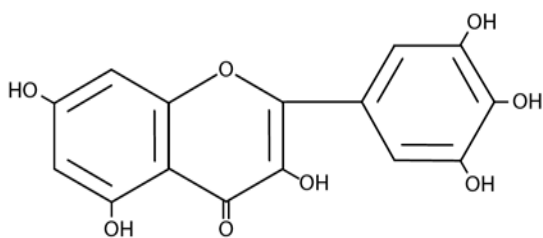
Tieto zlúčeniny sú obsiahnuté v celej časti rastliny – v koreni, stonke, liste, kvetov a bobuliach. Podľa výskumov prevádzaných ešte v Sovietskom zväze, obsah týchto látok v čerstvom ovocí bol stanovený na 854 mg na 100 g, v sušenom listí bol stanovený na 3888 mg na 100 g. Podľa výskumov čínskych pracovníkov sa obsah flavonoidov v rakytníku veľmi líši porovnaní s predchádzajúcimi hodnotami. Pre čerstvé ovocie bol obsah látok stanovený na 354 mg na 100 g, v listoch hodnota činila 867 mg na 100 g. Táto štúdia tiež preukázala, že obsah flavonoidov je závislý od lokality rastu. Druhy z prímorských oblastí mali obsah flavonoidov podstatne vyšší. Identifikovanými flavonoidmi v rakytníku rešetliakovom sú: isorhamnetin, quercetin, miricetin a kaempferol [10].



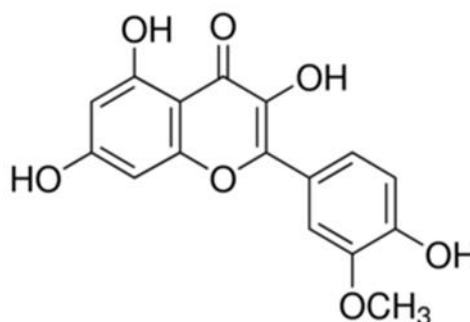
Obrázok 3 : Kaempferol [11]



Obrázok 4 : Quercetin [12]



Obrázok 5 : Miricetin [13]



Obrázok 6 : Isorhamnetin [14]

2.3.5 Steroly

Ďalšími, veľmi dôležitými biologickými látkami sú steroly. Nachádzajú sa v semenách, v kôre, ale hlavne v plodoch rakytníka. Vzorok pre stanovenie obsahu týchto látok pochádzali od dvoch hlavných poddruhov ako sinensis a hamnoides z Číny a Fínska. Celkový obsah sterolov v semenách bol stanovený na 1200–1800 mg/kg, v kôre 240–400 mg/kg a v bobuliach 340–520 mg/kg. Identifikovanými sterolmi v rakytníku sú sitosterol, amirin, isofucosterol, obtusifoliol, campesterol a stigmasterol [15].

2.3.6 Karotenoidy

Liečivé účinky rakytníka úzko súvisia s obsahom karotenoidov, preto je často ich zdrojom pri výrobe nutričných a zdraviu prospešných produktov. Výskumy ukázali rozdiely v zložení a obsahu karotenoidov medzi jednotlivými druhmi rakytníka, ktoré mohli byť spôsobené genetickou variáciou, klímou, podmienkami pestovania, stupňom dozrievania či skladovacími podmienkami a metódami analýzy. Je známych 41 odlišných karotenoidov, pričom hlavnými sú zeaxantín, β -kryptoxantín a β -karotén. Celkový obsah karotenoidov sa zvyšuje počas zrenia a bol stanovený na 1,5–18,5 mg na 100 g čerstvej hmotnosti [16].

2.3.7 Minerálne látky

V rakytníku rešetliakom sa vyskytuje veľmi veľa minerálnych látok. Najrozšírenejším prvkom nachádzajúcim sa v bobuľách je draslík. Viac ako desaťnásobná variácia elementárnych koncentrácií bola spozorovaná u prvkov ako molybdén či železo. Bobule fínskeho rakytníka rešetliakového obsahujú menej železa, vápnika a olova, avšak viac kadmia než rakytník z Číny [7].

2.3.8 Vitamíny rozpustné vo vode

V plodoch rakytníka sú v rôznych množstvách obsiahnuté vitamíny B1, B2, B3, B6, B9 a vitamín C. Obsah vitamínu B1 (thiamín) sa pohybuje v rozmedzí od 0,016 do 0,035 mg na 100 g plodov. Vitamín B2 jeho obsah v plodoch je 0,03 až 0,05 mg na 100 g. Súčasťou jedného z najvýznamnejších koenzýmov je vitamín B3 známy pod menom kyselina nikotínová. Plody obsahujú 0,8 mg na 100 g. Za prítomnosti ostatných vitamínov tejto skupiny sa jeho obsah v plodoch zvyšuje. Zaisťuje prenos vodíku pri výmene látok a bunkovom dýchaní. Hlavnou úlohou vitamínu B6 (pyridoxín) je účasť v metabolizme aminokyselín. V plodoch sa nachádza v troch podobách: pyridoxín, pyridoxal a pyridoxamin. Celkový obsah v plodoch je od 0,23 až 0,79 mg na 100 g. Vitamín B9 známy ako kyselina listová sa zúčastňuje na mnohých syntetických procesoch v tele. Jeho obsah je v rozmedzí od 0,15 až 0,80 mg na 100 g [2].

2.3.8.1 Vitamín C

Plody rakytníka rešetliakového patria k najvýznamnejším prírodným zdrojom vitamínu C známeho aj ako kyselina askorbová. Jeho obsah kolíše v závislosti na odrode a prírodných podmienkach. Prírodné porasty v Strednej Ázii obsahujú 150 až 200 mg, v oblasti Álp je obsah až okolo 800 mg i viac. Tento vitamín sa veľmi dobre uchováva v produktoch z plodov ako sú šťavy, džemy, a to vďaka tomu, že plody neobsahujú askorbinázu [17].

2.3.9 Vitamíny rozpustné v tukoch

V rakytníku sa vitamín E (tokoferol) nachádza vo svojej aktívnej forme ako alfa-tokoferol, ktorý má významný vplyv na plodnosť živočíchov a ľudí. Jeho obsah v plodoch kolíše od 8,0 do 16,00 mg na 100 g plodov. Obsah vitamínu K1 (fylochinon) v plodoch je 5 mg na 100 g, v rakytníkovom oleji až 200 mg na 100 g. Pri jeho nedostatku hrozí vykrvácanie, nakoľko je

porušená koagulačná kaskáda. Posilňuje steny krvného riečišťa a urýchľuje epitelizáciu rán pri poškodení kože [2].

2.3.10 Antioxidanty

Rakytník rešetliakový je významným zdrojom antioxidantov. Dôležitými látkami s antioxidačnými vlastnosťami sú najmä bioflavonoidy, Vitamín C a lykopén. Obsah lykopénu je 8 mg na 100 g plodu, čo je vyšší obsah než je v rajčinách, melóne alebo v ružovom grapefruite [18].

Vďaka antioxidačnému pôsobeniu v ľudskom organizme, výrazne napomáhajú proti pôsobeniu nebezpečných voľných radikálov, zabraňujú peroxidácií lipidov a likvidujú voľné kyslíkové radikály. Taktiež odstraňujú niektoré peroxidačné ióny kovov, ako napríklad železa a medi [2].

2.4 Účinky rakytníka rešetliakového

Rakytníkový olej a ďalšie extrakty boli používané ako prírodné liečivo a prírodné kozmetické prípravky v tradičnej tibetskej, ruskej a čínskej medicíne. V súčasnosti sa používa extrakt z listov a vetvičiek k liečeniu zápalu čriev a tráviaceho traktu zvierat aj ľudí. Najmä v indickej a tibetskej medicíne sa preukázali hemostatické a protizápalové účinky plodov rakytníka. Boli tiež používané pri poruchách metabolizmu, zažívacích problémoch, pľúcnych komplikáciách. Podľa starovekých spisov je rakytník rešetliakový mierny liek so schopnosťou znižovať horúčku a pôsobiť detoxikačne. Odstraňuje zápaly a hlieny z dýchacích ciest, lieči nachladnutie a kašeľ, uľahčuje dýchanie, má protirakovinové účinky najmä pre tráviac trakt a je častokrát aplikovaný pri gynekologických problémoch. Ako súčasť masť sa používa olej z bobúľ, ktorý obsahuje veľké množstvo nenasýtených mastných kyselín, z ktorých najdôležitejšia je kyselina palmitovo-olejová. Táto vzácna kyselina spolu s vitamínmi A, E, C a celým komplexom B vitamínov má výrazné regeneračné účinky na kožu a sliznice. Využíva sa pri liečbe ekzémov, chronických dermatitíd alebo ťažkých poraneniach kože – popáleniny a omrzliny, poškodenie kože radiačným žiarením. Olej zo semien absorbuje škodlivé ultrafialové žiarenie, preto ošetrenie pokožky týmto olejom ju uchráni pred nadmerným slnečným žiarením. Protizápalový účinok rakytníkového oleja sa preukázal pri lokálnom podávaní na afty v ústnej dutine u detí aj dospelých.

Rakytník obsahuje vysoké množstvo flavonoidov. Predovšetkým sú známe jeho antioxidačné účinky a vychytávanie voľných kyslíkových radikálov, rovnako tak priaznivé účinky na cievny systém. Cievnu stenu spevňujú bioflavonoidy, čím je znížená priepustnosť kapilár a tvorba edémov. Uplatnenie tak nachádza pri liečbe vredov predkolenia, kŕčových žíl, hemoroidov a ďalších kardiovaskulárnych ťažkostí. Rakytníkové flavonoidy pozitívne ovplyvňujú sťahy srdcového svalstva a zlepšujú prekrvenie myokardu. Spomaľujú vývoj aterosklerózy, ktorej príčinou je aj oxidačné poškodenie lipoproteínov voľnými radikálmi.

Rakytníkový olej sa stáva neoceniteľným pomocníkom na podporu imunitného systému človeka aj zvierat počas celého roka [2].

2.5 Využitie rakytníka rešetliakového v praxi

Na základe rozmanitých účinkov rakytníka rešetliakového má v bežnom živote veľké využitie. Nakoľko chuť bobúľ je pomerne kyslá, pre lepšie požitie sa využíva ako súčasť rôznych výživových doplnkov vo forme tabliet, čajov, liečiv alebo kozmetických prípravkov. Najväčšie využitie a cenu má práve olej z rakytníka, ktorý sa najčastejšie požíva vo forme rakytníkového sirupu.

2.6 Spektrálne metódy

Princíp spektrálnych metód spočíva v interakcií elektromagnetického žiarenia s časticami hmoty. Tieto častice môžu toto žiarenie buď absorbovať – absorpčné metódy, alebo emitovať v prípade metód emisných. Zvláštnym prípadom sú interakcie, pri ktorých má emitované žiarenie dlhšiu vlnovú dĺžku než žiarenie, ktoré bolo absorbované. V tom prípade hovoríme o spektrofotometrii luminiscenčnej, ktorá sa delí podľa doby trvania emisie na fosforescenciu (doba trvania 10^{-6} – 10^2 s) a fluorescenciu (doba trvania 10^{-9} – 10^{-6} s). Spektrometrické metódy môžeme rozdeliť na základe povahy interakcie. V prípade, že s elektromagnetickým žiarením interaguje hmota, hovoríme o atómovej spektrometrii, ak interakcia prebieha s molekulami, jedná sa o molekulovú spektrometriu.

Podľa rozsahu elektromagnetického žiarenia rozlišujeme oblasť röntgenovú (10^{-3} – 10 nm), ultrafialovú vákuovú (10–200 nm), ultrafialovú blízku (200–400 nm) viditeľnú (400–750 nm), infračervenú blízku (0,75–2,5 μ m), infračervenú strednú (2,5–50 μ m), infračervenú vzdialenú (50–1000 μ m), mikrovlnnú (1–1000 mm) a rádiovlnovú (1–1000 m) [19].

2.6.1 Molekulová spektrometria

Tento druh spektrometrie je založený na interakcií molekúl s elektromagnetickým žiarením. Energia molekulou absorbovaná (E) sa mení na energiu translačnú (E_t), na energiu vyvolávajúcu prechody válenčných elektrónov (E_e) a zmeny vibračných (E_v) a rotačných stavov (E_r) molekuly. Pomocou metódy je získané pásové spektrum, kedy jednotlivé pásy sú o rôznej šírke. Je to zapríčinené zmenou elektrónového, vibračného a rotačného stavu molekuly alebo zmenou len ich stavu vibračného alebo rotačného.

Najväčšími energetickými zmenami sú elektrónové prechody, ktorými sa zaoberá spektrometria v ultrafialovej (UV) a viditeľnej oblasti (VIS). Prechody vibračne-rotačnými sa zaoberá infračervená (IČ) a Ramanova spektrometria a rotačnými prechodmi mikrovlnná spektrometria [19,20].

2.6.2 UV/VIS spektrometria

Jedná sa o jednu z najrozšírenejších inštrumentálnych techník, ktoré sa využívajú v bežnej analytickej praxi. Využíva sa molekulová absorpcia elektromagnetického žiarenia v rozsahu vlnových dĺžok 200–400 nm (blízka UV oblasť) a 400–750 nm (VIS oblasť). Medzi metódy UV/VIS spektrometrie patrí kolorimetria, fotometria a spektrofotometria [19,20,21].

2.6.2.1 UV/VIS spektrofotometria

Pracuje na princípe merania energie pohltenej vzorkou pri prechode žiarenia. Meraním sú získané absorpčné spektrá, ktoré sú graficky vyjadrené ako závislosť absorpcie na vlnovej dĺžke. Bežne sa využíva meranie absorpcie, pričom závislosť absorpcie na koncentracii a hrúbke kvety je daná vzťahom, ktorý vychádza z Bouguerovho-Lambertovho zákona:

$$A = \epsilon * c * d$$

Kde: A = absorpcia, ϵ = molárny absorpčný (extinkčný) koeficient, c = látková koncentrácia, d = dĺžka kvety.

Jedná sa o fyzikálno-chemickú metódu. Rozsah vlnových dĺžok, pri ktorých UV/VIS spektrofotometria pracuje je v rozmedzí 200–800 nm [20, 21, 22, 23, 24].

2.7 Biochemické stanovenie aktívnych látok

Organizmy, ktoré sú existenčne závislé na kyslíku nazývame aeróbnymi. Sú však vystavené negatívnemu vplyvu reaktívnych foriem kyslíku, voľným radikálom a zlúčeninám vznikajúcich ako vedľajší produkt oxidačného metabolizmu. Živé organizmy disponujú komplexným systémom antioxidačnej ochrany [24].

2.7.1 Stanovenie celkových polyfenolov

Stanovenie polyfenolov sa prevádza pomocou spektrofotometrickej metódy s činidlom Folin-Ciocalteuovým. Je založená na interakcii látok zmesi Folinovho činidla s fenolmi obsiahnutými vo vzorke. Je využívaný proces redukcie fenolov za vzniku modrých produktov, chromogénov. Spektrofotometricky je následne toto zafarbenie merané pri vlnovej dĺžke 750 nm a určuje tak celkový obsah fenolov. Hodnota koncentrácie fenolových zlúčenín je získaná prepočtom na ekvivalentné množstvo kyseliny gállovej [25].

2.7.2 Stanovenie celkového obsahu flavonoidov

Ku stanoveniu celkového obsahu flavonoidov sa využíva spektrofotometrická metóda so soľou hlinitou a dusitanom, známa ako Christ-Müllerova metóda. Ide o detekciu Al^{3+} komplexov v alkalickom prostredí. Analyzovaný roztok je žltého zafarbenia a absorpcia je meraná pri vlnovej dĺžke 510 nm. Koncentrácia flavonoidov je stanovená prepočtom z kalibračnej krivky katechínu [26].

2.7.3 Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity

Metóda využívaná ku stanoveniu antioxidačnej aktivity sa nazýva TEAC, využívajúca ABTS radikál. Tento radikál je stabilný a tmavozeleno zafarbená kvapalina. Princíp spočíva v zhášaní radikálov ABTS antioxidantami, chovajúcich sa ako donory vodíka. Látky majúce antioxidačnú aktivitu a zároveň sú prítomné v roztoku je ABTS odfarbovaný. Antioxidačná aktivita je následne meraná spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 734 nm. Koncentráciu týchto látok určíme na základe zmeranej absorpcie z rozdielu a následného prepočtu z kalibračnej krivky troloxu [27].

2.8 Mikrobiologické metódy stanovenia aktívnych látok

Mikrobiologická aktivita, ktorá je stanovovaná je esenciálna pre stanovenie citlivosti organizmov na antibiotikách, rovnako tak ako je potrebné pre screening nových antimikrobiálnych látok. Všetky prírodné extrakty poskytujú širokú škálu možností pre ich vlastný výzkum ako prísad liečiv.

Metódy, ktoré sú využívané pre zistenie antimikrobiálnej aktivity nie sú založené na rovnakom princípe. Výsledky získané z jednotlivých stanovení sú ovplyvnené extrakčnou metódou a stupňom rozpustnosti jednotlivých testovaných zlúčenín [28].

2.8.1 Difúzne stanovenie antimikrobiálnej aktivity

K stanoveniu citlivosti mikroorganizmov k látkam s antimikrobiálnymi účinkami sa využíva difúzna metóda. Radí sa medzi kvalitatívne a semikvalitatívne metódy. Metóda spočíva vo vytváraní inhibičných zón testovanou látkou alebo extraktom za pomoci difúzie. Základom je tuhé agarové médiu, v ktorom je naočkovaný požadovaný mikroorganizmus. Veľkosť týchto zón závisí hlavne na koncentrácii testovanej látky, zložení agarového média, dobe inkubácie, pH či hrúbke vrstvy kultivačnej pôdy. Pre túto vrstvu je dôležitá rovnomerná hrúbka a samotný mikroorganizmus naočkovaný v celom médiu. Vzorky testovanej látky musia byť dostatočne vzdialené od okraja anesmú sa vzájomne dotýkať. Na základe nanášania testovanej látky metódu môžeme rozdeliť na jamkovú a diskovú difúznu metódu [28].

Jamková difúzna metóda spočíva v tom, že do ztuhnutého agaru spolu so zaočkovanou kultúrou sú pomocou korkovrtu vyhlbené jamky. Do týchto jamiiek sa následne napipetuje požadovaný objem testovanej látky [29].

Disková difúzna metóda je založená na napustení testovanej látky do papierikových diskov, z ktorých difunduje do ztuhlého média so zaočkovanou kultúrou [29].

3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité prístroje a pomôcky

Spektrofotometer (S-220 Spectrophotometer BOECO, Nemecko)

Centrifúga (MIKRO 120 Hettrich, Nemecko)

Automatické pipety. mikropipety: Nichipet EX, Kartell

Laboratórne váhy

Autokláv

Vortex

Fotoaparát

Laboratórne sklo : kadičky (50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml), odmerné banky (50 ml, 100 ml), odmerný válec (100 ml, 250 ml)

3.2 Použité chemikálie

Destilovaná voda

Ethanol, Lach-Ner (ČR)

Ethanol pre UV/VIS., Lach-Ner (ČR)

Uhlíčan sodný bezvodý, p.a., Lach-Ner (ČR)

Folin-Ciocaltauovo činidlo, Penta (ČR)

Dusičnan sodný, p.a., Lach-Ner (ČR)

Chlorid hlinitý anhydrit, p.a., Sigma-Aldrich (SRN)

Hydroxid sodný, p.a., Lach-Ner (ČR)

ABTS, Sigma-Aldrich (SRN)

Katechin, Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (SRN)

3.3 Použité programy

Operačný systém Windows 7

MS Word

MS Excell

3.4 Analyzovaný materiál

K rozboru jednotlivých látok boli použité nasledujúce vzorky:

1. Plody rakytníka rešetliakového. Plody pochádzali zo sadu v Žabčiciach, ktorý patrí Mendelovej univerzite v Brne.



Obrázok 6: Plody rakytníka použité v experimente

2. Čaj z rakytníka rešetliakového (Grešík Valdemar).



Obrázok 7: Rakytníkový čaj (Grešík Valdemar)

3.5 Kultivačné médium

Kultivačné médium použité pri uchovávaní a množení zvolených mikroorganizmov bolo Nutrient Agar No.2 (Čaderský-Envitek s.r.o.).

3.5.1 Príprava živného média

Do 1000 ml destilovanej vody bolo navážených 40 g živného média a následne bola prevedená sterilizácia v autokláve pri 120 °C po dobu 15 minút.

3.6 Použité mikroorganizmy

Mikrobiologické kultúry využité pri práci pochádzajú z Českej zbierky mikroorganizmov Prírodovedeckej fakulty Masarykovej univerzity v Brne.

Mikroorganizmy použité pri experimente *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*.

Bacillus subtilis

Baktéria rodu *Bacillus* sa bežne vyskytuje v pôde. Častokrát býva izolovaný z vody, vzduchu alebo zo zvyškov rozkladajúcich sa rastlín. Produkuje veľké množstvo glykolytických a proteolytických enzýmov. Je vhodný pre výrobu čistých biochemikálií, nukleotidov či aminokyselín [30,31].

Micrococcus luteus

Rod *Micrococcus* patrí medzi grampozitívne kokové baktérie, ktoré sa obvykle usporadúvajú do zhlukov buniek. Sú nepohyblivé, mezofilné, chemoorganotrofné s respiračným metabolizmom a sú nesporujúce. Vyskytuje sa v solených potravinách, mliečnych a živočíšnych produktoch kde môžu vytvoriť žlté, oranžové až intenzívne ružové kolónie. Za toto zafarbenie sú zodpovedné karotenoidné farbivá prítomné v bunkách. Tieto farbivá chránia bunky pred letálnymi účinkami ultrafialovej zložky slnečného svetla. Sú schopné prežívať dlhú dobu pri nízkych teplotách [32,33].

Serratia marcescens

Jedná sa o gramnegatívny pohyblivý rod baktérií. Sú peritrichálne obrvené rovné tyčinky s fermentatívnym a respiračným typom metabolizmu. Vyskytujú sa v pôde, vode, na rastlinách a v tráviacom trakte živočíchov. Vyvoláva u človeka meningitídu a infekciu dýchacích či močových ciest [34]

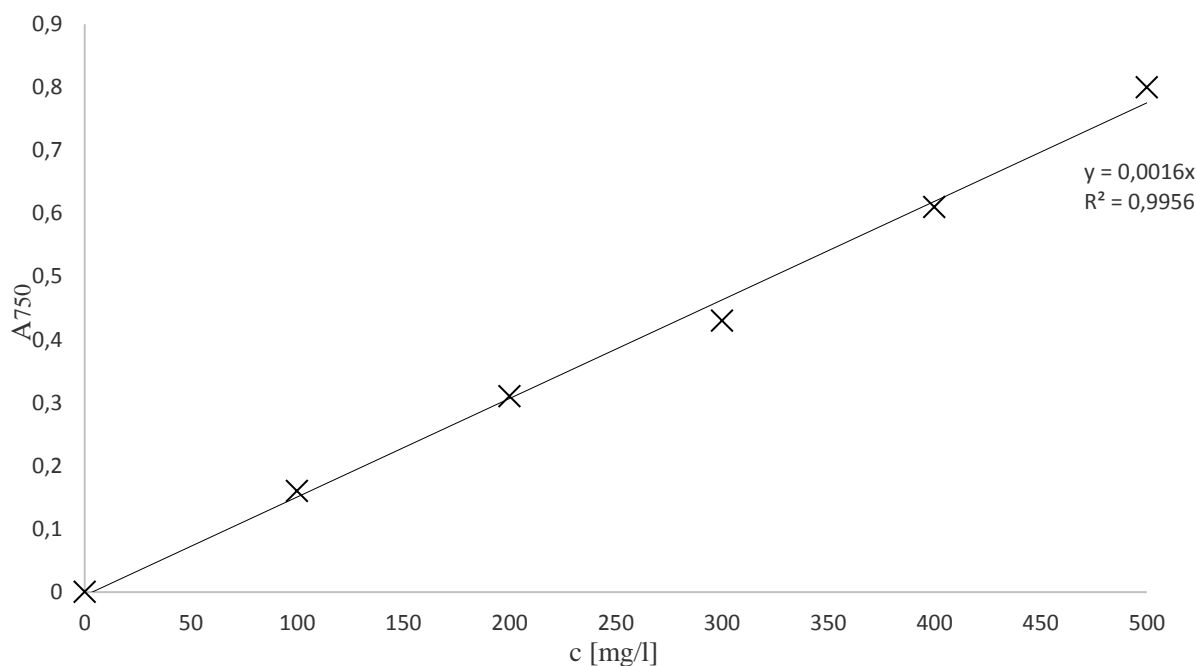
3.7 Príprava extraktov

V experimente boli použité ploty rakytníka rešetliakového. Následne bolo navážených 10 gramov týchto bobúľ celkovo trikrát. Prvá navážka bola zaliata destilovanou vodou majúca

laboratórnú teplotu a tento obsah bol v sterilnom vrecku 3M Bag Filter[®] homogenizovaný, aby sa čo najlepšie jeho látky dostali do celého objemu. Druhá navážka bola zaliata ethanolom, tretia horúcou destilovanou vodou a postupovalo sa rovnako ako v prípade destilovanej vody za laboratórnej teploty. Po rozdrvení bol tento obsah preliaty do zásobnej fľaše. Vzorky boli odoberané v nasledujúcich časových intervaloch: 15, 30, 60, 90, 120, 180 a 240 minút po zaliatí a rozdrvení. Po odobratí injekčnou striekačkou v jednotlivých časových intervaloch do erpen. skúmaviek boli dané do centrifúgy.

Pri experimente s čajom navážka činila opäť 10 gramov. Prvá navážka bola rovnako ako v prípade bobúľ zaliata destilovanou vodou majúcou laboratórnú teplotu, druhá navážka bola zaliata ethanol a tretia horúcou destilovanou vodou. Následne bol tento obsah preliaty do zásobnej fľaše. Vzorky boli odoberané v nasledujúcich časových intervaloch: 15, 30, 60, 90, 120, 180 a 240 minút po zaliatí. Po odobratí injekčnou striekačkou v jednotlivých časových intervaloch do Eppendorfových skúmaviek boli dané do centrifúgy.

3.8 Stanovenie celkových polyfenolov



Obrázok 8: Kalibračná krivka kyseliny gálovej

Zostavenie kalibračnej krivky

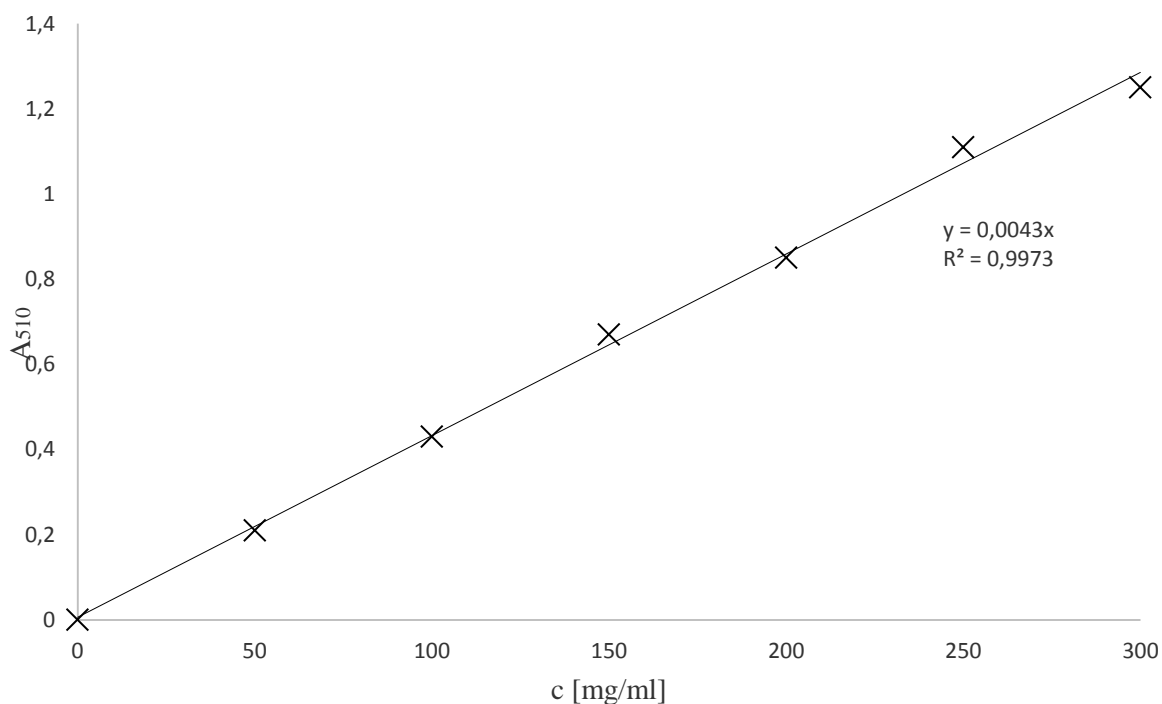
Z roztoku kyseliny gallovej o koncentrácií 1 g/l boli pripravené kalibračné roztoky v rozmedzí o koncentrácií od 0,1–0,5 mg/ml. Z každého takto pripraveného roztoku bolo do suchých a čistých skúmaviek napipetovaných 0,5 μ l, 1 ml vody a 1 ml Folin-Ciocalteuovho činidla, ktoré bolo zriedené v pomere 1:9. Skúmavky boli starostlivo premiešané pomocou prístroja Vortex. Po piatich minútach státi bol do skúmaviek pridaný 1 ml nasýteného roztoku uhličitanu sodného a roztoky boli opäť premiešané. Po 15 minútach bola absorbancia

jednotlivých kalibračných roztokov zmeraná spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 750 nm. Blank bol pripravený rovnako ako kalibračné roztoky, namiesto roztoku kyseliny gallovej bola použitá destilovaná voda.

Vlastné stanovenie

Do skúmavky bol napipetovaný 1 ml zriedeného Folin-Ciocalteuovho činidla, 1 ml destilovanej vody a 100 μ l extraktu vzorky. Každá vzorka bola stanovená v piatich paralelných stanoveniach. Roztok v skúmavkách bol dôkladne premiešaný a ponechaný k státiu. Po uplynutí piatich minút bol do každej skúmavky pridaný 1 ml nasýteného roztoku uhličitanu sodného. Tento obsah bol opäť dôkladne premiešaný. Po 15 minútach bola zmeraná absorbancia pomocou UV/VIS spektrofotometri pri vlnovej dĺžke 750 nm proti slepej vzorke (namiesto 100 μ l vzorky bolo použitých 100 μ l destilovanej vody).

3.9 Stanovenie celkových flavonoidov



Obrázok 9: Kalibračná krivka katechínu

Zostavenie kalibračnej krivky

Kalibračná krivka bola zostavená zo štandardného roztoku katechínu o koncentracii 1 g/l. Z tohto základného roztoku bolo pripravených 6 kalibračných roztokov o koncentraciách v rozmedzí 0,05–0,3 mg/ml. Z jednotlivých roztokov bolo odpipetovaných 0,5 ml a k nim bolo pridaných 1,5 ml vody a 0,2 ml 5% roztoku NaNO_2 . Skúmavky boli premiešané pomocou prístroja Vortex. Po päťminútovom odstáti bolo do nich pridaných 0,2 ml 10%

AlCl_3 . Roztoky boli dôkladne premiešané a nechali sa odstáť po dobu 5 minút. Následne bolo pridaných 1,5 ml 1 M roztoku NaOH a 1 ml destilovanej vody. Roztoky boli opäť zhomogenizované a ponechané k státiu po dobu 15 minút. Sada týchto roztokov bola meraná spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 510 nm.

Vlastné stanovenie

Do skúmavky bolo napipetovaných 0,5 ml centrifugovaného extraktu, 1,5 ml destilovanej vody a 0,2 ml 5% roztoku dusičnanu sodného. Roztok v skúmavkách bol dôkladne premiešaný a ponechaný k státiu po dobu piatich minút. Následne bolo do skúmaviek pridaných 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého. Skúmavky boli opätovne premiešané a ponechané 5 minút stáť. Nakoniec bolo pridaných 1,5 ml roztoku hydroxidu sodného a 1 ml destilovanej vody. Každá vzorka bola stanovená v piatich paralelných stanoveniach. Po uplynutí 15 minút boli vzorky analyzované pomocou UV/VIS spektrofotometrom pri vlnovej dĺžke 510 nm. Slepá vzorka bola pripravená podobne ale namiesto vzorkového materiálu bola pipetovaná destilovaná voda. Na základe zostrojenej kalibračnej krivky katechinu bolo vypočítané množstvo celkových flavonoidov vo vzorke.

3.10 Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity (metóda ABTS)

Radikálový kation bol získaný z ABTS reakciou s peroxodisíranom draselným. Roztok bol ponechaný k státiu v tme pri pokojovej teplote najmenej po dobu 12 hodín. Pred použitím sa $\text{ABTS}^{\bullet+}$ zriedil ethanolom pre UV/VIS na absorbanciu $0,70 \pm 0,02$ pri 734 nm (merané proti ethanolu pre UV/VIS). Do kremennej zúženej kyvety bol napipetovaný 1 ml $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a bola zmeraná absorbancia v čase 0. Následne po 10 minútach bolo pridaných 10 μl extraktu vzorky a pokles absorbancie bol zaznamenaný v desiatej minúte.

V tomto prípade kalibračná krivka zostavovaná nebola. Pre výpočet koncentrácie bola použitá už známa rovnica $A = 0,00137 \cdot c$.

3.11 Mikrobiálny rozbor vzoriek

Pre toto stanovenie boli použité tri modelové organizmy. Grampozitívne bakteriálne kmene *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus*. Ako gramnegatívny bakteriálny kmeň bol využitý *Serratia marcescens*.

3.12 Meranie inhibičných zón

Pre meranie inhibičných zón bola využitá metóda merania dĺžky. Táto metóda je založená na meraní v dvoch na sebe kolmých smeroch. Pre každú zónu bola následne vypočítaná priemerná hodnota a zo štyroch zón na Petriho miske bola zistená hodnota pre danú koncentráciu.

4. VÝSLEDKY A DISKUSIA

Hlavnou predmetom bakalárskej práce boli plody rakytníka rešetliakového a čaj z tejto plodiny.

Pri analýze vzoriek boli stanovené dva základné ciele. V prvom prípade bolo cieľom posúdenie antimikrobiálnej aktivity na mikroorganizmoch *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus*. V druhom prípade boli stanovené množstvá jednotlivých aktívnych látok. Jednalo sa o polyfenoly a flavonoidy. Tiež bola stanovená antioxidačná aktivita

4.1 Stanovenie antioxidačnej aktivity

Pre stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity bola zvolená metóda ABTS, spočívajúca v schopnosti vzorky zhášať radikál ABTS^{•+}. Zmiešaním peroxosíranu draselného s diamóniovou soľou bol pripravený požadovaný radikál. Následne bol zmeraný rozdiel absorbancií v čase pomocou spektrofotometru.

Výsledná absorbancia bola vypočítaná na základe vzťahu

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

kde A_0 je absorbancia extraktu vzorky s ABTS^{•+} v čase $t = 0$, A_{10} je absorbancia zmeraná po 10 minútach. Meranie každej vzorky prebiehalo trikrát a pre výpočet bola použitá priemerná hodnota pre danú vzorku. Takto získaná absorbancia bola použitá k výpočtu celkovej antioxidačnej aktivity zo známej kalibračnej krivky.

Rovnica kalibračnej krivky:

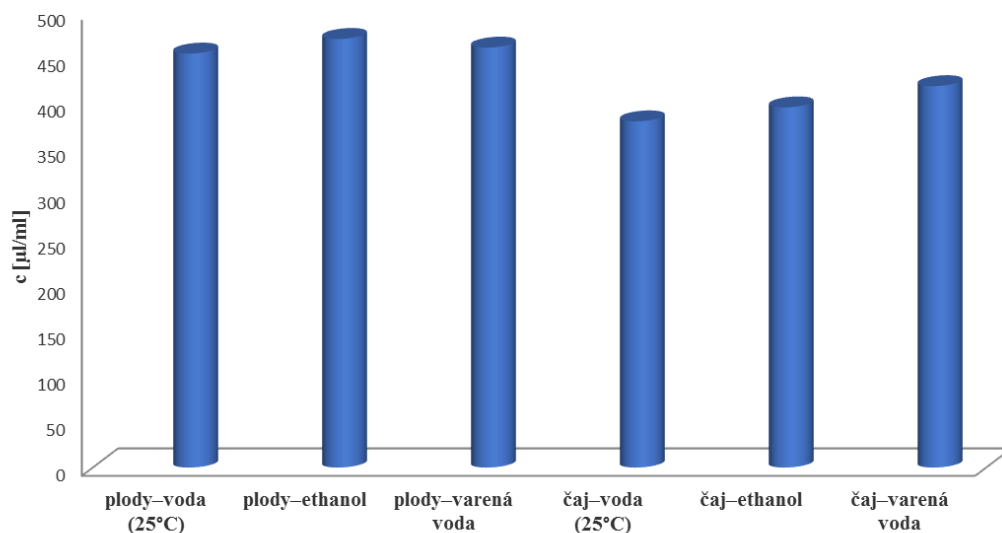
$$A = 0,00137 \cdot c$$

Tabuľka 3: Antioxidačná aktivita vzoriek po 240 minútach

Extrakt		A	c [$\mu\text{g/ml}$]
Plody	voda (25°C)	0,623	454,744
	ethanol	0,645	470,803
	varená voda	0,632	461,314
Čaj	voda (25°C)	0,521	380,292
	ethanol	0,542	395,620
	varená voda	0,574	418,978

V tabuľke 3 sú namerané výsledky antioxidačnej aktivity pre $t = 240$ minút, nakoľko u nich z pomedzi všetkých meraní boli zistené najvyššie hodnoty. Čo sa týka porovnania extraktov na základe zvoleného rozpúšťadla, najvyššia hodnota bola spozorovaná u plodov v ethanole.

Môže to byť spôsobené tým, že ethanol je veľmi dobrým organickým polárnym protickým rozpúšťadlom.

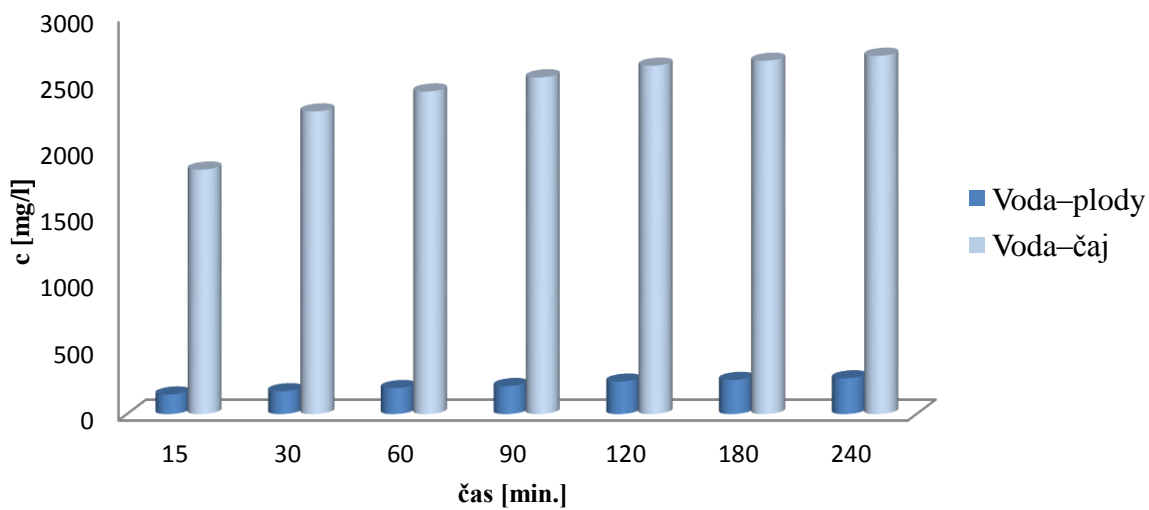


Obrázok 10: Antioxidačná aktivita v plodoch a čaji rakytníka rešetliakového

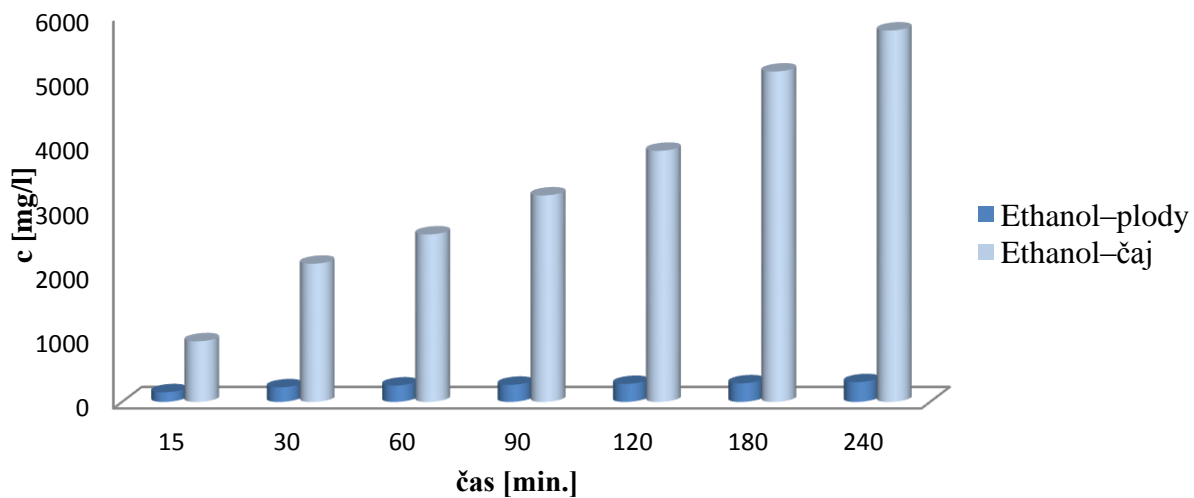
4.2 Stanovenie celkových polyfenolov

Pre stanovenie celkových polyfenolov v rakytníku bolo použité Folin-Ciocalteho činidlo. Princíp metódy je ten, že fenolické látky sa v jednotlivých vzorkách redukujú. Pripravené vzorky následne boli merané spektrofotometricky. Každá vzorka bola meraná päťkrát a výsledky boli spriemerované. Pri analyzovaní vzoriek čaju s jednotlivými rozpúšťadlami bolo potrebné urobiť desiatkové riedenie. Na základe kalibračnej krivky zostrojenej meraním roztokov kyseliny gállovej bol vypočítaný obsah polyfenolov.

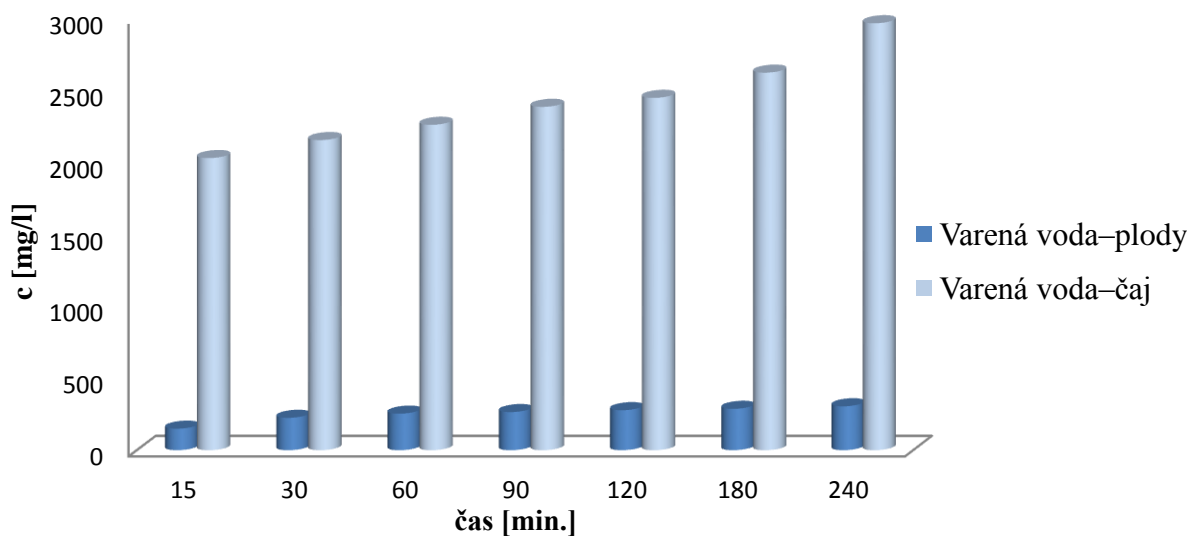
V grafoch sú uvedené hodnoty koncentrácií postupne po jednotlivých časoch. Ako z jednotlivých grafov vyplýva, s rastúcim časom rástla aj koncentrácia stanovovaných látok. U každého rozpúšťadla bola najvyššia koncentrácia dosiahnutá po čase 240 minút luhovania. Najvyššie koncentrácie dosahovali vzorky čaju s ethanolom. Môže to byť spôsobené tým, že ethanol je protické organické rozpúšťadlo.



Obrázok 11: Koncentrácia polyfenolov plodov a čaju vo vode



Obrázok 12: Koncentrácia polyfenolov plodov a čaju v ethanole

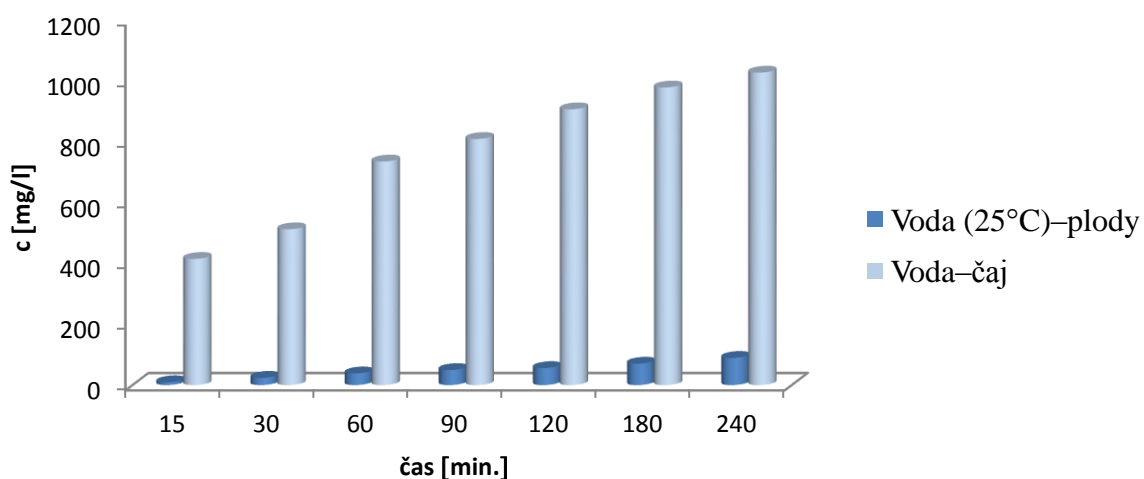


Obrázok 13: Koncentrácia polyfenolov plodov a čaju vo varenej vode

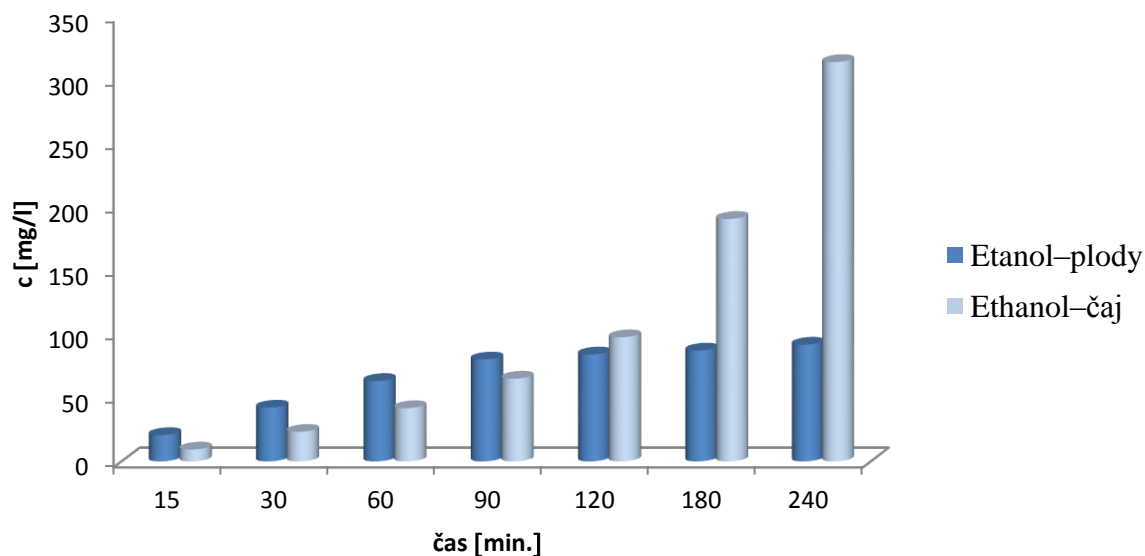
4.3 Stanovenie celkových flavonoidov

Stanovenie celkových flavonoidov v extraktoch bolo prevedené na základe metódy reakcie s hlinitou soľou a dusitanom. Stanovenie bolo prevedené na základe merania absorbancie spektrofotometrom. Každá vzorka bola zmeraná päťkrát a výsledné hodnoty boli spriemerované. Pri tomto stanovení vzoriek bolo potrebné vzorky riediť. Bolo zvolené desiatkové riedenie. Obsah celkových flavonoidov bol vypočítaný z kalibračnej rovnice katechínu.

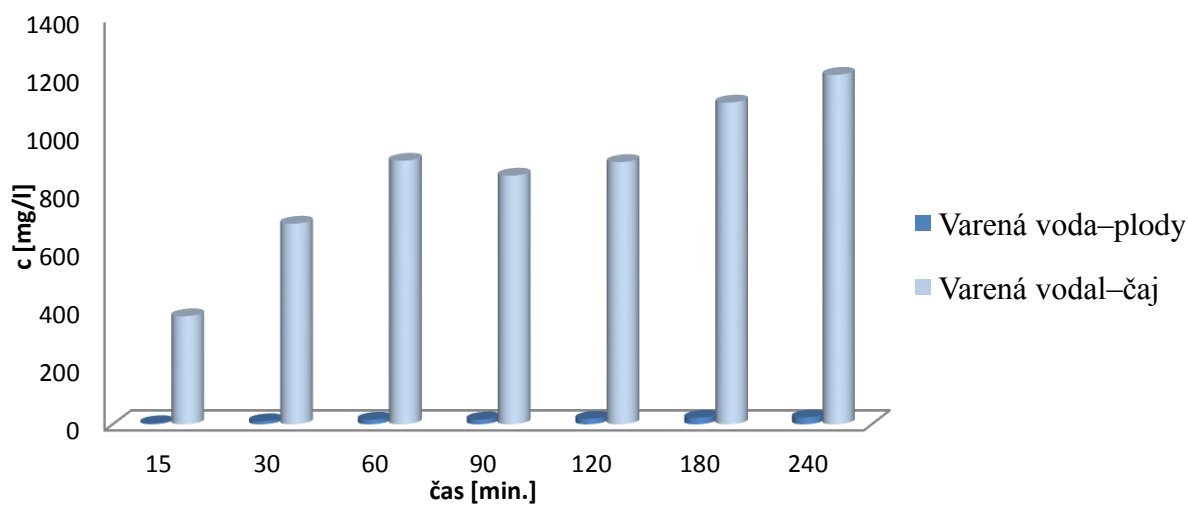
Z vypočítaných koncentrácií je vidieť, že najvyšší obsah flavonoidov bol zistený vo vzorke u plodov s vodou. Pri čaji vidieť, že najvyššia koncentrácia skúmaných látok bola zistená vo varenej vode.



Obrázok 14: Koncentrácia flavonoidov plodov a čaju vo vode



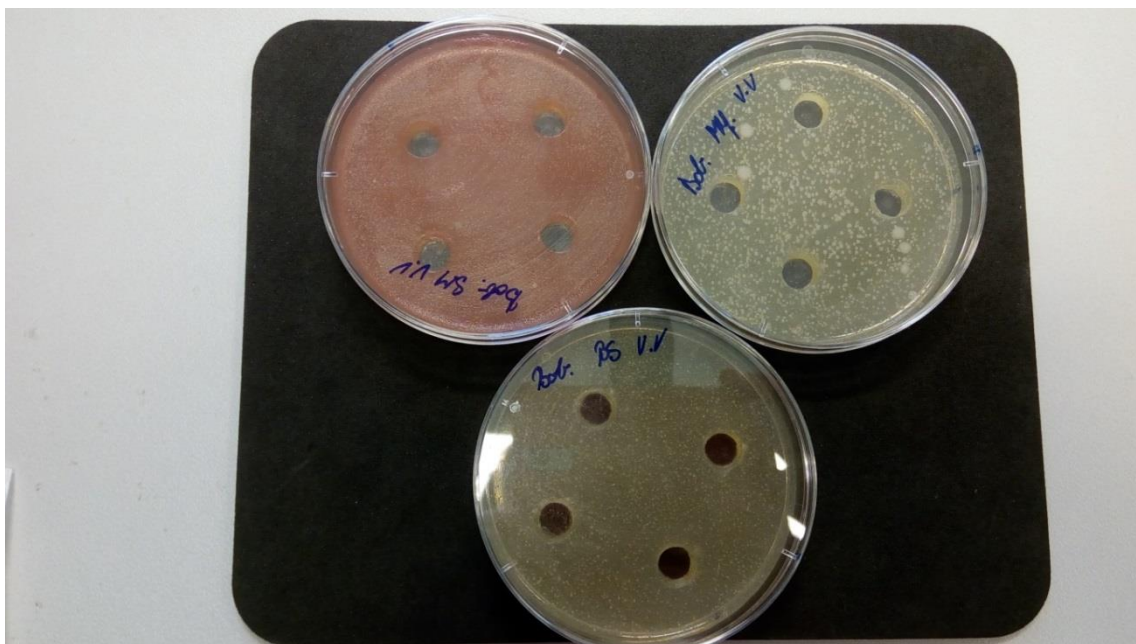
Obrázok 15: Koncentrácia flavonoidov plodov a čaju v ethanole



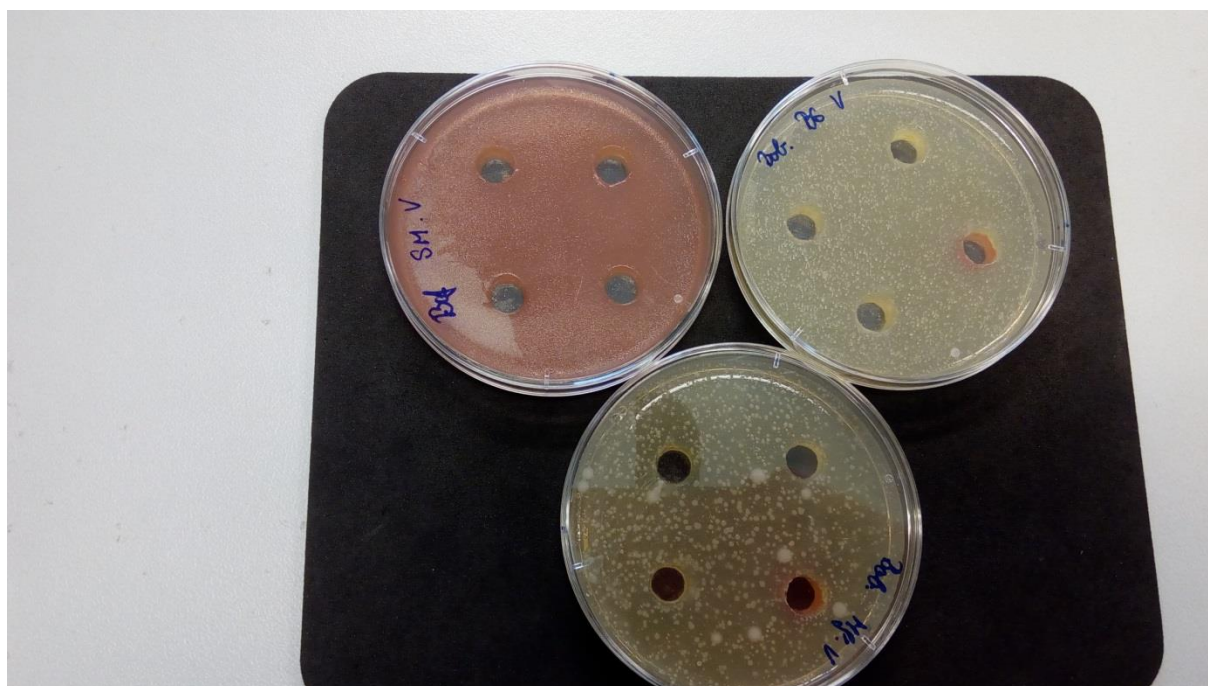
Obrázok 16: Koncentrácia flavonoidov plodov a čaju vo varenej vode

4.4 Inhibičný účinok extraktov

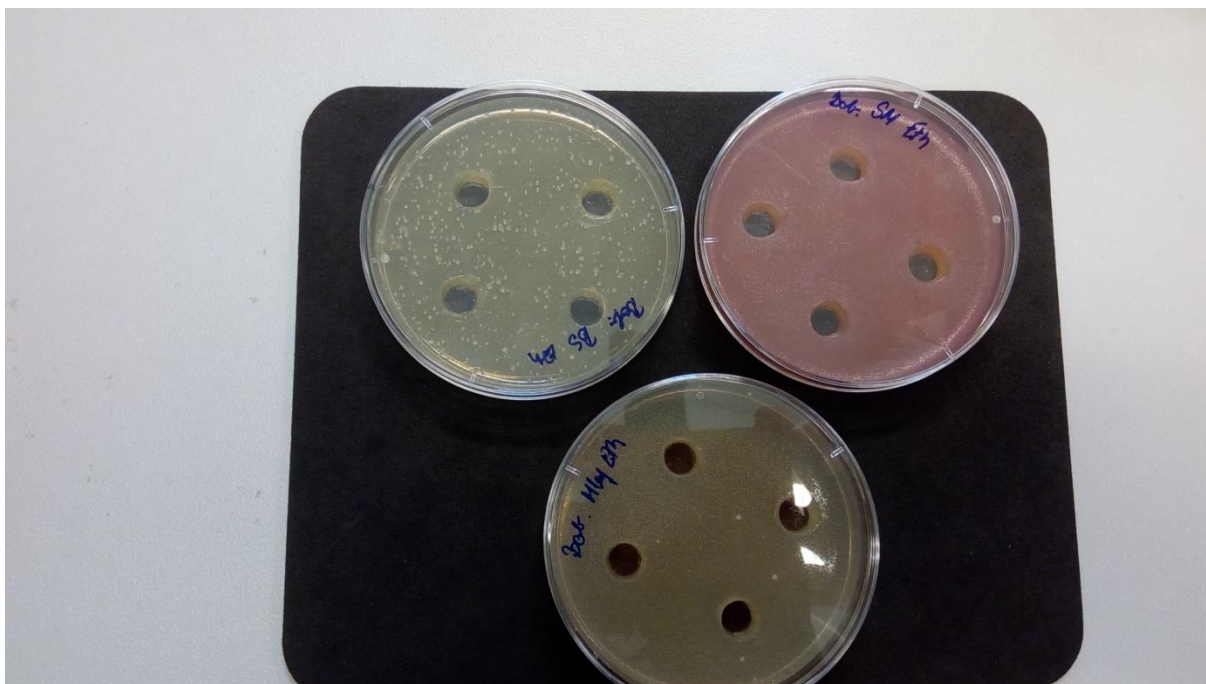
Pri tomto meraní boli využité vzorky, u ktorých bola stanovená najvyššia koncentrácia jednotlivých aktívnych látok. Išlo teda o extrakty odobrate po čase $t = 204$ minút. Na základe fotiek pre jednotlivé mikroorganizmy je vidieť, že extrakty nemali účinok na žiaden z pokusných mikroorganizmov. Záverom tohto stanovenia teda je, že inhibičná aktivita nebola preukázaná ako v plodoch, tak i v čaji z rakytníka rešetliakového.



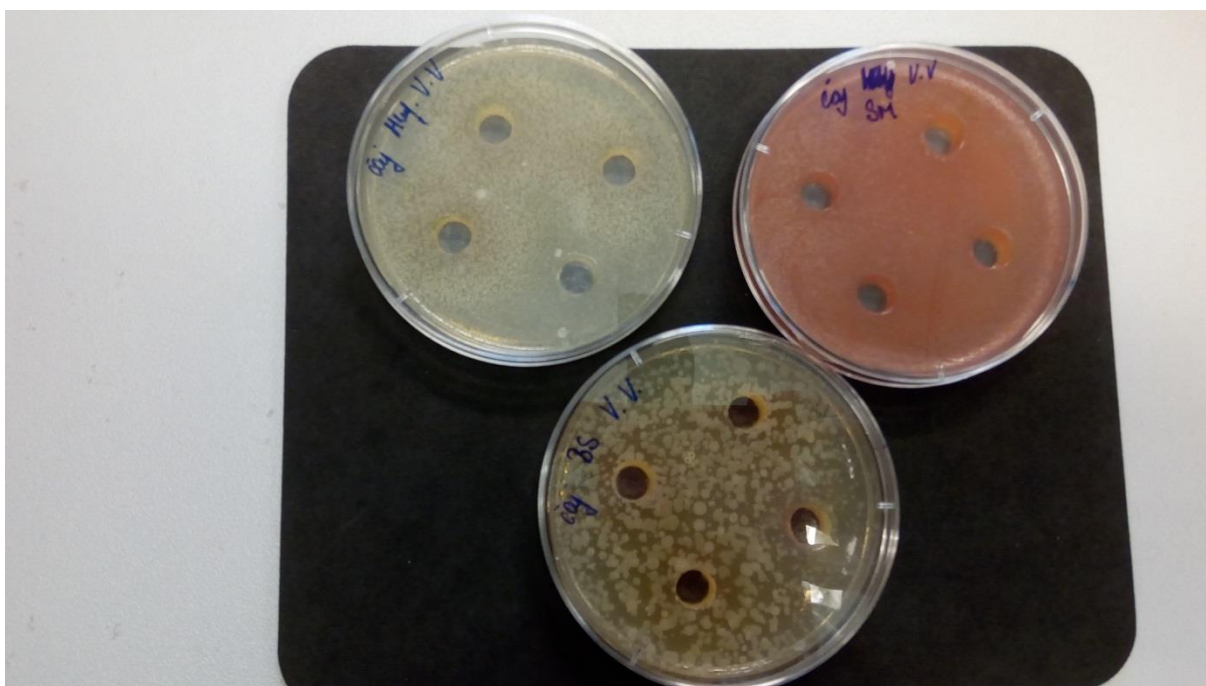
Obrázok 17: Antimikrobiálne účinky z plodov rakytníku – varená voda



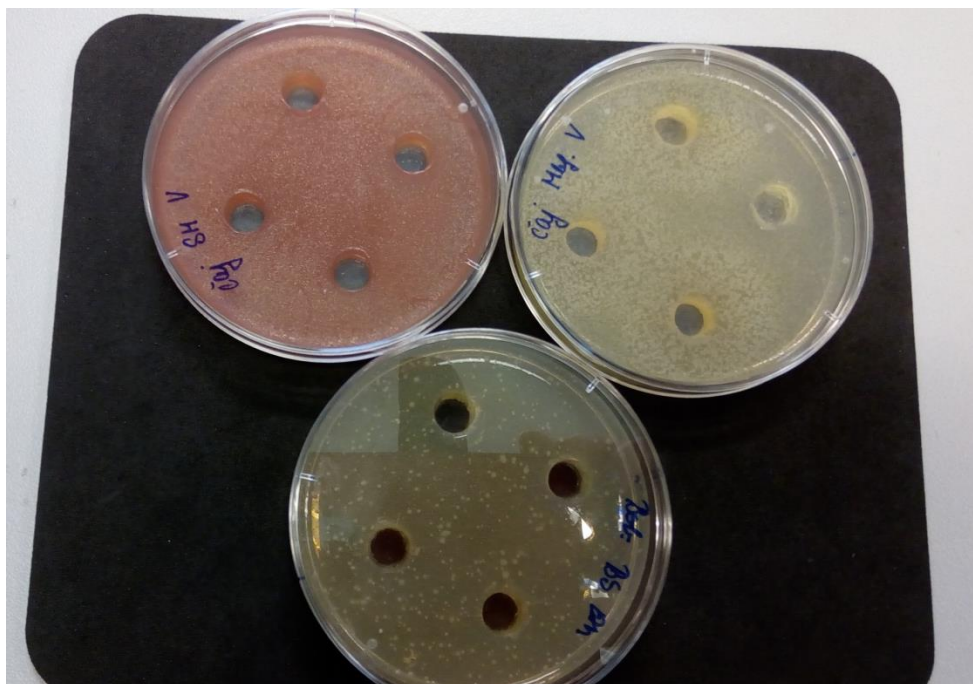
Obrázok 18: Antimikrobiálne účinky z plodov rakytníku – voda pri laboratórnej teplote



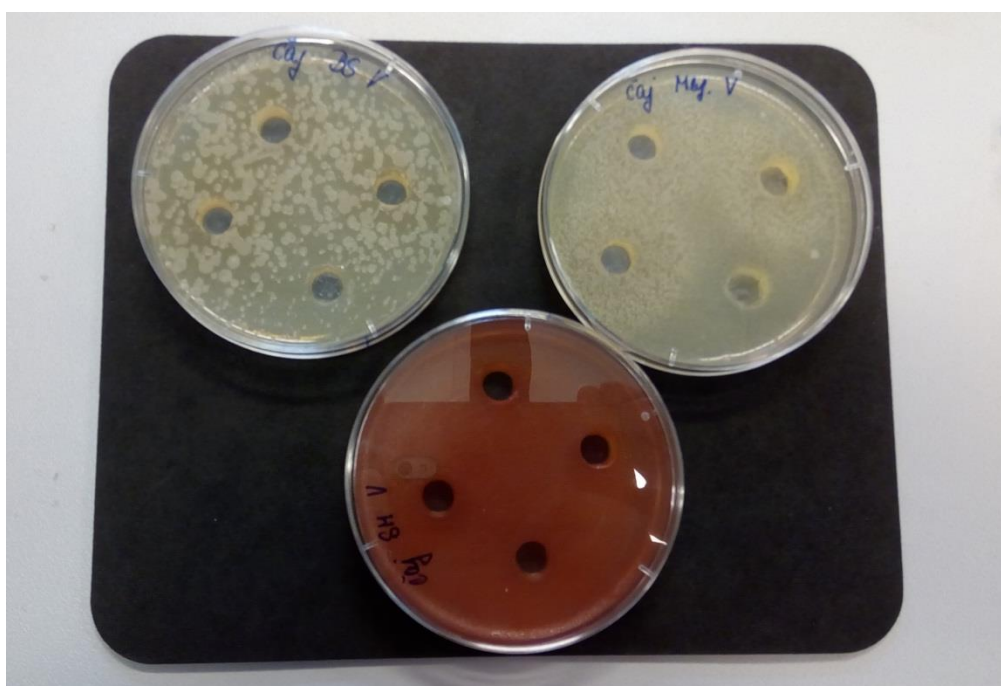
Obrázok 19: Antimikrobiálne účinky z plodov rakytníku – ethanol



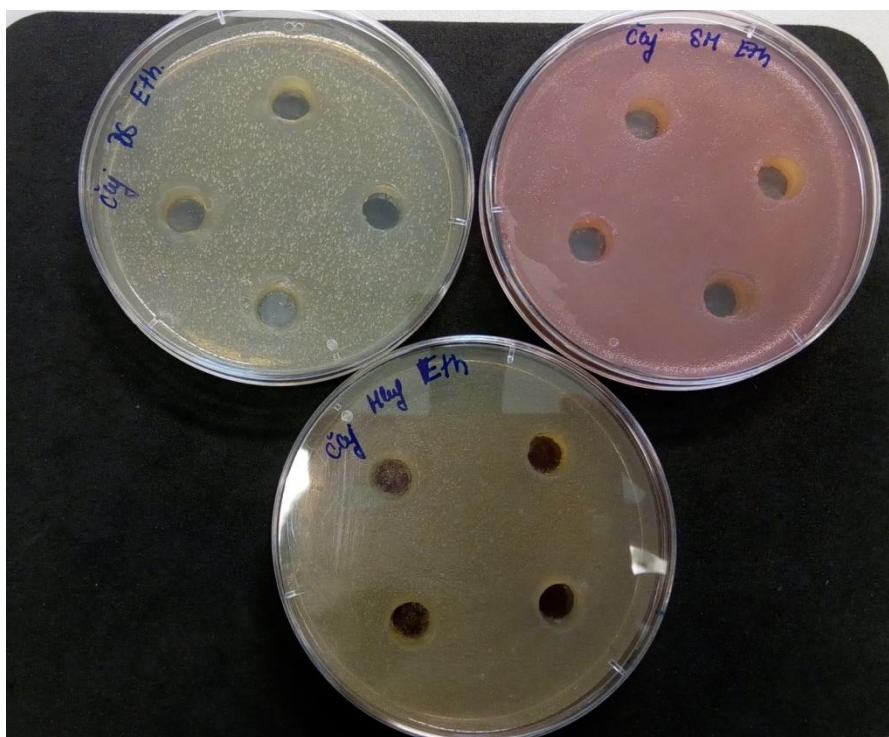
Obrázok 20: Antimikrobiálne účinky z čaju rakytníka – varená voda.



Obrázok 21: Antimikrobiálne účinky z čaju rakytníka – voda pri laboratórnej teplote



Obrázok 21: Antimikrobiálne účinky z čaju rakytníka – voda pri laboratórnej teplote



Obrázok 21: Antimikrobiálne účinky z čaju rakytníka – ethanol

5. ZÁVER

Hlavnou témou bakalárskej práce bolo štúdium antimikrobiálneho účinku jednotlivých extraktov a výluhov na vybrané mikroorganizmy ako *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*. Následne v experimente boli stanovené koncentrácie biologicky aktívnych látok ako sú polyfenoly a flavonoidy. Ako vzorky boli zvolené plody rakytníka rešetliakového a rakytníkový čaj. Extrakty boli pripravené ako výluhy, kedy rozpúšťadlom bola voda pri laboratórnej teplote, ethanol a voda varená.

Antimikrobiálna aktivita bola stanovená difúznou jamkovou metódou. Žiadna zo vzoriek nepôsobila na vybrané mikroorganizmy. V niektorých prípadoch sa však zdalo, že vybraný extrak podporuje rast daného mikroorganizmu.

Najvyššie koncentrácie polyfenolov a flavonoidov boli zistené u vzoriek luhovaných 240 minút. Konkrétne najvyššia koncentrácia polyfenolov bola u čaju s ethanolom, pri flavonoidoch sa jednalo o vzorku čaju s varenou vodou.

6. POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] KREJCAROVÁ, Jana, Eva STRAKOVÁ, Pavel SUCHÝ, Ivan HERZIG a Kateřina KARÁSKOVÁ. *Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) as a potential source of nutraceuticals and its therapeutic possibilities - a review*. DOI: 10.2754/avb201584030257. ISBN 10.2754/avb201584030257. Dostupné také z: <http://actavet.vfu.cz/84/3/0257/>
- [2] BAJER, Jiří. *Rakytník: zázračná rostlina, oranžový poklad--*. Praha: Mladá fronta, 2014. ISBN 978-80-204-3385-5.
- [3] VALÍČEK, Pavel a Emil Václav HAVELKA. *Rakytník řešetlákový: rostlina budoucnosti*. Benešov: Start, 2008. ISBN 978-80-86231-44-0.
- [4] The features of Seabuckthorn. RONGSEN, Lu. *Seabuckthron: A multipurpose plant species for fragile mountains*. Nepál: International Centre for Integrated Mountain Development, 1992, s. 6. ISBN 92-9115-030-0.
- [5] Rakytník rešetliakový. In: *Kráska z přírody* [online]. Kráska z přírody, 2017 [cit. 2017-05-17]. Dostupné z: <https://www.krasazprirody.sk/blog/rakytnik-resetliakovy---oranzovy-zazrak-pre-vasu-pokozku/>
- [6] SURYAKUMAR, Geetha a Asheesh GUPTA. Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.). *Journal of Ethnopharmacology*. 2011, 138, 268-278. DOI: 10.1016/j.jep.2011.09.024. ISBN 10.1016/j.jep.2011.09.024. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874111006945>
- [7] Alam Zeb. Chemical and Nutritional Constituents of Sea Buckthorn Juice. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2004, 3(2), 99-106. DOI: 10.3923/pjn.2004.99.106. ISBN 10.3923/pjn.2004.99.106. Dostupné také z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=pjn.2004.99.106>
- [8] OLAS, Beata. Sea buckthorn as a source of important bioactive compounds in cardiovascular diseases. *Food and Chemical Toxicology*. 2016, 97, 199-204. DOI: 10.1016/j.fct.2016.09.008. ISBN 10.1016/j.fct.2016.09.008. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691516303234>
- [9] CHRISTAKI, Efterpi. Hippophae Rhamnoides L. (Sea Buckthorn): a Potential Source of Nutraceuticals. *Food and Public Health*. 2012, 2(3), 69-72. DOI: 10.5923/j.fph.20120203.02. ISBN 10.5923/j.fph.20120203.02. Dostupné také z: <http://article.sapub.org/10.5923.j.fph.20120203.02.html>
- [10] YUZHEN, Zhao a Wu FUHENG. *Seabuckthorn flavonoids and their medical value*. 1997, 10(1), 39-41.
- [11] Kaempferol. In: *SIGMA-ALDRICH* [online]. Praha: SIGMA-ALDRICH, 2017 [cit. 2017-05-17]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/k0133?lang=en@ion=CZ>

- [12] SCHOR, Jacob. Quercetin s. In: *Physicians Who Listen: Official Blog of the AANP* [online]. Physicians Who Listen [cit. 2017-05-17]. Dostupné z: <http://physicianswholisten.blogspot.cz/2010/04/quercetin-synergy.html>
- [13] Miricetina. In: *COMPLEJO B* [online]. COMPLEJO B, 2011 [cit. 2017-05-17]. Dostupné z: <http://www.complejob.net/2011/08/que-es-la-miricetina.html>
- [14] Isorhamnetin. In: *SIGMA-ALDRICH* [online]. Praha: SIGMA-ALDRICH, 2017 [cit. 2017-05-17]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/17794?lang=en&ion=CZ>
- [15] SURYAKUMAR, Geetha a Asheesh GUPTA. Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2001, 49(11), 5620–5629. DOI: 10.1016/j.jep.2011.09.024. ISBN 10.1016/j.jep.2011.09.024. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874111006945>
- [16] ANDERSSON, Staffan C., Marie E. OLSSON, Eva JOHANSSON a Kimmo RUMPUNEN. Carotenoids in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berries during Ripening and Use of Pheophytin a as a Maturity Marker. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009, 57(1), 250-258. DOI: 10.1021/jf802599f. ISBN 10.1021/jf802599f. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf802599f>
- [17] KREJCAROVÁ, Jana, Eva STRAKOVÁ, Pavel SUCHÝ, Ivan HERZIG a Kateřina KARÁSKOVÁ. Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) as a potential source of nutraceuticals and its therapeutic possibilities - a review. *ACTA VETERINARIA BRNO*. 2015, 84(3), 257-268. DOI: 10.2754/avb201584030257. ISBN 10.2754/avb201584030257. Dostupné také z: <http://actavet.vfu.cz/84/3/0257/>
- [18] OLAS, Beata. Sea buckthorn as a source of important bioactive compounds in cardiovascular diseases. *Food and chemical toxicology*. 2016, 97, 199 - 204. DOI: 10.1016/j.fct.2016.09.008. ISBN 10.1016/j.fct.2016.09.008. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691516303234>
- [19] PETR, Praus a Vontrová JIŘINA. *Analytická chemie II*. 1. Ostrava: Vysoká škola báňská-Technická univerzita Ostrava, 2015. ISBN 978-80-248-3734-5.
- [20] NĚMCOVÁ, I. ČERMÁKOVÁ, L. a RYCHLOVSKÝ, P. *Spektrometrické analytické metody*. Praha : Karolinum, 1997. ISBN 80-7184-365-2.
- [21] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava : Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [22] MILATA, V. a SEGÁLA, P. *Spektrálne metody v chémii*. Bratislava : Slovenská technická univerzita, 2004. ISBN 80-227-2049-6.

- [23] PERKAMPUS, H. UV-VIS spectroscopy and its applications. Berlin : Springer, 1992. ISBN 978-3-642-77479-9.
- [24] GAUGLITZ, G. and MOORE, D.S. Handbook of spectroscopy. Weinheim : Wiley-VCH, 2014. ISBN 978-3-527-32150-6.
- [25] NACZK, Marian a Fereidoon SHAHIDI. Phenolics in cereals, fruits and vegetables. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [online]. 2006, vol. 41, issue 5, s. 1523-1542 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.04.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708506003062>
- [26] GRUBEŠIĆ, Renata Jurišić, Dario KREMER, Marijana Zovko KONČIĆ, Jadranka Vuković RODRÍGUEZ a RANDIĆ. Quantitative analysis of polyphenols and antioxidant activity in four *Daphne L.* species. Central European Journal of Biology [online]. 2012, vol. 7, issue 6, s. 1092-1100 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.2478/s11535-012-0102-8. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.2478/s11535-012-0102-8>
- [27] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. 2004, (98), 174-179.
- [28] KLANČNIK, Anja, Saša PISKERNIK, Barbara JERŠEK a Sonja Smole JEŽINA. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*. 2010, č. 81, s. 121-126 [cit. 2016-04-17].
- [29] VESELÁ, Mária: Praktikum z obecné mikrobiologie. 3. vyd., 2004, VUT FCH. ISBN 80- 214-2567-9.
- [30] SONENSHEIN, A. L. – HOCH, J. A. – LOSICK, R. 2002. *Bacillus Subtilis and Its Closest Relatives: From Genes to Cells*. ASM Press, 2002, 629 p. ISBN 978-1-55581-205-8.
- [31] WAITES, M. J. – MORGAN, N. J. – ROCKEY, J. S. – HIGTON, G. 2005. *Industrial Microbiology: An Introduction*. Malden: Wiley-Blackwell, 2005, 304 p. ISBN 978-0-632-05307-0.
- [32] BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., VÁNA, J. *Lékařská mikrobiologi*. Narvil 1996, 558 stran
- [33] NĚMEC, Miroslav a Dagmar MATOULKOVÁ. *Základy obecné mikrobiologie*. Ilustrace Magdalena Martínková. Brno: Masarykova univerzita, 2015, 255 stran. ISBN 978-80-210-7923-6.
- [34] MOSIO, Petra. *Atlas bakterií*. Vyd. 1. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2012. ISBN 978-80-7395-467-3.