

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2017

Bc. Patrik Konderla



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

STUDIUM BIOAKTIVNÍCH LÁTEK RŮŽE ŠÍPKOVÉ

STUDY OF ROSE HIP BIOACTIVE COMPOUNDS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Patrik Konderla

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1043/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Bc. Patrik Konderla**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **RNDr. Mária Veselá, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Studium bioaktivních látek růže šípkové

Zadání diplomové práce:

1. Prostudujte relevantní literární zdroje a sestavte rešerši shrňující současný stav poznání o bioaktivních látkách růže šípkové a spektrofotometrické metody jejich stanovení.
2. Připravte extrakty z plodů a květů (poupat) růže šípkové a analyzujte obsah bioaktivních látek.
3. Ověřte antimikrobiální účinky extraktů na vybrané mikroorganismy difuzní jamkovou metodou.

Termín odevzdání diplomové práce: 12.5.2017

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

Bc. Patrik Konderla
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

Cílem této diplomové práce bylo zkoumání obsahu vybraných biologicky aktivních látek bylinných šípkových extraktů a také stanovení antimikrobiální a antioxidační aktivity těchto extraktů.

V teoretické části byly shrnuty poznatky o rostlině růži šípkové, bližší specifikace biologicky aktivních látek, specifikace antioxidační a přehled metod stanovení antimikrobiálních látek a antimikrobiální aktivity.

V praktické části bylo kombinací, různých rozpouštědel, postupů a bylinného materiálu, vytvořeno 21 extraktů z růže šípkové, u kterých byly stanoveny extrakční křivky biologicky aktivních látek a také byla měřena antimikrobiální účinnost proti bakteriálním kmenům *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* a *Micrococcus luteus*.

Z výsledků vyplývá, že jistou antimikrobiální aktivitu prokázaly téměř všechny extrakty, ale pouze proti mikroorganismu *Micrococcus luteus* a *Bacillus cereus*. Také bylo zjištěno, že v poupatech je větší množství bioaktivních látek rozpustných v ethanolu, zatímco v šípcích je větší množství bioaktivních látek rozpustných ve vodě.

ABSTRACT

Purpose of this thesis was research the content of biologically active substances in herbal rosehip extracts and also determination of antimicrobial and antioxidant activity of these extracts.

Theoretical part describes informations about *Rosa canina L.*, detailed specification of biologically active substances, specification of antioxidation and overview of methods determine antioxidant compound and antimicrobial activity.

In the practical part was by combination of different solvents, procedures and herbal materials, made 21 extracts of *Rosa canina L.* From measuring of these extracts, was made extraction curves and also was determined antimicrobial efficiency against bacterial strains *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Micrococcus luteus*.

Results shows, that also all extracts has some antimicrobial activity, but only against microorganisms *Micrococcus luteus* and *Bacillus cereus*. Also was found that bud extracts contains more bioactive compounds soluble in ethanol, meanwhile rose hip extracts contains more bioactive compounds soluble in water.

KLÍČOVÁ SLOVA

Růže šípková, bylinné extrakty, polyfenoly, antimikrobiální aktivita, antioxidační aktivita

KEYWORDS

Rosa canina, herbal extracts, polyphenols, antimicrobial activity, antioxidant activity

KONDERLA, P. *Studium bioaktivních látek růže šípkové*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 61 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Mária Veselá, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Zde bych chtěl poděkovat vedoucí mé práce paní RNDr. Márii Veselé, Ph.D. za všechen poskytnutý čas a cenné rady, které mi při řešení této práce věnovala.

Velmi rád bych zde poděkoval také mé rodině, která mě po celou dobu studia nesmírně podporovala.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Růže šípková.....	8
2.1.1	Obecná charakteristika	8
2.1.2	Biologicky aktivní látky obsažené v Růži šípkové.....	8
2.2	Antimikrobiální látky v rostlinách	9
2.2.1	Fenolické látky	10
2.2.2	Flavonoidy.....	12
2.2.3	Taniny.....	15
2.3	Antioxidační aktivita.....	16
2.3.1	Antioxidanty	17
2.3.2	Volné radikály	18
2.4	Metody stanovení antimikrobiálních látek.....	18
2.4.1	Stanovení celkového obsahu polyfenolů	18
2.4.2	Stanovení celkového obsahu flavonoidů Christ-Müllerovou metodou	20
2.4.3	Metody stanovení antioxidační aktivity polyfenolů	20
2.5	Metody určování antimikrobiální aktivity	21
2.6	Semikvantitativní metody	22
2.6.1	Disková difúzní metoda.....	22
2.7	Kvantitativní – Diluční metody	23
2.7.1	Agarová diluční metoda	23
2.7.2	Diluční mikrometoda (mikrodiluční metoda).....	24
2.7.3	Etest.....	24
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1	Seznam použitých přístrojů.....	26
3.2	Seznam použitých chemikálií	26
3.3	Použitý software	26
3.4	Charakteristika použitých mikroorganismů	26
3.4.1	<i>Bacillus subtilis</i>	27
3.4.2	<i>Bacillus cereus</i>	27

3.4.3	<i>Serratia marcescens</i>	28
3.4.4	<i>Micrococcus luteus</i>	28
3.5	Vzorky čajů podrobené analýze	28
3.6	Kultivační média a jejich příprava	30
3.7	Příprava rostlinných extraktů	30
3.7.1	Příprava macerátů	30
3.7.2	Příprava výluhů	31
3.8	Ověření antimikrobiální účinnosti rostlinných extraktů	31
3.9	Stanovení celkových polyfenolů	31
3.10	Stanovení celkových flavonoidů	32
3.11	Stanovení celkové antioxidační aktivity	33
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	35
4.1	Stanovení celkového obsahu polyfenolů	35
4.2	Stanovení celkového obsahu flavonoidů	39
4.3	Stanovení celkové antioxidační aktivity	43
4.4	Stanovení antimikrobiální aktivity extraktů	47
5	ZÁVĚR	52
6	ZDROJE	54
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	61

1 ÚVOD

Rostliny produkují mnoho druhů sekundárních metabolitů, z nichž jsou pro lidské oblasti farmakologie a potravinářství zajímavé především fenolické sloučeniny. Některé studie naznačují, že dvě třetiny rostlinných druhů na planetě tvoří látky, jež mají léčivou hodnotu. Pro rostliny mají tyto bioaktivní sloučeniny většinou funkci ekologickou. Zvyšují jejich adaptační schopnosti a jejich množství je ovlivněno mimo další faktory, hodnotou stresových činitelů. Polyfenoly jsou považovány za jedny z nejdůležitějších antioxidantů v lidské stravě a jejich přítomnost v rostlinných potravinách může konzumenty chránit před oxidačním stresem [1].

V současné době se v tradiční a celostní medicíně používá čím dál více různých nových rostlinných prostředků. Užívání těchto produktů ovšem vyžaduje zvýšení znalostí jejich složení a stability, které by umožnilo validaci těchto léčiv. Tinktury a extrakty z pupenů jsou kapalné přípravky v Evropských zemích hojně používané, ale do dnešní doby ne příliš prostudované. Puppenové extrakty jsou základními rostlinnými produkty široce používané v gemoterapii. Gemoterapie je léčebná metoda využívající tinktur připravených z pupenů, mladých výhonků, kořenů a listů rostlin, protože se tyto tinktury musí často ředit, je gemoterapie vlastně kombinací bylinné léčby s homeopatií. Jistý výzkum dokázal, že extrakty z mladých výhonků z *Vaccinium myrtillus L.* a *Vaccinium vitis idaea L.* mají vyšší fenolický obsah a vyšší variabilitu aktivních sloučenin než dospělé listy [1][2].

Během posledních let byly u mnoha nevyužívaných potravinových zdrojů zkoumány jejich nutriční hodnoty a bezpečnost. Potenciál využití těchto potravinových zdrojů k tvorbě funkčních potravin je neustále profilován. Termín funkční potraviny zahrnuje jedlé složky s vlastnostmi nasytit stejně jako zlepšit antioxidantní, antimutagenní a imunitní úroveň těla. Tyto potraviny poskytují zdravotní benefity, pokud jsou fortifikovány pravidelně do stravy v dostatečném množství. Jedním z těchto nevyužívaných nutričních zdrojů jsou šípky, masité ovoce Růží. Čeleď *Rosaceae* (Rod *Rosa* je jedním z nejdůležitějších rodů v čeledi *Rosaceae*, zahrnujícím kolem 20 druhů a 20 000 kultivarů.) je dobře známá tím, že zahrnuje velké množství nutričně bohatého a chutného ovoce jako jsou jablka, hrušky, švestky, třešně, broskve, jahody a maliny [3][4][5].

I když globální využití šípků ke konzumaci není vysoké. S problémy, které mohou vzniknout v budoucnu si mohou získat svou pozornost. Bohatost živin těchto plodů z nich dělá ideální kandidáty pro začlenění do běžné stravy, buďto k přímé spotřebě nebo jako potravinové aditivum [4].

Cílem této práce je porovnání změny množství bioaktivních látek (polyfenoly, flavonoidy) s měnícím se časem v různých typech extraktů připravených z Růže šípkové (lišícími se způsobem přípravy, bylinným materiálem, extrakčním rozpouštědlem). U vzorků s nejvyššími naměřenými hodnotami bioaktivních látek byla následně testována jejich antimikrobiální aktivita na čtyřech mikroorganismech (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*)

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Růže šípková

2.1.1 Obecná charakteristika

Růže šípková, lat. *Rosa canina L.*, patří do čeledi růžovitých (*Rosaceae*). Je to vzpřímený keř dorůstající výšky přibližně 3,5 m, který občas může být i šplhavě rostoucí (v tomto případě může dorůstat až 10 m). Kořeny této rostliny mohou sahát až metr hluboko. Větve tohoto keře jsou většinou zakřivené nebo klenuté, vždy s patrnými nepravidelně se vyskytujícími hákovitými ostny (trny jsou morfologicky nesprávně). Listy jsou střídavé, řapíkaté, lichozpeřené s 5–7 hladkými lístky. Lístky jsou eliptické až vejčité, svrchu tmavě zelené a vespod světlejší s drobnými ostny. Kvete od května do července. Okvětní lístky jsou velké (5 až 6 cm v průměru) pětičetné bílé až bledě růžové, zřídka kdy sytě růžové [6][7].

Plody jsou sytě rudé šípky lat. *Fructus cynosbati*, které jsou z hlediska morfologického složené souplodí (nepravý plod), na jehož stavbě se podílejí nejen jednotlivé plody (nažky), ale i češule květu a květní lůžko. Šípky mají kulovitý až protáhlý tvar (2 až 3 cm dlouhé), na povrchu jsou většinou hladké, ale mohou být i slabě ostnitě. Na vrcholu šípku je prstencovitý límeček, tzv. disk, tvořený zbytky tyčinek, kalicha a čnělek. V jeho středu je otvor nazývaný ústí. Uvnitř masité dužiny šípku jsou nažky, vzniklé z jednotlivých (apokarpních) pestíčků, které mají na povrchu jemné chloupky. Šípky jsou na vrcholu zralosti na konci září až října [6][8][9].

Růže šípková se vyskytuje téměř v celé Evropě s výjimkou dalekého severu (na severu roste přibližně po 60° severní šířky). Vyskytuje se také na jihu a severozápadě Afriky, ve východní a střední Asii, Kavkaze a druhotně byla zavlečena i do severní Ameriky. Roste jak v nížinách, tak v horských oblastech do 1300 m n. m, na slunných místech, často jí můžeme nalézt na okrajích lesů nebo podél cest. Je to na půdu nenáročná rostlina, která dává přednost suchým vápenatým zeminám. Na našem území roste více jak 30 původních druhů růží [6][7][8].

2.1.2 Biologicky aktivní látky obsažené v Růži šípkové

Používání Růže šípkové jako potravy je známo z lidových tradic mnoha kultura a šípky rovněž bývaly nedílnou součástí lidového léčení. Jejich příznivé působení popisuje už anglosaský herbář z 11. století. Konzumace šípku je z Evropských zemí populární například v Polsku, Portugalsku, Německu, Finsku, Rumunsku a Švédsku. Obzvláště v skandinávských zemích jsou šípky velice oblíbená pochutina. Šípky se v různých zemích zpracovávají do dezertů, sušenek, koláčů, chlebů, želé, marmelád, zmrzlin, pudinků, polévek, syrupů, bylinných čajů a speciálních nápojů. Například *Nyponsoppa* je šípková polévka oblíbená ve Švédské kuchyni. *Hagebuttem* je tradiční Německá šípková polévka. *Dzika Róza Zachowanais* je druh Polské šípkové zavařeniny. Z šípku je vyroben také tradiční Maďarský alkoholický nápoj *Palinka*. V Turecku je šípek jedním z hlavních bylinných

léků a je zde také používán k výrobě marmelád a šťáv. V Íránském lidovém léčitelství je šípek využíván k léčbě nachlazení, žaludečních potíží, žlučových kamenů a zácpy [3][5][10][11].

To že, se šípek používal v lidovém léčitelství k léčbě různých onemocnění jistě není náhoda, což dosvědčují různé klinické studie, které prokázaly jistou účinnost šípků v léčbě osteoartritidy a také, že vykazují chondro protektivní a protizánětlivé antioxidační a anti-mutagenní vlastnosti [5].

Šípky obsahují několik skupin biologicky aktivních látek, jsou to: cukry, organické kyseliny, pektiny, taniny neboli třísloviny, karotenoidy, mastné kyseliny, vitamíny (především vitamin C, ale také vitamíny B1, B2, K, PP, E) makro a mikro elementy [12].

Co se týče vitamínu C jsou šípky jedním z nejbohatších zdrojů tohoto vitamínu, který dalece přesahuje ostatní ovoce a zeleninu. Nicméně obsah značně kolísá (30–1300 mg/100 g) v závislosti na době sběru, lokalitě výskytu a také bylo zjištěno, že důležitým faktorem ovlivňujícím množství vitamínu C v dužině je nadmořská výška [1][4].

Vitamin C neboli kyselina askorbová se vyskytuje ve dvou formách jako kyselina askorbová a dehydro askorbová, které tvoří reverzibilní oxidačně-redukční systém [13].

Úloha vitamínu C v lidském organismu spočívá především v hydroxylačních reakcích, jako jsou rozklad tyrosinu, vznik noradrenalinu, biosyntéza karnitinu a hydroxylace prolinu a lysinu v prokolagenu, kde je vitamin C kofaktorem enzymu prolylhydroxylasy a umožňuje zmíněnou hydroxylaci vznik síťované struktury kolagenu, která zajišťuje funkci vazivové tkáně. Vitamin C se účastní biosyntézy mukopolysacharidů a prostaglandinů, má také vliv na absorpci iontových forem železa a jeho transportu, stimuluje transport sodných, chloridových a zřejmě i vápenatých iontů a uplatňuje se v metabolismu cholesterolu, drog a v řadě dalších reakcí [13][14][15].

Šípky jsou také známé pro jejich vysoký obsah fenolických látek. U těchto sloučenin je známá, jejich antimutagenní a protinádorová aktivita. I když mechanismus účinnosti těchto látek není zcela objasněn [12].

Semena šípku jsou bohatá na olej a minerální látky. Mastné kyseliny obsažené v oleji z šípků jsou: linolová, olejová, linolenová, palmitová, stearová a arachidonová kyselina [11].

Do teď jsem zmiňoval především nepravé plody Růže šípkové tedy šípky. Biologicky aktivní látky obsahují, ale i listy a pupeny, jimiž se odborné studie tak často jako šípkům nevěnují. Například extrakty z listů obsahují ellagovou kyselinu, kvercetin a různé deriváty kaempferolu. V pupenech byly stanoveny především gallotaniny a ellagitaniny a dále také polyfenoly a flavonoly [2][12].

2.2 Antimikrobiální látky v rostlinách

Rostliny produkují široké spektrum sekundárních metabolitů s antimikrobiální aktivitou. Tyto látky různými mechanismy působí inhibičně na růst a reprodukci mikroorganismů a jsou důležitým prvkem ochrany rostlin vůči mikrobiálním infekcím. Některé rostliny či jejich produkty jsou pro silné antibakteriální účinky lidmi přímo využívány v medicíně či potravinářství, buď tradičně či jako nové alternativy syntetických látek [16].

Mechanismus účinku těchto látek je odvozen od jejich chemické struktury. Obecně však mají vlastnosti, kterými narušují funkce buněčných struktur bakterií. V následujících kapitolách jsou uvedeny hlavní skupiny rostlinných antibakteriálních látek, rozdělených podle chemické kategorizace.

2.2.1 Fenolické látky

Fenoly jsou organické těkavé sloučeniny obsahující OH skupinu, která je vázaná na aromatickém jádru. Tvoří oxoniové soli, fenoláty a estery. Jsou to aromatické hydroxylované sloučeniny, které vykazují antioxidační a biologickou aktivitu. Polyfenolické sloučeniny se vyskytují běžně v přirozené formě, kdy jsou produkovány rostlinami a živočichy nebo jsou vyráběny synteticky. Surové výtažky z rostlin a koření jsou velice bohaté na rostlinné fenoly. Fenolické látky jsou sekundární metabolity, které jsou deriváty pentafosfátu a fenylypropanoidů u rostlin. Tyto sloučeniny se řadí mezi fytochemikálie a mají značný fyziologický a fytochemický význam v rostlinách. Jsou velmi důležité v reprodukci, růstu a ochraně rostlin před predátory a patogeny [17][18][19].

Jsou také důležitou součástí lidské stravy, nejvíce se vyskytují v bylinách ovoci a zelenině. Fenolické sloučeniny koření jsou primárně zodpovědné za baktericidní a bakteriostatické účinky. Také vykazují celou řadu fyziologických účinků jako např. antialergické, antimikrobiální, antioxidační a antitrombotické. Mají velké využití v potravinářském průmyslu, protože dokážou zpomalit oxidační degradaci lipidů a tím zajistit zlepšení kvality nutriční hodnoty potravin [18][19][20].

Polyfenoly je možné na základě jejich chemické struktury rozdělit na tři základní skupiny: neflavonoidní, flavonoidní a ostatní. Tyto tři množiny látek lze rozčlenit na několik dalších skupin (viz tabulka 1) podle počtu uhlíků a formy jejich primárních vlastností. Takové skupiny jsou chuťové látky (taniny), barviva (flavonoidy, lignany, xanthony), přírodní antioxidanty (flavonoidy), vonné látky (některé benzochinony, kumariny) [21].

Tabulka 1: Rozdělení fenolických látek dle jejich chemické struktury [21]

Počet atomů uhlíku	Základní kostra	Skupina
6	C_6	Jednoduché fenoly, benzochinony
7	$C_6 - C_1$	Fenolové (benzoové) kyseliny
8	$C_6 - C_2$	Acetofenony, fenyloctové kyseliny
9	$C_6 - C_3$	Fenolové (skořicové) kyseliny, fenylpropeny, kumariny, chromony
10	$C_6 - C_4$	Naftochinony
13	$C_6 - C_1 - C_6$	Xanthony
14	$C_6 - C_2 - C_6$	Stilbeny, antrachinony
15	$C_6 - C_3 - C_6$	Flavonoidy, isoflavonoidy
18	$(C_6 - C_3)_2$	Lignany, neolignany
30	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$	Biflavonoidy
9n	$(C_6 - C_3)_n$	Ligniny
6n	$(C_6)_n$	Katecholmelaniny
15n	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$	Kondensované taniny, flavolany

2.2.1.1 Neflavonoidní fenolické látky

Do skupiny neflavonoidních fenolických látek lze zařadit takové polyfenoly, které svojí strukturou nespádají do široké skupiny flavonoidů [23].

Nejjednodušším zástupcem neflavonoidních fenolů jsou jednoduché fenoly a benzochinony, které se v potravinách uplatňují jako vonné látky. Primárně se vyskytují jako součásti silic, a pak také jako produkty činnosti mikroorganismů nebo termických procesů při zpracování potravin (např. při uzení masa dochází ke vzniku guajakolů a syringolů). Dalším způsobem vzniku benzochinonů v potravinách je působení etanolu na lignin dřeva při zrání alkoholických nápojů v dubových sudech. Potravinářsky zajímavým benzochinonem je arbutin obsažený v hruškách, jehož detekci je možno dokázat přítomnost hruškové složky v jablečných džusech [14][22].

Mezi neflavonoidní fenolické sloučeniny s jednoduchou strukturou lze zařadit skupinu fenolových (benzoových) kyselin, kam patří kyselina benzoová vyskytující se v mnoha druzích ovoce a zeleniny, a dokonce i v některých jogurtech. Její koncentrace však nejsou nikterak velké (např. v ovoci a zelenině se pohybuje okolo 0,05 %). Již přes sto let jsou známy účinky sodné soli této kyseliny neboli benzoátu sodného, jako inhibitoru růstu plísní a díky této vlastnosti je hojně používán jako konzervant kyselých potravin jako jsou například ovocné džusy nebo vína [23].

V potravinách se vyskytuje také kyselina skořicová, a to jako součást silic některých koření a jako výchozí surovina pro tvorbu dalších důležitých fenolických látek. Od skořicové kyseliny se odvozuje

hlavní kyselina zralých jahod *p*-kumarová a kyselina kávová, která představuje největšího zástupce skořicových kyselin v ovoci. Tvoří 75–100 % z obsahu všech skořicových kyselin v ovoci. Methoxyderiváty těchto látek jsou kyseliny vanillová a ferulová, které jsou nejvíce zastoupeny v obilovinách, a to především ve vnějších vrstvách zrna [24][25].

Skupinou na pomezí neflavonoidních a flavonoidních fenolických látek jsou stilbeny, přírodní barviva s chemickou strukturou podobnou flavonoidům. Jediným významnějším zástupcem v potravinách je resveratrol, významná bioaktivní látka v hroznech a vínech [14].

2.2.2 Flavonoidy

Flavonoidy tvoří rozsáhlou skupinu polyfenolických sloučenin, rozdílné chemické struktury nacházejících se v rostlinách. Vyskytují se v rostlinných tkáních, kde mohou být přítomny jednak uvnitř buněk, ale i na povrchu různých rostlinných orgánů. V dnešní době je známo více než 4000 flavonoidních látek. Pouze některé jsou však důležité jako přírodní rostlinná barviva, jiné jsou významné pro svoji chuť nebo vykazují významné biologické účinky [14].

Vysoká strukturální rozmanitost flavonoidů je způsobena mnoha různými hydrogenacemi, hydroxylacemi a metylacemi molekul. Chemicky lze flavonoidy popsat jako sloučeniny obsahující dva benzenové kruhy spojené tří uhlíkovým řetězcem v konstrukci $C_6 - C_3 - C_6$, s různým stupněm oxidace centrálního pyranového kruhu. V rostlinách, které jsou nejvýznamnějšími zdroji těchto látek, se vyskytují převážně jako β -glykosidy (obsahují ve své molekule aglykon a cukernou sacharidovou složku). Sacharidovou složkou je nejčastěji glukosa nebo rhamnosa, případně glukuronová kyselina, galaktosa nebo jiný sacharid. Volné aglykony se vyskytují pouze zřídka [26][27][28].

Jak již bylo zmíněno, skupina flavonoidů je velice široká a různorodá, proto se dělí na několik dalších podskupin. Nejdůležitější z nich uvádí tabulka 2, společně s nejčastějšími zástupci a jejich průměrným výskytem v běžně používaných potravinách [27].

Výsledná koncentrace flavonoidů (stejně jako celková koncentrace fenolických sloučenin) v potravinách rostlinného původu je ovlivněna mnoha faktory například druhem, odrůdou, stupněm zralosti, klimatickými podmínkami i způsobem posklizňového uskladnění [29].

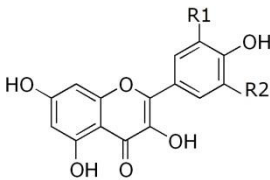
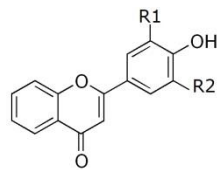
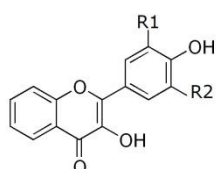
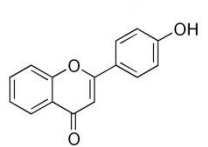
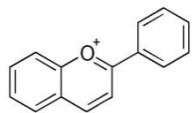
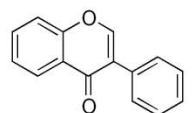
Flavonoidy v potravinách zastávají několik rolí. Některé skupiny jsou významnými přírodními barvivy (například anthokyany a anthokyanidiny), které mohou nabývat širokého spektra barev od modré, přes purpurovou, oranžovou až po červenou. Jejich barva je závislá na pH prostředí, teplotě, působení kyslíku a intenzitě dopadajícího světla. Jiné skupiny jsou naopak významné pro své chuťové (hořké, svíravé) nebo biologické účinky (antioxidační aktivita) [30].

Z flavonoidů uvedených v tabulce 2 se v rostlinných potravinách v největším množství vyskytují flavonoly, a to především kvercetin a kaempferol. Biosyntéza těchto produktů je stimulována světlem, proto jsou největší koncentrace detekovány ve vnějších a vzdušných rostlinných pletivech [24].

Zajímavou skupinou jsou i flavanony, které se ve významném množství vyskytují jen v citrusových plodech, například nositelé hořké chuti naringenin v grapefruitech, hesperetin v pomerančích nebo

eriodictyol v citronech. Dříve se tyto látky pro svoji vysokou antioxidační aktivitu a blahodárný vliv na lidský organismus označovaly jako skupina vitaminů P. Od tohoto značení se však upustilo, jelikož nedostatek těchto látek v organismu není doprovázen negativními reakcemi, jako je tomu u ostatních vitaminů [29].

Tabulka 2: Hlavní skupiny flavonoidů, jejich zástupci a hlavní zdroje [31]

Flavonoidy	Zástupci	Společný potravinový zdroj (celkový obsah skupiny; (mg.kg ⁻¹))
	Kvercetin	Ovoce: jablka 34, švestky 12, brusinky 170,
	Kemferol	jahody 39, hrozny 31
	Myricetin	Zelenina: kapusta 35 321, cibule 0,2–1096, brokolice 36 231, rajčata 3–191 Nápoje: červené víno 13 mg/l, zelený čaj 39 mg/l černý čaj 30 mg/l, hroznová šťáva 4 mg/l
	Apigenin	Zelenina: celer 130, zelené olivy 142, sladká
	Luteolin	Paprika 11
	Katechin	Ovoce: jablka 84, švestky 23
	Epigallokatechin	Nápoje: zelený a černý čaj, červené víno 110,
	Epigallokatechin gallát	Hroznová šťáva 5 mg/l
	Hesperetin	Ovoce: pomeranče 577, citrony 219
	Naringetin	Nápoje: Hroznová šťáva 2 mg/l
	Kyanidin	Ovoce: červené hrozny 92
	Delfinin	Nápoje: červené víno 2 mg/l, hroznová šťáva 2 mg/l
	Genistein	Luštěniny: sója 373–1403, cizrna 11–36
	Daidzein	

Mezi flavonoidní polyfenoly jsou zařazeny také látky označované jako lignany a biflavonoidy. Za nejvýznamnější potravinový zdroj lignanů je uváděno lněné semínko obsahující poměrně vysoké koncentrace sesaminu a sesamolinu. Oba zmínění zástupci vykazují silné biologické účinky (antioxidační a insekticidní). Mnohonásobně menší množství lignanů je možné nalézt i v obilninách,

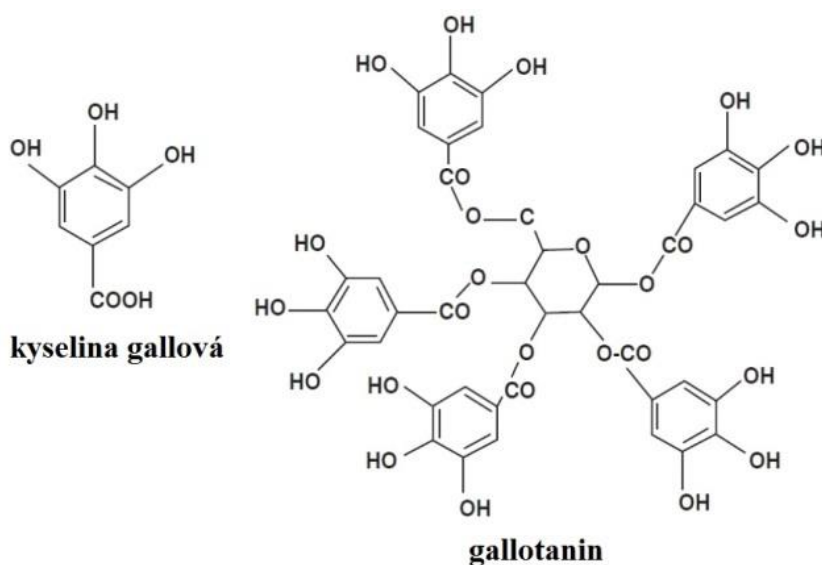
ovoci a v některých druzích zeleniny. Biflavonoidy potravinářský význam nemají. Pouze amentoflavon a několik dalších biflavonoidů, vyskytujících se ve větším množství v listech jinanu dvojlaločného (*Ginkgo biloba*), se používá pro speciální účely v medicíně [14][24].

2.2.3 Taniny

Taniny jsou přírodní polyfenolické sloučeniny o relativní molekulové hmotnosti (M_r) 500–3000. Mohou vytvářet interakce s dalšími makromolekulami, jako jsou bílkoviny, celulóza nebo pektin. Můžeme je rozdělit na dvě základní skupiny: hydrolyzovatelné a kondenzované taniny, které mají zcela odlišnou chemickou stavbu [32][33].

2.2.3.1 Hydrolyzovatelné taniny

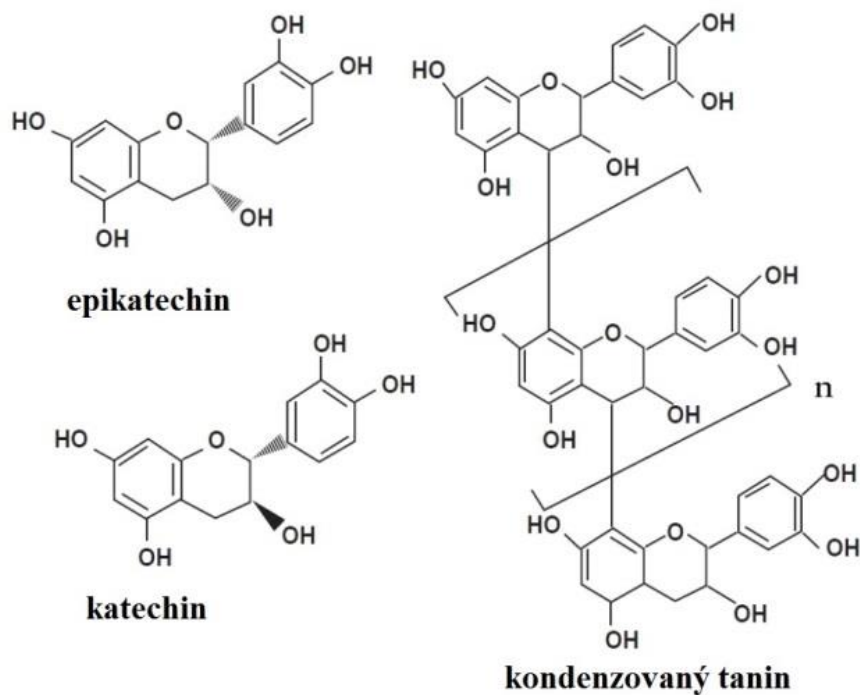
Hydrolyzovatelné taniny jsou většinou estery glukosy nebo jiných sacharidů s aromatickými hydroxykyselinami gallovou nebo *m*-digallovou (*m*-galloyl gallovou) kyselinou, tzv. gallotaniny (obrázek 1), nebo ellagovou kyselinou, ellagitaniny. Zbytky těchto kyselin se mohou vázat na pět volných hydroxylových skupin glukosy. Hydrolyzovatelné taniny nacházíme zejména v kůře a dřevě některých stromů. Hydrolyzovatelné taniny jsou přítomny pouze ve stopovém množství v běžně přijímané stravě [32].



Obrázek 1: Chemická struktura hydrolyzovatelných taninů [34]

2.2.3.2 Kondenzované taniny

V případě kondenzovaných taninů neboli proanthokyanidinů se jedná o polymerní látky, jejichž monomerními jednotkami jsou flavonoidy flavany, zejména flavan-3-oly, zvané katechiny (obrázek 2). Kondenzované taniny jsou široce zastoupeny v ovoci, zelenině, pícech, kakau, červeném vínu a určitých obilovinách (čirok, proso) a luštěninách [32][34].



Obrázek 2: příklad struktury kondenzovaného taninu [34]

Flavanové jednotky jsou spojovány vazbami mezi atomy uhlíku 4 a 8. Katechiny mají strukturu blízkou anthokyanidinům a flavanolu; mnohé vyšší oligomery a polymery proanthokyanidinů jsou kondenzované taniny. Kondenzované taniny se vyskytují ve formě dimerů a trimerů, které však snadno podléhají enzymové oxidaci, za vzniku polymerních hnědě až červeně zbarvených látek. Příkladem je hnědnutí rozřiznutého jablka nebo mechanicky poškozeného listu [32].

Kondenzované taniny mají širokou škálu biologických a farmakologických aktivit zahrnující antioxidační, kardio protektivní, protinádorové a analgetické účinky, bez způsobení výrazných toxikologických efektů [35].

Bylo pozorováno, že taniny dokáží zlepšit příjem glukosy díky mediátorům signálních drah pro inzulin, jako jsou PI3K (fosfoinositid-3-kinasa) a p38 MAPK (mitogenem aktivovaná protein kinasa) aktivace a translokace glukosovým transporterem (GLUT-4). Redukce glykémie (hladiny glukosy v krvi) fenolickými sloučeninami byla přisouzena schopností absorpce živin (př. katechiny čaje inhibují absorpci glukosy v tenkém střevu), snížení příjmu potravy (při epigallokatechingalláty výrazně redukuje příjem potravy), indukce regenerace β -buněk. Taniny byly také popsány jako antihyperglykemické látky v metabolismu diabetických krys. Taniny jsou tedy zkoumány v souvislosti s regulací metabolismu diabetiků 2. typu [33][35].

2.3 Antioxidační aktivita

Vzhledem k tomu, že je známá souvislost mezi oxidačním stresem a nemocemi jako například rakovina, ateroskleróza, mozková dysfunkce nebo různé prozánětlivé nemoci, vzrůstá také zájem

zkoumat možnosti snížení tohoto druhu stresu na lidský organismus. Jak již bylo zmíněno výše, některé sekundární metabolity rostlin mohou mít antioxidační aktivitu, neboli schopnost bránění působení oxidačního stresu. V posledních desetiletích se zvyšuje množství poznatků o těchto sloučeninách a velká pozornost o přírodní antioxidanty v poslední době je také posilována tím, že vzrůstají pochybnosti o možné karcinogenitě, poškození jater a stabilitě syntetických antioxidantů (např. butylhydroxytoluen (BHT) a butylhydroxyanisol (BHA)). Z potravinářského hlediska jsou látky s antioxidační aktivitou zajímavé vzhledem k jejich využitelnosti při zamezení oxidace lipidů a tím zlepšení kvality a nutričních hodnot potravin [36][37].

2.3.1 Antioxidanty

Antioxidanty se dají zjednodušeně definovat jako sloučeniny, které jsou-li přítomny ve výrazně nižších koncentracích ve srovnání s látkami, jež by měly chránit, mohou zabraňovat nebo zpomalovat oxidační destrukci těchto látek. Mechanizmy antioxidačního účinku jsou vychytávání reaktivních forem kyslíku ROS, dále předcházení vzniku ROS vazbou kovů nebo enzymatickou inhibicí nebo zastavení radikálových řetězových reakcí interferencí s propagační kaskádou volných radikálů [38][39].

Antioxidanty můžeme rozdělit na enzymatické (např. superoxid dismutáza (SOD), glutathion peroxidáza (GPx) a kataláza) a neenzymatické (např. glutathion, kyselina močová a flavonoidy) nebo na endogenní (tělu vlastní) a exogenní (přijímané s potravou). Některé potraviny rostlinného původu tak vedle své nutriční a energetické hodnoty mají také důležitou roli jako zdroj antioxidantů. K přírodním látkám s antioxidačními účinky, které jsou přijímané potravou, jsou v první řadě řazeny antioxidační vitaminy C, E (α -tokoferol) a karotenoidy. V poslední době se však mnohem větší význam přikládá zejména polyfenolickým sloučeninám. Celkový příjem polyfenolů z různých zdrojů byl odhadnut na 1 g denně a je tedy vyšší než příjem antioxidačních vitaminů. V řadě experimentálních studií bylo také prokázáno, že antioxidační aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než u antioxidačních vitaminů [35][40].

Ve stresu naše tělo produkuje více (ROS) než endogenních antioxidantů. Tato nerovnováha vede k poškození buněk a zdravotním problémům, rozvoji degenerativních onemocnění a právě exogenní antioxidanty přijímané potravou nám mohou pomoci nastolit opět původní rovnováhu [41].

Po reakci antioxidantů s volnými radikály mohou být nevratně zoxidovány, ale s oxidačními produkty méně škodlivými než produkty vzniklémi oxidací volných radikálů nebo mohou být buňkami recyklovány a opět využity k antioxidačním reakcím [35].

Antioxidanty mohou být velkým přínosem ke zlepšení kvality života tím, že preventivně působí nebo zpomalují nástup degenerativních chorob. Navíc mají potenciál k podstatnému snížení výdajů na zdravotní péči [42].

2.3.2 Volné radikály

Jak už bylo zmíněno, volné radikály negativně působí na organismus při řadě onemocnění. Jde především o reaktivní kyslíkové radikály ROS (peroxylový radikál (RCOO^\bullet), superoxidový anion (O_2^\bullet), peroxid vodíku (H_2O_2), singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), a hydroxylový radikál (HO^\bullet)) a dusíkové radikály RNS (peroxonitritový radikál (ONOO^\bullet), alkylperoxynitrit ROONO , oxid dusnatý NO^\bullet a oxid dusičitý NO_2^\bullet) souhrnně označované RONS (Reactive Oxygen and Nitrogen Species) [35].

Jako volný radikál označujeme jakoukoliv chemickou entitu, atom, molekulu nebo ion, která má ve vnější sféře svého elektronového obalu alespoň jeden nespárovaný elektron (je vysoce reaktivní) a je přitom schopna samostatné existence. Vznik radikálů může být iniciací radikálové řetězové reakce, reakce se pak propaguje do okolí za tvorby dalších radikálů, dokud nenarazí na další radikál (terminace) nebo antioxidant. Tyto radikály působí na biologicky významné sloučeniny, především lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny tím, že pozměňují jejich strukturu a modifikují jejich funkci. Kaskáda reakcí iniciovaná radikály vede k následným změnám ve struktuře buněk, poškození celých tkání, orgánů a důležitých funkcí v organismu [38][39][40].

2.4 Metody stanovení antimikrobiálních látek

Spektrofotometrické metody jsou s úspěchem využívány pro kvantitativní i kvalitativní analýzu přírodních fenolických látek a díky své jednoduchosti a nízkým ekonomickým nákladům patří v poslední době k nejpoužívanějším technikám. Poskytují užitečné informace a charakterizaci jak jednotlivých strukturních tříd polyfenolů, tak i celkové stanovení těchto komponent v rostlinném materiálu. Nejdůležitějším hlediskem pro výběr vhodné analytické metody je charakter matrice, povaha izolovaných látek a přítomnost rušivých komponent jako chlorofyly, terpeny, vosky a jiné.

Významné uplatnění v poslední době nacházejí modifikace spektrálních metod ve spojení s chromatografií. Jsou to vysoce selektivní metody s velkým potenciálem a patří k velmi užitečným nástrojům identifikace a separace prakticky všech složek vzorku [43].

2.4.1 Stanovení celkového obsahu polyfenolů

Existuje řada technik zaměřených na stanovení celkového obsahu polyfenolů v rostlinných tkáních, ale vzhledem ke značné variabilitě izolovaných sloučenin nelze použít jednu univerzální metodu, která by byla natolik senzitivní, a proto je často nutné provést několik různých analýz. Pro látky fenolického charakteru jsou typická dvě absorpční maxima, první je mezi hodnotami vlnové délky 240–285 nm a druhé 300–550 nm [44].

2.4.1.1 Folin-Ciocalteuho spektrofotometrická metoda

Folin-Ciocalteuho metoda se běžně používá pro stanovení celkového obsahu polyfenolových sloučenin. Tato technika byla poprvé představena v roce 1912 a byla používána výhradně pro studium metabolismu proteinů. Pozdější optimalizace protokolu a překonání prvotních technických problémů

umožnilo rozeznat kromě aminokyselin i další složky a metoda byla následně aplikována i pro identifikaci fenolů v moči a jiných matricích [43][45].

Metoda je založena na reakci látek směsi Folinova činidla fosfomolybdenanu a fosfowolframenu s fenoly obsaženými v rostlinném vzorku. Principem je redukce fenolů za současného vzniku chromogenů, modrých produktů. Rozsah zabarvení je spektrofotometricky měřený při vlnové délce 750 nm a představuje celkový obsah fenolů. Výsledná hodnota koncentrace fenolových sloučenin ve vzorku je pak získána přepočítáním na ekvivalentní množství kyseliny gallové nebo kyseliny chlorogenové podle kalibrační křivky [45][46].

Stanovení přírodních látek na základě původního protokolu vytvořeného Folinem a Ciocalteum je využíváno především pro identifikaci anthokyanů a hydrolyzovatelných a kondenzovaných taninů. Problémovým bodem metody je vliv diverzifikace polyfenolů na snížení účinnosti Folinova činidla a použití této metody pro srovnání vzorků zanechává určité procento nejistoty, zda získané hodnoty obsahu látek odpovídají žádané a skutečné koncentraci ve vzorku. Další nevýhodou této metody je nízká specifita a interference redukujících látek např. kyseliny askorbové [44][46].

Folin-Ciocalteuho spektrofotometrická metoda je také známá pod označením GAE (Gallic Acid Equivalent method) [45].

2.4.1.2 Folin-Denis spektrofotometrická metoda

Folin-Denis spektrofotometrická metoda je široce používaný postup pro kvantifikaci celkového obsahu fenolových sloučenin v rostlinném materiálu. Metoda je založena na interakci fenolů a fenolických skupin se směsí kyseliny fosfowolframové a fosfomolybdenové, které se chovají jako citlivé činidlo. Kyselina fosfowolframová je redukována na fosfowolframovou modř a kyselina fosfomolybdenová na fosfomolybdenovou modř. Intenzita zabarvení modrého komplexu spektrofotometricky měřená při vlnové délce 760 nm, představuje celkový obsah stanovovaných látek. Problematika tohoto testu spočívá v nízké specifitě a interferenci redukujících látek, jako je kyselina askorbová [46].

Tato metoda byla později upravena pro rutinní analýzu velkého počtu vzorků. Strukturální variabilita fenolových sloučenin značně ovlivňuje absorbanci Folinova činidla, dále se zde uplatňuje přítomnost rostlinných metabolitů, proteinů a alkaloidů, důsledkem těchto faktorů je snížení korektnosti stanovení přítomných fenolových sloučenin v rostlinných matricích. Nicméně Folin-Denis metoda je z praktického provedení jednoduchá a analýza v rámci jednoho vzorku poskytuje reálné hodnoty koncentrace obsažených látek. Folin-Denis test se rovněž používá pro stanovení tříslovin zejména v obilovinách a luštěninách. Výsledná koncentrace fenolových látek je stanovena jako ekvivalent kyseliny tříslové dle kalibrační křivky (TAE) [47][48].

2.4.2 Stanovení celkového obsahu flavonoidů Christ-Müllerovou metodou

Jeden z nejčastěji používaných analytických postupů pro rutinní stanovení celkového obsahu flavonoidů v rostlinné matrici. Principem metody je spektrofotometrická detekce barevných komplexů Al^{3+} s hydroxylovou a karbonylovou skupinou v alkalickém prostředí. Praktické provedení zahrnuje hydrolýzu flavonoidových glykosidů, extrakci aglykonů ethyl acetátem a následnou tvorbu komplexů s chloridem hlinitým. Výsledný roztok je žluté barvy a může být spektrofotometricky měřen při vlnové délce 425 nm. Výtěžek testu je vyjádřen jako ekvivalent katechinu podle následujícího vztahu:

$$g[\%] = A \times \frac{0,772}{b}$$

(A = absorbance, b = hmotnost suchého rostlinného materiálu v gramech) [49].

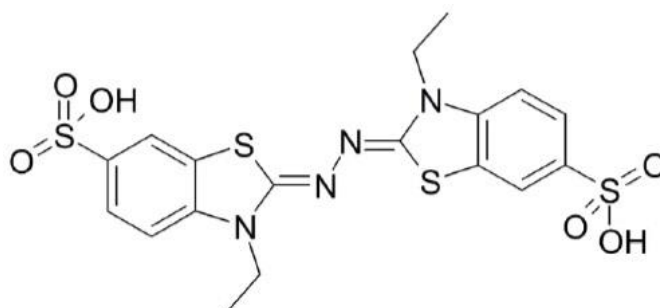
2.4.3 Metody stanovení antioxidační aktivity polyfenolů

V literatuře lze pro stanovení antioxidační aktivity nalézt velký počet analytických metod založených na různých principech. Obecně mohou být kategorizovány do dvou skupin – na metody posuzující schopnosti vzorku eliminovat radikály (metody DPPH, TEAC, ORAC) nebo na metody hodnotící redoxní vlastnosti látek (metoda FRAP). Většina publikací obsahuje stanovení antioxidační aktivity směsných vzorků jako celku, v této souvislosti byl zaveden pojem celková antioxidační aktivita TAA (total antioxidant activity). Jiný přístup ve výzkumu přírodních antioxidantů je testování individuálních izolovaných látek vůči jednotlivým volným radikálům. Slouží především k charakterizaci vztahů mezi strukturou a reaktivitou daných sloučenin. Výsledky stanovení antioxidační aktivity jsou významně ovlivněny celou řadou faktorů. Svou roli zde hraje matrice vzorku, typ použitého radikálu a standardu, dále i přítomnost přechodných kovů, reakční mechanismy zhášení radikálových částic, průběhy těchto reakcí a jejich limity [38][50].

2.4.3.1 Metoda používající ABTS (TEAC – Trolox equivalent antioxidant capacity)

Pro hodnocení antioxidační aktivity biologického materiálu byly vypracovány některé metody a postupem času i jejich modifikace. Nejpoužívanější metodou pro stanovení celkové antioxidační aktivity je metoda ABTS. Tato metoda využívá činidla, které za účasti iniciace jiné látky přechází ve svou radikálovou formu, která je barevná a relativně stabilní. V přítomnosti látek s antioxidační aktivitou se redukuje a tím i odbarvuje. Principem metody je sledování schopnosti vzorku zhášet kation radikál $ABTS^{•+}$ (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazol-6-sulfonát)). Zhášení radikálu $ABTS^{•+}$ antioxidanty, které se chovají jako donory vodíku, měříme spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm. Výpočet koncentrace antioxidačních látek ve vzorku vychází z rozdílů absorbance vzorku v čase 0 a 10 minut a také z kalibrační křivky vytvořené ze standardního roztoku troloxu (kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2 karboxylová), což je derivát vitamínu E. Díky tomu je tato metoda také označována jako metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Metoda je

velmi rychlá, jednoduchá a umožňuje široké hodnocení antioxidační aktivity různých látek i směsných vzorků [37][41][51].



Obrázek 3: Struktura ABTS [51]

2.4.3.2 Metoda používající DPPH

Jedna ze základních metodik pro stanovení antiradikálové aktivity izolovaných čistých látek i různých směsných vzorků. Principem metody je reakce testované látky se stabilním fialovým syntetickým radikálem DPPH (1,1 difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl), který je redukován na žlutý difenylpikrylhydrazin. Zhášení radikálu u DPPH testu probíhá dvěma reakčními mechanismy a to přenosem atomu vodíku (HAT – Hydrogen Atom Transfer) a přenosem elektronu (SET – Single Electron Transfer). Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky při 517 nm, buď po uplynutí konstantního času, nebo se měření provádí v kinetickém režimu. Aktivita směsných vzorků se vyjadřuje v ekvivalentech kyseliny askorbové nebo jednotkách standardu Troloxu [42][51].

Mechanismus zhášení radikálu DPPH• působením polyfenolů byl popsán na příkladu flavonoidu kvercetinu. Odštěpením atomu vodíku a jeho přenosem na radikál DPPH• vzniká z antioxidantu semichinon (aroxylový radikál), který může být další molekulou DPPH• oxidován na chinon. V závislosti na stupni oxidace zháší jedna molekula flavonoidu jednu nebo i více molekul radikálu DPPH• v souběžných reakcích. Je prokázán signifikantní vliv hydroxylové skupiny vázané v poloze 3 na antioxidační potenciál kvercetinu [52].

K metodám založených na reakci antioxidantu se stabilními radikály patří také test s galvinoxylem. Princip je podobný jako při reakci s DPPH•. Metoda spočívá v redukcí stabilního radikálu galvinoxylu látkami poskytující vodík, reakce se sleduje spektrofotometricky při vlnové délce 428 nm. Další možností je syntetický volný radikál nazvaný Fremyho sůl (nitrodisulfonan draselný) nebo radikál DMPD• [38][52].

2.5 Metody určování antimikrobiální aktivity

Rezistence mikroorganismů k antimikrobiálním látkám (AML) je dnes celosvětově jedním z největších problémů nejen klinické a veterinární praxe. Velký zájem o tuto problematiku je

i v oblasti mikrobiologie potravin, protože řada rezistentních bakterií je šířena nebo má svůj rezervoár právě v potravinách a potravinových surovinách. Z tohoto důvodu se při vyšetření potravinových izolátů stále častěji využívají i metody stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám [53].

V současnosti jsou klinické laboratorní standardy pro testování citlivosti pravidelně aktualizovány např. americkou organizací CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*; dříve NCCLS – *National Committee for Clinical and Laboratory Standards*). Metody stanovení citlivosti, resp. rezistence mikroorganismů k antimikrobiálním látkám lze rozdělit na semikvantitativní (disková difúzní metoda) a kvantitativní (tzv. diluční metody – např. agarová diluční metoda, diluční mikrometoda, Etest) [53][55].

2.6 Semikvantitativní metody

Semikvantitativní metody nachází uplatnění zejména při rutinním screeningu citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám. Do této skupiny náleží disková difúzní metoda, která se používá zejména pro vyšetření citlivosti u rychle rostoucích, nenáročných bakterií a některých náročnějších bakterií. Hodnocení se provádí na základě měření velikosti inhibičních zón vzniklých okolo disků s testovanou látkou. Podle velikosti inhibiční zóny jsou vyšetřované kmeny mikroorganismů zařazeny do kategorie citlivý (S), intermediálně rezistentní (I) (kmeny na rozmezí mezi citlivými a rezistentními) nebo rezistentní (R) k dané antimikrobiální látce. Při správném provedení prokazují výsledky diskové difúzní metody a výsledky kvantitativních dilučních metod vysokou shodu [54][55].

2.6.1 Disková difúzní metoda

První metodou hodnocení účinku antibiotik na bakterie byla disková difúzní metoda. Poprvé byla standardizována jako *paper disk method* v roce 1954. Navzdory své jednoduchosti, je disková difúzní metoda založena na sofistikovaných fyzikálně-chemických principech, které upravují dynamiku šíření (difúze) antibiotika ve vztahu k růstu bakterií v agarovém systému. Po kontaktu disku napuštěného antibiotikem s povrchem inokulovaného agaru, začnou molekuly antibiotika okamžitě difundovat do agaru a vytvářet dynamicky se měnící gradient koncentrace antimikrobiální látky. Mikroorganismy se začínají dělit, jejich počet vzrůstá až do kritického množství. Okraj inhibiční zóny vzniká v okamžiku, kdy je koncentrace antibiotika ještě schopná inhibovat mikroorganismus narůstající do velké buněčné masy. Současně je hustota buněk dostatečně vyšší než absorbovatelné množství antibiotika v bezprostřední blízkosti, subinhibiční množství antibiotika dovoluje mikroorganismu růst [55][56][57].

Difúzní koeficient antimikrobiální látky je ovlivněn nejen její molekulovou hmotností, velikostí, iontovým nábojem či rozpustností ve vodě, ale také viskozitou a výškou agaru, teplotou a dalšími

inkubačními podmínkami. Růst mikroorganismu ovlivňuje zejména dostupnost živin, hustota populace, růstová fáze inokula a inkubační teplota [57].

Výsledky *in vitro* testů citlivosti mohou být použity jako kvalifikovaný odhad k predikci léčebného výsledku běžných dávek antibiotik u zdravých pacientů. Na druhou stranu potenciální klinická účinnost antibiotika může být ovlivněna řadou dalších faktorů, proto výsledky kvalitativních testů musí být v korelaci s kvantitativními hodnotami MIC (minimální inhibiční koncentrace) [57].

Některé disky mohou být využity i pro screening některých speciálních mechanismů rezistence. Jedná se např. o detekci rezistence k vysokým hladinám aminoglykosidů u enterokoků nebo detekci přítomnosti širokospektré β -laktamasy (ESBL) u izolátů *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* či *K. oxytoca*.

Mezi hlavní výhody diskové difúzní metody patří jednoduché provedení bez nutnosti náročného vybavení, flexibilní změna spektra vyšetřovaných antimikrobiálních látek a nízká cena. Hlavní nevýhodou, mimo toho, že se nejedná o kvantitativní metodu, je do jisté míry časová náročnost, zahrnující zejména přípravu agarových ploten a dobu potřebnou k manuálnímu odečítání inhibičních zón a interpretaci výsledků. Přesto má v klinické praxi disková difúzní metoda svou nezastupitelnou roli [55][56].

2.7 Kvantitativní – Diluční metody

Diluční metody jsou kvantitativní metody určené ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC), tedy nejnižší testované koncentrace daného antibiotika, která inhibuje viditelný růst mikroorganismu. MIC se obvykle vyjadřuje v mg.l^{-1} , příp. v $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Odečtené hodnoty MIC se porovnávají s interpretačními kritérii a testovaný mikroorganismus se označí jako citlivý (S), intermediálně rezistentní (I) či rezistentní (R) k danému antibiotiku [53].

Vyšetření se provádí na agarových nebo bujónových půdách, které obsahují zvolené koncentrace antibiotika, obvykle v dvojnásobné geometrické řadě. Do půd se očkuje standardní inokulum testovaného mikroorganismu. Kvalita získaných výsledků závisí na přesném dodržení metody a ověřuje se systémem kontrol [54].

Stanovení hodnoty MIC je důležité pro určení terapeutické dávky antimikrobiální látky. Mezi nejpoužívanější metody patří agarová diluční metoda, diluční mikrometoda a Etest [53].

2.7.1 Agarová diluční metoda

Agarová diluční metoda je referenční metodou stanovení citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám, používá se mimo jiné pro ověřování spolehlivosti ostatních metod [54].

Nespornou výhodou agarové diluční metody je vysoká standardizovanost provedení (referenční metoda). Za standardních podmínek jí můžeme vyšetřit velký soubor kmenů. Využívá se také k hodnocení účinku nových antibiotik. Ve srovnání s mikrodiluční metodou spolehlivěji odhaluje kontaminaci kmenů a lépe detekuje hetero rezistenci, tj. rezistentní subpopulaci bakterií [53][58].

Na druhou stranu je tato metoda poměrně pracná, časově a ekonomicky náročná, a proto není praktická pro vyšetření citlivosti malého počtu nebo jednotlivých kmenů. Agarová diluční metoda může selhat v průkazu klinicky významné rezistence některých bakterií, problém mohou být i mikroorganismy s plazivým růstem (např. *Proteus* spp.) [58].

2.7.2 Diluční mikrometoda (mikrodiluční metoda)

Původní provedení bujónového dilučního testu bylo ve zkumavkách (tzv. makrodiluční metoda), v současnosti se upřednostňuje varianta v mikrotitračních destičkách (tzv. diluční mikrometoda nebo též mikrodiluční metoda) [59].

Výhodou mikrodiluční metody je vysoká shoda s výsledky agarové diluční metody. Klinické laboratoře ocení pružnou a snadnou přípravu velkého množství destiček s různými půdami, antibiotiky a jejich koncentracemi, které lze dlouhodobě uchovávat, aniž by došlo ke snížení jejich kvality (obvykle 1 měsíc při teplotě -20 °C). Další výhodou je jednoduché provedení a možnost automatizace odečítání výsledků a jejich vyhodnocení. Na rozdíl od ostatních metod koncentrace inokula neovlivní významně výsledek [56][59].

Mezi omezení mikrodiluční metody patří zejména obtížné rozpoznání případné kontaminace testovaného bakteriálního kmene a neschopnost detekce rezistentní subpopulace. Metodu nelze použít u kmenů, které v tekutém prostředí autolyzují. Stabilní sestava a koncentrace antibiotik v komerčních destičkách nemusí vyhovovat potřebám dané laboratoře [55][59].

2.7.3 Etest

Etest je moderní gradientová metoda kombinující principy diskové difúzní a agarové diluční metody. Byla vyvinuta ve Švédsku a poprvé prezentována v roce 1988. Pro vysoký stupeň shody s výsledky MIC získanými referenční agarovou diluční metodou je Etest vhodný ke stanovení MIC u řady mikroorganismů, včetně náročných bakterií a anaerobů [53].

Vlastní Etest je plastový proužek, na jehož spodní straně je imobilizovaný předdefinovaný koncentrační gradient daného antibiotika ve vysušeném stavu. Koncentrační gradient je kalibrován jako odpovídající hodnoty MIC, jedná se o stupnici nejméně 15–ti dvojnásobných geometrických ředění, která je umístěna na horní straně Etestu [55][60].

Podobně jako v případě diskové difúzní metody, je provedení Etestu velmi rychlé a jednoduché. Výhodou Etestu je dále lepší možnost odhalení kontaminace testovaných kmenů mikroorganismů a detekce hetero rezistence [54][59].

Hlavní nevýhodou, která brání masivnímu rozšíření Etestu, je vysoká cena testovacích proužků. Podobně jako u ostatních metod, mohou být výsledky stanovení ovlivněny koncentrací inokula [60].

Test lze provádět na různých živných půdách a za různých inkubačních podmínek, a proto nachází široké využití v klinické diagnostice aerobních i anaerobních mikroorganismů (streptokoky, pneumokoky, hemofily, gonokoky atd.). Mimo antibiotik jsou k dispozici i Etesty s některými

antifungálními látkami umožňující např. testování citlivosti izolátů *Candida* spp. Upravené Etesty lze použít k detekci speciálních mechanismů rezistence, např. širokospektrých β -laktamas či metalo- β -laktamas [58][59][60].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Seznam použitých přístrojů

Spektrofotometr – UV/VIS HELIOS DELTA – Thermospectronic, Anglie

Vortex – Reax Top, Heidolph, Německo

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

Analytické váhy – AND GR–202–EC, Japonsko

Fotoaparát Nikon D50

Mikropipety Biohit Proline

Centrifuga – Ependorf 5417–R

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

Autokláv – Vaposteri BMT, Brno

3.2 Seznam použitých chemikálií

Destilovaná voda

Ethanol 96 % (VWR)

Ethanol 99 % pro UV-VIS (VWR)

Folin-Ciocalteho činidlo (Sigma–Aldrich Chemie GmbH)

Uhličitan sodný (LACHEMA)

Kyselina gallová (PENTA)

Dusitan sodný (PENTA)

Katechin (LACHEMA)

Chlorid hlinitý (PENTA)

Hydroxid sodný (LACHEMA)

3.3 Použitý software

osobní počítač

operační systém windows

MS Word

MS Excel

program Lucia NET – program obrazové analýzy, umožňující archivaci, úpravu, měření různých znaků obrazu a zachycování rozsáhlých sekvencí obrazů [61]

3.4 Charakteristika použitých mikroorganismů

Kmeny mikroorganismů použitých v tomto měření pocházejí ze sbírky Masarykovy univerzity přírodovědecké fakulty v Brně. *Serratia marcescens* CCM 303, *Bacillus subtilis* CCM 1999, *Bacillus cereus* CCM 2010 a *Micrococcus luteus* CCM 210.

3.4.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis, jinak též nazývaný senný bacil, je grampozitivní bakterie, jejíž buňky mají tvar tyčinek se zaoblenými konci. Velikost těchto buněk je 0,3 až 1,5 × 2 až 3 μm. Vyskytují se jednotlivě i v řetězcích a jsou peritrichně obrvené. *Bacillus subtilis* je aerobní bakterie, ale za určitých podmínek může růst i anaerobně (dýchání pomocí dusičnanů, jako donorů elektronů nebo fermentací v nepřítomnosti elektronových donorů) patří tedy mezi fakultativní anaeroby. Za nepříznivých podmínek tvoří teplotně rezistentní, dormantní spory. *Bacillus subtilis* zkapalňuje želatinu, hydrolyzuje škrob a z dextrinů tvoří kyseliny [62].

Teplotní rozmezí růstu bakterie *Bacillus subtilis* je 10 až 55 °C a ideální teplota růstu je 37 až 40 °C. Sporulace začíná při teplotách nad 44 °C, v závislosti na bakteriálním kmenu a zvoleném kultivačním médiu. Spory vydrží teploty až 150 °C po dobu 6 hodin [62].

Tato bakterie je v přírodě velmi rozšířená, vyskytuje se především v půdě, v seně a v asociaci s rostlinami. S touto bakterií se můžeme často setkat při mikrobiologické kontrole v celém potravinářském průmyslu. *Bacillus subtilis* patří s *Escherichia coli* k nejlépe prozkoumaným prokaryotním mikroorganismům [62].

3.4.2 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus patří mezi grampozitivní bakterie z čeledi *Bacillaceae*. Tvoří neopouzdrěnou peritrichní pohyblivou sporulující silnou rovnou tyčinku s oblým nebo hranatým zakončením, která tvoří vlákna. Je to fakultativní anaerob s poměrně velkými vegetativními buňkami (1 x 3 až 5 μm), které se vyskytují samostatně nebo tvoří řetězky v počtu jednotek až stovek. *B. cereus* tvoří jen jednu endosporu, která je velmi odolná k vysokým teplotám, jedům, záření a jiným nepříznivým podmínkám. Spory jsou centrální cylindrického, elipsoidního nebo sférického tvaru a nezpůsobují zduření sporangia [63].

B. cereus roste v teplotním rozmezí 8–55 °C, optimálně při 28–35 °C a není zaznamenána žádná tolerance pro vodní aktivitu (min. ~ 0,95). Rozpětí hodnot pH, které umožňují ještě růst je přibližně 4,9–9,3. Je kultivačně nenáročný. Roste na běžných médiích, na krevním agaru vyrůstá ve velkých drsných koloniích s nepravidelnými okraji, obklopených zónou β-hemolýzy [63].

B. cereus je bakterie, která patří mezi saprofytické mikroorganismy, vyskytující se převážně v půdě, ve vodě, ve vzduchu a na rostlinách. Je běžnou součástí střevní mikroflóry člověka. Některé jsou patogeny hmyzu [63].

B. cereus může způsobovat onemocnění z potravy. Onemocnění vzniká po požití kontaminovaných potravin, entero toxikogenním kmenem a z kontaminovaných kosmetických přípravků. Jsou to hlavně enterotoxikózy, meningitidy, endokarditidy, konjunktivitidy, pneumonie, sepse a infekce ran. K otravám dochází při pomnožení této bakterie v potravine na koncentraci buněk 10⁷ g⁻¹ potraviny (u dětí stačí již koncentrace 10⁵ g⁻¹) [63].

3.4.3 *Serratia marcescens*

Serratia marcescens je gramnegativní bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*. Buňky této bakterie mají tvar velmi krátkých tyčinek o průměru do 1 µm. Vyskytuje se jednotlivě nebo v krátkých řetězcích. *Serratia marcescens* je fakultativně aerobní bakterie a jejím charakteristickým znakem je tvorba červeně pigmentovaných kolonií. Toto zbarvení je způsobeno červeným pigmentem prodigiosinem [64].

Optimální teplota růstu bakterie *Serratia marcescens* je mezi 20–25 °C. Při teplotách nad 37 °C přestává růst. *Serratia marcescens* dobře roste na všech základních půdách [64].

Všechny bakterie rodu *Serratia* jsou v přírodě velmi rozšířené. Vyskytují se především ve vodě a v zemědělských produktech. Tato bakterie je hlavním původcem červených skvrn na potravinách obsahujících škrob [64].

3.4.4 *Micrococcus luteus*

Micrococcus luteus patří mezi grampozitivní bakterie z čeledi *Micrococcaceae*. Je to přísný chemoorganotrofní aerob. Vytváří nepohyblivé kulovité buňky o velikosti 0,9–1,8 µm, které tvoří balíčky nebo se shlukují do tetrad. Optimální kultivační teplota je v rozmezí teplot 25–37 °C. Na kultivačních médiích tvoří sírově žluté až krémově bílé ve vodě nerozpustné kolonie. Na solených potravinách, kde se vyskytuje, může tvořit žluté až oranžové kolonie. Toto zbarvení je způsobeno karotenoidními barvivy, které chrání buňky před smrtícími účinky ultrafialové složky slunečního světla, a proto se *M. luteus* vyskytuje jako častá vzdušná kontaminace [65].

Je schopen růst v přítomnosti 5% NaCl, čehož se využívá při jeho stanovení, ale v 15% NaCl už neroste. Hydrolyzuje želatinu a neokyseluje glukosu [65].

M. luteus se vyskytuje primárně na pokožce savců a sekundárně na mase, v půdě a ve vodě. Patří mezi nežádoucí potravinové kontaminanty. Může způsobovat septický šok, pneumonii a infekci močových cest u jedinců se sníženou imunitou [65].

3.5 Vzorky čajů podrobené analýze

K testování inhibičního účinku u vybraných mikroorganismů byly použity připravené výluhy a maceráty ze dvou druhů čajů firmy Valdemar Grešík – Natura s. r. o. a jednoho druhu čaje firmy Sonnentor

- Šípek oplodí – plod zbavený semen



Obrázek 4: Použitý Šípkový čaj firmy Valdemar Grešík – Natura s. r. o. [66]

- Směs – šípek oplodí 50 %, aronie plod 40 %, černý rybíz plod 10 %



Obrázek 5: Použitá čajová směs firmy Valdemar Grešík – Natura s. r. o. [67]

- Růže květ (poupata)



Obrázek 6: Použitý čaj z poupat firmy Sonnentor [68]

3.6 Kultivační média a jejich příprava

Jako kultivační médium pro uchování a pomnožení testovaných mikroorganismů jsme použili živné médium firmy Himedia: Nutrient agar No. 2.

Složení a příprava:

Živočišná tkáň.....	10 g
Hovězí extrakt.....	10 g
Chlorid sodný (NaCl).....	5 g
Agar.....	15 g
Destilovaná voda.....	1000 ml
pH.....	7,2

40 g živného média se rozpustilo v 1000 ml destilované vody. Živné médium bylo poté vysterilizováno v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

3.7 Příprava rostlinných extraktů

3.7.1 Příprava macerátů

Statické maceráty

10 g zvoleného vzorku čaje bylo zalito 100 ml destilované vody o teplotě 25 °C a macerováno 6 dní bez přístupu světla při laboratorní teplotě (25 °C). Z macerátu byl každých 24 hodin odebrán jeden vzorek. Vzorky byly poté zcentrifugovány a filtrát byl uchováván v mrazničce při teplotě -4 °C.

Zrychlené maceráty

10 g zvoleného vzorku čaje bylo zalito 100 ml rozpouštědla o teplotě 25 °C a macerováno 3 dny na třepačce při laboratorní teplotě (25 °C). Z macerátů byly odebrány vzorky v časovém intervalu 2, 4, 8, 24, 48 a 72 hodin. Odebrané vzorky byly poté zcentrifugovány a uchovávány v mrazničce při teplotě -4 °C.

3.7.2 Příprava výluhů

10 g zvoleného vzorku čaje bylo zalito 100 ml destilované vody o teplotě 100 °C. Z tohoto výluhu byly odebrány vzorky v časovém intervalu 5, 10, 15, 20, 40 a 60 minut. Odebrané vzorky byly poté zcentrifugovány a uchovávány v mrazničce při teplotě -4 °C.

3.8 Ověření antimikrobiální účinnosti rostlinných extraktů

Na ověření inhibičních účinků bylinných extraktů a macerátů byla použita difúzní jamková metoda na agarových plotnách. Pro ověření byly použity Petriho misky o průměru 9 cm a skleněná trubice o průměru 1 cm.

Do zkumavky se 4,5 ml sterilního živného bujónu č. 2 byla naočkována kultura mikroorganismů, která byla inkubována v termostatu 24 hodin při 30 °C. Za 24 hodin bylo odpipetováno 1,5 ml do 150 ml vysterilizovaného agaru, který byl ochlazen na 42–45 °C. Takto připravené zaočkované medium bylo rozléváno na plastové Petriho misky (37 ml). Do tuhého agaru byly sterilní skleněnou trubicí vyhloubeny čtyři jamky. Do tří jamek bylo pipetováno po 100 µl testovaného výluhu nebo macerátu, který byl uchováván při -4 °C a před testováním byl rozmražen, do čtvrté jamky bylo napipetováno 100 µl čistého rozpouštědla bez aktivní látky tzv. blank. Petriho misky byly poté inkubovány při 30 °C po dobu 48 hodin v termostatu. Nakonec byla zhotovena fotografická dokumentace jednotlivých Petriho misek a změřena velikost inhibičních zón v programu Lucia NET.

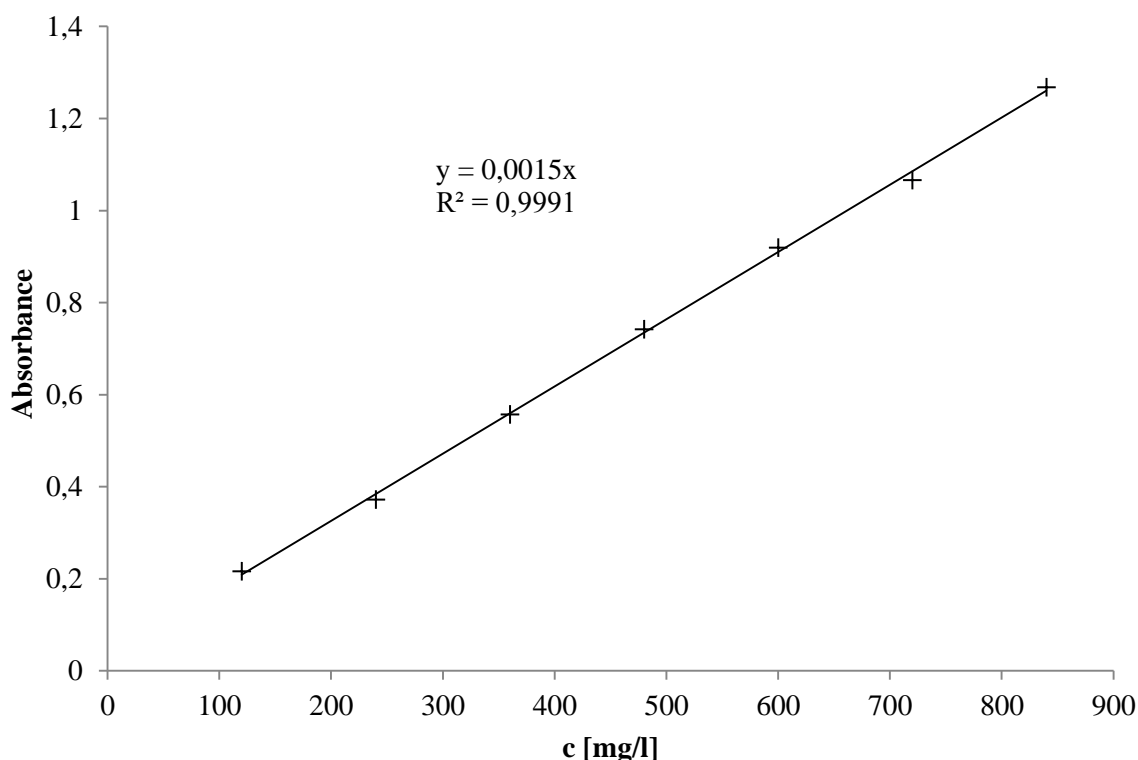
3.9 Stanovení celkových polyfenolů

Příprava standardu

Byla připravena kalibrační křivka kyseliny gallové o koncentracích 100, 200, 300, 400, 500 a 600 mg·l⁻¹. Pro její stanovení byl použit stejný postup jako u extraktů, kdy byly k reakční směsi přidávány připravené koncentrace kyseliny gallové. Absorbance jednotlivých koncentrací byla měřena při vlnové délce $\lambda = 750$ nm. Byla sestrojena kalibrační křivka, závislosti absorbance na koncentraci kyseliny gallové (mg·l⁻¹).

Tabulka 3: Jednotlivé objemy použitých činidel pro metodu FCM

Činidlo	V [ml]
Folin–Ciocaltauovo	1
Extrakt čaje	0,1
Uhlíčitán sodný	1
Destilovaná voda	1



Obrázek 7: Kalibrační křivka kyseliny gallové

Celkový obsah fenolů u bylinných extraktů byl stanoven pomocí Folin–Ciocalteuova činidla. Do zkumavky bylo napipetováno 1 ml zředěného Folin–Ciocalteuova činidla, 1 ml destilované vody a 100 μ l extraktu vzorku. Každý vzorek byl analyzován ve třech paralelních stanoveních. Roztok ve zkumavkách byl promíchán a ponechán stát. Po pěti minutách bylo do zkumavky přidáno 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného a roztok byl opět promíchán. Reakcí fenolických sloučenin s činidlem vzniklo modré zbarvení, jehož intenzita byla po 15 minutách změřena na spektrofotometru, při vlnové délce 750 nm proti slepému vzorku (kde namísto 100 μ l extraktu bylo použito 100 μ l rozpouštědla). Celkové množství polyfenolů bylo vypočteno pomocí kalibrační křivky.

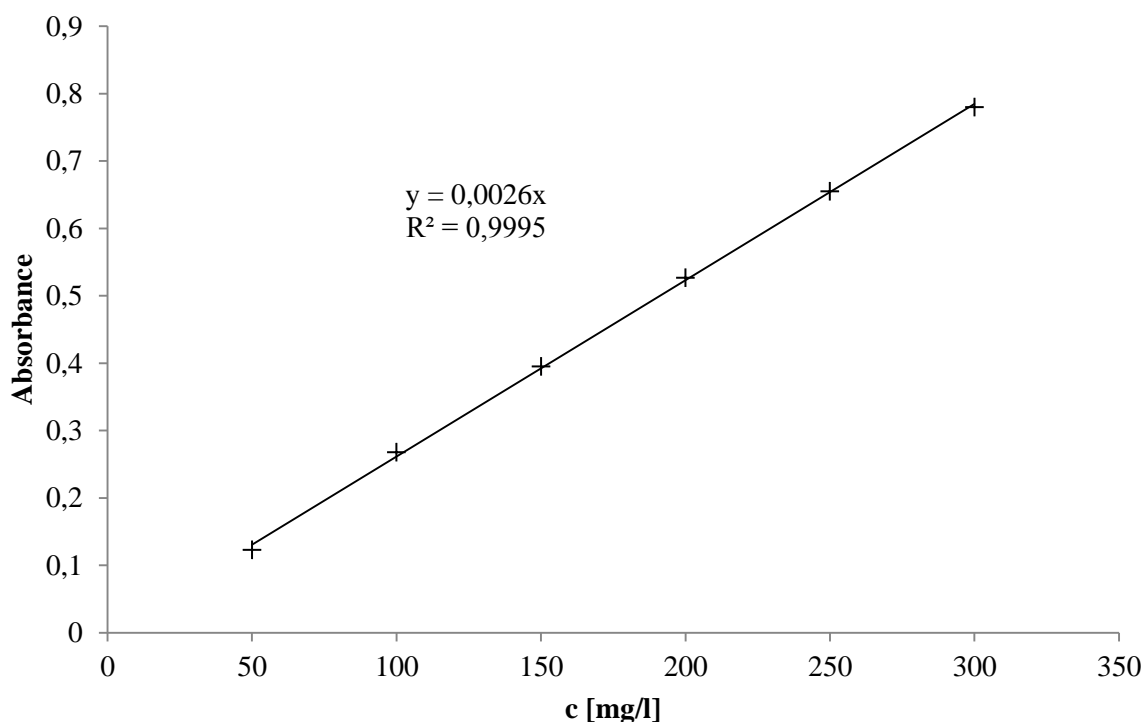
3.10 Stanovení celkových flavonoidů

Příprava standardu

Byla připravena kalibrační křivka katechinu o koncentracích 50, 100, 150, 200, 250 a 300 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro její stanovení byl použit stejný postup jako u extraktů, kdy byly k reakční směsi přidávány připravené koncentrace katechinu. Absorbance jednotlivých koncentrací byla měřena při vlnové délce $\lambda = 510$ nm. Byla sestrojena kalibrační křivka v závislosti absorbance na koncentraci standardu katechinu ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

Tabulka 4: Jednotlivé objemy použitých činidel pro stanovení flavonoidů

Činidlo	V [ml]
extrakt čaje	0,5
destilovaná voda	2,5
dusičnan sodný 5%	0,2
chlorid hlinitý 10%	0,2
hydroxid sodný	1,5



Obrázek 8: Kalibrační křivka katechinu

Celkový obsah flavonoidů u bylinných extraktů byl stanoven pomocí hlinité soli a dusitanu. Do zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml extraktu, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% roztoku dusičnanu sodného. Roztok ve zkumavce byl důkladně promíchán a ponechán stát 5 minut. Poté bylo do zkumavky přidáno 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého, roztok byl opět promíchán a ponechán stát 5 minut. Nakonec bylo do zkumavky přidáno 1,5 ml roztoku hydroxidu sodného a 1 ml destilované vody. Po 15 minutách byly vzorky analyzovány pomocí spektrofotometru při vlnové délce 510 nm proti slepému vzorku (500 μ l rozpouštědla). Celkové množství flavonoidů bylo vypočteno pomocí kalibrační křivky katechinu.

3.11 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Radikál kationtu ABTS byl připraven reakcí ABTS diamonné soli s peroxidisíranem draselným. Byl připraven roztok ABTS o koncentraci 7 mM, rozpuštěním ABTS v destilované vodě. Radikálový

kationt z ABTS byl poté získán reakcí s 2,45 mM peroxodisíranem draselným. Vzniklý roztok byl ponechán stát ve tmě při laboratorní teplotě 16 hodin.

Před použitím byl ABTS^{++} zředěn ethanolem pro UV/VIS na absorbanci $0,7 \pm 0,02$ při 734 nm (měřeno proti ethanolu pro UV/VIS). Do zúžené kyvety bylo napipetováno 1 ml ABTS^{++} a 10 μl použitého extrakčního rozpouštědla (dest. voda nebo ethanol) a byla změřena absorbance A_0 v čase $t = 0$. Poté bylo do další kyvety napipetováno 1 ml ABTS^{++} a 10 μl extraktu vzorku. Kyveta byla na 10 minut uložena do tmy a poté byl změřen pokles absorbance A_{10} .

Pro výpočet celkové antioxidační aktivity byla použita kalibrační rovnice troloxu:

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

jednotky koncentrace jsou v $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Hlavním tématem této práce bylo testování bylinných extraktů, ve kterých obsahově převládaly části Růže šípkové. Trh nabízí běžnému konzumentovi nepřehledné množství bylinných směsí s různým obsahem a druhem léčivých látek. V této práci byly použity bylinné směsi firem Valdemar Grešík Natura s. r. o. a Sonnentor. Od první jmenované firmy to byly dvě směsi Šípek oplodí – jedná se o sypaný čaj s hrubě nadrcenými sušenými plody Růže šípkové a čajová směs Aronie & Šípek & Černý rybíz. Tato čajová směs byla jemně nadrcená a zabalena ve formě čajových sáčků. Od firmy Sonnentor to byla bylinná směs Růže květ, poupata – sypaný čaj skládající se ze sušených pupat Růže.

Kombinací metod přípravy a rozpouštědel vzniklo sedm různých typů extraktů (vodný statický macerát, vodný zrychlený macerát, vodný výluh a dále zrychlené maceráty s 20%, 40%, 60% a 80% ethanolem). U každého z těchto typů byly připraveny tři varianty, jelikož byly v této práci použity tři bylinné směsi. Celkově bylo tedy vytvořeno 21 různých extraktů.

Cílemi této práce bylo za prvé, vytvoření extrakčních křivek zobrazujících závislost obsahu biologicky aktivních látek (polyfenolů, flavonoidů) extraktů na čase extrakce. Za druhé byly za pomoci zmíněných extrakčních křivek vybrány ty vzorky, u kterých byly stanoveny nejvyšší hodnoty biologicky aktivních látek. Vybrané vzorky byly poté použity k antimikrobiálním testům na zvolených mikroorganismech *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* a *Serratia marcescens*.

4.1 Stanovení celkového obsahu polyfenolů

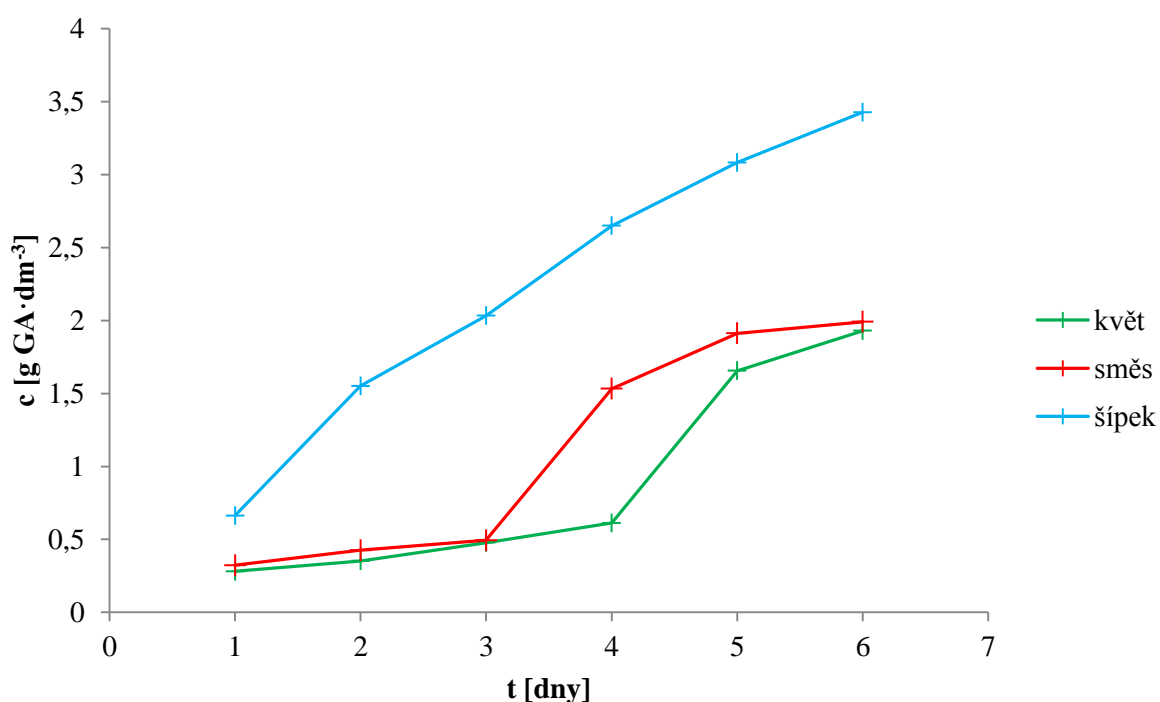
Celkový obsah polyfenolů byl stanoven za použití Folin-Ciocalteuho činidla. Principem metody je redukce fenolických sloučenin obsažených ve výluzích a macerátech bylinných extraktů. Každý vzorek byl třikrát změřen a získané hodnoty obsahu polyfenolických látek byly zprůměrovány. Z rovnice lineární regrese kalibrační křivky kyseliny gallové (Obrázek 7) byl vypočítán obsah polyfenolů. Výsledky jsou vyjádřeny v g kyseliny gallové/1 l vzorku ($\text{g GA} \cdot \text{dm}^{-3}$). Z výsledných hodnot vzorků v jednotlivých odběrových časech byly poté vytvořeny extrakční křivky. Ty jsou zobrazeny na obrázcích 9 až 13. Obrázek 14 zobrazuje přehled vzorků s nejvyššími hodnotami polyfenolů vybraných z jednotlivých extrakčních křivek.

Jak již bylo zmíněno výše v praktické části této práce bylo vytvořeno celkem 21 různých extraktů. 15 extraktů stejnou metodou s různými rozpouštědly (macerace na třepačce po dobu 72 hodin) a zbylých 6 extraktů dvěma různými metodami (3 extrakty – macerování ve tmě po dobu 6 dní; 3 extrakty – výluh z vařící vody). Co se týče statických macerátů a výluhů je situace podobná, z extrakčních křivek je jasně vidět, že nejvyšší koncentrace polyfenolů u všech odběrů měly extrakty z šípků. U extraktů ze směsi a pupat byla v případě statických macerátů situace velmi podobná (oba

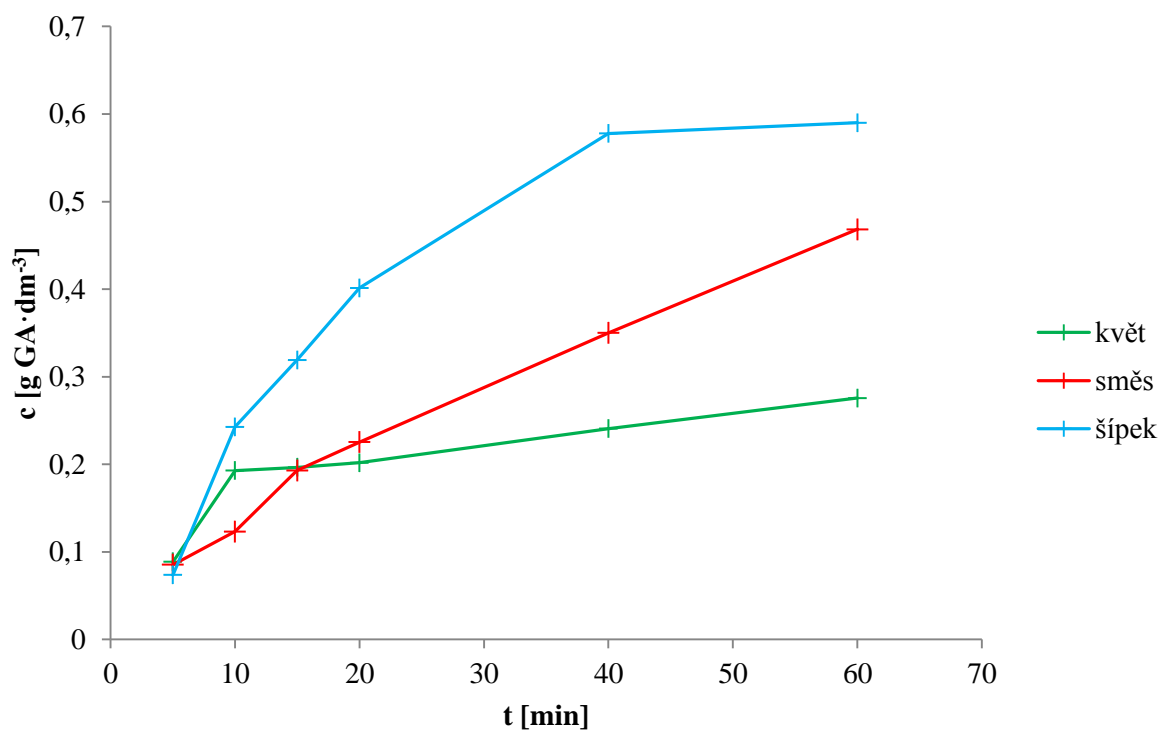
extrakty měly téměř shodné hodnoty po celou dobu odběrů). V případě výluhů dosahovaly extrakty ze směsi o něco vyšších hodnot než extrakty z poupat.

U zbylých patnácti extraktů (zrychlené maceráty) si můžeme povšimnout jednoho zajímavého jevu. U extraktů kde byla použita nižší koncentrace ethanolu nebo voda, byly naměřeny nejvyšší hodnoty polyfenolů u šípkových extraktů a nejnižší koncentrace polyfenolů u extraktů z poupat. U extraktů s vyšší koncentrací ethanolu (60 %, 80 %) je tomu přesně naopak, tedy nejnižší koncentrace polyfenolů byly naměřeny u extraktů z šípků a nejvyšší koncentrace polyfenolů u extraktů z poupat. Tento rozdíl se projevoval nejvíce u extraktů z šípků a poupat. Hodnoty extraktů ze směsí byly nejvyrovnanější. Nejvyšších hodnot polyfenolů bylo dosaženo u statických a zrychlených vodných macerátů z šípků. Dále byly následovány extrakty z poupat u kterých byla použita vyšší koncentrace ethanolu (60 %, 80 %).

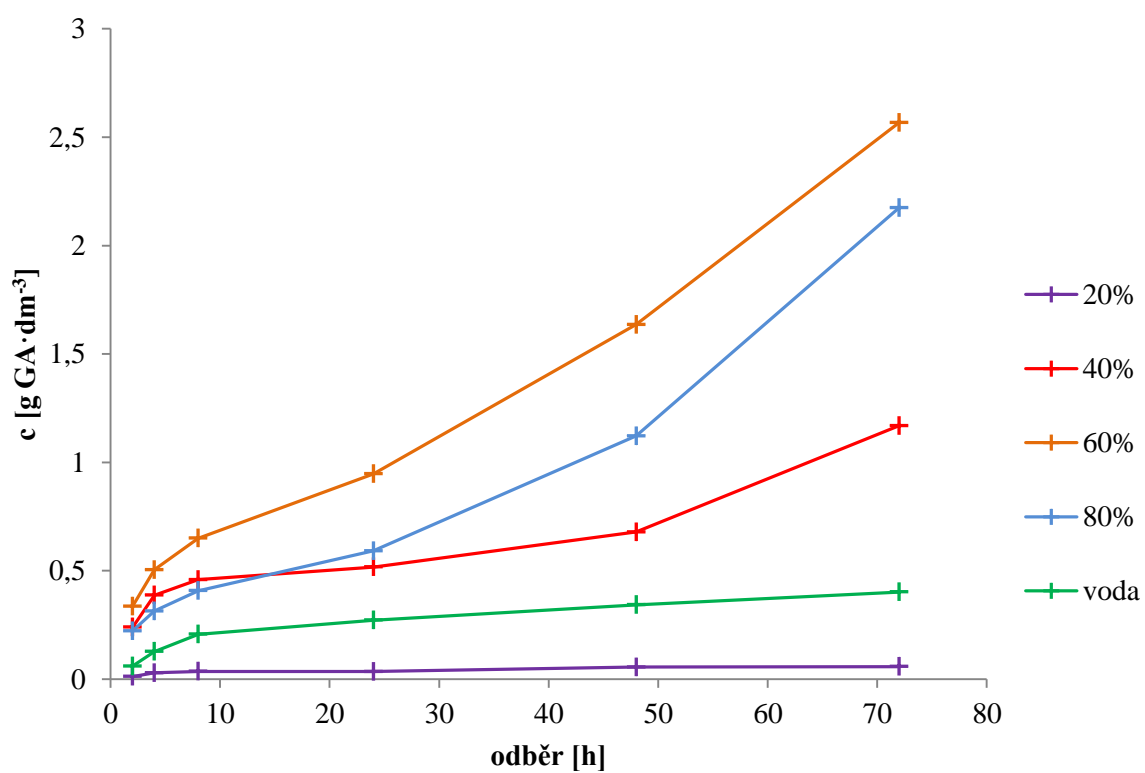
Také si můžeme povšimnout, že u extraktů ze směsí bylin měly největší koncentraci polyfenolů extrakty s 20% a 40% ethanolem. Extrakty s těmito koncentracemi ethanolu měly v ostatních případech vždy nejnižší koncentrace polyfenolů.



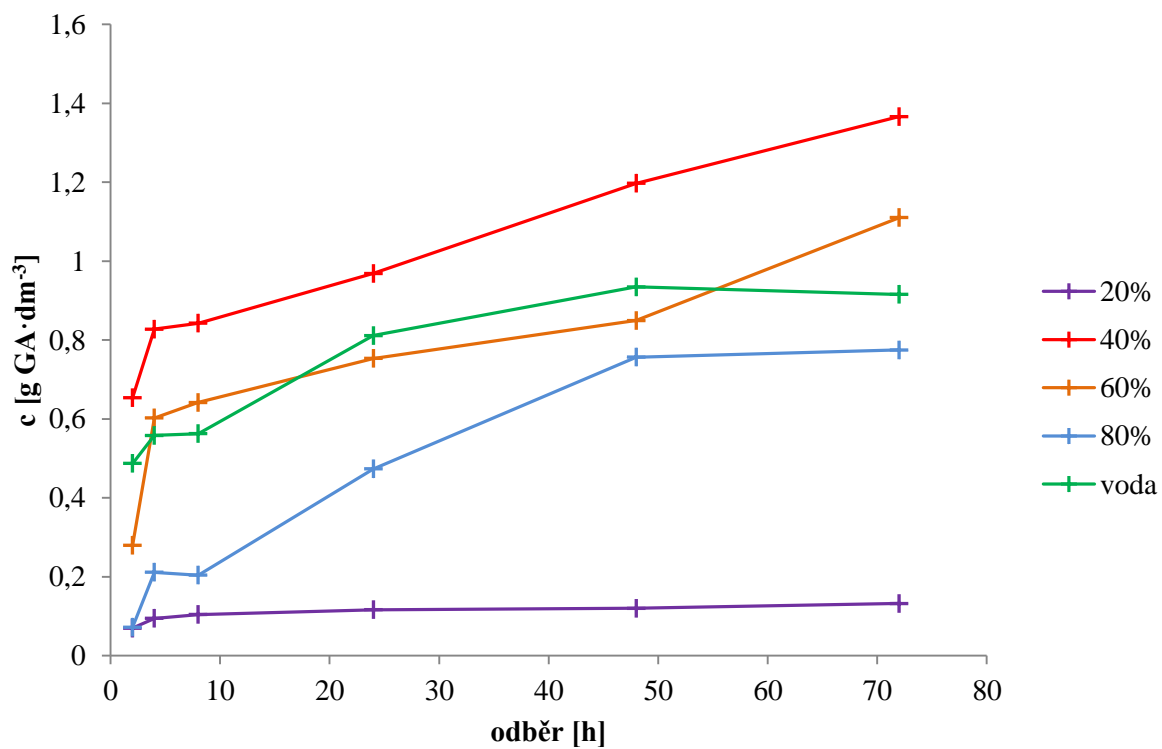
Obrázek 9: Extrakční křivky statických macerátů



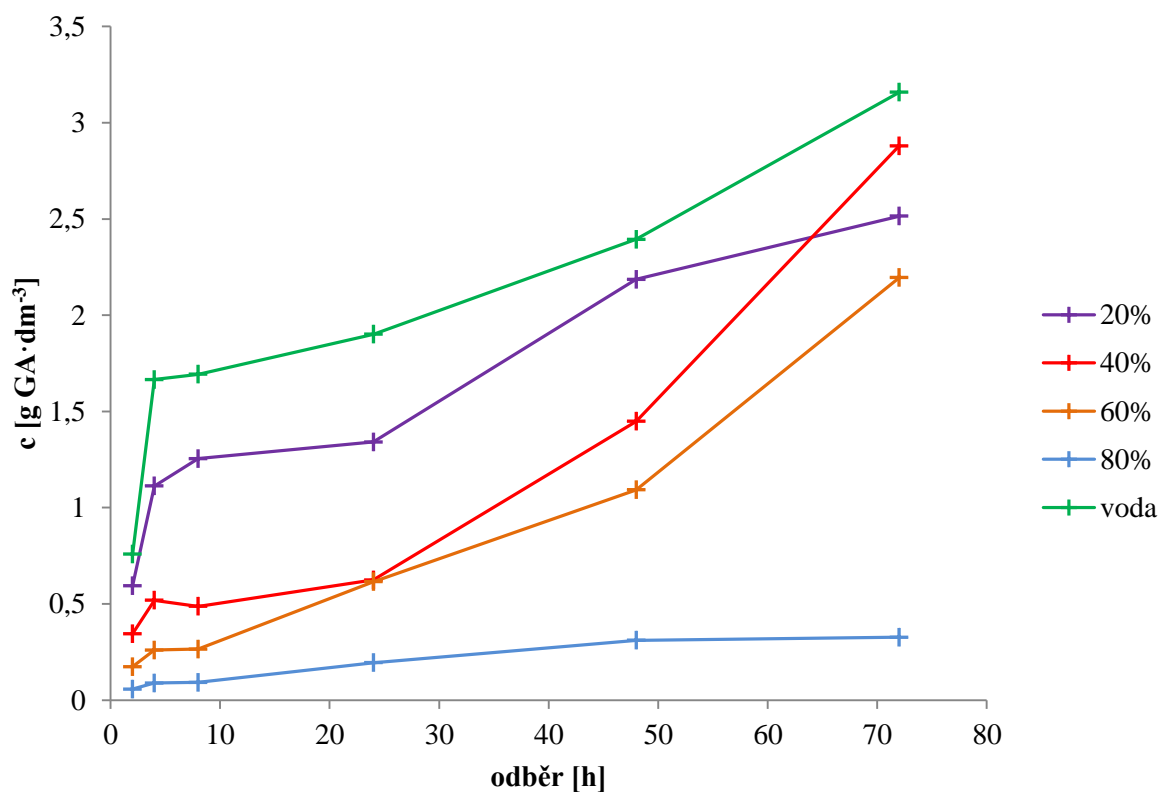
Obrázek 10: Extrakční křivky výluhů



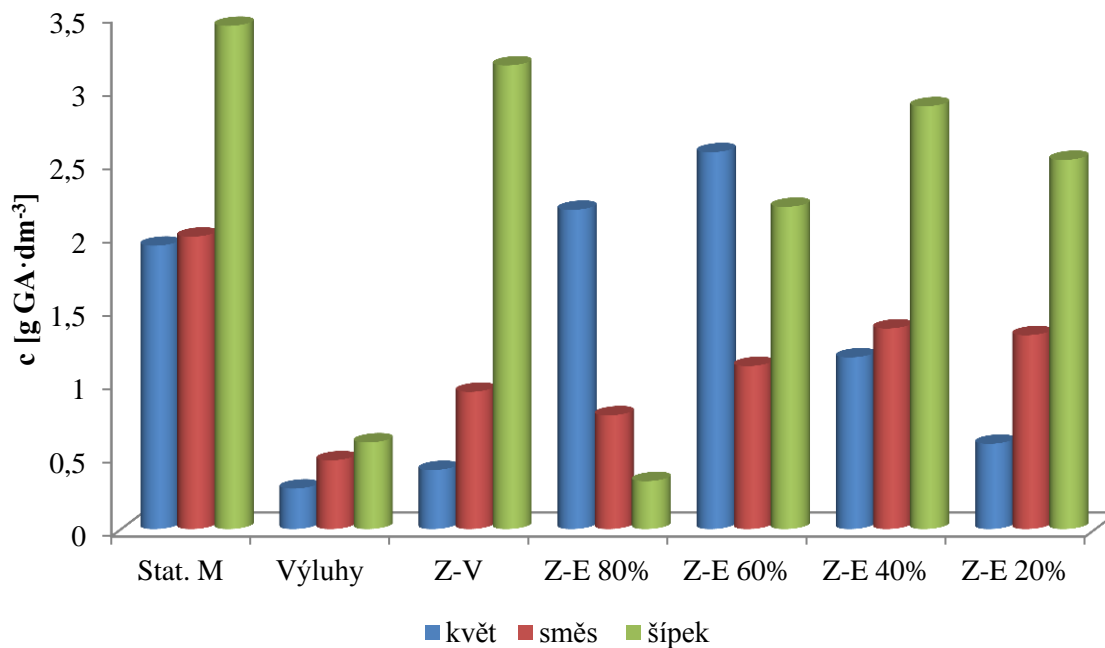
Obrázek 11: Extrakční křivky zrychlených macerátů extraktů z poupat



Obrázek 12: Extrakční křivky zrychlených macerátů extraktů ze směsi



Obrázek 13: Extrakční křivky zrychlených macerátů extraktů z šípku



Obrázek 14: Srovnání vzorků s nejvyšší hodnotou polyfenolů stanovených metodou FCM z jednotlivých extrakčních křivek (Stat. M – statické maceráty, Z-V – zrychlené vodé maceráty, Z-E – zrychlené ethanolové maceráty)

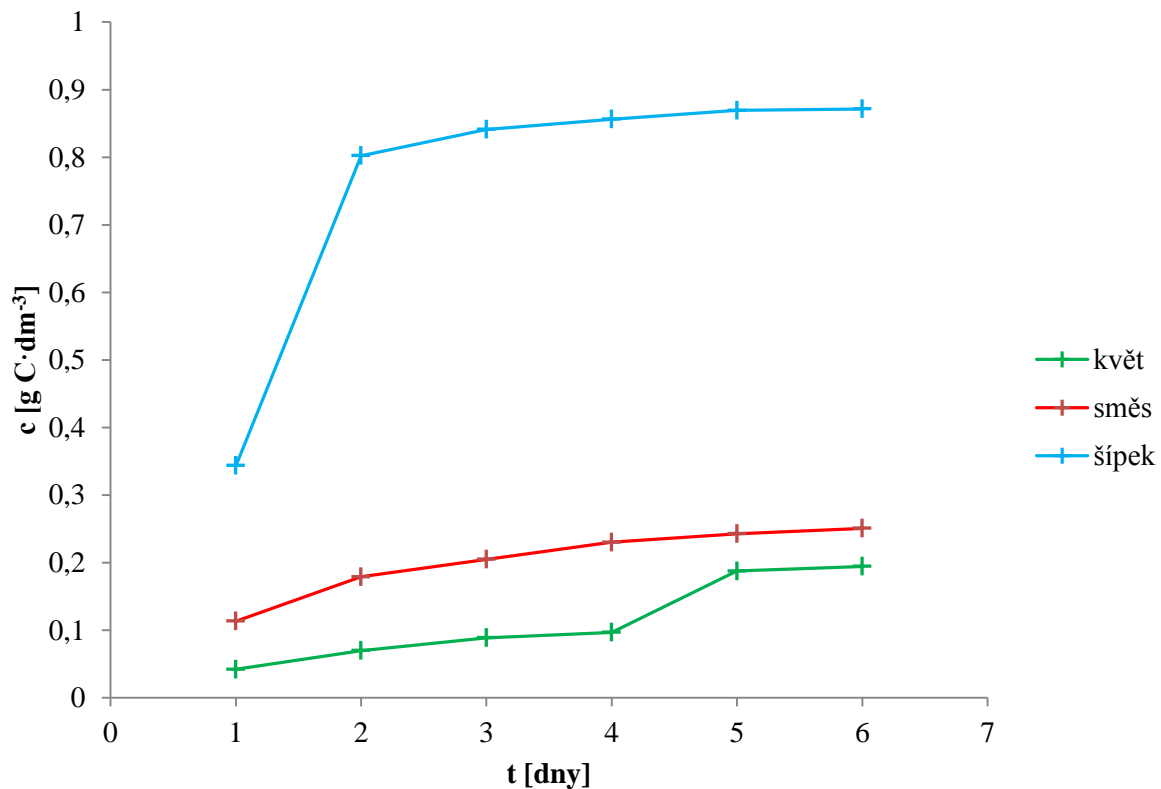
4.2 Stanovení celkového obsahu flavonoidů

Stanovení celkového množství flavonoidů v rostlinných extraktech bylo provedeno pomocí spektrofotometrické metody reakcí s hlinitou solí a dusitanem. Za přítomnosti flavonoidů ve vzorku vznikalo oranžovočervené zbarvení, u kterého byla změřena absorbance při 510 nm. U každého vzorku bylo měření třikrát zopakováno a pro výpočet obsahu flavonoidů byla použita průměrná hodnota těchto měření. Celkový obsah flavonoidů v jednotlivých vzorcích byl získán dosazením naměřené absorbance do rovnice kalibrační křivky (Obrázek 8) získané ze standardu katechinu. Výsledky jsou vyjádřeny v g katechinu/1 l vzorku ($\text{g C} \cdot \text{dm}^{-3}$). Z výsledných hodnot vzorků v jednotlivých odběrových časech byly poté vytvořeny extrakční křivky. Ty jsou zobrazeny na obrázcích 15 až 19. Obrázek 20 zobrazuje přehled vzorků s nejvyššími hodnotami flavonoidů vybraných z jednotlivých extrakčních křivek.

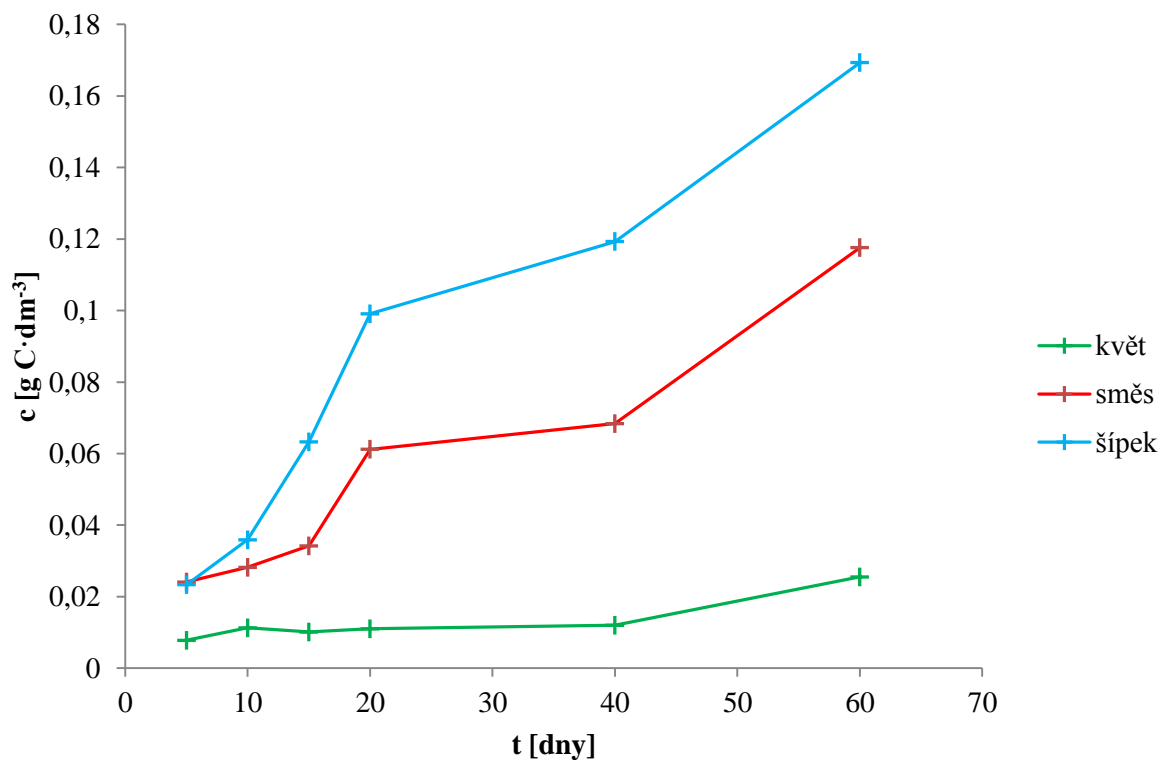
Výsledky z měření celkového obsahu flavonoidů jsou podobné těm z měření polyfenolů jen jsou s přibližně o řád nižšími hodnotami. U statických macerátů a výluhů byly nejkonzentrovanejší vzorky šípkových extraktů. Hodnoty z měření směsi si byly celkem blízké u obou typů extraktů.

U zrychlených macerátů můžeme pozorovat opět stejný jev jako u stanovení polyfenolů. U všech extraktů z pupat a šípků, byly u šípků na flavonoidy bohatší vodné extrakty, u pupat byl větší obsah flavonoidů naměřen u ethanolových extraktů. Nejvyšších hodnot flavonoidů dosáhly statické a zrychlené vodné maceráty a zrychlený macerát s 60% ethanolom.

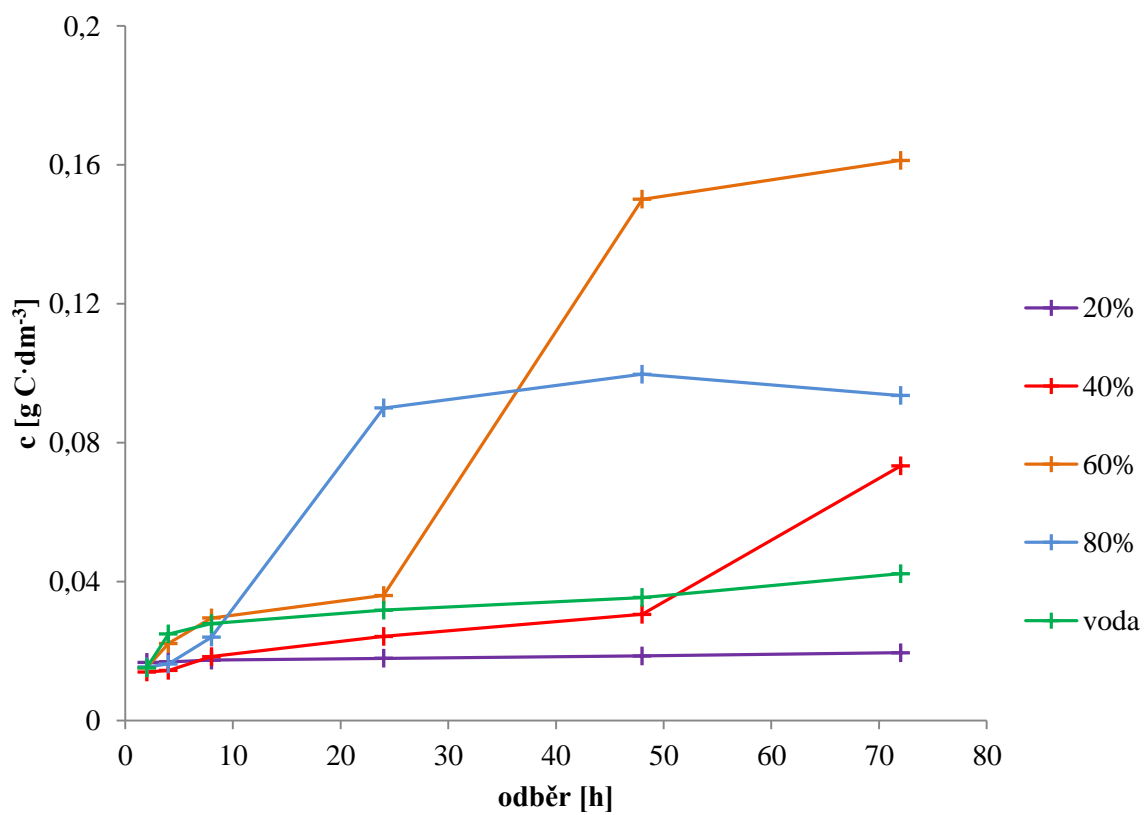
Také se zde opakuje jev extraktů z bylinné směsi, kde byl větší obsah flavonoidů naměřen u zrychlených macerátů z 20% a 40% ethanolu. I když celkově u extraktů z bylinné směsi byly hodnoty všech extraktů nejvyrovnanější.



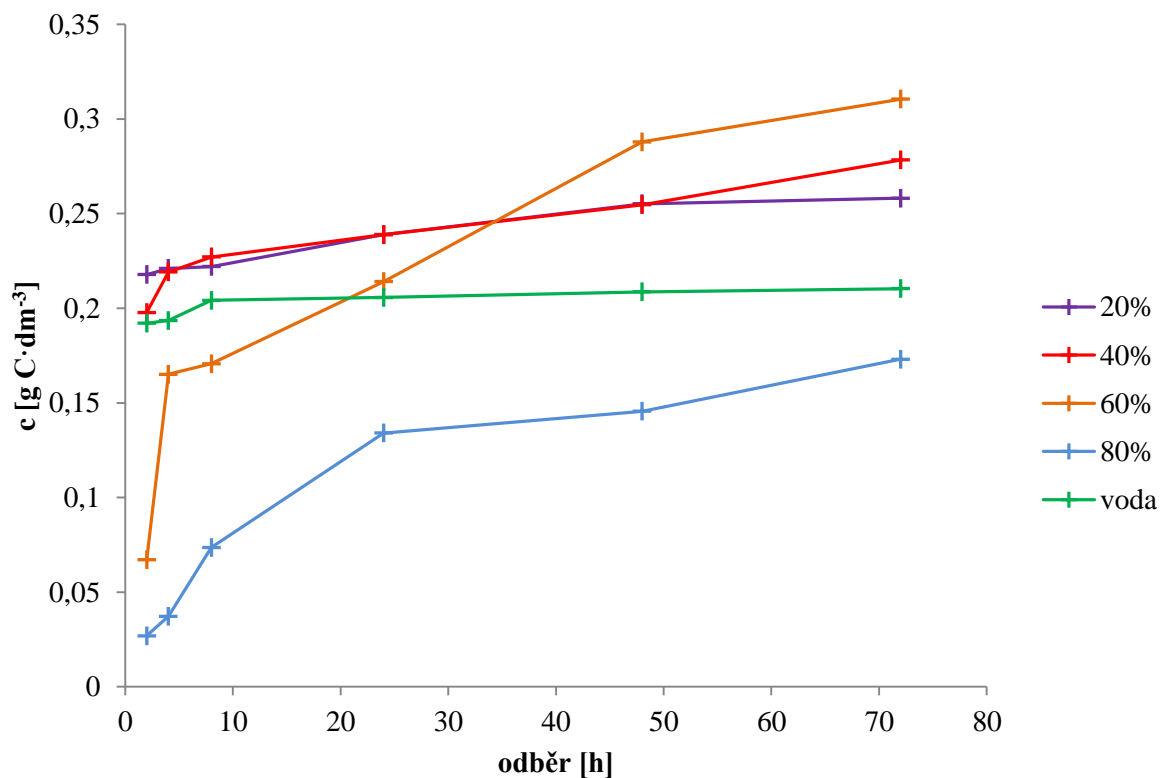
Obrázek 15: Extrakční křivky statických macerátů



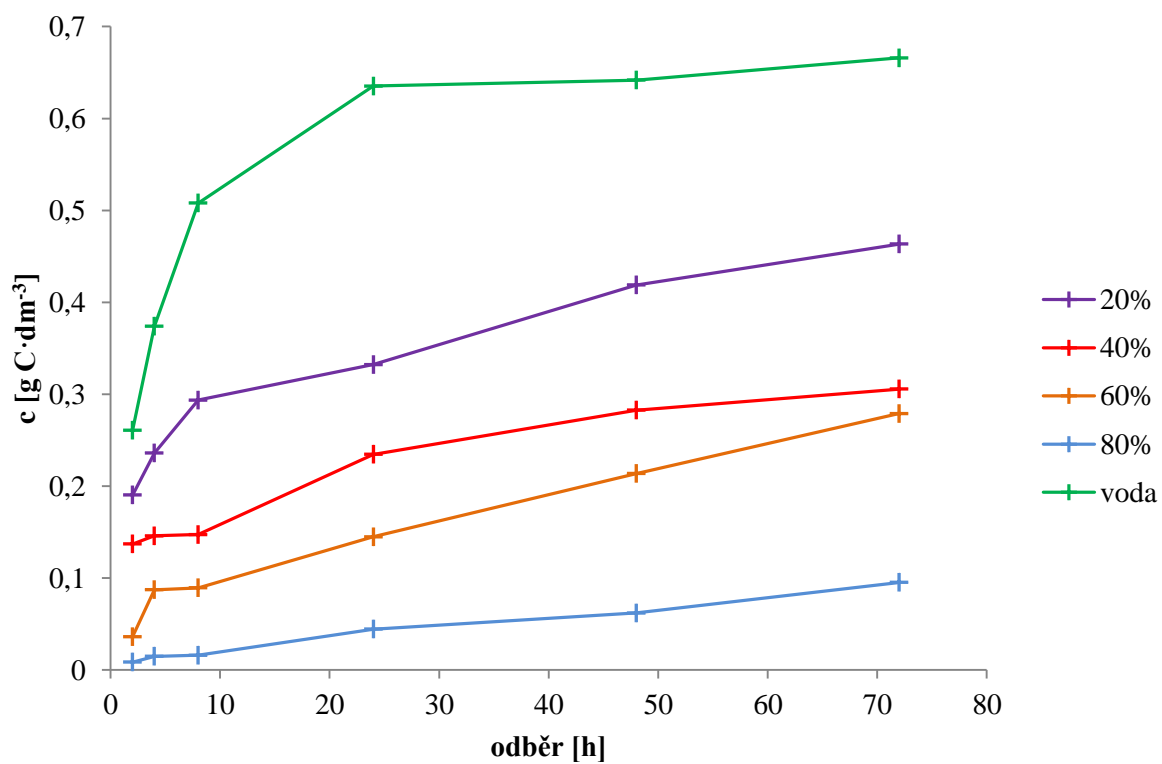
Obrázek 16: Extrakční křivky výluhů



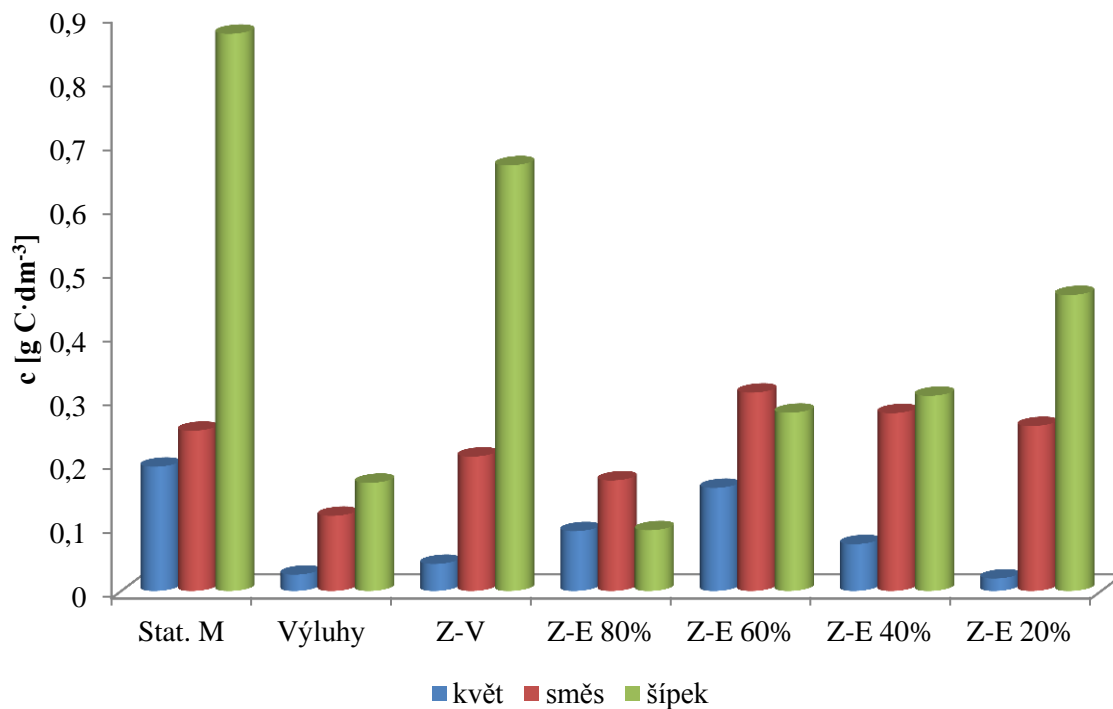
Obrázek 17: Extrakční křivky zrychlených macerátů extraktů z poupat



Obrázek 18: Extrakční křivky zrychlených macerátů extraktů ze směsi



Obrázek 19: Extrakční křivky zrychlených macerátů extraktů z šípku



Obrázek 20: Srovnání vzorků s nejvyšší hodnotou flavonoidů z jednotlivých extrakčních křivek

4.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Pro vyhodnocení celkové antioxidační aktivity vzorku byla použita metoda ABTS, jenž spočívá v měření schopnosti vzorku zhášet kation–radikál $ABTS^{++}$. Tento radikál byl připraven smícháním peroxidisíranu draselného s diamonnou solí ABTS. Zhášení radikálu bylo sledováno spektrofotometricky na základě změn absorpčního spektra $ABTS^{++}$. Výsledná absorbance A vzorku byla vypočtena pomocí vzorce:

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

kde A_0 je absorbance $ABTS^{++}$ v čase $t = 0$ a A_{10} je absorbance extraktu vzorku s $ABTS^{++}$ změřená po 10 minutách. Měření bylo pro každý vzorek třikrát zopakováno a pro výpočet byla použita průměrná hodnota. Takto získaná hodnota absorbance byla použita pro výpočet celkové antioxidační aktivity vzorků dosazením do kalibrační rovnice troloxu:

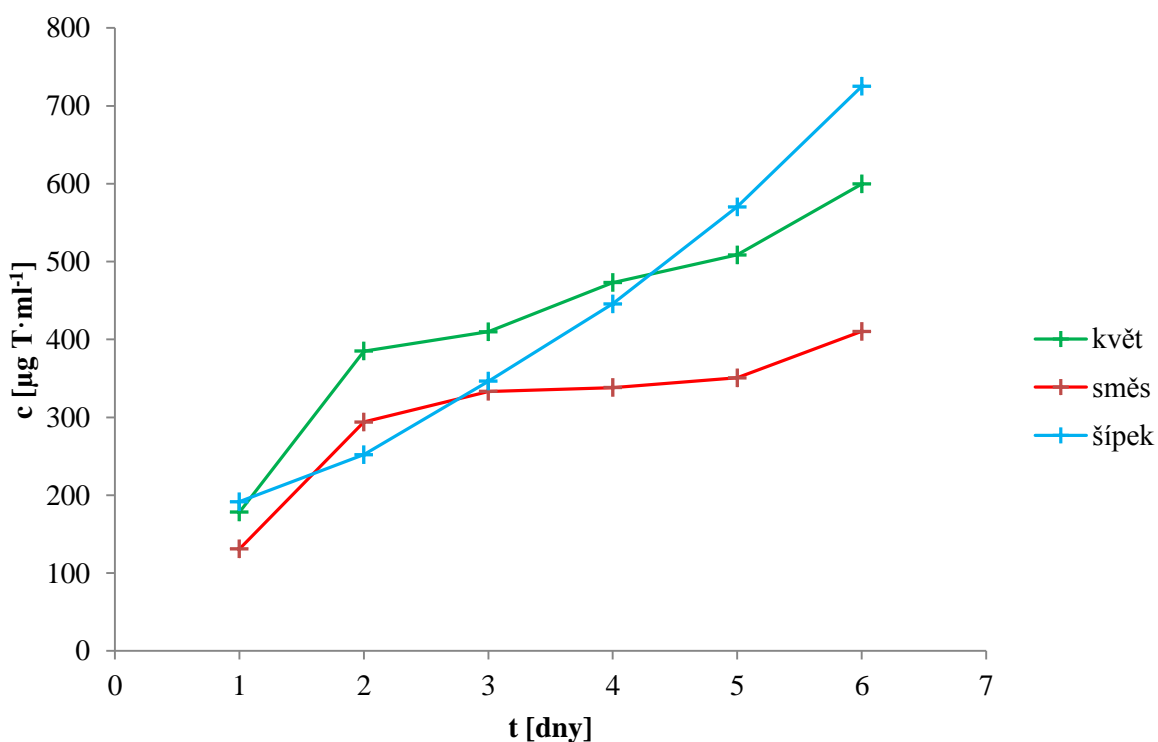
$$A = 0,00137 \cdot c.$$

Výsledky jsou vztaženy na ekvivalentní množství troloxu a jsou vyjádřeny v μg troloxu/1 ml vzorku ($\mu\text{g T} \cdot \text{ml}^{-1}$). Získané výsledky byly použity k vytvoření křivek zobrazujících změnu antioxidační aktivity extraktů v průběhu času a jsou zobrazeny na obrázcích 21 až 25. Obrázek 26 zobrazuje přehled vzorků s nejvyššími hodnotami antioxidační aktivity, vybraných z jednotlivých extrakčních křivek.

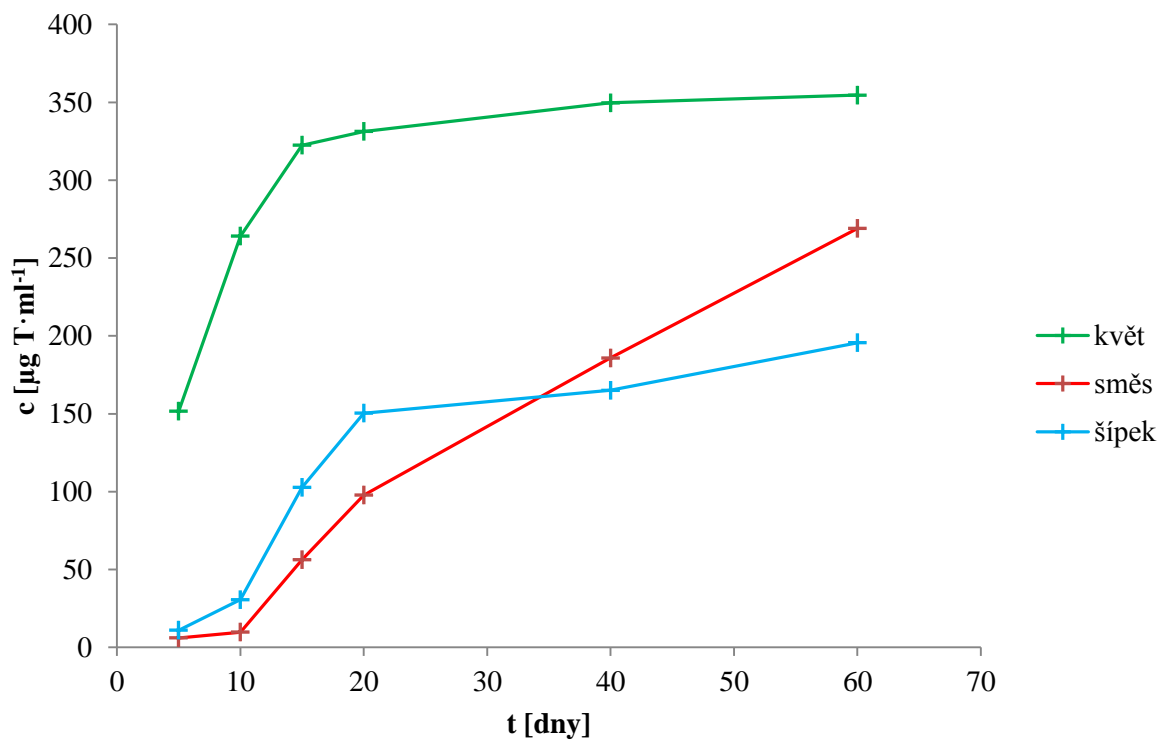
Při prohlédnutí výsledků z měření antioxidační aktivity extraktů si můžeme povšimnout, že žádný z extraktů (pokud nebudeme brát v úvahu extrakty z výluhů) nemá výrazně vyšší nebo nižší hodnoty antioxidační aktivity.

Nejvyšších hodnot antioxidační aktivity dosáhl u poutat extrakt ze zrychleného ethanolového 40% macerátu, u směsi extrakt ze zrychleného ethanolového 60% macerátu a u šípku extrakt z vodného statického macerátu.

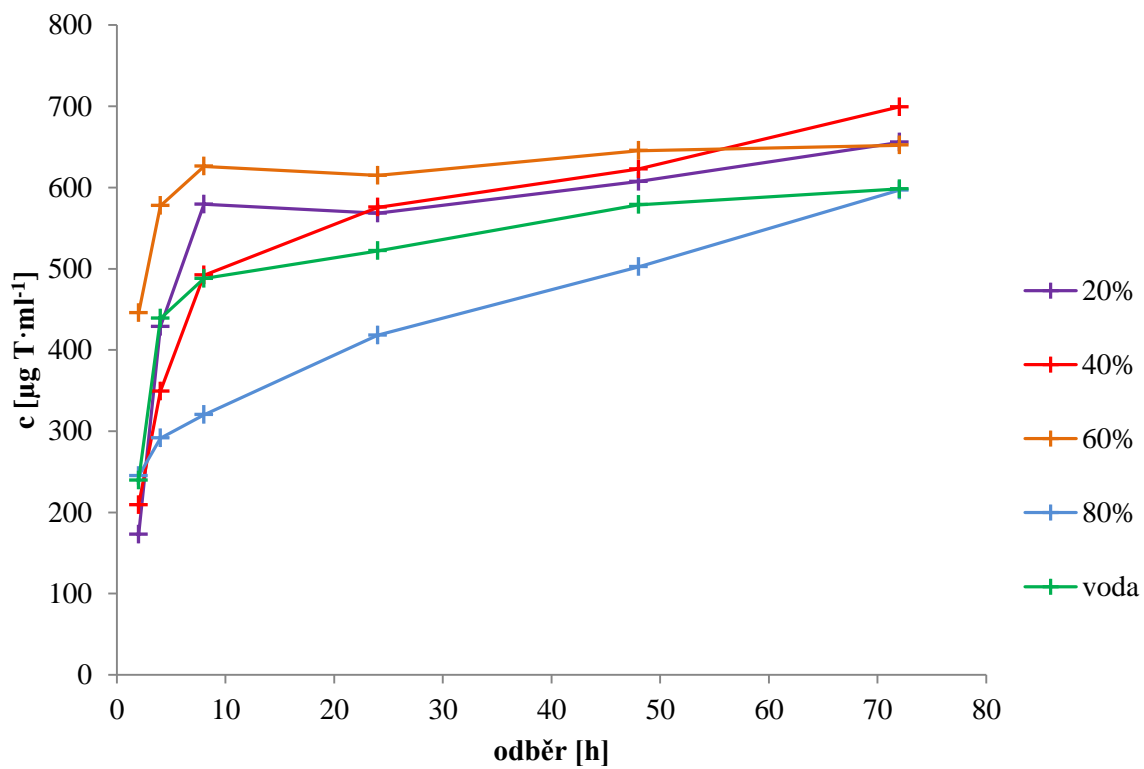
Celkově byly u extraktů z poutat a šípku naměřeny o něco vyšší hodnoty antioxidační aktivity než u extraktů ze směsi.



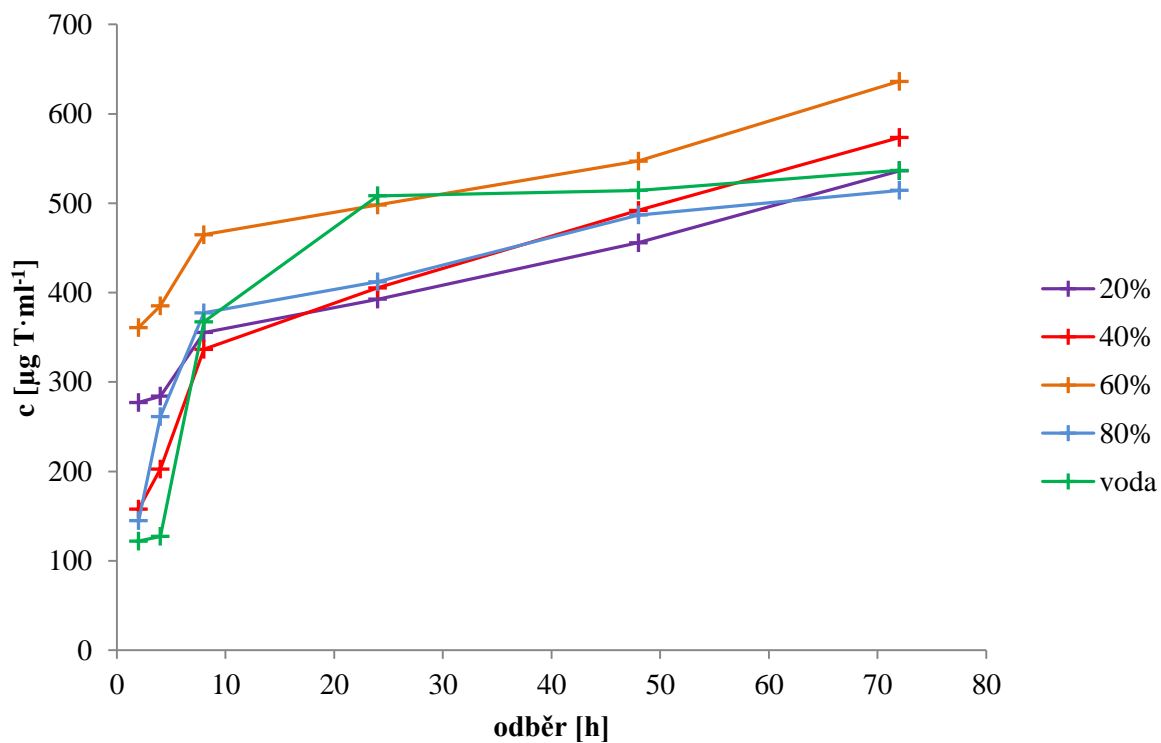
Obrázek 21: Extrakční křivky statických macerátů



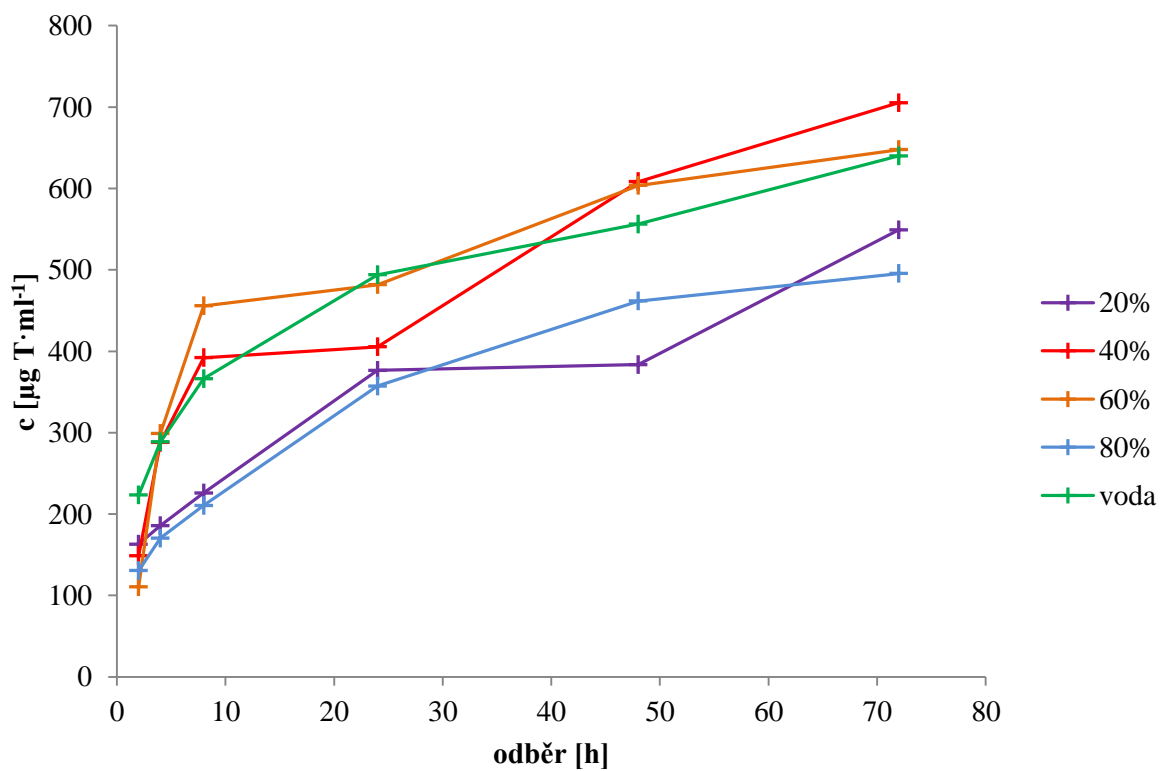
Obrázek 22: Extrakční křivky výluhů



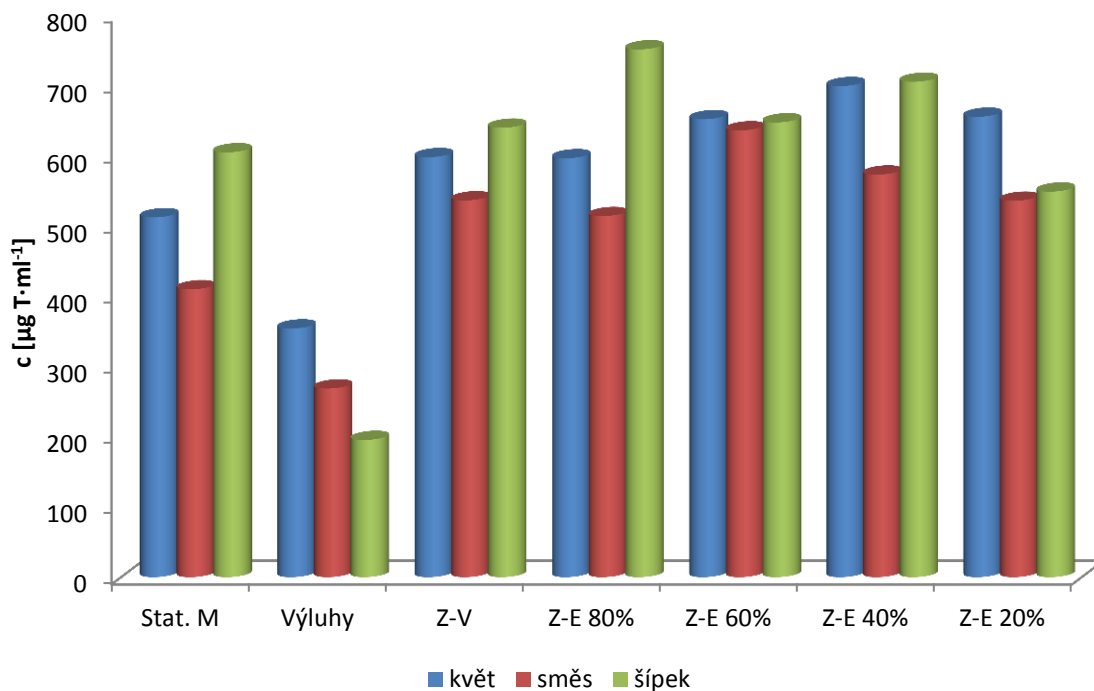
Obrázek 23: Extrakční křivky zrychlených macerátů extraktů z poupat



Obrázek 24: Extrakční křivky zrychlených macerátů extraktů ze směsi



Obrázek 25: Extrakční křivky zrychlených macerátů extraktů z šípku



Obrázek 26: Srovnání vzorků s nejvyšší hodnotou antioxidační aktivity z jednotlivých extrakčních křivek

4.4 Stanovení antimikrobiální aktivity extraktů

Za účelem ověření antimikrobiální aktivity rostlinných extraktů proti *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* a *Serratia marcescens*, byla použita jamková difuzní metoda. Předmětem sledování byl jak vliv přípravy extraktu (macerát, výluh), tak použité rozpouštědlo (dest. voda, ethanol v různých koncentracích) na výslednou antimikrobiální aktivitu.

Po zhodnocení extrakčních křivek byly k stanovení antimikrobiální aktivity vybrány vždy vzorky z posledních odběrů experimentů, jelikož u nich byly naměřeny vždy nejvyšší hodnoty. U statických macerátů to byly odběry z šestého dne, u zrychlených macerátů odběry z třetího dne a u výluhů odběry z 60 minuty extrakce.

Výsledky testování antimikrobiální aktivity se dají shrnout do několika bodů. Každý ze sedmi typů extraktů byl vždy aspoň v jednom případě účinný (Tabulka 5). Většina extraktů byla účinná pouze proti kmenu *Micrococcus luteus*, některé i proti *Bacillus cereus* (Tabulka 6). Proti kmenům *Bacillus subtilis* a *Serratia marcescens* extrakty nebyly účinné.

Pokud byl proti některému mikroorganismu účinný některý extrakt, vždy byl proti tomuto mikroorganismu účinný i stejný extrakt z poupat. Určitá antimikrobiální aktivita byla nejčastěji zaznamenána u extraktů z poupat a proti kmenu *Bacillus cereus* byly účinné pouze extrakty z poupat. Z testování antimikrobiální aktivity extraktů proti *Bacillus subtilis* vyplývá, že některé extrakty naopak podporují růst tohoto kmene (Obrázek 27)

Největší inhibiční zóny vznikly u kmene *Micrococcus luteus* po aplikaci extraktu z šípkového statického macerátu (33,3 mm). U *Bacillus cereus* vznikly největší inhibiční zóny po aplikaci extraktů z 60% ethanolového zrychleného macerátů z pupat (20,1 mm).

Tabulka 5: Přehled velikostí inhibičních zón po aplikaci všech extraktů na bakteriální kmen

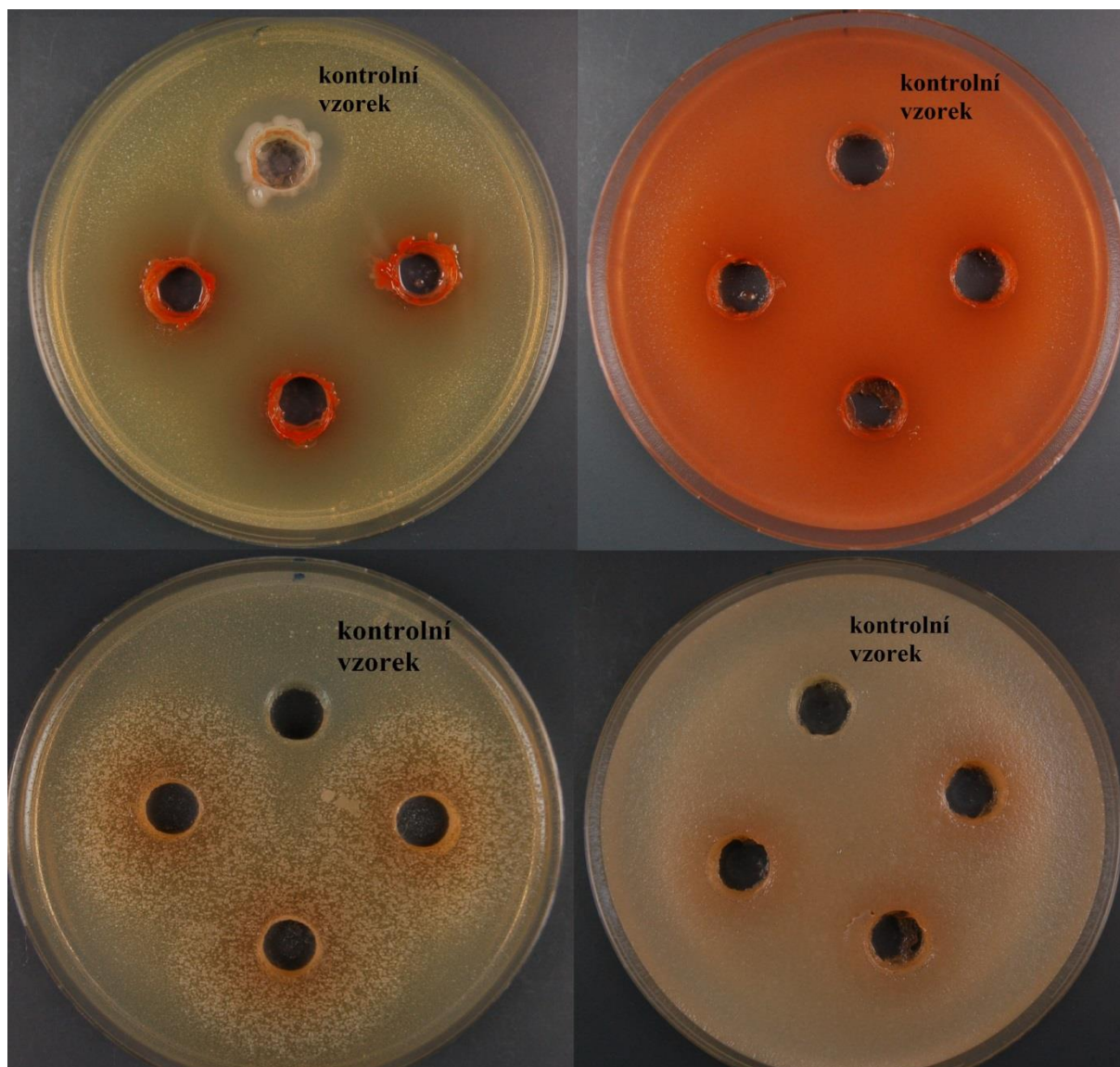
Micrococcus luteus

	Statické maceráty	výluhy	Zrychlené maceráty				
			Voda	Ethanol 20%	Ethanol 40%	Ethanol 60%	Ethanol 80%
Poupata	29,2 ± 0,3	24,5 ± 0,8	23,8 ± 0,1	25,6 ± 0,9	28,6 ± 0,3	28,5 ± 0,1	25,0 ± 0,4
Směs	25,3 ± 0,2	23 ± 0,6	23,6 ± 0,4	28,5 ± 1,6	20,1 ± 1,0	20,1 ± 0,7	-
šípek	33,3 ± 0,7	-	22,3 ± 0,3	20,7 ± 0,7	18,6 ± 0,7	17,7 ± 0,3	-

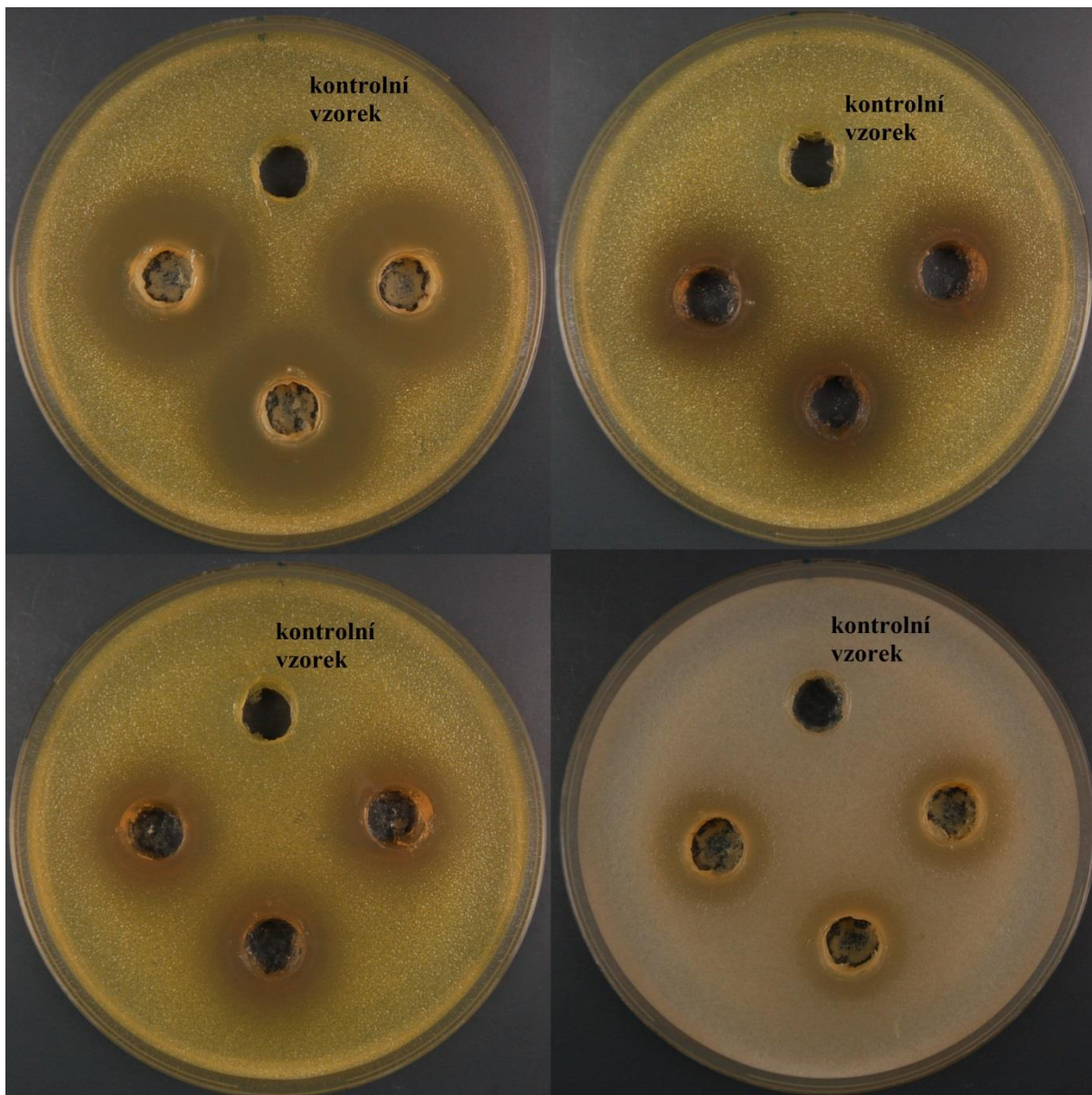
Tabulka 6: Přehled velikostí inhibičních zón po aplikaci všech extraktů na bakteriální kmen *Bacillus*

cereus

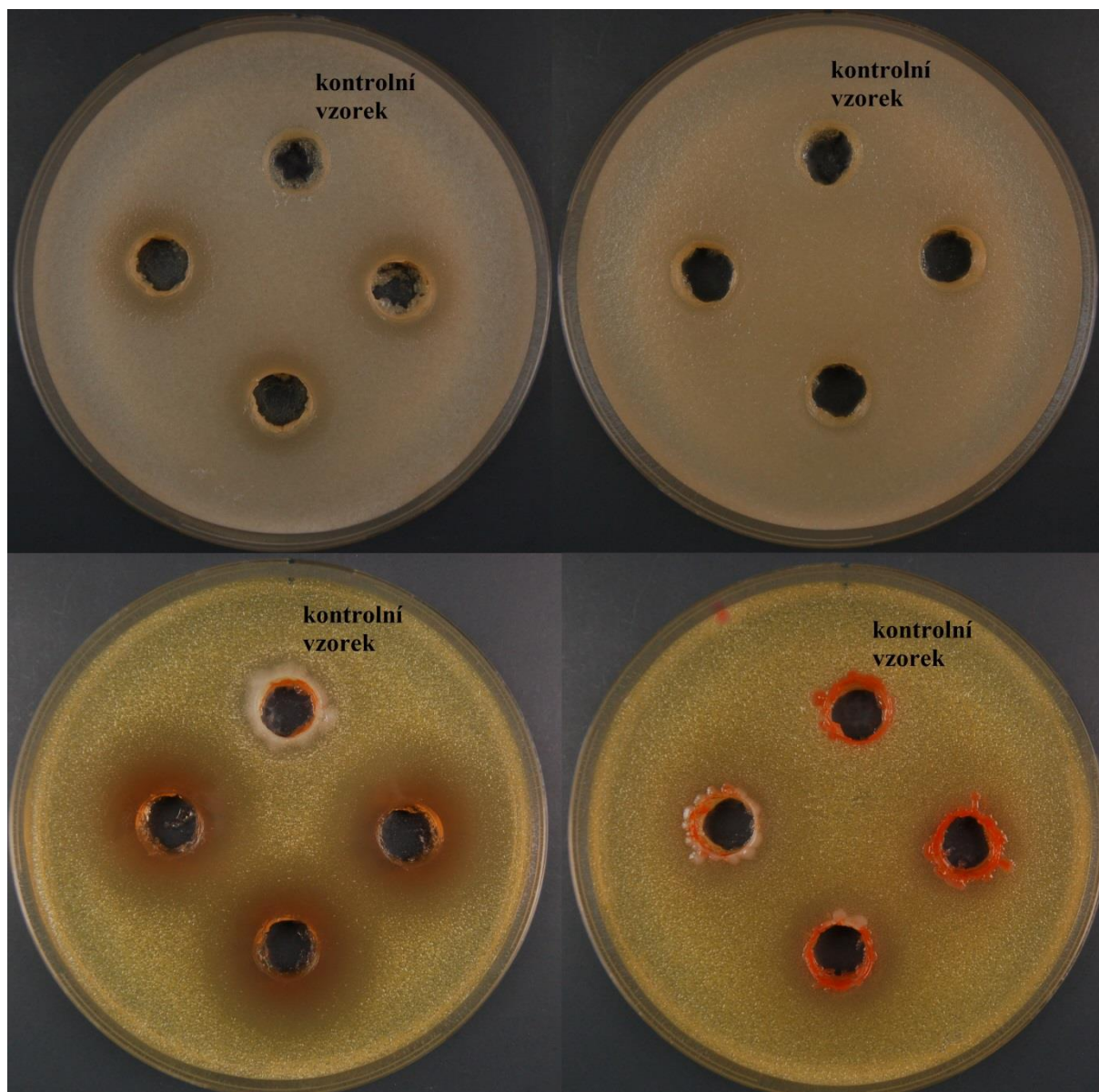
	Zrychlené maceráty			
	Ethanol 20%	Ethanol 40%	Ethanol 60%	Ethanol 80%
Poupata	16,4 ± 0,2	18,2 ± 0,2	20,1 ± 0,7	18,5 ± 0,1
Směs	-	-	-	-
šípek	-	-	-	-



Obrázek 27: ukázka porovnání antimikrobiální aktivity vybraných extraktů: všechny čtyři fotografie zobrazují aplikaci statického vodného macerátu z šípku, vlevo nahoře na agaru naočkovaném ML, vpravo nahoře na agaru naočkovaném SM, vlevo dole na agaru naočkovaném BS, vpravo dole na agaru naočkovaném BC



Obrázek 28: ukázka porovnání antimikrobiální aktivity vybraných extraktů: vlevo nahoře ethanolový macerát (40%) z poupat na agaru naočkovaném ML, vpravo nahoře ethanolový macerát (40%) ze směsi na agaru naočkovaném ML, vlevo dole ethanolový macerát (40%) z šípku na agaru naočkovaném ML, vpravo dole ethanolový macerát (40%) z poupat na agaru naočkovaném BC



Obrázek 29: ukázka porovnání antimikrobiální aktivity vybraných extraktů: vlevo nahoře ethanolový macerát (40%) z poupat na agaru naočkovaném BC, vpravo nahoře zrychlený vodný macerát z poupat na agaru naočkovaném BC, vlevo dole ethanolový macerát (20%) z šípku na agaru naočkovaném ML, vpravo dole vodný výluh z šípku na agaru naočkovaném ML

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo stanovit antimikrobiální účinky vybraných druhů bylinných přípravků s vysokým obsahem plodů a pupat růže šípkové na zástupce mikroorganismů *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus* a současně stanovit celkovou antioxidační aktivitu těchto extraktů a celkovou koncentraci biologicky aktivních látek, které se z velké části podílejí na antioxidační aktivitě těchto extraktů.

Testovány byly tři druhy bylinných přípravků, jeden obsahoval pouze sušená poupata, druhý sušené šípky a v třetím byly sušené šípky majoritní části bylinné směsi spolu s plody černého rybízu a aronie. Extrakty z těchto přípravků byly připraveny třemi způsoby jako statické maceráty, zrychlené maceráty a výluhy. Při přípravě statických macerátů a výluhů byla použita pouze voda, u zrychlených macerátů byly kromě vodných extraktů, připraveny také ethanolové extrakty a to v 20, 40, 60 a 80 procentní koncentraci.

Porovnáním naměřených hodnot a vyhodnocení výsledků vyplývá, že proti mikroorganismu *Micrococcus luteus* vykazovaly jistou antimikrobiální aktivitu téměř všechny extrakty. Proti mikroorganismu *Bacillus cereus* byly účinné pouze ethanolové extrakty z pupat a to ve všech koncentracích (20%, 40%, 60% a 80%). U mikroorganismů *Serratia marcescens* a *Bacillus subtilis* nebyla zjištěna žádná antimikrobiální aktivita. Naopak u mikroorganismu *Bacillus subtilis* byl v místě aplikace některých extraktů pozorován zvýšený nárůst kolonií. Tento zvýšený nárůst kolonií v místech aplikace extraktů se neobjevil pouze v případě ethanolových extraktů z pupat.

Z těchto informací vyplývá, že nejvyšší antimikrobiální aktivitu prokázaly ethanolové extrakty z pupat, pokud tedy hodnotíme rozsah účinku napříč spektrem mikroorganismů. Co se týče velikosti inhibičních zón byly nejúčinnější vodné extrakty statických macerátů. Nejrozměrnější zóna byla naměřena u vodného statického macerátu z šípků (33,3 mm).

Co se týče stanovení skupin antimikrobiálních látek a celkové antioxidační aktivity, rozdělil bych hodnocení na za prvé, statické maceráty a výluhy a za druhé zrychlené maceráty. U statických macerátů byly stanoveny nejvyšší hodnoty jak polyfenolů tak flavonoidů a to téměř u všech extraktů v porovnání s ostatními metodami přípravy. Stejně tak byly u výluhů zjištěny nejnižší hodnoty těchto dvou skupin látek v porovnání s ostatními extrakty. Oba jevy jsou pochopitelné a souvisejí především s rozdílnými časy extrakce.

Zajímavého jevu si, ale můžeme povšimnout při sledování výsledných hodnot stanovení celkových polyfenolů a flavonoidů u zrychlených macerátů, tedy extraktů připravovaných macerací na třepačce. U extraktů z šípků klesá obsah bioaktivních látek v těchto extraktech, od vodných ke koncentrovaným 60% ethanolovým extraktům (80% ethanolové extrakty měli o něco nižší obsah těchto látek). U extraktů z pupat je tomu přesně naopak. Nejvyšší koncentrace polyfenolů a flavonoidů byla dosažena u 60% a 80% extraktů, o něco nižší hodnoty byly naměřeny u 40% a 20% extraktů a nejnižší

obsah těchto látek byl zjištěn u vodných extraktů. Tato zjištění nasvědčují tomu, že v poupatech bude větší obsah bioaktivních látek rozpustných v ethanolu, zatímco v šípcech bude větší obsah bioaktivních látek rozpustných ve vodě.

6 ZDROJE

- [1] OUERGHEMMI, Saloua, Houcine SEBEL, Laura SIRACUSA, Giuseppe RUBERTO, Antonina SAIJA, Francesco CIMINO a Mariateresa CRISTANI. Comparative study of phenolic composition and antioxidant activity of leaf extracts from three wild Rosa species grown in different Tunisia regions: Rosa canina L., Rosa moschata Herrm. and Rosa sempervirens L. *Industrial Crops and Products* [online]. 2016, **94**, 167-177 [cit. 2017-05-08]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.08.019. ISSN 09266690. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669016305337>
- [2] IERI, Francesca, Marzia INNOCENTI, Lucia POSSIERI, Sandra GALLORI a Nadia MULINACCI. Phenolic composition of “bud extracts” of Ribes nigrum L., Rosa canina L. and Tilia tomentosa M. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2015, **115**, 1-9 [cit. 2017-05-08]. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.06.004. ISSN 07317085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708515300212>
- [3] PATEL, Seema. Rose hip as an underutilized functional food: Evidence-based review. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2017, **63**, 29-38 [cit. 2017-05-08]. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.03.001. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224416304277>
- [4] NADPAL, Jelena D., Marija M. LESJAK, Filip S. ŠIBUL, Goran T. ANAČKOV, Dragana D. ČETOJEVIĆ-SIMIN, Neda M. MIMICA-DUKIĆ a Ivana N. BEARA. Comparative study of biological activities and phytochemical composition of two rose hips and their preserves: Rosa canina L. and Rosa arvensis Huds. *Food Chemistry* [online]. 2016, **192**, 907-914 [cit. 2017-05-08]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.07.089. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461501122X>
- [5] CHENG, Brian Chi Yan, Xiu-Qiong FU, Hui GUO, Ting LI, Zheng-Zhi WU, Kelvin CHAN a Zhi-Ling YU. The genus Rosa and arthritis: Overview on pharmacological perspectives. *Pharmacological Research* [online]. 2016, **114**, 219-234 [cit. 2017-05-08]. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.10.029. ISSN 10436618. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661816306065>
- [6] ALBERTS, Andreas, Peter MULLEN a Margot SPOHN. *Léčivé stromy a keře: jednotlivé druhy a jejich léčebné účinky*. Praha: Beta-Dobrovský, 2006. Kapesní průvodce přírodou. ISBN 80-729-1144-9.
- [7] DREYER, Eva-Maria. *Bylinky do kuchyně a jejich jedovatí dvojníci*. Líbeznice: Víkend, 2008. Průvodce přírodou (Víkend). ISBN 978-8086891-77-4.
- [8] JANČA, Jiří a Josef Antonín ZENTRICH. *Herbář léčivých rostlin*. Ilustroval Magdalena MARTÍNKOVÁ. Praha: Eminent, 1996. ISBN 80-85876-20-5.
- [9] *Léčivky na zahrádce*. Praha: Sun, 2007. Vaše zahrada (Sun). ISBN 978-80-7371-217-4.

- [10] ROMAN, Ioana, Andreea STĂNILĂ a Sorin STĂNILĂ. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Rosa canina* L. biotypes from spontaneous flora of Transylvania. *Chemistry Central Journal* [online]. 2013, **7**(1), 73- [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1186/1752-153X-7-73. ISSN 1752153x. Dostupné z: <http://ccj.springeropen.com/articles/10.1186/1752-153X-7-73>
- [11] ERCISLI, S. Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species. *Food Chemistry* [online]. 2007, **104**(4), 1379-1384 [cit. 2017-05-08]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.01.053. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607001550>
- [12] DEMIR, N., O. YILDIZ, M. ALPASLAN a A.A. HAYALOGLU. Evaluation of volatiles, phenolic compounds and antioxidant activities of rose hip (*Rosa* L.) fruits in Turkey. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2014, **57**(1), 126-133 [cit. 2017-05-08]. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.12.038. ISSN 00236438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643813005094>
- [13] FENNEMA, Owen R. *Food chemistry*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, c1996. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), v. 76. ISBN 0-8247-9691-8.
- [14] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 8090239145.
- [15] PÁNEK, Jan, Jan POKORNÝ a Jana DOSTÁLOVÁ. *Základy výživy a výživová politika*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 8070804688.
- [16] UNLU, Mehmet, Emel ERGENE, Gulhan Vardar UNLU, Hulya Sivas ZEYTINOGLU a Nilufer VURAL. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2010, **48**(11), 3274-3280 [cit. 2017-05-08]. DOI: 10.1016/j.fct.2010.09.001. ISSN 02786915. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691510005648>
- [17] RACLAVSKÁ, H., J. KUCHAROVÁ a D. PLACHÁ. Přehled metod a identifikace látek sledovaných podle Protokolu o registrech úniků a přenosů znečišťujících látek v únicích do půd. [online]. 2008 [cit. 2017-03-19]. Dostupné z: http://www.irz.cz/dokumenty/irz/metody_mereni/puda/Fenoly.pdf.
- [18] WOJDYLO, Aneta, Jan OSZMIANSKI a Renata CZEMERYS. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*. 2007, č. 105, s. 940-949.
- [19] BALASUNDRAM, SUNDRAM a Samir SAMMAN. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 2006, č. 99, s. 191-203
- [20] TAJKARIMI, M.M., S. A. IBRAHIM, D. A. CLIVER. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*. 2010, č. 21, s. 1199-1218.

- [21] Harborne, J.B.: *Encyclopedia of Plant Physiology, Secondary Plant Products*, Berlin: Springer-Verlag, 1980
- [22] Thavarajah, P., Low, N. H.: Adulteration of apple with pear juice: emphasis on major carbohydrates, proline and arbutin. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 2006, 4861-4867.
- [23] Krebs, H. A., Wiggins, D., Stubbs, M.: Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochemical Journal*, 214, 1983, 657-663.
- [24] Manach, C., Scalbert, A., Morand, Ch., Rémésy, Ch., Jiménez, L.: Polyphenols: food source and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 2004, 727-747
- [25] Mandelová, L.: *Antimutagenní aktivita obsahových látek v zelenině a ovoci*. Brno, 2006. Disertační práce na Lékařské fakultě Masarykovy univerzity. Školitel disertační práce Jiří Totušek.
- [26] Pietta, P., Gardana, C., Pietta, A.: Flavonoids in Herbs. In *Flavonoids in health and diseases*. 2. vyd. New York: Marcel Dekker, Inc., 2003. Kapitola 2, 43-70, ISBN: 0-8247-4234-6.
- [27] SHAHIDI, Fereidoon a Marian. NACZK. *Phenolics in food and nutraceuticals*. Boca Raton: CRC Press, 2003. ISBN 1-58716-138-9.
- [28] Slanina, J., Táborská, E.: Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka, *Chemické listy*, 98, 2004, 239-245
- [29] ANDERSEN, Øyvind M. a Kenneth R. MARKHAM. *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Boca Raton, FL: CRC, Taylor & Francis, 2006. ISBN 0-8493-2021-6.
- [30] Schwartz, S. J., vonElbe, J. H., Giusti, M. M.: Colorants. In Fennema's Food Chemistry. 4. vyd Boca Raton: CRC Přes, 2008. Kapitola 10, ISBN: 0-8493-9272-1.
- [31] Duthie, G. G., Gardner, P. T., Kyle, J. A. M.: Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Nutrition Society*, 62, 2003, 599-603.
- [32] Vodrážka, Z.: *Sekundární metabolity rostlin*, v knize *Biochemie (kniha třetí)*, Academia, Praha, str. 67-79 (1999).
- [33] Kumari, M., Jain, S.: *Res. J. C.hem. Sci.*, 1: 70-73, (2012).
- [34] Themodernnembalmer.com [online]. [cit. 2017-25-3]. URL: <http://www.themodernnembalmer.com/tannin.html>
- [35] MATKOWSKI, Adam. Plant in vitro culture for the production of antioxidants — A review. *Biotechnology Advances* [online]. 2008, 26(6), 548-560 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.07.001. ISSN 07349750. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975008000803>
- [36] KÄHKÖNEN, Marja P., Anu I. HOPIA, Heikki J. VUORELA, Jussi-Pekka RAUHA, Kalevi PIHLAJA, Tytti S. KUJALA a Marina HEINONEN. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1999, 47(10), 3954-3962 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1021/jf990146l. ISSN 00218561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf990146l>

- [37] TAN, Joash Ban Lee a Yau Yan LIM. Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. *Food Chemistry* [online]. 2015, **172**, 814-822 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.09.141. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614015271>
- [38] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHAŘOVÁ a Eva Táborská. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chem. Listy*. 2004, roč. 98, s. 174-179 Dostupné z: http://w.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf
- [39] OH, Jungmin, Heonjoo JO, Ah Reum CHO, Sung-Jin KIM a Jaejoon HAN. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food Control* [online]. 2013, **31**(2), 403-409 [cit. 2017-05-08]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.10.021. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713512005798>
- [40] ALMAJANO, M. Pilar, Rosa CARBÓ, J. Angel López JIMÉNEZ a Michael H. GORDON. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry* [online]. 2008, **108**(1), 55-63 [cit. 2017-05-08]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.10.040. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607010631>
- [41] KRISHNAIAH, Duduku, Rosalam SARBATLY a Rajesh NITHYANANDAM. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 2011, **89**(3), 217-233 [cit. 2017-05-08]. DOI: 10.1016/j.fbp.2010.04.008. ISSN 09603085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960308510000520>
- [42] ALAM, Md. Nur, Nusrat Jahan BRISTI a Md. RAFIQUZZAMAN. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* [online]. 2013, **21**(2), 143-152 [cit. 2017-05-08]. DOI: 10.1016/j.jsps.2012.05.002. ISSN 13190164. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319016412000357>
- [43] NACZK, Marian a Fereidoon SHAHIDI. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2006, **41**(5), 1523-1542 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.04.002. ISSN 07317085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708506003062>
- [44] DE RIJKE, Eva, Pieter OUT, Wilfried M.A. NIESSEN, Freek ARIESE, Cees GOOIJER a Udo A.Th. BRINKMAN. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, **1112**(1-2), 31-63 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.01.019. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967306001269>
- [45] LAPORNIK, Brigita, Mirko PROŠEK a Alenka GOLC WONDRA. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* [online]. 2005, **71**(2), 214-222 [cit. 2017-05-09]. DOI:

- 10.1016/j.jfoodeng.2004.10.036. ISSN 02608774. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877404005345>
- [46] NACZK, Marian a Fereidoon SHAHIDI. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, **1054**(1-2), 95-111 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.08.059. ISSN 00219673. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967304014098>
- [47] APPEL, Heidi M., Heather L. GOVENOR, Mark D'ASCENZO, Erin SISKKA a Jack C. SCHULTZ. *Journal of Chemical Ecology* [online]. **27**(4), 761-778 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1023/A:1010306103643. ISSN 00980331. Dostupné z:
<http://link.springer.com/10.1023/A:1010306103643>
- [48] C. FERREIRA, Edilene, Ana RITA A. NOGUEIRA, Gilberto B. SOUZA a Luiz A. R. BATISTA. Effect of drying method and length of storage on tannin and total phenol concentrations in Pigeon pea seeds. *Food Chemistry* [online]. 2004, **86**(1), 17-23 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.08.024. ISSN 03088146. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814603004187>
- [49] GRUBEŠIĆ, Renata, Dario KREMER, Marijana KONČIĆ, Jadranka RODRÍGUEZ a Marko RANDIĆ. Quantitative analysis of polyphenols and antioxidant activity in four *Daphne* L. species. *Open Life Sciences* [online]. 2012-01-1, **7**(6), - [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.2478/s11535-012-0102-8. ISSN 2391-5412. Dostupné z:
<http://www.degruyter.com/view/j/biol.2012.7.issue-6/s11535-012-0102-8/s11535-012-0102-8.xml>
- [50] HOLASOVÁ, Marie a Vlasta FIEDLEROVÁ. Porovnání metod stanovení antioxidační aktivity v ovocných a zeleninových šťávách. *Chem. listy: Laboratorní přístroje a postupy*. 2011, roč. 105, s. 766-772. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_10_766-772.pdf
- [51] HOŘAVOVÁ, Lenka. *Sledování antioxidačních ukazatelů u dětí se zhoubnými nádory* [online]. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2011 [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/2025>.
Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií. Ústav biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce Ivo Provazník.
- [52] DANGLES, Olivier, Guillaume FARGEIX a Claire DUFOUR. One-electron oxidation of quercetin and quercetin derivatives in protic and non protic media. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* [online]. (7), 1387-1396 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1039/a901460h. ISSN 03009580. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=a901460h>
- [53] URBÁŠKOVÁ, P.: *Rezistence bakterií k antibiotikům, Vybrané metody*, Praha, Trios, s.r.o., 1998.

- [54] URBÁŠKOVÁ, P., SCHINDLER, J., TICHÁČEK, B., POTUŽNÍK, V.: Vyšetření pro antimikrobiální terapii, *Avicenum*, 1985, s. 19–31.
- [55] KALEMBA, D., KUNICKA, A.: Antibacterial and antifungal properties of essential oils, *Current Medicinal Chemistry*, 2003, vol. 10, no. 10, s. 813–829.
- [56] DIDRY, Nicole, Luc DUBREUIL, Francis TROTIN a Madeleine PINKAS. Antimicrobial activity of aerial parts of *Drosera peltata* Smith on oral bacteria. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 1998, **60**(1), 91-96 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1016/S0378-8741(97)00129-3. ISSN 03788741. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874197001293>
- [57] HERNÁNDEZ, T., M. CANALES, J.G. AVILA, A.M. GARCÍA, A. MARTÍNEZ, J. CABALLERO, A. Romo de VIVAR a R. LIRA. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2005, **96**(3), 551-554 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1016/j.jep.2004.09.044. ISSN 03788741. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874104004982>
- [58] ALI, Shaik, AleemA KHAN, Irshad AHMED, et al. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* [online]. **4**(1), 20- [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1186/1476-0711-4-20. ISSN 14760711. Dostupné z: <http://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-0711-4-20>
- [59] STERMITZ, F. R., P. LORENZ, J. N. TAWARA, L. A. ZENEWICZ a K. LEWIS. Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2000, **97**(4), 1433-1437 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1073/pnas.030540597. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.030540597>
- [60] KELEN, Mustafa a Bektas TEPE. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology* [online]. 2008, **99**(10), 4096-4104 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.09.002. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852407007407>
- [61] Příručka pro uživatele LUCIA NET. Praha: Laboratory Imaging, spol. s. r. o., 2004.
- [62] PIGGOT, P. J. *Bacillus subtilis*. *Encyclopedia of microbiology*. 2009, 45-56.
- [63] GRIFFITHS, M.W. a H. SCHRAFT. *Bacillus cereus* Food Poisoning. *Foodborne Diseases* [online]. Elsevier, 2017, s. 395 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1016/B978-0-12-385007-2.00020-6. ISBN 9780123850072. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123850072000206>
- [64] HEJAZI, A. a F. R. FALKINER. *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 1997, **46**(11), 903-912 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1099/00222615-

46-11-903. ISSN 0022-2615. Dostupné z:

<http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-46-11-903>

- [65] FRIEDMAN, Mendel, Robert BUIICK a Christopher T. ELLIOTT. Antimicrobial activities of plant compounds against antibiotic-resistant *Micrococcus luteus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 2006, **28**(2), 156-158 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2006.05.023. ISSN 09248579. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092485790600197X>
- [66] <http://www.gresik.cz/caje/caje-4-svetadilu/caje-necaje/586-sipek-oplodi/>
- [67] <http://www.gresik.cz/caje/ovocne-caje/ovocne-caje-porcovane/19-aronie-sipek-cerny-rybiz-porcovany/>
- [68] http://www.sonnentor.cz/sonnentor_cz/e_shop/caje/jednodruhove/node_27949

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

BHT – butylhydroxytoluen

BHA – butylhydroxyanisol

ROS – reaktivní formy kyslíku

SOD – superoxid dismutáza

GPx – glutathion peroxidáza

GAE – gallic acid equivalent method

TAA – total antioxidant activity

ABTS – 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonová kyselina)

TEAC – trolox equivalent antioxidant capacity

DPPH – 1,1 difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl

HAT – hydrogen atom transfer

SET – single electron transfer

AML – antimikrobiální látka

MIC – minimální inhibiční koncentrace

GA – kyselina gallová

C – katechin

T – trolox

Stat. M – statické maceráty

Z-V – zrychlené vodné maceráty

Z-E – zrychlené ethanolové maceráty

BS – *Bacillus subtilis*

BC – *Bacillus cereus*

SM – *Serratia marcescens*

ML – *Micrococcus luteus*